

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



# UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

## DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL

### TESIS DOCTORAL

#### “MICROPROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE VARIEDADES ESPAÑOLAS DE OLIVO”

Doctorando:

Borja Cabello Moreno

Directores de Tesis:

Dra. Isabel M<sup>a</sup> González Padilla

Dra. Araceli Barceló Muñoz

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



Enero 2016


UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Borja Cabello Moreno

 <http://orcid.org/0000-0001-7538-756X>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

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](http://riuma.uma.es)







Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera  
**CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL**

**Isabel M<sup>a</sup> González Padilla y Araceli Barceló Muñoz**, Investigadoras del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) del Centro Churriana (Málaga) perteneciente a la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía

#### **CERTIFICAN:**

Que la tesis doctoral titulada **“Micropropagación y Conservación *in vitro* de Variedades Españolas de Olivo”**, que presenta D. Borja Cabello Moreno, para optar al Título de Doctor, 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 ser defendida en el Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Málaga.

Málaga, 26 de Enero de 2016

Fdo.: Isabel M<sup>a</sup> González Padilla

Fdo.: Araceli Barceló Muñoz



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**Antonio Flores Moya**, Director del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga

**CERTIFICA:**

Que la tesis doctoral titulada **“Micropropagación y Conservación *in vitro* de Variedades Españolas de Olivo”**, que presenta el licenciado D. Borja Cabello Moreno, para optar al Título de Doctor, ha sido realizada bajo la dirección y supervisión de las doctoras Isabel M<sup>a</sup> González Padilla y Araceli Barceló Muñoz, investigadoras del Instituto de Investigación Formación Agraria y Pesquera; y bajo la tutela de Fernando Pliego Alfaro, catedrático del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Málaga, autorizo su presentación para ser defendida en el Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Málaga.

Málaga 26 de Enero de 2016

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



Fdo.: Antonio Flores Moya

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**Fernando Pliego Alfaro**, Catedrático del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Málaga

**CERTIFICA:**

Que la tesis doctoral titulada **“Micropropagación y Conservación *in vitro* de Variedades Españolas de Olivo”**, que presenta D. Borja Cabello Moreno, para optar al Título de Doctor, ha sido realizada bajo mi tutela y autorizo su presentación para ser defendida en el Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Málaga.

Málaga 26 de Enero de 2016

Fdo.: Fernando Pliego Alfaro



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





El doctorando ha disfrutado de una beca predoctoral del Instituto de Investigación Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) cofinanciada por la Junta de Andalucía y fondos INIA- FEDER (proyecto RTA2010-00013-C02-01).

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





*A mi padre*

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



Hay un proverbio chino que dice algo tal que así, “el aleteo de las alas de una mariposa se puede sentir al otro lado del mundo”, empiezo así porque, son tantas las circunstancias por las que he pasado que no sabría decir cuales fueron realmente los motivos por los cuales al final decidí embarcarme en esta locura. Y no sé si diría que fue cosa del destino, de lo que, si estoy seguro, es que ese mismo destino os puso a vosotros en mi camino y gracias a ello he podido terminar esto. Así, que es mi obligación mostraros mi agradecimiento.

En primer lugar, a **Isabel M<sup>a</sup> González Padilla**, gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de iniciarme en la investigación. Por mostrarte como una persona humilde y cercana y estar siempre disponible cuando te necesite, con una paciencia y calma infinita. Gracias por tu dedicación, tus consejos y tu dirección. En definitiva, gracias por ser mi guía en esta aventura.

A **Araceli Barceló**, por ser una buena jefa, sabiendo mantener el equilibrio perfecto entre el respeto y las obligaciones de cada uno. Ha sido un placer trabajar al lado tuyo y gracias a eso creo haber aprendido muchísimo.

De forma especial, no puede faltar el agradecimiento a mis compis de fatigas. **Eli**, mi compañera de todo, gracias por tu ayuda infinita, por acogerme con los brazos abiertos, eres el alma del laboratorio, espero que nunca faltes; A las chicas multiusos, **Sonia e Inma**, gracias por estar siempre dispuestas a echar una mano y siempre con una sonrisa en la cara. Transmitís algo especial, no cambiéis, sois geniales, os deseo lo mejor del mundo, sé que lo conseguiréis porque a gente como vosotras nada os puede ir mal; **Amalia**, gracias por estar siempre que te necesite; **Clara, Adela**, las “nuevas adquisiciones del laboratorio”, ha sido un placer conoceros, transmitís una confianza brutal, eso me permitió sincerarme con vosotras, habéis sido un apoyo fundamental en este tramo final tan duro, gracias; A **Maite**, gracias por tus innumerables consejos, la estadística aunque sigo sin entenderla bien, fue algo más llevadera contigo; A **Marta**, por escuchar mis tonterías y siempre creértelas; **Pepa**, eres una cachonda, nada en el IFAPA sería igual sin tus “buenos días”; **Josefa, Gema, Nieves** sois unas chicas estupendas; A las que ya no están, pero que sin ellas nada hubiera sido igual **Yanet, Isa Vidoy, Laura y Eva**, siempre tendréis un huequito en mi corazón. En general y esta va por todas, que os digo a vosotras que no sepáis ya, pues gracias por esos ratos de cabinas cultivando, por esos almuerzos con dietas permanentes, por ese día a día tan desternillante, en definitiva, mil gracias por innumerables momentos inolvidables en los que la nota común eran vuestras risas, os quiero. Aprovecho la ocasión para agradecer a una persona muy especial, mi compañero y amigo **José Luis**, gracias por estar siempre presto a ofrecerme tu brazo y ayuda cuando la he necesitado, gracias por todos esos momentos en los que hemos hablado y hablado sin parar, en los que tan útil me han resultado tus consejos, sin ti todo hubiera sido un poquito más difícil, gracias.

No creeríais que me he olvidado de vosotros, **Julio, Edu, Enrico, Javi y Enrique**, yo no os englobo en el apartado compañeros, porque sois más que eso. Gracias por ser unos amigos geniales. Gracias por esos desayunos en los que palabras como Danerys y comunio eran la tónica habitual, o eso o estábamos arreglando al mundo atizando a la política. Gracias por vuestros consejos y por vuestra ayuda incondicional, que tanto he necesitado en los momentos más difíciles. Gracias por esas quedadas, en lo que lo de menos era la comida porque ya íbamos bien servido de cachondeo. Me siento un chico afortunado, de poder contar con gente tan maravillosa, sin duda sois de lo mejorcito que ahí. Gracias.

A todos mis compañeros del IFAPA de Churriana con los que he tenido el placer de compartir esta experiencia. Desde el personal de administración, **Nani, Yolanda, Elena, Marisol, Ana, Paloma, Carmen V.** incluyendo también a la directora **Nieves**; pasando por el personal de invernaderos y campos, **Pepillo, Antonio, Baltasar**; otros laboratorios, **Juan Ramón, José Miguel, Carmen R., Eva, Oscar, Carmen S., Juan Carlos, Rosalía, José M<sup>a</sup>, Blanca, Leonardo, Pepe, Iris, Elsa, Ana Belén, Marta**; y terminando por cafetería, **Conchi**, todos habéis contribuido a sentirme como en una familia y eso ha sido una parte esencial de este trabajo.

A todos esos becarios IFAPA (koalas) con los que tuve el placer de compartir cursos de diversa índole, y en los que la diversión era la solución para afrontar los problemas a los que nos hemos visto en esta batalla. **Ana, Antonio, Aura, Clemente, Gloria, Manuel, María, María Jesús, Miguel, Montse y Tacho** gracias y mucha suerte.

A toda la gente del Departamento de Pomología de la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC), **Juan, Arantxa, Elena, Pili A. y Pili L.**, gracias por hacerme sentir uno más nada más pisar el laboratorio. Con vosotros, siempre me sentí como en casa, hicisteis que incluso pensara en quedarme allí para siempre (¡y eso que cuando venían los aires de la fábrica me ponía fatal eh!). Gracias por demostrarme la pasión en lo que hacéis y por transmitirme una confianza inmensa. Fue un placer enorme poder trabajar con vosotros.

A **Rosario Linacero y Javier Gallego**, del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Complutense de Madrid. Gracias por iniciarme en el mundo de los marcadores genéticos, por vuestra total disponibilidad hacia mí. Por vuestros consejos, y porque hicisteis que mi estancia en Madrid fuera más que placentera.

No podía faltar, a toda mi familia, pues siempre han sido el pilar sobre el que he forjado mi vida. En especial a mi mami, **Rosa**, gracias por dejar de lado tus preocupaciones y problemas y esperarme siempre con una sonrisa y un gran abrazo cuando eras tú los que los necesitaba. Os quiero.

A mi mujer, **Rocío**. Gracias por apoyarme en esta aventura, cuando ni yo mismo creía en ella. Gracias por darme fuerzas, cuando las mías flaqueaban. Gracias por aguantarme, cuando ni yo mismo lo hacía. Por ser mi compañera, consejera, amiga y escucharme, cuando ni entendías de lo que te hablaba. Gracias porque cuando más oscuro se mostraba todo, ponías ese toque de luz para guiarme. Por confiar en mí y no dudar ni un segundo en que lo conseguiría. Te amo.

Para el final he dejado a mi padre, **Francisco**. Gracias, por mostrarte entusiasmado y atento, por preguntar por mis experimentos a pesar de que apenas lograbas entender a que me dedicaba o que hacía en el laboratorio. Gracias porque al hablar notaba el orgullo que sentías por tu hijo. Desde pequeño me inculcaste que los valores del esfuerzo y la lucha siempre tienen recompensa y esos valores han definido mi vida y quien soy. Gracias a esos valores hoy estoy aquí. Lo que más me duele en el alma, es que no puedas estar aquí viendo alcanzar esta meta. Pero sé que desde allí arriba, estarás orgulloso de tu "bioquímico". Gracias por ser el padre que siempre necesite.

# INDICE



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## INDICE

|  |            |
|--|------------|
| <b>ABREVIATURAS .....</b>  | <b>i</b>   |
| <b>RESUMEN.....</b>  | <b>1</b>   |
| <b>OBJETIVOS .....</b>   | <b>3</b>   |
| <br>   |            |
| <b>CAPITULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>                     | <b>7</b>   |
| <b>I.1. EL OLIVO.....</b>  | <b>9</b>   |
| I.1.1. Descripción de la especie.....                            | 9          |
| I.1.2. Origen y distribución geográfica .....                    | 11         |
| I.1.3. Importancia y estado actual del cultivo.....              | 17         |
| I.1.4. Principales variedades españolas de olivo .....           | 21         |
| I.1.5. Métodos de propagación.....                               | 39         |
| <b>I.2. RECURSOS FITOGENÉTICOS.....</b>                          | <b>45</b>  |
| I.2.1. Banco de Germoplasma Mundial de Olivo .....               | 47         |
| I.2.2 Métodos de conservación de los Recursos Fitogenéticos..... | 49         |
| <br>   |            |
| <b>CAPITULO II: MICROPROPAGACIÓN.....</b>                        | <b>51</b>  |
| <b>II 1: INTRODUCCIÓN .....</b>                                  | <b>53</b>  |
| II.1.1. Fases de la micropropagación .....                       | 53         |
| II.1.2. Métodos de micropropagación .....                        | 67         |
| II.1.3. Factores que influyen en la micropropagación .....       | 71         |
| II.1.4. Micropropagación del olivo .....                         | 81         |
| II.1.5. Variación somaclonal.....                                | 99         |
| <b>II.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>                             | <b>119</b> |
| II.2.1. Condiciones generales .....                              | 119        |
| II.2.2. Establecimiento <i>in vitro</i> del material.....        | 120        |
| II.2.3. Multiplicación .....                                     | 125        |
| II.2.4. Enraizamiento .....                                      | 127        |
| II.2.5. Estabilidad Genética .....                               | 133        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>II.3. RESULTADOS .....</b>  | <b>137</b> |
| II.3.1. Establecimiento <i>in vitro</i> del material.....  | 137        |
| II.3.2. Multiplicación .....   | 153        |
| II.3.3. Enraizamiento .....  | 158        |
| II.3.4. Estabilidad Genética .....   | 164        |
| <b>II.4. DISCUSIÓN .....</b>   | <b>171</b> |
| II.4.1. Establecimiento <i>in vitro</i> del material.....  | 171        |
| II.4.2. Multiplicación .....   | 175        |
| II.4.3. Enraizamiento .....  | 178        |
| II.4.4. Estabilidad genética .....   | 180        |
| <br>   |            |
| <b>CAPITULO III; CONSERVACIÓN <i>IN VITRO</i> .....</b>  | <b>185</b> |
| <b>III.1. INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>187</b> |
| III.1.1. Conservación <i>in vitro</i> .....  | 187        |
| III.1.2. Métodos de conservación <i>in vitro</i> .....   | 187        |
| III.1.3. Factores que afectan a la conservación <i>in vitro</i> .....  | 201        |
| <b>III.2. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>   | <b>211</b> |
| III.2.1. Condiciones generales .....   | 211        |
| III.2.2. Frigoconservación .....   | 213        |
| III.2.3. Encapsulación .....   | 213        |
| III.2.4. Conservación a medio plazo de secciones nodales de olivo mediante<br>encapsulación a baja temperatura ..... | 222        |
| <b>III.3. RESULTADOS .....</b>   | <b>225</b> |
| III.3.1. Frigoconservación .....   | 225        |
| III.3.2. Encapsulación .....   | 229        |
| III.3.3. Conservación a medio plazo de secciones nodales de olivo mediante<br>encapsulación a baja temperatura ..... | 287        |
| <b>III.4. DISCUSIÓN .....</b>  | <b>295</b> |
| III.4.1. Frigoconservación .....   | 295        |
| III.4.2. Encapsulación .....   | 296        |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>  | <b>317</b> |
| <b>ANEXO .....</b>   | <b>323</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>  | <b>325</b> |



# ABREVIATURAS



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## ABREVIATURAS

**2,4,5-T:** Ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético.

**2,4-D:** Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

**2iP:** 6-( $\gamma,\gamma$ -Dimetil amino) purina.

**AAO:** Agencia para el Aceite de Oliva.

**ABA:** Ácido abcísico.

**ADN:** Ácido desoxirribonucléico.

**AFLPs:** Amplified Fragment Length Polymorphism.

**AIA:** Ácido indolacético.

**AIB:** Ácido indol-3-butírico.

**ANA:** Ácido naftalenacético.

**ANOVA:** Análisis Normalizado de la Varianza.

**ASA:** Ácido acetilsalicílico.

**B5:** Medio de cultivo descrito por Gamborg *et al.* (1968).

**BA:** 6-Bencil-adenina.

**BAP:** 6-Bencil-aminopurina. Sinónimo BA.

**BMGO, CAP-UCO-IFAPA:** Banco Mundial de Germoplasma de Olivo

**BN:** Medio de cultivo descrito por Bourgin y Nitsch (1967).

**CF:** Cambio de fase.

**COI:** Consejo Oleícola Internacional.

**DKW:** Medio de cultivo descrito por Driver y Kuniyuki (1984).

**DKWr:** Medio de cultivo descrito por Revilla *et al.* (1996).

**DMSO:** Dimetilsulfóxido.

**ES:** Embriogénesis somática.

**ECO:** Medio de embriogénesis cíclica de olivo descrito por Pérez-Barranco *et al.* (2007).

**EEUU:** Estados Unidos.

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura.

**FMP:** Flurprimidol.

**GA<sub>3</sub>**: Ácido Giberélico.

**has**: Hectáreas.

**IM**: Medio de cultivo descrito por Rugini (1984).

**ISSRs**: Intersimple Sequence Repeats.

**Kin**: Kinetina.

**MAGRAMA**: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente.

**Man**: Manitol.

**MES**: 2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid.

**MS**: Medio de cultivo descrito por Murashige y Skoog (1962).

**OM**: Medio de cultivo descrito por Rugini (1984).

**OMc**: Medio OM modificado.

**OMe**: Medio de elongación de raíces descrito por Cañas *et al.* (1987).

**OMr**: Medio de inducción de raíces descrito por Cañas *et al.* (1987).

**pb.**: Par de bases.

**PBZ**: Paclobutrazol.

**PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa.

**PVS**: Solución de vitrificación.

**QL**: Medio de cultivo descrito por Quoirin y Lepoivre (1977).

**RAPDs**: Polimorfismo de productos amplificados al azar.

**RC**: Reguladores de crecimiento.

**RRFF**: Recursos fitogenéticos.

**RFLP**: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción.

**RP**: Medio de cultivo descrito por Roussos y Pontikis (2002).

**sa**: sección apical.

**SA**: Ácido salicílico.

**Sac**: Sacarosa.

**SAU**: Superficie Agrícola Utilizada.

**SCARs**: Sequence Characterized Amplified Region.

**SH**: Medio de cultivo descrito por Schenk y Hildebrandt (1972).

**sn:** sección nodal.

**SNK:** Test Students-Newman-Keuls de comparaciones múltiples de medias.

**SNPs:** Single Nucleotide Polymorphism.

**Spp.:** Subespecie.

**SSAPs:** Sequence Specific Amplification Polymorphims.

**SSRs:** Simple Sequence Repeat.

**STSs:** Sequence Tagged Site PCR.

**T1:** Tasa de multiplicación inicial

**T1m:** Tasa de multiplicación inicial media.

**T2:** Tasa de multiplicación final.

**T2m:** Tasa de multiplicación final media.

**TDZ:** Tidiazurón.

**TIBA:** Ácido triiodobenzoico.

**UE:** Unión Europea.

**UM:** Unidad de multiplicación.

**UV:** Ultravioleta.

**Var.:** Variedad.

**WPM:** Medio de cultivo descrito por Lloyd y McCown (1980).

**Z:** Zeatina.

**ZR:** Ribósido de zeatina.

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



# RESUMEN



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





## RESUMEN

El olivo (*Olea europaea* L) es la especie oleaginosa más relevante a nivel económico en los países de la Cuenca Mediterránea, siendo España líder mundial en producción tanto de aceite como de aceituna de mesa. Además de esta importancia del sector oleícola en España, el cultivo destaca por su antigüedad y su carácter tradicional, lo que genera gran cantidad de beneficios, desde la mano de obra que implementa para su mantenimiento, hasta el efecto de protección medioambiental que ejerce a nivel de la protección de suelo y de la lucha contra la erosión. El material vegetal cultivado en España incluye un gran número de variedades, entre las que se encuentran, en base a su importancia y difusión, las 24 variedades principales, que son la base del sector del olivar. Siendo el olivar un recurso esencial a conservar y mejorar, la creación de El Banco de Germoplasma Mundial de Olivo (BGMO, CAP-UCO-IFAPA), ha sido fundamental para el sector. En la actualidad este Banco mantiene en colección más de 885 accesiones procedentes de 24 países. Entre sus objetivos se encuentra conservar el patrimonio genético de la especie con la máxima seguridad posible, implementando distintos métodos de conservación.

El cultivo *in vitro* es una alternativa eficaz de conservación *ex situ*, que complementaría el mantenimiento, conservación y salvaguarda de la colección de variedades del BGMO, CAP-UCO-IFAPA. Sin embargo, para poder realizar la conservación *in vitro* se requiere la puesta a punto de protocolos de micropropagación. El hecho de introducir una especie o variedad *in vitro* es por sí mismo una forma de conservación del material. En este sentido, en nuestro laboratorio se puso a punto un protocolo de micropropagación para dos variedades españolas de gran interés agronómico, 'Arbequina' y 'Picual'. Este protocolo podría servir para la introducción *in vitro* de otras variedades, aún sin micropropagar, y como paso previo para poder llevar a cabo la conservación de todo el Banco.

En este trabajo se ha estudiado la posibilidad de aplicar el protocolo de micropropagación puesto a punto para las variedades 'Arbequina' y 'Picual' a las 22 variedades españolas principales de olivo. Como resultado, se han conseguido establecer *in vitro* 15 variedades y llevar a cabo la micropropagación de 12 de ellas ('Alfafara'; 'Blanqueta-11'; 'Castellana'; 'Cornicabra'; 'Hojiblanca'; 'Lechín de Granada'; 'Lechín de Sevilla'; 'Manzanilla Cacereña'; 'Sevillenca'; 'Verdial de Huévar'; 'Verdial de Vélez Málaga' y 'Villalonga'). Esto supone un gran éxito en la micropropagación de olivo, donde normalmente los protocolos publicados son genotipo dependientes, y abre nuevas posibilidades de conservación y mejora mediante ésta técnica. Además, se ha estudiado la

estabilidad genética de plantas aclimatadas de 8 de las variedades micropropagadas, comprobándose que ni el protocolo de propagación utilizado, mediante yemas axilares, ni el medio de cultivo parecen producir variación somaclonal.

En la actualidad, la disponibilidad de protocolos de micropropagación para distintos cultivares de olivo permitiría utilizar la técnica de frigoconservación o conservación a baja temperatura, para mantener *in vitro* gran parte del material presente en los bancos de germoplasma de esta especie. En nuestro laboratorio se desarrolló un protocolo que permite la frigoconservación de brotes de la variedad 'Arbequina', durante al menos un año con muy buenos resultados y que en esta tesis se ha aplicado a 8 de las variedades micropropagadas ('Blanqueta-11', 'Castellana', 'Cornicabra', 'Hojiblanca', 'Lechín de Granada', 'Sevillenca', 'Verdial de Vélez Málaga' y 'Villalonga') con buenos resultados también.

Por otra parte, las variedades de olivo se podrían conservar también en frío en forma de microestaquillas encapsuladas previamente en alginato, lo que facilitaría su manejo y alargaría el periodo de conservación, facilitando además el intercambio de material entre laboratorios y ahorrando espacio de almacenamiento. La supervivencia de estos micropropágulos, durante el periodo de almacenamiento, estará condicionada por la composición del medio de encapsulación y los tratamientos a los que sean sometidos en etapas previas al proceso. Así, los tratamientos previos con carbohidratos y/o inhibidores del crecimiento, favorecería la inducción de un cierto estado de dormancia en los propágulos, prolongando el periodo efectivo de conservación. En esta tesis se ha estudiado el efecto de factores como la temperatura, los pretratamientos con carbohidratos y los retardantes del crecimiento en el desarrollo de secciones nodales de olivo de la variedad 'Arbequina' y su posterior aplicación a su conservación en alginato a baja temperatura. De los pretratamientos ensayados, la utilización de flurprimidol ha sido clave para la conservación del material encapsulado, de forma que un pretratamiento de las secciones nodales durante 4 semanas con 1 mg/l de flurprimidol y su posterior encapsulación en una matriz de alginato y posterior conservación a 4 °C ha permitido conservar el material durante al menos un año con un porcentaje de recuperación del 88%.

# OBJETIVOS

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Estudiar la aptitud para la micropropagación de 22 variedades españolas de olivo pertenecientes al BMGO, CAP-UCO-IFAPA.
2. Estudiar la aptitud para la frigoconservación *in vitro* de diferentes variedades españolas de olivo.
3. Puesta a punto de un protocolo de encapsulación y conservación en frío para la variedad 'Arbequina'.

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



# CAPITULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





## I.1. EL OLIVO

### I.1.1. Descripción de la especie

El olivo (*Olea europaea* L.) pertenece a la familia *Oleaceae*, constituida por unos 29 géneros, de los que tienen interés económico u hortícola los géneros *Fraxinus* (Fresno), *Jasminium* (Jazmín), *Ligustrum* (Aligustre), *Phillyrea* (Agracejo), *Syringa* (Lilo) y *Olea* (Olivo). Las plantas de esta familia son mayormente árboles y arbustos, a veces trepadores, y muchas de ellas producen aceites esenciales en sus flores y frutos, algunos de los cuales son utilizados por el hombre. En total, la familia *Oleaceae*, comprende cerca de 600 especies de plantas distribuidas por las regiones tropicales y templadas del mundo. Y concretamente dentro del género *Olea*, existen unas 35 especies entre las que se encuentra *Olea europaea* L.

Incluida en la especie *O. europaea* L. se encuentran todos los olivos cultivados (variedad *europaea*) y también los acebuches u olivos silvestres (variedad *sylvestris*) (Baldoni *et al.*, 2009), aunque existen discrepancias sobre cómo subclasificar dentro de la especie. Así, atendiendo a caracteres morfológicos y a la distribución geográfica, Green y Wickens (1989), distinguieron 3 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*, en los macizos del Sahara; iii) *O. europaea* spp. *cuspidata*, en Asia y el este de África.

Sin embargo, Civantos (2008) distingue una sola especie, *Olea europaea*, con las subespecies *sativa* y *sylvestris*, agrupando así a los cultivares y a las formas silvestres, respectivamente.

El olivo se considera una especie diploide ( $2n= 2x= 46$ ) (Minelli *et al.*, 2000), aunque se han descrito casos de poliploidía tanto en mutantes como en poblaciones naturales (Rugini *et al.*, 1996; Besnard *et al.*, 2008). El tamaño de su genoma se ha estimado en torno a unas 1500 Mb mediante estudios de citometría de flujo en diferentes cultivares portugueses y acebuche (Loureiro *et al.*, 2006). Estos resultados discrepan de los obtenidos en cultivares italianos (Rugini *et al.*, 1996), poniendo de manifiesto la existencia de variabilidad intraespecífica en el tamaño del genoma.

Los estudios moleculares han ayudado a redefinir la clasificación dentro del género *Olea* (Besnard y Bervillé, 2000; Vargas *et al.*, 2000; De la Rosa, *et al.*, 2003; Belaj *et al.*, 2003a,b; Besnard *et al.*, 2009). Estos trabajos evidencian la utilidad de diversos marcadores moleculares (RAPDs, AFLPs y SSRs) de ADN de origen diverso (nuclear, mitocondrial y cloroplastídico) para estudios filogenéticos. A través de estos estudios se ha reorganizado la clasificación dentro de la especie *Olea*

*europaea* en 6 subespecies: *subespecie europaea* (Cuenca mediterránea), *subespecie cuspidata* (desde Sudáfrica por todo el este de África, Arabia hasta el sudoeste de China), *subespecie guanchica* (Canarias), *subespecie maroccana* (Marruecos), *subespecie cerasiformis* (Madeira) y *subespecie laperrinei* (Argelia, Sudán y Níger).

El olivo cultivado es la única especie de la familia con fruto comestible y se destina tanto a la producción de aceite como a la de aceituna de mesa, y se circunscribe, fundamentalmente, a la cuenca Mediterránea, donde se encuentra el 98% de la superficie mundial del cultivo. Es, posiblemente, de origen híbrido (Chevalier, 1948; Breviglieri y Battaglia, 1954; Acevedo-Couthinho, 1956). La gran diversidad mostrada dentro de la misma y estudios citogenéticos hacen suponer que se trata de un aloploiploide (Acevedo-Couthinho, 1956), es decir, el olivo procedería de un cruzamiento entre distintas especies del género *Olea* con números básicos de 11 y 12 cromosomas y posterior duplicación (Rallo, 2005). Sin embargo, existen discrepancias sobre las especies que han intervenido en el origen del olivo. Así, Ciferri (1942) y Vavilov (1951) consideran al olivo afín a *Olea chrysophylla* Lam., a *O. europaea laperrinei* y a *O. europaea cuspidata*. Por su parte, Chevalier (1948) incluye como posibles antepasados a las especies *O. chrysophylla* Lam., difundida en África tropical, Arabia y Madagascar; *O. verrucosa* Link., localizada en África Austral; *O. ferruginea* Royle, extendida por India, Afganistán y Nepal; *O. somaliensis* Baker, originaria de Somalia y *O. laperrinei* Batt. y Trab., procedente de Marruecos y Sahara. Otras clasificaciones plantean la posibilidad de incluir a la mayoría de los grupos de *Olea* en una sola especie: *Olea europaea* (Green y Wickens, 1989; Browicz y Zielinski, 1990 citado por Lavee *et al.*, 1996).

El olivo es un árbol longevo de tamaño mediano y copa redondeada que puede variar de porte por las condiciones agronómicas y ambientales durante su crecimiento. Rapoport (2008) 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 durante su crecimiento. Presenta hojas simples, de forma lanceolada con bordes enteros, que persisten 2 o 3 años en el árbol, aunque también pueden permanecer por más tiempo. El haz de la hoja presenta una cutícula gruesa que le permite adaptarse a periodos prolongados calurosos y con escasas precipitaciones. Las estructuras reproductoras son inflorescencias paniculadas que se desarrollan en las axilas de las hojas de los 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, con un alto contenido en aceite (Rugini, 1995; Barranco *et al.*, 1998; Rapoport, 2008).

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) pudiendo ser acortada 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 *et al.*, 1996; Moreno-Alias *et al.*, 2010a).

Además de la capacidad de fructificación, existe 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 *et al.*, 2000).

### 1.1.2. Origen y distribución geográfica

El origen del olivo silvestre se sitúa en Asia Menor, donde forma verdaderos bosques. Parece haberse extendido desde Siria hacia Grecia, a través de Anatolia (Candolle, 1883), por eso, algunos autores (Polymerou-Kamilakis, 2006) lo consideran autóctono de toda la Cuenca Mediterránea y ubica el origen del olivo cultivado en Asia Menor hace unos doce milenios. Aceptando una zona originaria que se extiende desde el sur del Cáucaso hasta la altiplanicie de Irán y la costa mediterránea de Siria y Palestina (Acerbo), el cultivo del olivo alcanzó un notable desarrollo en estas dos últimas regiones para expandirse por la isla de Chipre hacia Anatolia o por la isla de Creta hacia Egipto. A partir del s. XVI a.C. los fenicios difunden el olivo por las islas griegas y en los siglos XIV a XII a.C. por la Península Helénica, donde se incrementa su cultivo, llegando a alcanzar gran importancia en el s. IV a.C. cuando Solón promulgó decretos sobre la plantación de olivos. Desde el siglo VI a.C. se propagó por toda la Cuenca del Mediterráneo pasando a Trípoli, a Túnez, a la isla de Sicilia, y desde allí a la Italia Meridional. Los romanos prosiguen la expansión del olivo por los países costeros del Mediterráneo como arma pacífica en sus conquistas para el asentamiento de

poblaciones (Boskou, 2006; Baldoni *et al.*, 2009). En Marsella es introducido unos 600 años a.C. y desde allí a toda la Galia.

El olivo, que se había introducido en España durante la dominación marítima de los fenicios (1050 a.C.), no alcanzó notable desarrollo hasta la llegada de Escipión (212 a.C.) y la dominación de Roma (45 a.C.). Después de la tercera guerra púnica, el olivar ocupaba una importante extensión en la Bética y se expandió hacia el centro y el litoral mediterráneo de la Península Ibérica. Los árabes introdujeron sus variedades en el sur de España e influyeron en la difusión del cultivo hasta el punto de que los vocablos castellanos de aceituna, aceite o acebuche o los términos en portugués para aceituna (azeitona) y aceite de oliva (azeite) tienen raíz árabe (COI, 2015).

### I.1.2.1. El olivo en el mundo

Pese a su rusticidad, el olivo presenta una serie de requisitos que limitan su área de distribución. Su hábitat se concentra entre las latitudes 30° y 45°, tanto en el hemisferio norte como en el sur, en regiones climáticas del tipo mediterráneo, caracterizadas por un verano seco y caluroso. En el hemisferio sur, el olivar está presente en latitudes más tropicales con clima modificado por la altitud. El cultivo del olivo salta fuera de la cuenca mediterránea con el descubrimiento de América (1492). Desde Sevilla pasan los primeros olivos a las Antillas y después al continente. En 1560 hay olivares en producción en México, después en Perú, en California, en Chile o en Argentina, donde todavía vive una de las plantas llevadas en la conquista, el viejo olivo de Arauco (COI, 2015).

En tiempos más modernos, el olivo ha continuado su expansión más allá del Mediterráneo, cultivándose hoy en lugares tan alejados de su origen como en la Región Sudafricana, en Australia, en Japón o en China (Civantos, 2008).

### I.1.2.2. El olivo en España

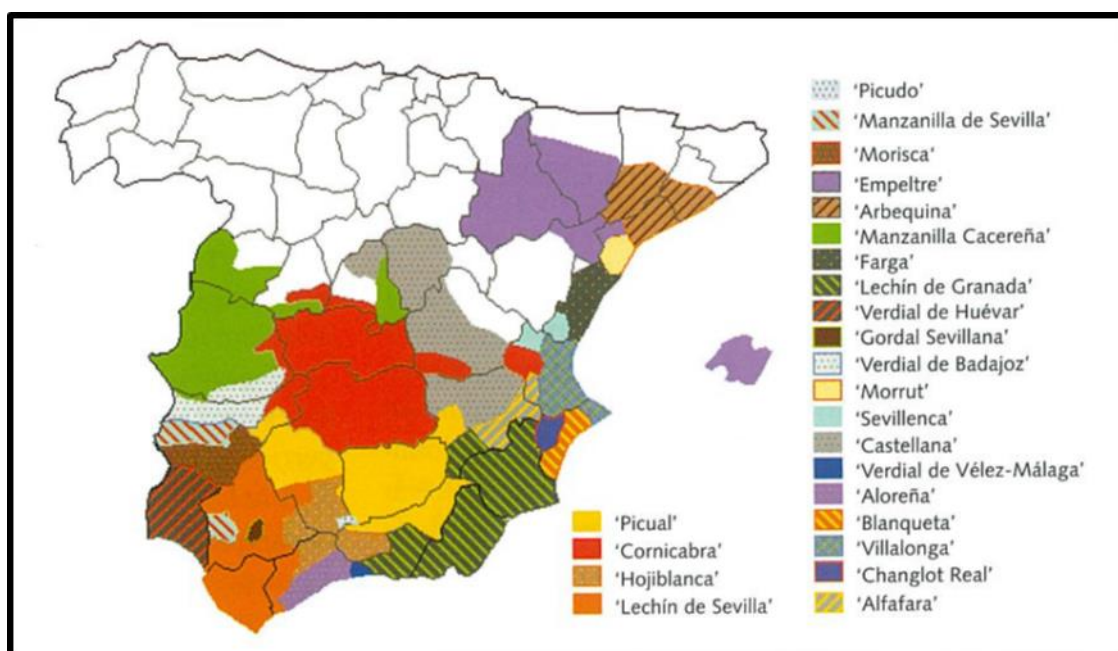
El material vegetal del olivo cultivado en España está constituido por un gran número de variedades, todas ellas muy antiguas y que presentan unas zonas de difusión restringidas a sus posibles lugares de origen. Existen problemas de sinonimias (denominaciones diferentes para la misma variedad) y homonimias (misma denominación para variedades diferentes), y esta confusión representa un gran problema para la catalogación varietal, por lo que es necesario disponer de sistemas de identificación para establecer las sinonimias, las homonimias y delimitar el área de cultivo real de cada variedad. Barranco y Rallo (1984) establecieron un esquema pomológico que

incluye caracteres del árbol, rama, hoja, inflorescencia, fruto y endocarpio, el cual se ha mostrado muy eficaz para trabajos de prospección e inventario de variedades de olivo (Barranco *et al.*, 2005a).

En España se ha encontrado una gran diversidad de variedades de olivo cultivadas (más de 260 variedades). Una de las causas de esta diversidad probablemente sea el origen autóctono de las variedades, surgidas de la probable selección de materiales diferentes en cada zona y de su restringida difusión en torno a la misma (Barranco *et al.*, 2005a). Asimismo, la longevidad de las plantaciones limita la renovación varietal, salvo por portainjertos, lo que ha restringido la sustitución de cultivares (Barranco *et al.*, 2005a; Baldoni *et al.*, 2009).

El confinamiento de las variedades es otra característica del material vegetal del olivo. La mayoría de las variedades de olivo se difunden por las zonas contiguas en las que son dominantes, pero fuera de ellas su importancia decae rápidamente. Por otro lado, existe un gran número de variedades que no han llegado a extenderse fuera de los límites de una comarca, y sólo dos variedades, 'Manzanilla de Sevilla' y 'Empeltre' han conseguido difundirse a zonas alejadas de las de su cultivo inicial (**Figura 1**), 'Manzanilla de Sevilla', debido a su gran valor como aceituna de mesa, se ha difundido en todo el mundo, y 'Empeltre', que en las Islas Baleares fue injertada masivamente sobre acebuchales. En los últimos años son las variedades 'Arbequina' y 'Picual' (por su aceite) y 'Manzanilla de Sevilla' (para aderezo) las que mayor expansión han experimentado dentro del territorio español y las que se han elegido principalmente para las nuevas plantaciones.

Esta difusión limitada de las variedades se debe al desconocimiento, aún presente, del comportamiento de las mismas en otras zonas de cultivo y a las grandes necesidades de material vegetal que requerían los sistemas tradicionales de propagación. Ambos factores, junto a las exigencias de adaptación al medio de algunas variedades, han restringido la elección de cultivares a los ya conocidos y disponibles en cada comarca (Barranco *et al.*, 2005a).



**Figura 1:** Distribución geográfica en el territorio español de las variedades principales de olivo (Barranco *et al.*, 2005a).

En función de su importancia y difusión, las variedades de olivo cultivadas en España se han clasificado en cuatro categorías: principales, secundarias, difundidas y locales (Barranco *et al.*, 2005a):

Variedad principal: Aquellas que son base de plantaciones, su superficie plantada es la dominante en alguna comarca y tiene importancia a nivel nacional.

Variedad secundaria: Aquellas que son base de plantaciones regulares, pero o no llegan a ser dominantes en ninguna comarca o su superficie plantada, aunque considerable, no tiene importancia a nivel nacional.

Variedad difundida: Aquellas localizadas en varias comarcas, donde son bien conocidas, pero con escasa importancia superficial.

Variedad local: Aquellas que se han localizado en una sola zona donde tienen, generalmente, muy poca difusión.

La **Tabla 1** recoge el destino, la importancia superficial y las provincias donde se difunden las 24 variedades principales de olivo de España. La gran mayoría de las variedades se dedican en exclusiva a la obtención de aceite, sólo dos de ellas ('Manzanilla de Sevilla' y 'Gordal Sevillana') se

destinan fundamentalmente a aceituna de mesa; y otras tres ('Hojiblanca', 'Manzanilla Cacereña' y 'Aloreña') dedican parte de su producción a aceite y parte a aderezo.

**Tabla 1:** Destino, importancia superficial y difusión de las principales variedades de olivo cultivadas en España (Barranco *et al.*, 2005a)

| <b>Variedad</b>            | <b>Destino*</b> | <b>Superficie**</b> | <b>Difusión</b>                 |
|----------------------------|-----------------|---------------------|---------------------------------|
| Alfafara                   | A               | 4                   | Valencia, Albacete              |
| Aloreña                    | A-M             | 17                  | Málaga                          |
| Arbequina                  | A               | 91                  | Lérida, Tarragona, resto España |
| Blanqueta                  | A               | 17                  | Alicante, Valencia              |
| Castellana                 | A               | 22                  | Guadalajara, Cuenca             |
| Changlot Real              | A               | 5                   | Valencia                        |
| Cornicabra                 | A               | 270                 | Ciudad Real, Toledo             |
| Empeltre                   | A               | 72                  | Zaragoza, Teruel, Baleares      |
| Farga                      | A               | 45                  | Castellón, Tarragona            |
| Gordal Sevillana           | M               | 30                  | Sevilla                         |
| Hojiblanca                 | A-M             | 267                 | Córdoba, Málaga, Sevilla        |
| Lechín de Granada          | A               | 36                  | Granada, Almería, Murcia        |
| Lechín de Sevilla          | A               | 105                 | Sevilla, Cádiz                  |
| Manzanilla Cacereña        | A-M             | 64                  | Cáceres, Salamanca              |
| Manzanilla de Sevilla      | M               | 95                  | Sevilla, Badajoz, resto España  |
| Morisca                    | A               | 74                  | Badajoz                         |
| Morrut                     | A               | 28                  | Tarragona, Castellón            |
| Picual                     | A               | 900                 | Jaén, Córdoba, Granada          |
| Picudo                     | A               | 60                  | Córdoba, Granada                |
| Sevillena                  | A               | 26                  | Tarragona, Castellón            |
| Verdial de Badajoz         | A               | 29                  | Badajoz, Cáceres                |
| Verdial de Huévar          | A               | 34                  | Huelva, Sevilla                 |
| Verdial de Vélez<br>Málaga | A               | 20                  | Málaga                          |
| Villalonga                 | A               | 26                  | Valencia                        |

(\*) A: Aceite; M: Mesa

(\*\*) 1.000has



En relación a sus características productivas, en 1972, el Ministerio de Agricultura dividió el territorio español en diez zonas olivaderas (**Tabla 2**). La distribución geográfica en 2005 se representa en la **Figura 1**.

**Tabla 2:** Zonas olivaderas del territorio español (Ministerio de Agricultura, 1972).

| 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           | Hojiblanca, Picual, Picudo, Carrasqueña de Córdoba y Chorrúo                                       | Córdoba (excepto comarca de Bujalance y La Carlota), Estepa, Comarca de Loja, Comarca de Antequera | Baena, Priego de Córdoba  |
| Andalucía Occidental | Lechín de Sevilla, Hojiblanca, Verdial de Huévar, Gordal Sevillana, Manzanillo, Manzanilla Serrana | Cádiz, Huelva, Sevilla (excepto Estepa), comarca La Carlota  | Sierra de Cádiz   |
| Andalucía Oriental   | Lechín de Granada, Verdial de Vélez-Málaga, Aloreña y Picual de Almería                            | Almería, Granada (excepto comarca Iznalloz, y comarca de Loja), Málaga (excepto comarca 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, Alfafara, Cordal 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, Sevillena, 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. Importancia y estado actual del cultivo

La actividad agrícola más tradicional de la cuenca mediterránea está representada por el cultivo del olivo. Históricamente, ha sido un icono en la cultura mediterránea y su importancia en esta región va más allá de su impacto en la economía, pues, integra e identifica económica, social y culturalmente a los habitantes de la cuenca mediterránea, además de ser determinante en su paisaje rural (Loumou y Giourga, 2003).

La producción de aceite de oliva y de aceituna de mesa identifica al olivo como uno de los cultivos *oleaginosos* más importantes del mercado. Como elemento principal de la dieta mediterránea, el aceite de oliva constituye la fuente principal de grasas vegetales para los habitantes de la cuenca mediterránea. Numerosos estudios indican los beneficios sobre la salud cardiovascular (López-Miranda *et al.*, 2010) y prevención de cáncer (Escrich *et al.*, 2011; Pelucchi *et al.*, 2011), además de su calidad nutricional (Cicerale *et al.*, 2009; Soriguer *et al.*, 2009). Todo ello, unido a su calidad organoléptica, ha determinado la difusión de su consumo a otros países.

La tendencia mundial en el cultivo del olivo ha sido la de un incremento tanto en el área de cultivo como en la producción (FAOSTAT, 2015). Esta tendencia se explica por la introducción del cultivo en países lejos de la cuenca mediterránea, como en Sudamérica (Argentina, Chile), Estados Unidos, Australia y Sudáfrica (Baldoni y Belaj, 2009), así, como por el incremento en los propios países de la cuenca mediterránea, donde se encuentran los 5 principales países productores: España, Italia, Grecia, Turquía y Túnez (FAOSTAT, 2015).

#### I.1.3.1. Dimensión económica

Según un informe del Consejo Oleícola Internacional (COI, 2015), el patrimonio oleícola existente se estima en aproximadamente 4.000 millones de olivos, ocupando una superficie de aproximadamente 10 millones de hectáreas. El 68.1% del total se sitúa en los países de la cuenca mediterránea, el 15.0% en Asia, el 14,7% en África, 2.0% en el continente americano y otro 0.2% en Oceanía (FAOSTAT, 2015).

Unos 75 millones de olivos se benefician de aportaciones de agua de riego, considerado éste en el sentido más amplio, predominando, por consiguiente, los que se cultivan en secano (Civantos, 2008).

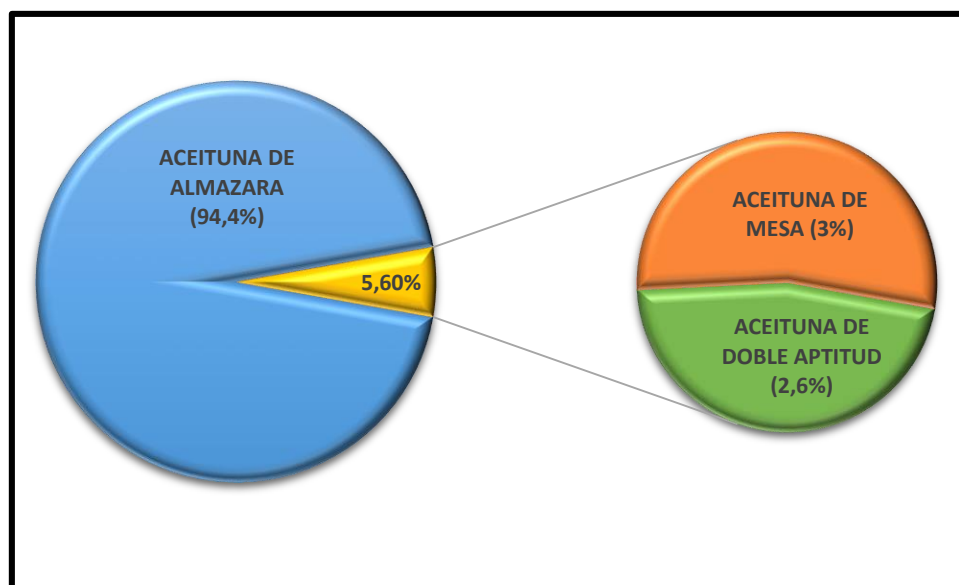
Por otra parte, la producción del olivar alcanza una media anual de cerca de 1.600.000 toneladas de aceitunas, con una clara tendencia al alza, siendo la producción en la cosecha

2013/2014 de 3.270.500 toneladas. Aproximadamente, el 90% se destinan a la obtención de aceite y el 10% se consumen elaboradas como aceitunas de mesa (COI, 2015).

En España, el cultivo del olivo tiene un marcado carácter social y se estima que genera unos 46 millones de jornales cada campaña, siendo una fuente de empleo de gran importancia, sobre todo en aquellas regiones donde constituye un auténtico monocultivo. El valor de la producción del sector del aceite de oliva se sitúa en torno a 1.886 millones de € como promedio de 2007 a 2012, y de 269 millones de € para la aceituna de mesa. Un informe reciente señala, además, la importancia socioeconómica de los productos oleícolas y los esfuerzos realizados en las últimas décadas, que sitúan a España en los primeros puestos en cuanto a investigación y desarrollo tecnológico en este sector (MAGRAMA, 2015).

En cuanto a superficie y producción España se sitúa en el primer lugar mundial en superficie y producción de aceite de oliva (MAGRAMA, 2015). La producción española representa aproximadamente el 60% de la producción de la UE y el 45% de la mundial. La superficie dedicada a este cultivo es de 2.584.564 ha, lo que representa el 14% de la superficie agrícola útil (SAU). Del total de las hectáreas el 94.4% (2.439.660 ha) son de olivar de almazara, el 3% (77.734 ha) son de olivar de mesa, y el 2.6% (67.170 ha) son de olivar de doble aptitud (**Figura 2**). Una parte muy considerable de la superficie oleícola española, 1.515.320 ha, se encuentra en la comunidad autónoma andaluza, que se considera una región líder a nivel mundial en la producción de aceite de oliva (AAO, 2013).

El olivar de aceituna de mesa supone el 0,8 % de la SAU (superficie agrícola utilizada) nacional y el 5,6% de la superficie total de olivar, con un total de 144.904 ha, de las cuales 67.170 has son de doble aptitud aceituna/aceite y 77.734 has. sólo de aceituna de mesa. El 43% de la superficie está en regadío y se localiza mayoritariamente en Andalucía, con más del 80%, y en Extremadura, con el 18% (MAGRAMA, 2015).



**Figura 2:** Representación gráfica de la aptitud del olivar español. Porcentajes respecto al total de hectáreas (2.439.600 ha) MAGRAMA, 2014.

Desde 2005 la superficie de olivar ha aumentado un 5.2%. En los años 2007 y 2008 se produjo el mayor crecimiento en torno al 1.5%, el resto de anualidades no ha aumentado más del 1%. Del aumento de superficie entre 2005 y 2012 (127.845 ha) el 95.5% de la superficie se reparte entre Andalucía (52.9%), Extremadura (25.9%) y Castilla la Mancha (17.3%).

La media de producción en las 5 últimas campañas (2009/10– 2013/14) ha sido de 1.361.600 t, con un récord de 1.781.500 t en la campaña 2013/14. Es importante destacar que, en el último decenio, la producción media se ha incrementado un 23% respecto al anterior periodo, que era de 986.654 t. El cultivo del olivar se caracteriza por su marcado carácter vecero, que supone la alternancia de producciones altas y bajas en años consecutivos. En las últimas campañas 2012/13 (618.107 t) y 2013/14 (1536.600 t) se puso en evidencia este comportamiento.

España es líder mundial también en producción de aceituna de mesa, representando aproximadamente el 71% de la producción de la UE y el 22% de la mundial.

La producción media de las últimas 5 campañas (2009/10-2013/14) ha sido de 524.400 t, de las cuales, el 70% aproximadamente se destina para su consumo como aceituna verde y el resto para aceituna negra. Cabe destacar que la producción media en la última década (2004-2013) se ha incrementado en un 57% respecto a la media de la anterior (1994-2003), pasando de 330.057 t a 516.919 t.

Estos datos son indicadores de la importancia del sector oleícola en España, siendo el olivar un recurso esencial a conservar y mejorar debido a la gran cantidad de beneficios que genera, desde

la mano de obra que implementa para su mantenimiento, hasta el efecto de protección medioambiental que ejerce a nivel de la protección de suelo y de la lucha contra la erosión.

### I.1.3.2. Comercio exterior

Según el informe del MAGRAMA (2015), España es el primer exportador mundial de aceite de oliva, que ocupa el cuarto lugar entre los productos agroalimentarios exportados desde España, solamente por detrás de los cítricos, el vino y la carne de porcino.

Las exportaciones representan el 60% del comercio total del aceite de oliva en España, con más de 100 países de destino, y con una media en las campañas 2007/08 – 2012/13 de 745.700 t. El volumen de las exportaciones ha subido un 48% desde la campaña 2006/07 hasta la 2011/12, aunque en la campaña 2012/13 las exportaciones fueron excepcionalmente bajas a causa de una cosecha anormalmente baja también. En los últimos años, destaca la tendencia al incremento de las exportaciones de aceite de oliva envasado en detrimento del aceite de oliva a granel y el menor peso de las exportaciones a la UE en el cómputo total, aunque sigue siendo el mayoritario (cerca del 75% del total se destina a la UE).

En cuanto a la aceituna de mesa, España es también el primer exportador mundial. La aceituna española está presente en más de 100 países en los cinco continentes y en las últimas 6 campañas, las exportaciones se han situado en una media de 357.790 t, confirmándose así la vocación exportadora del sector.

Las importaciones tienen mucha menor relevancia que las exportaciones, con una media en los últimos seis años de 55.066t. La mayor parte del aceite importado procede de la UE (el 57%), siendo Portugal e Italia (50 y 27% sobre el total UE respectivamente) los principales suministradores. En cuanto a la aceituna de mesa las importaciones tradicionalmente han sido poco importantes y proceden fundamentalmente de países de la UE.

#### I.1.4. Principales variedades españolas de olivo

La catalogación de las variedades de olivo en España solo se ha llevado a cabo con carácter sistemático en los últimos 40 años. Diferentes trabajos abordan el estudio de las variedades de olivo en el siglo XX. El primer gran impulso se inicia a partir del VII Congreso Internacional de Oleicultura, celebrado en Sevilla en 1924. Los estudios de Priego (1924, 1930, 1931, 1932, 1933 y 1935) representan el intento de catalogación más completo realizado hasta la época. Posteriormente hay dos trabajos que merecen ser reseñados: Patac *et al.* (1954), en el que llegan a establecer 52 grupos con todas las variedades encontradas, y Ortega-Nieto (1955, 1963), en el cual se describen las 24 variedades más importantes de España.

En 1970 se inicia en Córdoba, en el marco de un programa de colaboración de España con la FAO –Proyecto CEMEDETO-, el establecimiento de la Colección Mundial de Variedades de Olivo del IFAPA, en el Centro Alameda del Obispo, en Córdoba, y que posteriormente dio lugar al Banco de Germoplasma Mundial de Olivo (BGMO, CAP-UCO-IFAPA). Esta iniciativa desencadenó el comienzo de la catalogación sistemática de las variedades de olivo en nuestro país.

Tras los trabajos de prospección de variedades de olivo en España realizados por el Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba, cuyo objetivo fue localizar el material de esta especie en nuestro país, identificarlo e introducirlo a la colección, se obtuvo información sobre la importancia y difusión de las variedades, lo que permitió clasificarlas de acuerdo a las categorías antes descritas, obteniéndose, tras los estudios como resultado final, 24 variedades principales, 24 variedades secundarias, 50 variedades difundidas y 164 variedades locales (Barranco *et al.*, 2005a).

A continuación, se detallan las 24 variedades principales, basándonos en la información proporcionada por Barranco *et al.* (2005a).

### *Alfafara*

#### Denominación y sinonimias

Toponímico de la localidad alicantina de Alfafara, de donde supuestamente es originaria. La sinonimia *Alfalfarenca*, señalada en *Concentaina*, hace igualmente referencia a su localidad de origen.

#### Difusión e importancia

Se cultiva en diferentes comarcas de las provincias de Albacete, Valencia y Alicante (en estas dos últimas provincias ocupa una superficie de 4.688 ha (Iñiguez *et al.*, 2001). Es la principal variedad en la comarca de Almansa, en Albacete.

#### Consideraciones agronómicas y comerciales

Enraíza fácilmente por estaquillado y suele usarse como patrón de otras variedades. La precocidad de entrada en producción es media. Su productividad es elevada. Sus frutos son de maduración tardía, suelen presentar una resistencia elevada al desprendimiento, su contenido en aceite es medio y presentan un índice de extractabilidad muy bajo. El aceite es de baja calidad. A veces se utiliza también para aderezo en verde. Variedad resistente al frío y susceptible a la sequía. Se considera resistente a tuberculosis y susceptible a repilo.



### *Aloreña*

#### Denominación y sinonimias

Toponímico de la población de Álora (Málaga), centro de su zona de cultivo. También se ha encontrado con las sinonimias de '*Arola*' (corrupción de Álora) en Lebrija, '*Manzanilla*' en Antequera y '*Manzanilla de los Ranchos*' en Grazalema.



#### Difusión e importancia

Se localiza en toda la provincia de Málaga y es la variedad principal de la comarca Centro-Sur de dicha provincia, donde ocupa alrededor de 11.000 ha.

### Consideraciones agronómicas y comerciales

Esta variedad es precoz en su entrada en producción y de productividad elevada y constante. Sus frutos son de maduración media y presentan baja resistencia al desprendimiento, lo que facilita su recolección mecánica. Su principal destino es para aderezo en verde, razón por la que sus frutos se recolectan a finales de agosto. En estas condiciones son muy apreciados por la calidad de su pulpa, aunque no aguantan mucho tiempo aderezados. La separación de la pulpa del hueso es difícil. Es variedad de contenido medio en aceite, pero de escasa apreciación. Variedad exigente en condiciones de clima y suelo, en particular, es especialmente susceptible a la sequía. Se la considera sensible a repilo y a la mosca.

### *Arbequina*

#### Denominación y sinonimias

Toponímico de Arbeca, localidad de Lérida donde se supone que se inició su cultivo (Tous y Romero, 1993). Una sinonimia es la denominación ‘Blanca’ en Barbastro.



#### Difusión e importancia

Es la variedad más importante de Cataluña donde ocupa más de 55.000 ha. También se encuentra ampliamente difundida en Aragón y recientemente, en Andalucía, donde ocupa más de 20.000 ha en plantaciones intensivas. Fuera de España se encuentra principalmente en Argentina.

### Consideraciones agronómicas y comerciales

Esta variedad posee una capacidad de enraizamiento elevada. Su vigor es reducido, lo que permite su utilización en plantaciones intensivas, de precoz entrada en producción y de productividad elevada y constante. Su época de floración es media y es considerada autocompatible. La fuerza de retención de sus frutos es media, pero su pequeño calibre dificulta la recolección mecánica con vibrador de troncos. El rendimiento graso es elevado y la calidad de su aceite excelente, principalmente por sus buenas características organolépticas, aunque presenta baja estabilidad. Es la variedad base de las Denominaciones de Origen catalanas “Les Garrigues” (Lleida) y “Siurana” (Tarragona). Variedad resistente al frío, tolerante a la salinidad y susceptible a la clorosis férrica en terrenos muy calizos. Es considerada sensible a la mosca y verticilosis y tolerante al repilo.



### *Blanqueta*

#### Denominación y sinonimias

Esta denominación hace referencia al color de fondo blanquecino del fruto en maduración. Son sinonimias las denominaciones '*Blanca*' en Enguera y '*Blanc Roig*' en Granollers.



#### Difusión e importancia

Ocupa más de 17.000 ha en las provincias de Alicante, Valencia y Murcia. También se ha difundido ligeramente en Cataluña en las provincias de Barcelona y Tarragona. Es la variedad principal de las comarcas El Comtat (Alicante) y La Canal de Navarrés y Vall d'Albaida (Valencia) (Iñiguez *et al.*, 2001).

#### Consideraciones agronómicas y comerciales

Variedad de vigor reducido con una capacidad de enraizamiento elevada. Su época de floración es tardía y su polen presenta baja germinabilidad. La entrada en producción es precoz y su productividad es elevada y constante. La época de maduración de sus frutos es media y la fuerza de retención de los mismos es relativamente elevada, lo que dificulta su recolección mecánica. Su contenido en aceite es elevado y muy apreciado. Su aceite es dulce y afrutado, pero de muy baja estabilidad. Se la considera rústica por su adaptación a la sequía y resistencia al frío, pero es susceptible a la mosca, repilo y tuberculosis.

### *Castellana*

#### Denominación y sinonimias

Esta variedad, probablemente, debe su denominación a ser originaria de Castilla-La Mancha. También se ha encontrado con numerosas denominaciones: '*Abucheña*', '*Asperilla*', '*Común*', '*Corriente*', '*De Aceite*', '*Manzanilla*', '*Piñoncilla*', '*Reluciente*', '*Verdeja*', '*Verdinal*'.





Difusión e importancia

Es la variedad principal en las provincias de Cuenca y Guadalajara. También domina en las comarcas de La Roda en Albacete y Vegas en Madrid. En total ocupa más de 22.000 ha.

Consideraciones agronómicas y comerciales

Es una variedad con una capacidad de enraizamiento por estaquillado semileñoso elevada. La época de maduración es media y la fuerza de retención del fruto elevada. Su productividad es elevada y constante. Se destina exclusivamente a la obtención de aceite, siendo su contenido graso y calidad medios. Presenta una buena adaptación a suelos pobres y se considera tolerante al frío y susceptible a tuberculosis.

***Changlot Real***Denominación y sinonimias

Variedad de origen valenciano, su denominación significa fragmento de racima de uva (Patac *et al.*, 1954) que hace referencia a la tendencia de esta variedad a presentar varios frutos por inflorescencia. Es conocida también con las sinonimias de '*Changlot*' en Jumilla, Requena y Villena, '*Dulce*' en Ayora y '*Royal*' en Lorca.

Difusión e importancia

Ocupa cerca de 5.000 ha en las provincias de Alicante y Valencia. Llega a ser la variedad más importante en la comarca de Vinalopó Mitjá (Alicante) (Iñiguez *et al.*, 2001).

Consideraciones agronómicas y comerciales

La época de floración de esta variedad es media y suele producir frutos arracimados. Su entrada en producción es precoz y su productividad es elevada y alternante. La época de maduración es media pero la elevada fuerza de retención de sus frutos dificulta la recogida mecánica. Es apreciada por el elevado contenido en aceite de sus frutos y por la calidad del mismo. Variedad de buena adaptación a suelos desfavorables. Se considera susceptible al frío y la sequía. También es susceptible a tuberculosis y repilo y resistente a verticilosis y mosca.

### *Cornicabra*

#### Denominación y sinonimias

Es conocida con diversas denominaciones que, generalmente, hacen referencia a la forma curvada o alargada de su fruto como ‘Cabrilla’, ‘Cornal’, ‘Cornatillo’, ‘Cornezuelo’, ‘Corniche’, ‘Cornita’, ‘Corriente’, ‘Corval’, ‘Cuernecillo’, ‘Longar’, ‘Longuera’, ‘Ornal’, ‘Osnal’.



#### Difusión e importancia

Es la segunda variedad española en cuanto a superficie cultivada. Actualmente ocupa más de 270.000 ha en las provincias de Ciudad Real, Toledo, Madrid, Badajoz y Cáceres.

#### Consideraciones agronómicas y comerciales

La época de floración de esta variedad es tardía y, aunque suele tener un elevado aborto ovárico, asegura un cuajado suficiente, incluso en autopolinización, aunque su polen presenta baja germinabilidad. Presenta fácil propagación por estaquillado semileñoso. Su entrada en producción es tardía, la productividad es elevada y la producción alternante. La maduración de sus frutos es tardía y presentan elevada resistencia al desprendimiento. Es apreciada por su elevado rendimiento graso y por la calidad de su aceite, de excelentes características organolépticas y elevada estabilidad. También es utilizada para aderezo por la calidad de su pulpa. Variedad de gran adaptación a suelos pobres y zonas secas y frías. Es especialmente sensible a tuberculosis, verticilosis y repilo. También es sensible a los ataques de mosca.

### *Empeltre*

#### Denominación y sinonimias

Esta denominación procede de la palabra catalana “Empelt” que significa injerto y hace referencia al modo de propagación utilizado para esta variedad. Es conocida por diversas sinonimias como ‘Aragonesa’ en Tortosa, Ulldecona, Vall D’Alba,



Vinaroz, ‘Común’ en Soler, ‘de Aceite’ en Tarazona, ‘Fina’ en Belchite, ‘Injerto’ en Barbastro, ‘Macho’ en Belvis de la Jara, ‘Mallorquina’ en Artá y Mancor, y ‘Zaragozana’ en Calatayud.

Difusión e importancia

Es la variedad dominante en las comunidades de Aragón y Baleares. También se ha difundido en algunas comarcas de Castellón, Tarragona y Navarra. En total ocupa más de 70.000 ha en España. Fuera de España se ha difundido en Argentina.

Consideraciones agronómicas y comerciales

La capacidad de enraizamiento de esta variedad es baja por lo que habitualmente se propaga por injerto. La entrada en producción es tardía. Su época de floración es temprana y es considerada parcialmente autofértil y con polen de escaso poder germinativo. La productividad es constante y elevada. La época de maduración de sus frutos es temprana y éstos presentan una baja resistencia al desprendimiento.

Es muy apreciada por su elevado contenido graso y excelente calidad de aceite. También se utiliza como aceituna de mesa aderezada en negro. Variedad rústica que se adapta bien a terrenos de mala calidad y se considera tolerante a la sequía. Se considera tolerante a antracnosis y verticilosis, pero sensible a repilo, tuberculosis y mosca.

*Farga*Denominación y sinonimias

Variedad muy antigua de la que no se conoce el origen de su denominación. También se ha localizado con la sinonimia 'Común' en Mora d'Ebre.

Difusión e importancia

Se cultiva principalmente en las provincias de Castellón, Tarragona y algo en Lérida. Es la variedad principal de las comarcas castellonenses Baix Maestrat, L'Alcalatén y La Plana Alta. En total hay unas 21.000 ha.

Consideraciones agronómicas y comerciales

Variedad muy vigorosa, de gran capacidad de respuesta a podas severas. Su capacidad de enraizamiento es baja. Tiene un buen comportamiento como patrón de otras variedades poco vigorosas. La entrada en producción es tardía, su productividad es elevada y la producción vecera. Sus épocas de floración y maduración son tempranas. Los frutos presentan una elevada fuerza de retención. Se destina para almazara por su elevado rendimiento graso y la buena calidad del aceite,

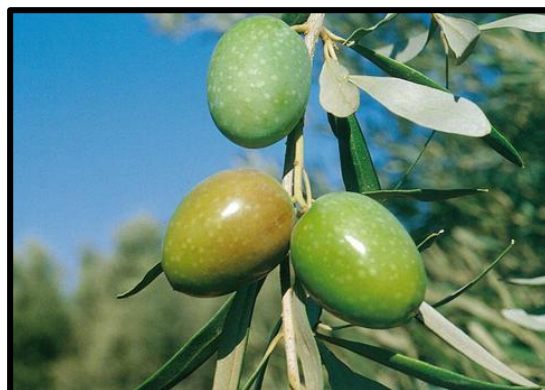


aunque es de difícil extracción. Es considerada muy rústica por su tolerancia al frío invernal. Parece ser susceptible al repilo, verticilosis y mosca y resistente a tuberculosis.

### *Gordal Sevillana*

#### Denominación y sinonimias

Esta variedad aparece principalmente con las denominaciones '*Gordal*' y '*Sevillano*' que hacen referencia al tamaño de su fruto, y a su principal zona de cultivo respectivamente. También se ha encontrado con las sinonimias '*Cordobés*', '*Injerta*', '*Mollar*', '*Morcal de Limón*'. Fuera de España es conocida como '*Bella di Spagna*' (Italia), '*Sevillano*' (EEUU) y '*Extra*' (Chile).



#### Difusión e importancia

Es una variedad de mesa muy difundida internacionalmente. Su cultivo en España se concentra en la provincia de Sevilla, donde alcanza 12.000 ha, aunque está difundida en todas las comarcas olivícolas. Fuera de España ha tenido mucha difusión en EEUU donde se cultivan cerca de 4.000 ha.

#### Consideraciones agronómicas y comerciales

Variedad vigorosa cuando está injertada, presenta menor vigor en sus propias raíces. Su capacidad de enraizamiento por estaquillado semileñoso es muy baja, por lo que normalmente se recurre al injerto para su propagación. Se precocidad de entrada en producción es media. Su época de floración es media, se considera autoincompatible, de elevado aborto ovárico y con polen de muy baja germinabilidad. Su productividad es baja y alternante. La época de maduración de sus frutos es precoz y se destinan exclusivamente para aderezo, pues su contenido en aceite es muy bajo y de mala calidad. Como aceituna de mesa es apreciada por su gran tamaño más que por su calidad. Se considera tolerante al frío invernal y a la humedad, pero susceptible a la sequía. Es resistente a repilo y susceptible a tuberculosis y a la antracnosis.

### *Hojiblanca*

#### Denominación y sinonimias

Esta denominación hace referencia al color claro de sus hojas. También se le conoce en diversas localidades cordobesas con las sinonimias de ‘*Casta de Lucena*’ (Cabra) y ‘*Lucentino*’ (Baena, Cabra y Castro del Río).



#### Difusión e importancia

Es la tercera variedad española en cuanto a superficie cultivada. Actualmente ocupa más de 265.000 ha en las provincias de Córdoba (43%), Málaga (30%), Sevilla (17%) y Granada (10%).

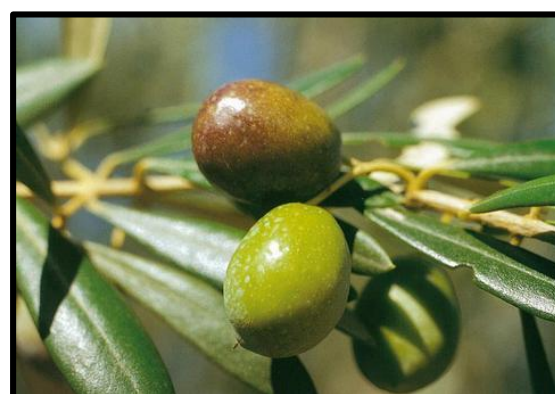
#### Consideraciones agronómicas y comerciales

La precocidad de entrada en producción de esta variedad es media y su productividad elevada y alternante. La época de floración es de media a tardía y es autocompatible y con polen de mediana calidad. Su capacidad de enraizamiento se considera media. La maduración es tardía y sus frutos presentan elevada resistencia al desprendimiento. Tienen doble aptitud y se consideran muy adecuados para el aderezo en negro. Su contenido en aceite es bajo pero muy apreciado por su calidad, aunque presenta baja estabilidad. Variedad resistente a suelos calizos, sequía y tolerante al frío invernal. Se la considera susceptible a repilo, tuberculosis y verticilosis.

### *Lechín de Granada*

#### Denominación y sinonimias

Esta variedad se conoce generalmente con la denominación de ‘*Lechín*’ en las provincias de Granada y Jaén. En su amplia zona de cultivo se localiza con numerosas sinonimias: ‘*Caera*’, ‘*Común*’, ‘*Cuquillera*’, ‘*Cuquillana*’, ‘*Cuquillo*’, ‘*Manzanilla*’, ‘*Menuda*’, ‘*Minuera*’, ‘*Negreta*’ y ‘*Onil*’.





### Difusión e importancia

Variedad principal que se cultiva en el sureste español. Ocupa unas 30.000 ha en las provincias de Granada, Almería, Murcia y Albacete.

### Consideraciones agronómicas y comerciales

Esta variedad presenta una época de floración media y es considerada autocompatible. La entrada en producción es precoz. La productividad es elevada y alternante. La época de maduración de sus frutos es tardía y presentan elevada fuerza de retención. Es una variedad apreciada por su doble aptitud. Su rendimiento graso es elevado y produce aceite de excelente calidad, de color amarillento y de baja estabilidad. Variedad rústica de gran adaptación a suelos calizos y a sequía. También se considera tolerante al frío. Es muy susceptible a repilo, verticilosis y mosca.

### *Lechín de Sevilla*

#### Denominación y sinonimias

Esta variedad es conocida en su zona de cultivo fundamentalmente con tres denominaciones: '*Lechín*', '*Ecijano*' y '*Zorzaleño*'. Se ha adoptado la denominación '*Lechín de Sevilla*', para diferenciarla de otras variedades con igual denominación genérica.



Otras sinonimias de menor difusión son '*Alameño*', '*Cordobés*', '*Lechino*' y '*Manzanilla Serrana*'.

### Difusión e importancia

Ocupa más de 5.000 ha en las provincias de Sevilla, Córdoba, Cádiz y Málaga.

### Consideraciones agronómicas y comerciales

La aptitud al enraizamiento de esta variedad es elevada. Su época de floración es media. En ocasiones presenta elevados porcentajes de aborto ovárico y tiene un polen de baja capacidad germinativa, pero es considerada, en general, autocompatible. La precocidad de entrada en producción es media. La productividad es elevada y alternante. La maduración de sus frutos es temprana y presentan una elevada relación entre fuerza de retención y tamaño. Esta variedad se encuentra en regresión por su contenido en aceite medio y su dificultad de recolección. Tiene a su favor, sin embargo, un aceite apreciado organolépticamente y también puede aderezarse en negro. Variedad de gran adaptación a terrenos desfavorables y a zonas frías. Presenta elevada resistencia

a suelos calizos, a la salinidad y a la sequía. Debido a esta rusticidad se la considera un excelente patrón de otras variedades. Es susceptible a tuberculosis, pero destaca por ser una de las variedades más resistentes al repilo y a la mosca.

### *Manzanilla Cacereña*

#### Denominación y sinonimias

Esta variedad es conocida con numerosas sinonimias en su amplia zona de cultivo. Entre las más utilizadas están: *'Albareña'*, *'Alvellanilla'*, *'Asperilla'*, *'Blanca'*, *'Cacereña'*, *'Carrasqueño'*, *'Costalera'*, *'Hembra'*, *'Manzanil'*, *'Morillo'*, *'Negrillo'*. En Portugal se le encuentra con las denominaciones *'Azeitera'*, *'Azeitoneira'* y *'Negrinha'*.



#### Difusión e importancia

Es variedad principal en las provincias de Cáceres, Badajoz, Salamanca, Ávila y Madrid. En total ocupa 64.000 ha en España. También se encuentra muy difundida en Portugal.

#### Consideraciones agronómicas y comerciales

Variedad poco vigorosa cuya capacidad de enraizamiento es muy elevada. Su época de floración es temprana y es considerada autocompatible y de bajo porcentaje de aborto ovárico. Su entrada en producción es precoz y la productividad elevada y constante. La maduración de sus frutos es temprana y presenta baja fuerza de retención. Variedad con doble aptitud. Es muy apreciada para su aderezo, tanto en verde como en negro, por la calidad de su pulpa. Su contenido en aceite es bajo, aunque de buena calidad. Se la considera de buena adaptación a suelos pobres y al frío invernal. Es susceptible a verticilosis y tolerante a mosca y tuberculosis.

### *Manzanilla de Sevilla*

#### Denominación y sinonimias

Esta variedad es conocida en casi todas las comarcas con las denominaciones de '*Manzanilla*' o '*Manzanillo*', que hacen referencia a su forma esférica similar a la de algunas manzanas, se le añade el apelativo "de Sevilla" para distinguirla de otras 17 variedades que tienen el mismo nombre genérico. Otras sinonimias son '*Carrasqueño*', '*Larga*', '*Redondil*', '*Romerillo*' y '*Varetuda*'.



#### Difusión e importancia

Es la variedad de olivo más difundida internacionalmente. Su cultivo en España se concentra en las provincias de Sevilla (60.000 ha), Badajoz (30.000 ha) y Huelva (4.000 ha). Fuera de España se cultiva en Portugal, Estados Unidos, Israel, Argentina y Australia.

#### Consideraciones agronómicas y comerciales

Variedad de vigor reducido que se adapta fácilmente al cultivo en plantaciones intensivas. Su capacidad de enraizamiento es media, tanto por estaca como por estaquillado semileñoso en nebulización. Su entrada en producción es precoz. Su época de floración es media y su polen presenta elevada capacidad germinativa. En España se cultiva sin polinizadores. La productividad es elevada y alternante. Su época de maduración es precoz y presenta elevada resistencia al desprendimiento. Es la variedad de mesa más apreciada internacionalmente por su productividad y calidad de fruto. Por otro lado, su contenido en aceite es medio y elevada capacidad y estabilidad. Se la considera susceptible a la asfixia radical, a la clorosis férrica en suelos calizos y al frío invernal. Es muy sensible a verticilosis y sensible a repilo, tuberculosis, lepra y mosca.



### *Morisca*

#### Denominación y sinonimias

Esta variedad es conocida en su zona de cultivo fundamentalmente con las denominaciones de 'Basta' y 'Morisca'. En Portugal es conocida con la denominación 'Conserva' de Elvas.



#### Difusión e importancia

Esta variedad ocupa en España más de 75.000 ha, fundamentalmente en el sur de la provincia de Badajoz, y en el norte de la de Sevilla. En Portugal se cultiva en el Alentejo.

#### Consideraciones agronómicas y comerciales

Su capacidad de enraizamiento por estaquillado semileñoso es media y su capacidad de brotación, tras podas severas, es limitada. La época de floración es media y suele presentar elevados porcentajes de aborto ovárico. La precocidad de entrada en producción es media y la productividad media y alternante. La época de maduración de sus frutos es media y presenta elevada resistencia al desprendimiento. Variedad apreciada para aceite, por su elevado rendimiento graso, y para mesa, por su tamaño y facilidad de aderezo. Variedad resistente a la sequía que la hace recomendable como patrón de variedades más susceptibles. Se considera muy susceptible a repilo y tuberculosis y susceptible a lepra y mosca.

### *Morrut*

#### Denominación y sinonimias

El nombre más extendido para esta variedad es 'Morrut' o 'Morruda' que hace referencia al prominente pezón del fruto.



#### Difusión e importancia

Se cultiva en las provincias de Castellón (7.000 ha) y Tarragona (23.000 ha). Dentro de esta última se encuentra principalmente en las comarcas de Baix Ebre y Montsiá, donde se alcanza la categoría de variedad principal.

### Consideraciones agronómicas y comerciales

Variedad que se multiplica fácilmente por estaquillado semileñoso en nebulización. Su época de floración es muy precoz y suele presentar elevados porcentajes de aborto ovárico. Su productividad es baja y alternante y la entrada en producción es tardía. La época de maduración de sus frutos es muy tardía. Tiene elevado rendimiento graso y un aceite de muy baja estabilidad. Variedad considerada poco rústica por ser susceptible a la sequía, suelos pobres y frío invernal. No es atacada por la mosca debido a su maduración tardía, pero es susceptible al repilo.

### *Picual*

### Denominación y sinonimias

La denominación de esta variedad hace referencia a la forma apuntada que presentan sus frutos. Otras sinonimias: *'Andaluza'*, *'Fina'*, *'Grosal'*, *'Jabata'*, *'Marteño'*.



### Difusión e importancia

Es la variedad más importante de España. Actualmente ocupa en Andalucía más de 850.000 ha, dominando en Jaén (97%) y Granada (40%). Es la base de las nuevas plantaciones en todo el país.

### Consideraciones agronómicas y comerciales

Variedad de fácil propagación vegetativa por estaca y por estaquillado semileñoso. Presenta elevada capacidad de brotación tras podas severas. La entrada en producción es precoz y su productividad es elevada y constante. Su época de floración es media y se considera autofértil. La época de maduración de sus frutos es precoz y presenta baja resistencia al desprendimiento. Es muy apreciada por su rendimiento graso elevado y facilidad de cultivo. La apreciación de su aceite es media, aunque destaca por un alto índice de estabilidad. Variedad rústica por su adaptación a diversas condiciones de clima y suelo; en particular se estima tolerante al frío, a la salinidad y al exceso de humedad en el suelo. Sin embargo, es sensible a la sequía y a terrenos calizos. Es una variedad tolerante a tuberculosis y lepra, pero muy susceptible al repilo, verticilosis y a la mosca.

### *Picudo*

#### Denominación y sinonimias

Esta denominación hace referencia al ápice apuntado y curvado de sus frutos y a la presencia de un evidente pezón. Se han encontrado como sinonimias de esta variedad las denominaciones '*Basta*', '*Carrasqueño*', '*Castúo*', '*Gordal*', '*Paseto*', '*Picudo Blanco*' y '*Zorzaleño*'.



#### Difusión e importancia

Es una de las principales variedades españolas. Sin embargo, no llega a ser dominante en ninguna comarca. Ocupa alrededor de 35.000 ha en las provincias de Córdoba, Granada, Málaga y Jaén.

#### Consideraciones agronómicas y comerciales

Variedad de elevada capacidad de enraizamiento. Su entrada en producción es precoz y la productividad es elevada y alternante. Tiene una época de floración media y su polen presenta una elevada capacidad germinativa, lo que la hacen recomendable como polinizador. La época de maduración de sus frutos es tardía y éstos presentan una elevada fuerza de retención. Variedad muy valorada por su buen rendimiento graso y por las excelentes características organolépticas de su aceite. También es apreciada como aceituna de mesa. Variedad considerada rústica por su elevada tolerancia a suelos calizos y al exceso de humedad en el suelo. También se le atribuye cierta tolerancia al frío. Se la considera muy sensible a lepra y tuberculosis y sensible a repilo y verticilosis.

### *Sevillenca*

#### Denominación y sinonimias

Esta variedad es conocida con la denominación '*Sevillenca*' en su zona de cultivo en Tarragona y con la de '*Serrana*' en Castellón.



### Difusión e importancia

Su cultivo se localiza fundamentalmente en las provincias de Tarragona (57%), Castellón (37%) y Valencia (6%), ocupando en total cerca de 26.000 ha.

### Consideraciones agronómicas y comerciales

La capacidad de enraizamiento por estaquillado de esta variedad es media. Su época de floración es tardía y la de maduración es media. Su precocidad de entrada en producción es media y la productividad es media y algo alternante. El contenido en aceite es alto y su calidad es media debido a su bajo contenido en ácido oleico y baja estabilidad. En ocasiones también se usa para aderezo. Variedad considerada poco rústica. Es susceptible a mosca y repilo y resistente a verticilosis.

### *Verdial de Badajoz*

### Denominación y sinonimias

Esta variedad es conocida en su zona de cultivo con numerosas sinonimias como '*Macho*', '*Manzanilla*', '*Rabuda*', '*Mollar*', '*Original*' y '*Zorzaleño*'. Se ha adoptado la denominación '*Verdial de Badajoz*' por ser ésta su principal provincia de cultivo.



### Difusión e importancia

Ocupa cerca de 29.000 ha en las provincias de Badajoz y Cáceres.

### Consideraciones agronómicas y comerciales

Esta variedad presenta escasa capacidad de enraizamiento. Su época de maduración es tardía, con una resistencia al desprendimiento media. Variedad apreciada por su productividad elevada y constante, tamaño de fruto y contenido en aceite. También se utiliza para aderezo en verde. Variedad rústica de gran adaptación a suelos pobres pero sensible al frío invernal. Se considera susceptible a repilo, tuberculosis y mosca.



### *Verdial de Huévar*

#### Denominación y sinonimias

Esta variedad se encuentra con varias sinonimias que hacen referencia al color verde de sus frutos en maduración, '*Verdial Duro*', '*Verdial Real*' en España, y en Portugal se conoce como '*Verdeal de Serpa*' y '*Verdeal Alentejana*'.



#### Difusión e importancia

Esta variedad ocupa unas 20.000 ha en España, en las provincias de Huelva y Sevilla. También se encuentra difundida en el Alentejo (Portugal).

#### Consideraciones agronómicas y comerciales

La capacidad de enraizamiento de esta variedad es baja. Su época de floración es tardía y se considera parcialmente autoincompatible. Su entrada en producción es tardía y su productividad es baja y alternante. La época de maduración es muy tardía, tanto que su fruto no llega a ponerse negro. Variedad de gran adaptación a terrenos húmedos y compactos y a condiciones de sequía, que hacen aconsejable su utilización como patrón. También se considera tolerante a las heladas invernales. Se considera sensible a repilo y verticilosis. Sin embargo, es resistente a tuberculosis y mosca.

### *Verdial de Vélez-Málaga*

#### Denominación y sinonimias

Esta variedad se ha encontrado en su zona de cultivo con la denominación '*Verdial*'. Se ha adoptado la denominación '*Verdial de Vélez Málaga*' por ser la utilizada por el Ministerio de Agricultura (1976) y para diferenciarla de otras variedades de igual denominación genérica.



### Difusión e importancia

Se encuentra localizada en el sureste de la provincia de Málaga, donde ocupa más de 11.000 ha.

### Consideraciones agronómicas y comerciales

Variedad de rigor medio que no soporta podas severas. Su capacidad de enraizamiento es baja. Su precocidad de entrada en producción es media y la productividad es elevada y constante. Su época de maduración es de precoz a media. Es muy apreciada por el elevado contenido graso de sus frutos y por la excelente calidad del aceite que producen. Se considera sensible a repilo y resistencia a la mosca.

### *Villalonga*

#### Denominación y sinonimias

Además de la denominación '*Villalonga*', se le ha encontrado con las sinónimas de '*Forna*', '*Manzanet*', '*Manzanilla*', '*Sevillano*' y '*Valenciana*' en España; En Portugal aparece con los nombres de '*Blanqueta de Elvas*' y '*Branquita*'.



### Difusión e importancia

Es la variedad principal en la provincia de Valencia y en la zona norte de Alicante. En total ocupa más de 26.000 ha. También se ha difundido en Italia y en la comarca de Elvas, en Portugal.

### Consideraciones agronómicas y comerciales

La época de floración de esta variedad es media y suele presentar bajos porcentajes de aborto ovárico. La entrada en producción es precoz y la productividad es elevada y constante. La época de maduración de sus frutos es temprana. Su rendimiento graso es elevado y el aceite de muy buena calidad. También es apreciada como aceituna de mesa. Se considera susceptible al frío y a la sequía. Parece tolerar, sin embargo, el exceso de humedad en el suelo. Se considera muy susceptible a repilo y verticilosis.

### I.1.5. Métodos de propagación

La propagación vegetativa ha sido usada en el olivo desde tiempos remotos, y esto explicaría la antigüedad de las variedades actuales, su localización restringida a los lugares de origen y la homogeneidad genética existente entre las diferentes variedades (Barranco, 2008). La propagación por semillas ha quedado restringida a la obtención de plantas para reforestación, para injerto de variedades difíciles de enraizar y para la evaluación de las progenies en los programas de mejora genética por cruzamiento.

#### I.1.5.1. 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 *et al.*, 1983).

La germinación de las semillas es máxima cuando alcanzan la madurez, aunque existe una gran variabilidad en la germinación *in vivo*. Sotomayor-León y Caballero (1990) indica que la madurez de la semilla se produce cuando el embrión ha alcanzado su longitud y peso seco máximos, y su endospermo representa menos del 20% del peso seco de la semilla.

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 *et al.*, 1996; Moreno-Alías *et al.*, 2010b).

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

### I.1.5.2. Enraizamiento de grandes propágulos

Un sistema de propagación clásico ha sido el enraizamiento de grandes propágulos, ya sean zuecas o estacas leñosas (Caballero y Del Río, 2008). Las zuecas se toman de la parte basal de troncos viejos, puede 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. No obstante, este sistema de propagación aún se utiliza en algunas zonas olivareras del Norte de África y Oriente Próximo (Caballero y Del Río, 2008).

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 estaca 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 y, cuando se realiza el trasplante a suelo, la planta debe seguir formando su sistema radicular, limitando su crecimiento durante el primer año.
5. Se acentúa la tendencia natural del olivo a crecer de forma arbustiva, lo que obliga a costosas podas de formación.



### I.1.5.3. Enraizamiento de estaquillas bajo nebulización

La rizogénesis puede verse mejorada mediante el empleo de reguladores de crecimiento aplicados en la base de la estaquilla. Este sistema 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 (2-4g/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. La 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.

Su principal inconveniente es la falta de homogeneidad en los resultados obtenidos (Caballero y Del Río, 2008). No obstante, mediante el empleo de este método, se han conseguido propagar las principales variedades españolas de olivo (**Tabla 3**).

### I.1.5.4. Injerto

En el caso de variedades de olivo con bajas capacidades de enraizamiento, se utiliza el injerto como método de propagación. Entre sus inconvenientes se encuentra que cuando se realiza en vivero requiere de cuatro a cinco años para la obtención de una buena planta, lo que incrementa su coste; Además, parte del sistema radicular queda en el suelo del vivero y, si se realiza en bolsa, se produce un crecimiento limitado de las raíces, al igual que ocurría con la propagación por enraizamiento de grandes propágulos. 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 *et al.*, 2011).

Según datos proporcionados por el COI (2015), la producción anual de plantas de olivo es de, aproximadamente, 40 millones, con 32 millones en el área mediterránea y 8 millones en el resto del mundo. De ellas, unos 28 millones de plantas se obtienen por estaquillado semileñoso bajo nebulización; 7 millones por injerto y 5 millones a partir de grandes propágulos (Fabbri *et al.*, 2004).

### I.1.5.5. Micropropagación

La micropropagación comercial del olivo no está muy extendida debido a que determinadas variedades, de gran importancia económica i.e. 'Frantoio', 'Kalamata', 'Leccino', 'Picholine', 'Pendo lino', '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 con 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).

En el siguiente Capítulo se revisará más detenidamente la micropropagación de esta especie (Véase Capítulo II: Micropropagación del olivo pág. 81).

**Tabla 3:** Aptitud al enraizamiento y método de propagación empleado en las principales variedades españolas de olivo.

| <b>Variedad</b>                | <b>Enraizamiento</b> | <b>Propagación</b>  |
|--------------------------------|----------------------|---|
| <b>Alfajara</b>                | Alta                 | Estaquillado  |
| <b>Aloreña</b>                 | **                   | Estaquillado  |
| <b>Arbequina</b>               | Alta                 | Estaquillado/Esquejes/Injerto/Micropropagación <sup>1</sup> |
| <b>Blanqueta</b>               | Alta                 | Estaquillado  |
| <b>Castellana</b>              | Alta                 | Estaquillado  |
| <b>Changlot Real</b>           | **                   | Estaquillado  |
| <b>Cornicabra</b>              | Alta                 | Estaquillado/Esquejes/Micropropagación <sup>2</sup>         |
| <b>Empeltre</b>                | Baja                 | Estaquillado  |
| <b>Farga</b>                   | Baja                 | Estaquillado  |
| <b>Gordal Sevillana</b>        | Baja                 | Estaquillado  |
| <b>Hojiblanca</b>              | Media                | Estaquillado/Micropropagación <sup>2</sup>                  |
| <b>Lechín de Granada</b>       | Media                | Estaquillado  |
| <b>Lechín de Sevilla</b>       | Alta                 | Estaquillado  |
| <b>Manzanilla Cacerense</b>    | Media                | Estaquillado  |
| <b>Manzanilla de Sevilla</b>   | Alta                 | Estaquillado/Micropropagación <sup>2</sup>                  |
| <b>Morisca</b>                 | Alta                 | Estaquillado  |
| <b>Morrut</b>                  | **                   | Estaquillado  |
| <b>Picual</b>                  | Alta                 | Estaquillado/Micropropagación <sup>1</sup>                  |
| <b>Picudo</b>                  | Alta                 | Estaquillado  |
| <b>Sevillena</b>               | Media                | Estaquillado  |
| <b>Verdial de Badajoz</b>      | Baja                 | Estaquillado  |
| <b>Verdial de Huévar</b>       | Baja                 | Estaquillado  |
| <b>Verdial de Vélez Málaga</b> | Baja                 | Estaquillado  |
| <b>Villalonga</b>              | Media                | Estaquillado  |

Modificada de Del Río y Caballero (2005): <sup>1</sup>Vidoy-Mercado *et al.* (2012a); <sup>2</sup>Zuccherelli y Zuccherelli (2002).

Alta: > 60%; Media: 40-60%; Baja: <40%; \*\*No hay datos.

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## I.2. RECURSOS FITOGENÉTICOS

La conservación de la biodiversidad vegetal es de vital importancia (Bhojwani y Dantu, 2013b). Las plantas son la clave en el mantenimiento de la biodiversidad en la Tierra, ya que proporcionan hábitat adecuado, comida y oxígeno a todos los demás seres vivos. Están dotadas con la capacidad única de convertir la energía solar en energía química, sintetizando miles de compuestos de vital importancia para nuestras vidas, haciendo que la existencia de cualquier vida animal dependa directa o indirectamente de las plantas.

La domesticación y el cultivo de las especies vegetales supusieron un gran avance en la evolución de la humanidad (Diamond, 2002), pero la domesticación de las plantas implica la selección de una serie de características genéticas de un material silvestre para adaptarlo a las necesidades humanas y al ambiente que el hombre le proporciona, por lo que, en general, las especies cultivadas presentan menor variabilidad genética que las formas silvestres, debido a que sólo una pequeña fracción de la diversidad inicial presente en el acervo genético del ancestro pasó a las formas cultivadas, es el llamado “cuello de botella” debido al “efecto de los fundadores” (Carillo Becerril *et al.*, 2010). Además, la selección realizada por el hombre en las primeras fases de la domesticación de las características más favorables para sus intereses, dio origen al síndrome de la domesticación (Harlan, 1975), por el cual, las formas silvestres sufren una serie de cambios drásticos que Pérez de la Vega (2010) resume como: pérdida de los mecanismos naturales de dispersión de frutos y semillas, pérdida de los mecanismos de dormancia de semillas, aumento del tamaño del fruto o semillas, disminución o pérdida de factores de defensa y cambios en los sistemas de reproducción, desde la alogamia generalizada hacia la autogamia o multiplicación vegetativa.

Además, la selección posterior de mejores características de rendimiento, forma, calidad, etc. por parte de los agricultores produce una reducción en la variabilidad de los genes implicados.

Como resultado, en la actualidad unas 7000 especies de plantas sostienen la alimentación mundial (<1% de la diversidad biológica vegetal) y de ellas sólo 150 especies son realmente importantes, de las cuales 100, representan el 90% de las producciones mundiales y 12 de ellas el 70%, de forma que la mayor parte de este porcentaje se debe a sólo tres especies, trigo, arroz y maíz (Monreal, 2010). Esto ha llevado a que exista actualmente una concienciación a nivel mundial para la conservación de la diversidad.

Si la domesticación de las plantas representó el primer paso de la erosión genética, ésta ha continuado y se ha acelerado con el desarrollo de la mejora genética moderna, ya que esta tecnología ha ido produciendo variedades con altos rendimientos, pero el proceso ha puesto en peligro la base de la que depende la propia mejora, la variabilidad (Pérez de la Vega, 2010).

Los recursos fitogenéticos (RRFF) para la alimentación y la agricultura, son cualquier material genético de origen vegetal de valor real o potencial para la agricultura y la alimentación. Se trata pues, de recursos naturales limitados y perecederos, que constituyen un patrimonio de la humanidad de valor incalculable y su pérdida es un proceso irreversible que supone una grave amenaza para la estabilidad de los ecosistemas, el desarrollo agrícola y la seguridad alimentaria del mundo, por lo que se debe garantizar su conservación y disponibilidad (Becerril *et al.*, 2010).

Estos RRFF se pueden clasificar en tres grandes categorías: Variedades de especies cultivadas, tanto tradicionales como comerciales, especies silvestres o asilvestradas afines a las cultivadas o con un valor actual o potencial y materiales obtenidos en trabajos de mejora genética (Esquinas-Alcázar, 1993).

Estos RRFF son básicos y esenciales para la alimentación y la agricultura, por lo que para garantizar la seguridad alimentaria mundial es totalmente necesario la conservación y el uso sostenible de los mismos. Las expectativas hablan de que para el año 2020 la población mundial alcanzará los 8 billones, con lo cual, para satisfacer esa futura demanda, los niveles actuales de producción deberían doblarse hasta alcanzar los 5 millones de toneladas por año (Rao, 2004). Para satisfacer esa necesidad de alimentos será necesario realizar un mejor uso de la diversidad vegetal existente a nivel mundial. Sin embargo, en la actualidad, los RRFF están desapareciendo a un ritmo sin precedente. Las razones de esta pérdida son muchas e incluyen la deforestación (alrededor de 15 millones de hectáreas de bosque tropical se pierden cada año) o el desarrollo de actividades tales como proyectos hidroeléctricos y grandes infraestructuras como la red de carreteras, urbanizaciones, etc. Los cambios en las prácticas agrícolas que van encaminada a la introducción de variedades nuevas y uniformes provocan, igualmente, la pérdida de gran diversidad vegetal.

Además, los RRFF constituyen la materia prima necesaria para el desarrollo de nuevas y mejores variedades, siendo pues, totalmente necesarios e imprescindibles para avanzar en los programas de mejora genética previos y para abordar nuevos objetivos, ya que para conseguir estos objetivos se requiere ampliar la base genética de los cultivos aprovechando el germoplasma

suministrado por los RRF. En los programas de mejora actuales se intenta aumentar la variabilidad genética mediante el uso de acervos genéticos primarios por introgresión de los genes deseados por cruzamiento sexual y selección.

Tester y Langridge (2010) indicaron que el aumento de la diversidad genética requiere una expansión de la base de germoplasma en los programas de mejora y que el aprovechamiento eficiente de los RRF requiere de mejorar las técnicas para determinar el valor y el uso de las accesiones individuales de las colecciones de germoplasma.

### 1.2.1. Banco de Germoplasma Mundial de Olivo

Una concienciación global acerca de esta pérdida de biodiversidad llevo a una acción internacional y en muchos países se empezaron a establecer programas de conservación mediante la implantación de bancos de germoplasma.

El principal objetivo a abordar es la colección y el mantenimiento de la mayor diversidad genética, con el fin de asegurar su continua disponibilidad. En este sentido, la conservación de germoplasma requiere de métodos de colección que capturen la máxima variabilidad y de métodos de conservación y regeneración que minimicen las pérdidas a lo largo del tiempo de conservación.

Los bancos de germoplasma son un instrumento básico y fundamental para la mejora de cualquier especie, y los motivos son básicamente dos: salvaguardan el patrimonio genético y estudian y evalúan los RRF. El patrimonio genético acumulado durante siglos de cultivo, mejora y expansión por diversas zonas del mundo puede perderse en especies con estructura varietal dinámica, por la aparición de nuevas variedades más adaptadas a las necesidades actuales. El olivo se está acercando a dicha situación y tiene un riesgo adicional de erosión genética, que puede hacer que se pierdan variedades de las zonas marginales, precisamente las más ricas en material vegetal (Barranco y Rallo, 1983). Por otra parte, es objetivo de los bancos de germoplasma el estudio y evaluación de las variedades en las mismas condiciones de cultivo. Los resultados de dichos estudios en la colección facilitan la elección de variedades para programas de experimentación varietal y de mejora genética, cuyos objetivos son proporcionar al sector variedades seleccionadas o nuevas (Caballero y Del Río, 2005).

En el caso del olivo en España, a pesar del gran patrimonio genético, las nuevas plantaciones se basan en pocas variedades con buenas características agronómicas. La creciente demanda de variedades adaptadas a una olivicultura moderna y competitiva son algunas de las causas de la escasa diversificación varietal. Todo ello fomenta la erosión genética y la posible pérdida irreversible de variedades tradicionales (Belaj *et al.*, 2013). Las variedades tradicionales podrían ser una fuente de diversidad muy útil ante nuevos cambios climáticos, enfermedades o plagas y para la obtención de nuevas y mejores variedades de olivo adaptadas a las nuevas técnicas de cultivo (Rallo *et al.*, 2008). Por todo ello, la salvaguarda del patrimonio vegetal acumulado es de vital importancia.

La Colección Mundial de Variedades de Olivo (integrada en el BGMO, CAP-UCO-IFAPA) está situada en el IFAPA, Centro Alameda del Obispo, Córdoba, y consta actualmente de cinco parcelas diferentes, con una superficie total cercana a las 9 ha. De ellas, tres parcelas están cultivadas en secano, una en regadío y la quinta sirve como campo de recepción y propagación (Caballero *et al.*, 2005). La ocupación de tanta superficie responde a dos objetivos fundamentales: conservar el patrimonio genético de la especie con la máxima seguridad posible y caracterizar las variedades que la componen con un gran número de criterios, tanto agronómicos y pomológicos como oleotécnicos.

Este banco lo inició el Centro de Mejora y Demostración de las Técnicas Oleícolas (CEMEDETO), creado en Córdoba para el desarrollo del proyecto FAO/INIA. En 1970, se introdujeron en la colección las primeras variedades. Desde entonces, se han recibido muchas más accesiones procedentes de prospecciones en España (Barranco y Rallo, 2000; Belaj *et al.*, 2004a, b; Barranco *et al.*, 2005a) y de las peticiones realizadas a Centros de Investigación y Desarrollo de diversos países del mundo olivarero. Estas prospecciones han puesto de manifiesto la gran riqueza varietal nacional, que consta de, al menos, 270 variedades de olivo.

En la actualidad el Banco mantiene en colección más de 885 accesiones procedentes de 24 países: Albania (20), Argelia (45), Argentina (8), Croacia (7), Chipre (5), Chile (13), Egipto (28), España (271), Francia (6), Grecia (24), Irán (10), Israel (7), Italia (157), Jordania (5), Líbano (14), Marruecos (3), Méjico (11), Portugal (10), Siria (115), Túnez (86), Turquía (18), Uruguay (1) y EEUU (6) (Belaj *et al.*, 2013). De ellas, 524 han sido ya confirmadas como auténticas, y por tanto constituyen ya una variedad.



## 1.2.2 Métodos de conservación de los Recursos Fitogenéticos

Tradicionalmente, han existido dos aproximaciones para la conservación del material vegetal, *in situ* y *ex situ*. Estos diferentes métodos de conservación no son excluyentes, sino complementarios, ya que juntos compensan las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

### 1.2.2.1. Conservación *in situ*.

La estrategia de conservación más deseable es proteger y nutrir a las plantas en sus ecosistemas naturales (Bhojwani y Dantu, 2013b). La conservación *in situ* implica mantener las poblaciones silvestres en sus hábitats naturales donde se conservan y evolucionan sin intervención del ser humano (Llácer y Badenes, 2010). Una modalidad de conservación *in situ* es la conservación 'on farm', en la que poblaciones cultivadas o variedades locales son conservadas por los agricultores de la zona. Cubero *et al.* (2006) señala una serie de ventajas de este tipo de conservación, entre las que destacan la continuidad de la evolución natural, tanto de las plantas silvestres como de las cultivadas y la permanencia de un gran número de genes de interés en las poblaciones, muchos de los cuales se pierden en los procesos de mejora genética, y que, para ciertas especies, puede ser la única forma de conservación. Este tipo de conservación, además de salvaguardar el germoplasma, preserva culturas y hábitats naturales que integran lógicamente a los RRF. Sin embargo, presenta una serie de dificultades prácticas, ya que es difícil proyectar la conservación de un gran número de especies silvestres o de tipos locales en campos de agricultores, rodeados de agricultores que practican una agricultura con otras variedades diferentes y sobre todo con mejores resultados económicos. Además, en los países subdesarrollados, que, por su abundancia en especies silvestres, es donde mejor podría realizarse este tipo de conservación, no se puede llevar a cabo por su situación económica y social (Cubero *et al.*, 2006).

En los últimos años, a pesar de estas dificultades, muchos países están realizando grandes esfuerzos para la conservación *in situ* de sus RRF. Algunos ejemplos son la conservación del palmeral de Elche (única palmera datilera en Europa), la conservación de especies silvestres de peral y manzano, en las reservas naturales de Alemania (Cubero *et al.*, 2006), o la conservación de ciruelos y castaños en Turquía (Tan y Tan, 2002). También muchas variedades antiguas minoritarias de olivo se están conservando en Italia, aunque existe un grave riesgo de que se pierdan si no se realiza una adecuada caracterización y se complementa con métodos de conservación *ex situ* (Muzzalupo *et al.*, 2009).

### 1.2.2.2. Conservación *ex situ*

Alternativamente, la biodiversidad puede ser conservada fuera de sus hábitats naturales, es lo que se conoce como conservación *ex situ*, y se lleva a cabo en instalaciones creadas para ese fin. Generalmente, este método es usado para salvaguardar poblaciones en peligro de desaparición debido a la erosión genética y al desarrollo de la agricultura comercial, que hacen desaparecer los sistemas tradicionales que favorecían la diversidad agrícola. La mayor ventaja de este modo de conservación es que facilita la evaluación del germoplasma conservado (Llácer y Badenes, 2010).

El avance biotecnológico en el cultivo *in vitro*, ha permitido que esta tecnología constituya una alternativa eficaz de conservación *ex situ* (Véase Capítulo III: Conservación *in vitro* pág. 187). Sin embargo, para poder realizar la conservación *in vitro* de los RRFF, se requiere la puesta a punto de los protocolos de micropropagación.

# CAPITULO II: MICROPROPAGACIÓN



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## II 1: INTRODUCCIÓN

La micropropagación o propagación *in vitro*, es una herramienta biotecnológica de gran utilidad para la producción de plantas genéticamente homogéneas, que presenta importantes ventajas con respecto a la propagación vegetativa tradicional, pero también puede presentar algunos inconvenientes (George y Debergh, 2008).

Entre sus principales ventajas destacan: la rapidez del proceso en comparación con la propagación vegetativa convencional; la pequeña cantidad de material vegetal que requiere debido a la utilización de propágulos de pequeño tamaño; la óptima calidad sanitaria del material producido, pudiéndose obtener material libre de enfermedades; es un proceso independiente de la estacionalidad, con lo que se puede obtener gran producción a lo largo de todo el año en unas condiciones muy controladas; permite manipular grandes cantidades de material vegetal en espacios muy reducidos, suponiendo un ahorro en espacio en invernaderos; es posible la producción de clones de muchos tipos de plantas que por propagación vegetativa ocurriría de forma más lenta o incluso sería imposible (George y Debergh, 2008).

Entre sus inconvenientes se encuentran: pueden aparecer problemas de variabilidad genética (variación somaclonal) dependiendo de las condiciones de cultivo y del material vegetal utilizado (Bairu *et al.*, 2011); la capacidad de regeneración del cultivo puede perderse tras sucesivos cultivos; algunas especies presentan problemas para su establecimiento *in vitro*, enraizamiento y aclimatación, lo que requiere un gran trabajo previo de investigación para poner a punto un protocolo válido, siendo esto a veces económicamente costoso (George y Debergh, 2008).

### II.1.1. Fases de la micropropagación

A la hora de establecer un protocolo de micropropagación para una especie o variedad, lo primero es la elección del material con el cual se va a trabajar. Una vez el material vegetal está seleccionado se inicia el proceso de micropropagación de acuerdo a una serie de fases.

Murashige (1974), definió 3 etapas o fases en la propagación *in vitro* de plantas mediante cultivo de tejidos, sin embargo, otros autores consideran que los tratamientos y preparación de la planta madre deben ser considerados como una etapa más y, además, la última fase de preparación

para el trasplante a suelo la dividían en dos: elongación y enraizamiento *in vivo*, y por tanto establecen 5 fases, siendo la fase preparativa la fase 0 (Debergh y Maene, 1981). Bhojwani y Razdan (1996) y George y Debergh (2008) diferencian también 5 etapas o fases, denominadas: Fase 0: preparativa; Fase 1: Inicio; Fase 2: Multiplicación; Fase 3: Enraizamiento *in vitro*; Fase 4: Aclimatación.

### II.1.1.1. Preparación de la planta madre

Esta fase consiste en la aplicación de una serie de tratamientos a la planta madre que será utilizada como fuente de los explantos, para facilitar la realización del cultivo *in vitro*, y aunque no son estrictamente necesarios, son recomendados para mejorar la eficacia de la micropropagación (Debergh y Read, 1991; Bhojwani y Dantu, 2013a).

Se distinguen dos tipos de pretratamientos de la planta madre en función de su objetivo:

#### a) Pretratamientos para mejorar el estado sanitario de la planta madre

Consisten en programas de tratamientos para conseguir un crecimiento óptimo de la planta madre, prevenir enfermedades y reducir el nivel de contaminación (George y Debergh, 2008).

Según la procedencia del material vegetal con el que se inicia el cultivo *in vitro* (directamente del campo, de un invernadero o de una cámara de cultivo en condiciones controladas), estos pretratamientos pueden variar, ya que, si el material vegetal procede de una cámara de cultivo su nivel sanitario es muy alto, lo que facilita su establecimiento *in vitro*. Por otro lado, un material que procede directamente de campo, dependiendo de la estación del año, puede presentar unos niveles muy altos de contaminación superficial e incluso enfermedades en sus tejidos que pueden hacer muy problemático su establecimiento *in vitro* (Bhojwani y Dantu, 2013a).

Así mismo, es importante tener en cuenta el estado nutricional de la planta madre, ya que los explantos más adecuados para el cultivo *in vitro* son, generalmente, los obtenidos de plantas que tiene un adecuado estado nutricional (Read y Preece, 2003).

Los principales aspectos a tener en cuenta para un adecuado estado sanitario de las plantas madre, se resumen a continuación:

1. Es aconsejable que las plantas madre se mantengan en invernadero o cámara de crecimiento para reducir al máximo el nivel de contaminación.

2. Diseñar un programa de tratamientos con insecticidas y fungicidas con el fin de prevenir enfermedades y ataques de parásitos.
3. Aplicar un programa adecuado de abonado que permita un crecimiento óptimo de las plantas madre.
4. No mojar la parte aérea. Es recomendable el riego por goteo o el cultivo en un sistema hidropónico.
5. La duración mínima de estos pretratamientos debe comprobarse para cada especie, siendo recomendable realizarlos al menos un mes antes del cultivo *in vitro*.

b) Pretratamientos para forzar cambios fisiológicos en el material vegetal

La importancia de la fase 0 no se limita a procurar una mejora del estado sanitario, también se pueden diseñar pretratamientos que permitan modificar la fisiología del material vegetal, permitiendo una mejor respuesta en cultivo (Debergh y Read, 1991; Bhojwani y Dantu, 2013a).

Los principales parámetros a tener en cuenta son: la luz, la temperatura y los reguladores del crecimiento.

*Luz:* El control del fotoperiodo de un invernadero o en un fitotrón abre posibilidades de una producción más homogénea a lo largo del año. Esto es especialmente interesante para aquellas especies cuya floración está bajo un control fotoperiódico. Hilding y Welander (1976), observaron que los explantos de *Begonia hiemalis*, sólo producían brotes adventicios y raíces cuando se sometían a fotoperiodo de 15-16 horas. Similares resultados obtuvieron Simmonds y Nelson (1989), citado por Preece (2008). Watad *et al.* (1992), trabajando con *Protea obtusiolia*, realizaron pretratamientos de etiolación a la planta madre que resultaron ser efectivos para prevenir la oxidación y necrosis de los explantos, logrando así su establecimiento *in vitro*.

*Temperatura:* Un ejemplo clásico es la necesidad de frío para romper el reposo en bulbos y ciertos árboles. La conservación de bulbos a 4-5 °C durante varias semanas puede mejorar la micropropagación de estas especies (Ko, 1986, citado por Preece, 2008). Por otro lado, el tratamiento de plantas madre de especies leñosas cultivadas en macetas a

4-5 °C puede producir, después de dicho tratamiento, un nuevo flujo de crecimiento. Este tipo de tratamientos puede permitir la aceleración del proceso de establecimiento *in vitro* y la mejora de la respuesta a todo el protocolo, pues este tratamiento simula el tiempo requerido en la naturaleza, por dicha planta, para romper el reposo de las yemas (Debergh y Read, 1991). Puddephat *et al.* (1999) comprobaron que la embriogénesis en bulbos de cebolla, mejora en torno a 10 veces más, si los stocks de plantas madres eran mantenidos a 15 °C en los invernaderos en lugar de a 10 °C.

*Reguladores de crecimiento:* La respuesta de un explanto durante la fase de establecimiento o, incluso, durante la fase de multiplicación, puede verse influenciada por un tratamiento apropiado de la planta madre o del explanto mismo antes de su cultivo (Debergh y Read, 1991). La aplicación de giberelinas y/o citoquininas es a menudo muy efectiva para inducir cierto grado de rejuvenecimiento en algunas especies leñosas, permitiendo el inicio de los explantos, antes imposible. Es el caso descrito por Preece (1987), el cual observó que un pretratamiento a la planta madre con ácido giberélico podía inhibir la formación de brotes adventicios y el enraizamiento cuando explantos de hojas de tomate eran cultivados con BA. Por su parte, Franclet *et al.* (1987), comprobaron que la aplicación de BA tenía un efecto de rejuvenecimiento sobre los esquejes de varias especies facilitando así su establecimiento *in vitro*. Read y Qiguang (1985), aplicaron durante esta fase un pretratamiento a ramas de *Castanea* y *Aesculus* combinando reguladores de crecimiento con otros compuestos (Citrato de 8-hidroxi-quinolina, BA, GA<sub>3</sub>) y observaron que se mejoraba el establecimiento *in vitro* de los explantos. Resultados similares obtuvieron Yang y Read (1997), con *Acanthopanax sieboldianus*, planta perteneciente a la familia de las *Araliaceae*. Se trata de una planta leñosa difícil de micropropagar, pero con un pretratamiento con una solución igual a la anterior citada, pero sin GA<sub>3</sub> se mejoró notablemente el protocolo de micropropagación.

Frecuentemente la inducción de yemas axilares, provocando un incremento de la tasa de multiplicación, puede ser estimulada por pretratamientos con reguladores de crecimiento (Preece, 2008). Así, Pérez Francés *et al.* (2001), observaron un considerable aumento en la producción de yemas axilares en las plantas tratadas con BA (200 mg/L), aunque no se apreció mejora significativa en las fases de establecimiento o multiplicación.



Las giberelinas han sido usadas también para facilitar el crecimiento de las plantas madres e incrementar así el número de secciones nodales con el cual poder trabajar después (Offord *et al.*, 1992).

#### II.1.1.2. Establecimiento de los cultivos asépticos

En esta fase se pretende la obtención de cultivos libres de infecciones, con un alto grado de supervivencia y que muestren un rápido crecimiento (Murashige, 1974), debiéndose tener en cuenta una serie de factores (Bhojwani y Dantu, 2013a):

a) Elección del explanto

El tipo de explanto elegido variará dependiendo del objetivo del cultivo. Así, si se pretende conseguir multiplicación por brotes axilares, sólo se podrán utilizar explantos que tengan yemas vegetativas preformadas, mientras que, si la multiplicación se hace mediante la inducción de yemas adventicias, los explantos podrán proceder de porciones de raíces, tallos, hojas, etc. Finalmente, si el objetivo es la producción de plantas libres de virus, obligatoriamente habrá que iniciar los cultivos a partir de meristemas (Bhojwani y Razdan, 1996). El estado de desarrollo y la edad de la planta madre pueden también ser factores críticos a la hora de la elección del material vegetal.

b) Aislamiento, esterilización y siembra *in vitro*

Para el aislamiento *in vitro* se pueden utilizar dos tipos de material, plantas cultivadas en condiciones controladas (invernadero o cámara de crecimiento) o plantas cultivadas en campo. Si el aislamiento se realiza a partir de una planta cultivada en campo, existen muchas más probabilidades de que se produzcan infecciones, pero si, a pesar de los inconvenientes, es necesario utilizar este material, se debe tener en cuenta que las yemas deben aislarse una vez estén en crecimiento activo, pudiéndose usar ramas a las que se les haya inducido la brotación en el interior (Pierik, 1990a).

Los elevados porcentajes de contaminación que se producen utilizando material cultivado en campo hacen generalmente necesario utilizar material procedente plantas cultivadas en condiciones controladas.

La asociación explanto-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los explantos durante su cultivo *in vitro*, conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos, que se pueden encontrar en la superficie de los explantos, contaminaciones exógenas, o en su interior, contaminaciones endógenas (Mronginski y Roca, 1991). La contaminación exógena puede ser eliminada por desinfección, para ello, los explantos han de ser esterilizados superficialmente antes de su cultivo en el medio nutritivo (Bhojwani y Razdan, 1996). Existen diversos agentes desinfectantes, siendo las soluciones de hipoclorito (sódico o cálcico) las que han probado su efectividad en la mayoría de los casos. La efectividad de estos tratamientos, al igual que los daños producidos en los tejidos, es esencialmente una respuesta de tiempo y dosis, en consecuencia, se debe buscar un equilibrio según el tipo de explanto que se trate (Bhojwani y Razdan, 1996). Respecto a las contaminaciones endógenas, son difíciles de eliminar, pudiéndose incluir en el medio de cultivo agentes funguicidas o bactericidas (Mronginski y Roca, 1991).

Por otra parte, cuanto menor sea el tamaño del explanto, menor tasa de supervivencia y de crecimiento inicial tendrá (Bhojwani y Razdan, 1996), pero más fácil será su desinfección (Murashige, 1974).

Además de la contaminación, un grave problema en el cultivo *in vitro* de algunas especies es la oxidación de compuestos fenólicos que se produce en la superficie de corte de los explantos (George, 2008). Estas sustancias pueden ser tóxicas e inhibir el desarrollo de los explantos, siendo este problema especialmente común en tejidos adultos de plantas leñosas (Bhojwani y Razdan, 1996). La adición al medio de carbón activado, ácido ascórbico o ácido cítrico puede contribuir a solucionarlo (Grattapaglia *et al.*, 1998).

Por otra parte, en el diseño del medio de establecimiento óptimo para una especie hay que tener en cuenta varios factores, como la formulación salina empleada, la fuente de carbono, las vitaminas y fundamentalmente, por ser los que generalmente producen cambios más drásticos, los reguladores de crecimiento. Además, diversos factores tales como la luz y la temperatura deben ser controlados de forma adecuada durante esta fase.

El final de la fase de establecimiento se produce cuando los brotes formados, libre de infecciones alcanzan el tamaño necesario para aislarse y cultivarse en el medio de multiplicación.

Cuando los brotes axilar o adventicio obtenidos son muy pequeños y/o se desarrollan lentamente, puede ser necesario uno o varios subcultivos a medio fresco antes de pasar a la fase de multiplicación, para que alcancen el tamaño mínimo deseado.

### II.1.1.3. Multiplicación

El objetivo de esta fase es obtener un rápido incremento de órganos u otras estructuras que finalmente den lugar a plántulas. Este incremento se puede obtener por estimulación del crecimiento de yemas axilares, mediante la inducción de brotes adventicios o por formación de embriones somáticos. La elección del método de multiplicación es de gran importancia ya que puede afectar a la estabilidad genética de las plántulas producidas (Murashige, 1974).

En la propagación mediante yemas axilares, el material de partida lo constituyen meristemas, ápices o yemas, y únicamente es necesario provocar el desarrollo de las yemas ya existentes (Hu y Wang, 1983). Con este método se obtienen las tasas de multiplicación más bajas, ya que el número máximo de brotes estará limitado por el número de yemas presentes en el propágulo (Debergh y Maene, 1981).

La inducción de brotes adventicios, así como la embriogénesis somática, son vías más rápidas y proporcionan mayores tasas de multiplicación, pero también presentan mayores problemas de inestabilidad genética del material obtenido (Murashige, 1974; Debergh y Maene, 1981; Hu y Wang, 1983).

Los factores principales a tener en cuenta para el control de la tasa de multiplicación son:

a) Composición química del medio

El medio utilizado para la fase de multiplicación depende de la especie, cultivar o tipo de cultivo, siendo necesario experimentar para ajustar las concentraciones y optimizar las tasas de multiplicación (Murashige y Skoog, 1962).

En esta fase, reviste especial importancia la relación citoquinina-auxina. El concepto general sobre la regulación de la organogénesis por dos grupos de hormonas, citoquininas y auxinas (Machakova *et al.*, 2008 y Van Staden *et al.*, 2008), es universalmente aplicable. De acuerdo con estos autores, la organogénesis está regulada por las concentraciones relativas de estos dos grupos de hormonas, de forma que una relación citoquinina/auxina alta promovería la formación de brotes, mientras que la relación inversa favorecería la formación de raíces. Dicha relación varía dependiendo del método de multiplicación elegido. Para la inducción de brotes adventicios se recomiendan concentraciones moderadas de ambas hormonas, sin embargo, para el desarrollo de yemas axilares son necesarias altas concentraciones de citoquininas, añadiéndose a menudo a bajas dosis de auxina que, aunque no mejoren las tasas de multiplicación, si mejoran el crecimiento de los brotes. Por último, para la multiplicación a través de callo, se requieren altas dosis de auxina que provoquen la formación de callo y que tendrán que ser fuertemente reducidas o excluidas del medio, para promover la embriogénesis somática (Murashige, 1974; Hu y Wang, 1983; Machakova *et al.*, 2008 y Van Staden *et al.*, 2008).

b) Técnicas y condiciones de cultivo

El estado fisiológico del material vegetal durante su multiplicación puede tener efectos importantes sobre la tasa de multiplicación y condicionar, también, las restantes fases del protocolo.

El efecto de los subcultivos sobre la tasa de multiplicación varía según la especie (Naik *et al.*, 2003). Autores como Hu y Wang (1983) y Mc Cown y Amos (1979) han puesto de manifiesto que el estado recalcitrante de muchas especies, que impide aumentar la tasa de multiplicación, puede ser gradualmente modificado a través de sucesivos subcultivos,

para lo cual conviene acortar el periodo entre subcultivos, puesto que, cuando los explantos se subcultivan en periodos relativamente cortos, el crecimiento de los tallos puede llegar a ser más rápido y su multiplicación más fácil de estimular. Por otro lado, autores como Grant y Hammatt (1999), concluyeron que el rejuvenecimiento de los tejidos maduros, que provocaban un aumento en la tasa de multiplicación, estaba más relacionado con el tiempo de cultivo en sí que con el número de subcultivos realizados, de tal forma que cuanto mayor era el tiempo de cultivo mejores eran las tasas de producción de brotes. De esta forma, se reduce el número de subcultivos y los posibles problemas de variación somaclonal y cambios epigenéticos que pueden ir asociados a ello (Véase Capítulo II, apartado II.1.5. Variación somaclonal pág. 99).

Por el contrario, en el trabajo de Naik *et al.* (2003) se observó, que, aunque el número de subcultivos no afectaba a la elongación de los brotes, sí que la capacidad de los brotes de proliferar y de enraizar disminuía conforme aumentaba el número de subcultivos. Mismos resultados obtuvieron Norton y Norton (1986) trabajando con especies de *Rosaceas*, los cuales achacaron esta pérdida de capacidad de brotación con el número de subcultivos a la exposición repetitiva de los explantos a ciertas cantidades de citoquininas al inicio de cada subcultivo.

En cuanto al uso de medios líquidos, estos pueden mejorar sensiblemente la tasa de multiplicación de diversas especies durante su micropropagación (Thorpe *et al.*, 2008). Una de las ventajas del uso de este tipo de medio es que permite un contacto total entre los nutrientes del medio y el explanto, pudiendo éste incorporar los nutrientes a través de más superficie de contacto y de una forma más eficiente. Además, estimula la elongación de los brotes (Debergh y Maene, 1981). Es importante la agitación del medio para favorecer su aireación y tener en cuenta que un cultivo prolongado en un medio líquido puede resultar en la aparición de tallos hiperhídricos (Thorpe *et al.*, 2008).

Tras la multiplicación, puede ser necesaria una fase de elongación, bien para conseguir material uniforme que permita realizar el enraizamiento *ex vitro*, tal y como recomiendan Debergh y Maene (1981), o porque no se alcance el tamaño mínimo necesario para realizar el enraizamiento *in vitro*. En ambos casos, la transferencia a un medio sin citoquininas y suplementado con auxinas, o libre de reguladores de crecimiento, estimula la elongación de los brotes (George y Debergh, 2008).

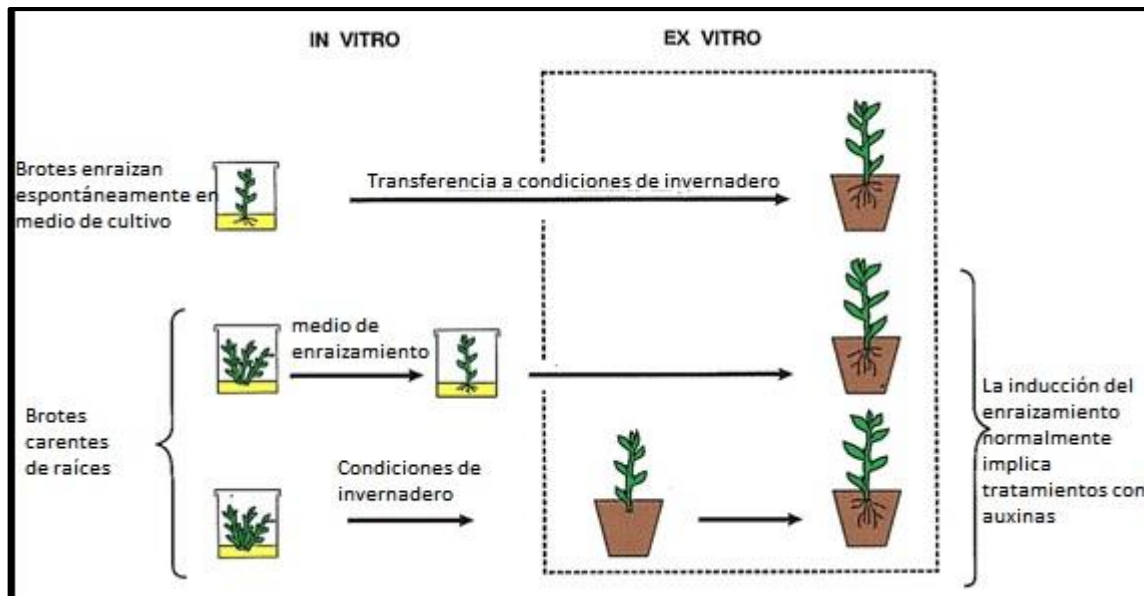
### II.1.1.4. Enraizamiento

Una vez finalizada la fase de multiplicación y los brotes producidos alcancen el tamaño adecuado, el siguiente paso en los protocolos de micropropagación consiste generalmente en la inclusión de una fase de enraizamiento, en la cual, además del enraizamiento de la plántula se realiza la conversión del estado heterótrofo al autótrofo y el endurecimiento para soportar las condiciones de estrés (Murashige, 1974). Esta fase puede llevarse a cabo *in vitro* o *ex vitro*, para después aclimatar las plántulas en condiciones de invernadero.

En ocasiones, los brotes que se encuentran en medios de cultivo en fase de proliferación de forma espontánea empiezan a enraizar, sin necesidad de añadir ningún componente al medio de cultivo. En este caso los explantos ya enraizados *in vitro*, son transferidos a condiciones *ex vitro*, para completar su proceso de aclimatación (**Figura 3**). Sin embargo, esto son casos excepcionales, y lo que se entiende propiamente como enraizamiento *in vitro*, es que los explantos son recultivados en un medio específico de enraizamiento, con una alta relación auxina/citoquinina, siendo al AIA (natural), AIB y ANA (sintéticas) las auxinas más usadas (Machakova *et al.*, 2008). El enraizamiento *in vitro*, puede realizarse en una o en dos etapas. En el primer caso, la inducción y la elongación de las raíces se realiza en un medio con concentraciones relativamente bajas de auxinas y, frecuentemente, con carbón activado. En el segundo caso, la inducción de las raíces se realiza cultivando los brotes durante algunos días en un medio con alto contenido en auxina y pasándolos posteriormente a un medio basal, sin reguladores de crecimiento, en el que tiene lugar la elongación de las raíces. A menudo, una reducción de la concentración de sales en el medio, suele ser beneficiosa (Hu y Wang, 1983).

Debergh y Maene (1981) recomendaron el enraizamiento *ex vitro* siempre que éste fuese posible. En este caso, los propágulos serían tratados como microestaquillas, que tras el tratamiento auxínico, pasarían a enraizar en el sustrato adecuado. Este enraizamiento permite disminuir las labores manuales y solucionar algunos problemas que con frecuencia aparecen durante la aclimatación, por ejemplo, la mala absorción y circulación de agua derivada de las débiles y malformadas conexiones vasculares de la zona de transición raíz-tallo de algunas plantas enraizadas *in vitro* (Grout y Aston, 1977), o la falta de pelos radicales en las raíces formadas en agar, que a menudo se necrosan provocando una parada en el crecimiento de la planta (Debergh y Maene, 1981).

Driver y Shuttle (1987) proponen realizar el enraizamiento y la aclimatación simultáneamente, trasplantando las microestaquillas directamente al sustrato, después de una etapa previa de endurecimiento *in vitro*.



**Figura 3:** Tipos de enraizamiento (George y Debergh, 2008).

La fase de enraizamiento constituye uno de los puntos críticos de los protocolos de micropropagación según George y Debergh, (2008). Tanto si el enraizamiento se realiza *in vitro* como *ex vitro*, es importante considerar factores como los reguladores de crecimiento, carbohidratos, genotipo, tamaño del explanto y las condiciones medioambientales de temperatura y luz.

El balance citoquinina/auxina es la llave de la morfogénesis, así, en esta fase, las auxinas son los reguladores más importantes, ya que son necesarias para el proceso de inducción de los primordios radicales, aunque no se requieren o pueden inhibir, su crecimiento posterior. Por lo que hay que tener en cuenta tres cosas básicas para cada cultivo, el tipo de auxina a emplear, la concentración requerida y la duración del tratamiento.

Los carbohidratos son importantes para suministrar la energía necesaria para todos los procesos que conducen a la formación de raíces (George y Debergh, 2008), aunque su papel en el enraizamiento no está del todo definido. En general, para el enraizamiento *in vitro* se recomienda reducir la concentración de sacarosa empleada en el medio de proliferación (Montaño *et al.*, 2009).

Autores como Kooi *et al.* (1999), Pospisilova *et al.* (1999) y Xiao *et al.* (2010) apoyan esta idea, pues observaron que una reducción en el contenido de los azúcares mejoraba el enraizamiento. Contrariamente, altas concentraciones de sacarosa resultaron ser beneficiosas para el enraizamiento en alcornoque (Romano *et al.*, 1995), manzano (Calamar y De Klerk, 2002) y algarrobo (Custodio *et al.*, 2004).

Además, tan importante como la concentración, es el tipo de azúcar. En la mayoría de los trabajos el azúcar empleado es la sacarosa, probablemente porque es el principal carbohidrato en el floema de muchas plantas (Fuentes *et al.*, 2000). Sin embargo, las invertasas, enzimas liberadas por los explantos al medio, degradan la sacarosa en glucosa y fructosa (Calamar y De Klerk, 2002), por lo que los explantos están usualmente expuestos a una mezcla de azúcares. Otros azúcares como el manitol, la glucosa y el sorbitol son también comúnmente empleados (Custodio *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2007; Yaseen *et al.*, 2009; Montañaño *et al.*, 2009).

La capacidad de los brotes para regenerar raíces adventicias está fuertemente influenciada por el genotipo. Las especies herbáceas suelen ser más fáciles de enraizar que las leñosas. Pero, además, dentro del mismo género, se pueden encontrar especies, y dentro de la misma especie, variedades, fáciles de enraizar y otras que son extremadamente difíciles, y que se consideran recalcitrantes. Montañaño *et al.* (2009), llegaron a la conclusión que de entre los distintos factores que afectaban a la capacidad de enraizamiento de la vid, el principal era el genotipo, encontrando diferencias de hasta un 30% en función de la variedad empleada.

Las diferencias observadas entre variedades, en cuanto a la capacidad de formar raíces, ha sido atribuida, principalmente, a diferencias en el metabolismo auxínico. Otros factores, como la entrada y transporte de auxinas en el brote, pueden también contribuir a las diferencias observadas (Ludwig-Müller, 2003).

Para que los brotes sean adecuados para un tratamiento de enraizamiento deben tener una cierta longitud mínima. El hecho de que explantos mayores sean más fáciles de enraizar que otros de menor tamaño, puede atribuirse a un mayor contenido de reserva en los primeros.

Es conveniente eliminar las hojas de la zona basal del brote con el fin de facilitar el enraizamiento. En los brotes con hojas en la zona basal, la auxina penetra a través del corte en la base del brote y no por la epidermis del microtallo. Guan y De Klerk (2000) han demostrado que la eliminación de las hojas permite la entrada de auxina por las zonas de corte de la base de los



peciolos. Esto permite la disminuir la concentración de auxina necesaria para el enraizamiento debido a una mayor eficacia en la penetración del regulador.

La capacidad de enraizamiento de los brotes se puede ver influenciada por el número de subcultivos que permanece el material en la fase de multiplicación. En algunas especies, la formación de raíces adventicias disminuye después de un determinado número de subcultivos (Naik *et al.*, 2003), en otras todo lo contrario, esto es especialmente observado en especies leñosas, en las que un mayor número de subcultivos puede conducir a un rejuvenecimiento de los brotes facilitando su enraizamiento (Grant y Hammatt, 1999).

El correcto desarrollo de las raíces requiere una adecuada aireación. Este aspecto, garantizado en el enraizamiento *ex vitro*, especialmente si se utiliza un sustrato suficientemente poroso, puede estar limitado en los medios con agar, ya que este dificulta el suministro de oxígeno a los tejidos.

En cuanto al fotoperiodo, es conocido que la formación de raíces adventicias se favorece en condiciones de oscuridad o de poca intensidad lumínica, aunque existen excepciones (George y Davies, 2008). Esto aparentemente es debido a que los niveles naturales de auxinas se incrementan en esas condiciones, mientras que en presencia de luz disminuye.

Tanto en la propagación vegetativa convencional, como en la micropropagación, la formación de raíces es dependiente de la temperatura. Esto hay que tenerlo en cuenta tanto en el enraizamiento *in vitro* como *ex vitro* (George y Davies, 2008). Hay plantas que enraízan mejor a temperaturas medias (Chalupa, 1987; Hatano *et al.*, 1988 citado por George y Davies, 2008), mientras que, en otros casos, se requieren de altas temperaturas (Kataeva y Butenko, 1987; Zimmerman, 1984).

#### II.1.1.5. Aclimatación

La aclimatación es una etapa fundamental de la micropropagación, porque dependen de ella la eficiencia del proceso y la calidad final de las plantas producidas *in vitro*, permitiendo que la planta alcance un crecimiento autotrófico normal.

Muchas plantas micropropagadas no sobreviven cuando son transferidas desde las condiciones *in vitro* a *ex vitro*. Esto es así porque los invernaderos presentan baja humedad relativa, altos niveles de luz y un ambiente séptico, condiciones mucho más estresantes para las plantas

micropropagadas que las que se dan *in vitro* (Preece y Sutter, 1991; Hazarika, 2003). Las condiciones especiales en las que se encuentran las plántulas durante el cultivo *in vitro* provocan en ellas una morfología, anatomía y fisiología anormal. Después de la transferencia a condiciones *ex vitro*, estas plántulas fácilmente podrían verse afectadas por los cambios bruscos de las condiciones ambientales, por lo que necesitan un período de aclimatación para corregir dichas anomalías.

A pesar de que la aclimatación es una etapa que se suele llevar a cabo tras el enraizamiento *in vitro*, en el caso del enraizamiento *ex vitro*, puede ocurrir al mismo tiempo, lo que simplifica el procedimiento y los costes (Zimmerman, 1987). Das *et al.* (1990) y Sharma *et al.* (1999), observaron que el realizar de forma conjunta los procesos de enraizamiento *ex vitro* y aclimatación mejoró el rendimiento respecto a realizar el enraizamiento *in vitro* y posteriormente la aclimatación. Todas las plántulas, tanto si el enraizamiento es *in vitro* o *ex vitro*, deben someterse a un proceso de aclimatación para readaptarse a las condiciones ambientales *in vivo* durante la cual las plántulas enraizadas desarrollan raíces y hojas plenamente funcionales y el crecimiento de los brotes se inicia o se acelera.

Aunque los detalles específicos de la aclimatación pueden variar, hay ciertas generalizaciones a tener en cuenta. La eficiencia del proceso de adaptación depende, entre otros factores, de la elección del sustrato y de la obtención de una relación adecuada entre los componentes de la mezcla, que asegure una buena supervivencia en el trasplante (Pospisilova *et al.*, 1999). Dicho sustrato deberá permitir la formación de un buen sistema radicular. Se trata de materiales sólidos y porosos, de origen natural o sintético, que, solos o en mezclas, permiten un crecimiento adecuado de las plantas en condiciones aun controladas.

Smith *et al.* (1990, 1991), sugieren también un papel importante de retardantes de crecimiento como el paclobutrazol, flurprimidol y ancimidol en los procesos de aclimatación. El Paclobutrazol (PBZ), añadido en el medio de enraizamiento, reduce la abertura de estomas, aumenta la cera epicuticular, provoca engrosamiento de tallos y raíces, provoca mayor producción de clorofila en las hojas y reduce el marchitamiento después del trasplante.

El uso de antitranspirantes, como la parafina y el glicerol, también se ha empleado en procesos de aclimatación con resultados dispares, ya que, aunque mejora la supervivencia *ex vitro* de los explantos, sobre todo en herbáceas, presentan un fuerte efecto de fitotoxicidad e interferencia con la fotosíntesis que provoca el efecto contrario (Hazarika, 2003).

La micropropagación autotrófica es también un método para reducir costos y mejorar la eficiencia del proceso de aclimatación. El objetivo es modificar el fenotipo de las plántulas cultivadas *in vitro*, que presentan hojas con pocos estomas y fotosintéticamente poco activas, para hacerlas autotróficas y así reducir las pérdidas de material en su aclimatación. Para ello, se siguen diversas estrategias como: reducir la concentración de oxígeno en el medio, aumentar la intensidad de luz y/o incrementar la concentración de CO<sub>2</sub>. Con estas pautas se consigue mejorar la capacidad fotosintética de las hojas, pues se reduce el ratio de fotorrespiración y las pérdidas en cuanto a efectividad de la fotosíntesis derivado de ella. El cultivo de plantas bajo este sistema provoca que las plantas presenten tasas de fotosíntesis equivalentes a las que muestran plantas de semilleros, debido a que presentan hojas persistentes y, por tanto, más activas fotosintéticamente (Hazarika, 2003). Alternativamente, también se reduce o se elimina el azúcar del medio de cultivo, lo cual es una ventaja adicional, pues se reduce también la contaminación microbiana (Fujiwara *et al.*, 1988). Estos procedimientos, por lo tanto, pueden utilizarse para facilitar la transferencia exitosa de plantas derivadas del cultivo *in vitro* a condiciones *ex vitro*.

### II.1.2. Métodos de micropropagación

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

1. Organogénesis Axilar.
2. Organogénesis Adventicia.
3. Embriogénesis somática.

En los dos últimos métodos se produce la formación de *novo* de un meristemo que puede producirse bien a) directamente, a partir de porciones de tejido (explantos) de la planta madre o b) indirectamente, vía callo.

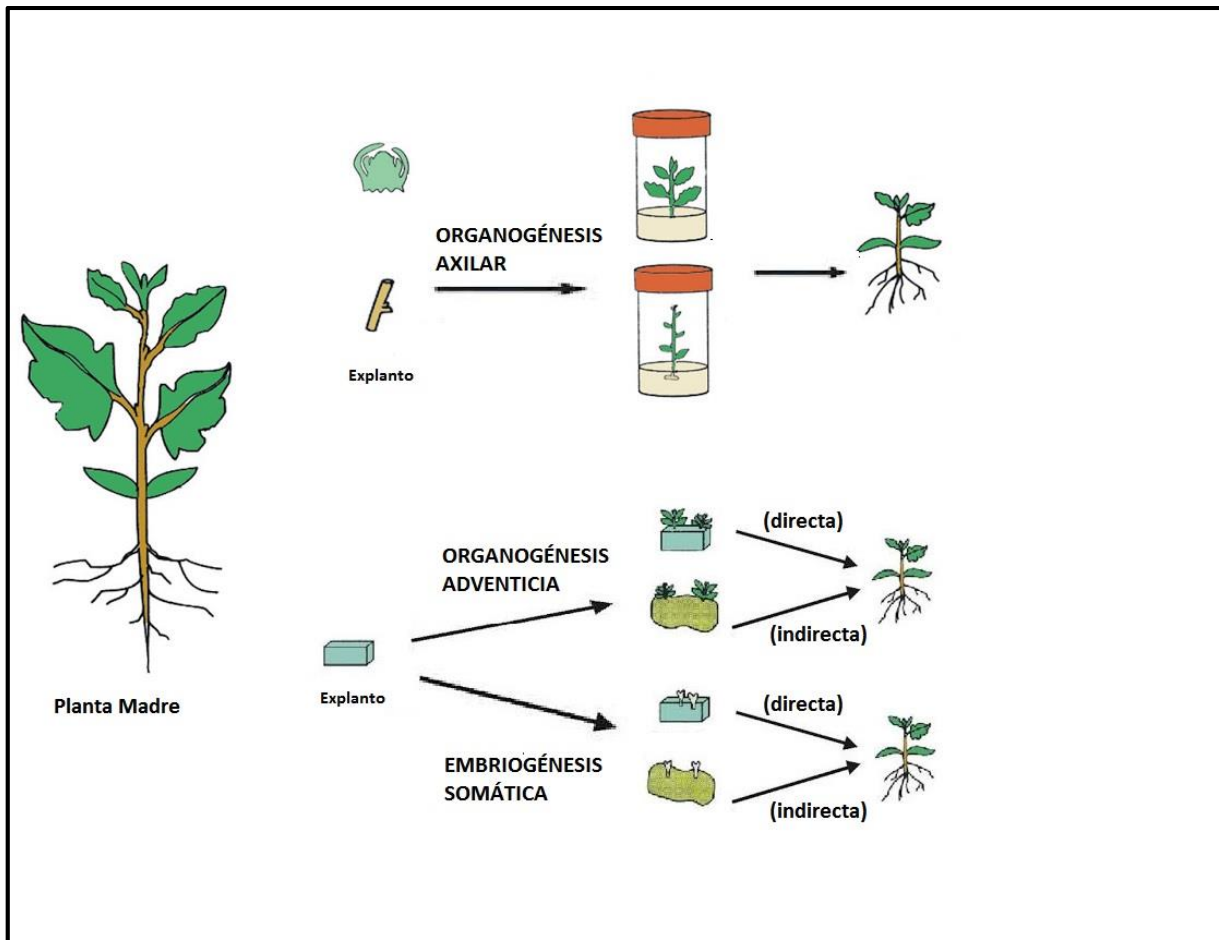


Figura 4: Principales métodos de micropropagación.

En cuanto a la organogénesis axilar, incluye diferentes técnicas en las que se busca la estimulación de los meristemos preexistentes en los diferentes órganos de la planta (meristemos apicales, meristemos axilares, etc.) para que se desarrollen y usar los brotes obtenidos como propágulos o unidades de propagación durante el desarrollo de la fase de multiplicación, hasta obtener suficiente cantidad de material vegetal, para seguidamente someterlos a un tratamiento de enraizamiento y obtener, así, una planta completa. El cultivo de meristemos, de secciones nodales y ápices son ejemplos de técnicas que utilizan este método (**Figura 4**). La multiplicación de plantas mediante este método es el que mejor asegura la estabilidad genética de las plantas micropropagadas (George y Debergh, 2008), ya que no supone cambios dramáticos en la estructura de los tejidos vegetales, puesto que no se forman nuevos meristemos. Además, los reguladores de crecimiento son necesarios a concentraciones relativamente bajas, lo cual garantiza, en gran medida, la estabilidad genética del material obtenido.

En la organogénesis adventicia, se fuerza la formación de nuevos meristemos (meristemoides) por la acción de concentraciones relativamente altas de reguladores de crecimiento (George y Debergh, 2008). El material de partida es tejido diferenciado (segmentos de tallo, hoja, raíz, etc.) a partir del cual, se desdiferencian células, formando los meristemoides (organogénesis adventicia directa). También es posible que, a partir de dicho material, la desdiferenciación de lugar a la formación de callos, a partir del cual se formen brotes que den lugar a la planta completa (organogénesis adventicia indirecta) (**Figura 4**). La tasa de multiplicación (número de yemas viables por explanto) obtenida por este método es generalmente, mucho más alta que mediante el método de multiplicación mediante meristemos preexistentes, pero la estabilidad genética puede ser fácilmente alterada por las concentraciones de reguladores de crecimiento necesarias para la formación de los meristemoides (George y Debergh, 2008).

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula somática, que no es un gameto ni un producto de la fusión de gametos (Tapia *et al.*, 1999). El proceso ocurre cuando una célula de un explanto, cambia su patrón de expresión y genera una estructura bipolar denominada embrión somático (Pliego-Alfaro y Barceló-Muñoz, 2001). Un embrión somático es parecido morfológicamente a un embrión cigótico (Fabbri *et al.*, 2004; Neumann *et al.*, 2009), pero con una diferencia sustancial, y es que los embriones somáticos no pasan por las fases de desecación y latencia observadas en los embriones cigóticos, y tienden a iniciar la fase de germinación cuando están completamente formados (Zimmerman, 1993; Nolan y Rose, 2010).

Al igual que la organogénesis adventicia, puede ser inducida de forma directa, a partir de tejidos vegetales diferenciados como secciones de hojas, tallos, capas finas de células, etc. (embriogénesis somática directa) o de forma indirecta, previa formación de callo (embriogénesis somática indirecta) (**Figura 4**), siendo necesaria la estimulación con concentraciones relativamente altas de auxinas. La más utilizada suele ser el 2,4-D, el cual produce inestabilidad genética en diversos tipos de cultivos *in vitro*. Por lo tanto, la formación de embriones somáticos puede tener el inconveniente, al igual que la multiplicación por organogénesis adventicia, de la aparición de variabilidad genética. Sin embargo, la cantidad de plantas que se puede obtener por ambos métodos puede ser muy alta. La formación de embriones somático de forma directa, permite la producción de plantas con menor variabilidad genética que la vía indirecta, lo que abre grandes posibilidades de uso para esta técnica como sistema de micropropagación. Sin embargo, estos métodos se

caracterizan por una alta tasa de proliferación de embriones somáticos pero una baja producción de embriones maduros (George y Debergh, 2008).

Entre los factores que afectan independientemente del método escogido, están el genotipo, el crecimiento estacional de la planta madre y su edad. Y también el tipo de explanto empleado (tamaño, posición y fase de desarrollo). La composición nutritiva del medio de cultivo, la luz y la ventilación del recipiente son otros de los factores que interfieren en el éxito del proceso (George y Debergh, 2008).

En cuanto al tamaño del explanto a utilizar, los explantos más grandes presentan una serie de ventajas respecto a los más pequeños (George y Debergh, 2008): mejor supervivencia al transferirse a las condiciones *in vitro*, comienzan más rápidamente el crecimiento y contienen mayor número de yemas axilares. Sin embargo, al ser más grande presentan más problemas para su desinfección. En la práctica, se emplea el explanto más grande posible con el que se pueda garantizar su condición de aséptico.

Igualmente importantes son los reguladores de crecimiento, especialmente las citoquininas, pues son las responsables del crecimiento y proliferación de los explantos, rompiendo la dominancia del meristemo, permitiendo así el desarrollo de las yemas axilares (George y Debergh, 2008). En la maduración de los embriones somáticos es importante el balance de reguladores de crecimiento y los carbohidratos. También se ha observado que el empleo de bajas temperaturas y la adición de calcio interfieren de forma positiva en la maduración (George y Debergh, 2008).

### II.1.3. Factores que influyen en la micropropagación

#### II.1.3.1. Genotipo

Entre los principales factores que influyen en la micropropagación tienen especial importancia el genotipo y la edad

El crecimiento del cultivo de tejidos y órganos, así como la morfogénesis está muy influenciado por el genotipo (George, 2008), de tal forma que se puede decir que la micropropagación es genotipo dependiente. Zuccherelli y Zuccherelli (2002) trabajando con 50 variedades de olivo, observaron respuestas muy diferentes al micropropagarlas, pudiendo clasificarlas en fáciles de propagar (21 variedades), con dificultad intermedia (16) o difíciles de propagar (13). Cozza *et al.* (1997) señalaron que el cultivo *in vitro* de olivo es muy dependiente del medio de cultivo, y que este debe ser puesto a punto para cada variedad, tanto en las formulaciones minerales como en las concentraciones hormonales. Así, Vidoy-Mercado *et al.* (2012a) comprobaron que las variedades 'Arbequina' y 'Picual' mostraban diferencias de comportamiento según el medio utilizado, de tal forma que mientras, para la variedad 'Arbequina' los mejores resultados se observaban en el medio DKW, para la variedad 'Picual' el mejor medio era el OM. Resultados similares obtuvieron Bracci *et al.* (2012) y Sghir *et al.* (2005) con distintas variedades de olivo, las cuales mostraron distintos comportamientos y ratios de multiplicación *in vitro*, a pesar de estar sometidas todas al mismo medio de cultivo y mismas condiciones.

En cuanto a la capacidad de regeneración de raíces adventicias, las plantas herbáceas suelen ser más fáciles de enraizar que las leñosas. Pero, además, dentro del mismo género, se pueden encontrar especies, y variedades dentro de la misma especie, fáciles de enraizar y otras que son extremadamente difíciles. Así, Seifi *et al.* (2014), Denaxa *et al.* (2012), Padilla *et al.* (2009a) y Sghir *et al.* (2005) observaron, en olivo, respuestas muy diferentes en el enraizamiento *in vitro* dependiendo de la variedad estudiada. Las diferencias entre variedades en la capacidad de formar raíces han sido atribuidas, principalmente, a diferencias en el metabolismo auxínico, concretamente al particular equilibrio endógeno que cada variedad tiene entre auxinas, hormonas responsables de la iniciación radical, y cofactores de enraizamiento, tanto promotores como inhibidores del proceso (Del Rio, 1988). Otros factores, como la entrada y transporte de auxinas en el brote, pueden también contribuir a las diferencias observadas (Ludwig-Müller, 2003).

En el inicio y crecimiento de callo, muchos investigadores han ilustrado como la tasa de crecimiento del mismo es dependiente de la variedad, por ejemplo, en *Brassica* (Buiatti *et al.*, 1974),

*Helianthus* (Espinasse y Lay, 1989), Maíz (Shannon y Batey, 1973; Green y Phillips, 1975), Avena (Cummings *et al.*, 1976), *Pelargonium* (Jelaska y Jelencic, 1980), Petunia (Izhar y Power, 1977), Patata (Simon y Peloquin, 1977), Arroz (Abe y Sasahara, 1982) etc. El efecto del genotipo se observa también en las diferentes texturas y color de los callos formados, así como en la capacidad morfogénica del mismo (George, 2008). En olivo, diversos trabajos ilustran como la embriogénesis somática está influida por la variedad (Cañas *et al.*, 1987; Kiani *et al.*, 2006).

En definitiva, esto pone de manifiesto que, aunque todos estos procesos están frecuentemente regulados y controlados mediante la adición de reguladores de crecimiento, el genotipo influye enormemente en todos ellos hasta el punto de que se observan grandes diferencias entre variedades estrechamente relacionadas.

### II.1.3.2. Edad

Son numerosas las especies en las que se ha descrito la relación inversa entre capacidad morfogénica *in vitro* y edad del material vegetal, obteniéndose siempre mayores tasas de supervivencia, proliferación y enraizamiento cuando el material se encuentra en fase juvenil, y siendo difícil, en muchos casos, mantener el material adulto durante un número de subcultivos elevado (Monteuuis, 1987; Drew, 1991). Al encontrarse con una especie recalcitrante *in vitro*, se aconseja comenzar desarrollando métodos de micropropagación para material juvenil, y establecidos los parámetros básicos para su cultivo, se sugiere aplicarlos al material adulto (Bonga, 1982).

Uno de los factores a tener en cuenta a la hora de la micropropagación es la edad ontogénica del material de partida, pues existe una estrecha relación entre esta y su capacidad morfogénica, de tal forma que para las plantas leñosas la micropropagación de material procedente de ejemplares juveniles es más fácil, mientras que conforme la planta se va desarrollando y pasa a fase adulta pierde capacidad morfogénica (Favre y Juncker, 1987; Arrillaga *et al.*, 1991).

Sin embargo, si se desea realizar una clonación útil de una especie leñosa ha de hacerse a partir de individuos adultos, ya que es durante esta fase del ciclo vital cuando se expresa todo su potencial genético y se manifiestan todas las características agronómicas que hacen posible su selección como ejemplar élite.



Todos los organismos poseen unas etapas de desarrollo definidas por una serie de características diferenciales. Así, en el ciclo de una planta podemos diferenciar cuatro fases de desarrollo (Greenwood, 1987):

Fase embrionaria, o de crecimiento, que sigue a la germinación de la semilla.

Fase juvenil, en la que la planta crece vegetativamente aumentando de tamaño y volumen.

La duración del periodo juvenil está influenciada tanto por factores genéticos como ambientales (Hackett, 1985) y en plantas leñosas es muy variable, encontrándose algunas especies de *Rose* con un periodo juvenil de 20-30 días, hasta especies como *Fagus sylvatica* cuyo periodo juvenil abarca 30-40 años (Clark, 1983).

Fase adulta, en la que la planta cambia su forma de crecimiento de vegetativo a reproductivo, con la producción de los primordios florales.

La adquisición de la capacidad de florecer implica cambios drásticos en los patrones de diferenciación celular (cutícula de la hoja, orientación del tallo, grosor, textura y color de la corteza, etc.). Pero el único criterio válido para asegurar el fin del período juvenil es la capacidad de la planta para florecer (Zimmerman, 1972 citado por Vidoy-Mercado, 2014). Hay que tener en cuenta que la floración depende, tanto de la fase de desarrollo de la planta, como de ciertas condiciones ambientales (temperatura, fotoperiodo, etc.), por lo que la ausencia de floración no debe ser considerada como indicador de juvenilidad.

La transición de la fase juvenil a la adulta fue denominada cambio de fase (CF) por Brink (1962).

Fase de senescencia. La senescencia es un proceso de desarrollo normal de la planta, dependiente de energía y que está controlado por el propio programa genético de la planta, y que lleva a la muerte de determinados órganos de la planta.

### II.1.3.2.1. Características diferenciales entre la fase juvenil y la fase adulta

Las características de las diferentes etapas de desarrollo en el ciclo de vida de una planta se pueden clasificar en tres grandes grupos (Haffner *et al.*, 1991 citado por Vidoy-Mercado, 2014): morfológicas, citológicas e histológicas y fisiológicas.

De forma general, se consideran plantas juveniles aquellas en las que predominan las características juveniles (ramas gruesas y largas, tronco no bifurcado, retención de hojas en invierno y corteza lisa, y ausencia de floración), por el contrario, se considera planta adulta cuando presentan floración, ramas finas, tronco bifurcado, hojas y corteza gruesas. Además de estas consideraciones generales, existen especies con características morfológicas claramente diferentes en las distintas etapas del desarrollo, como el hábito de crecimiento (McGowran *et al.*, 1998), y hace que simplemente usando criterios morfológicos se puedan diferenciar a un individuo juvenil de uno adulto.

En tejidos juveniles, las células normalmente presentan núcleos pequeños y cromatina no condensada, un domo apical pequeño y sus hojas presentan células epidérmicas grandes (Vidoy-Mercado, 2014). Mientras, en tejidos adultos suelen observarse células con núcleo reticulado y elongado, rodeado de retículo endoplasmático, cromatina condensada y un domo apical de gran tamaño (Bonga, 1982; Franclet, 1983). En el caso de *Olea europaea*, Mazzuca *et al.* (1995), describe como el ápice de plantas adultas aumenta el número de cromocentros y del ADN nuclear.

Existe una relación entre el contenido hormonal y los procesos implicados en el cambio de fase. Así, en general, las giberelinas y las auxinas se asocian con el crecimiento juvenil, mientras que sustancias como el ácido indolacético (AIA) se asocia con la fase adulta (Andrés *et al.*, 2002; Materán *et al.*, 2009). Otras diferencias fisiológicas entre la fase juvenil y adulta son la capacidad fotosintética, que es menor en la fase juvenil (Bauer y Bauer, 1980) o la presencia de flavonoides, característicos de la fase adulta (Fico *et al.*, 2000).

La capacidad de enraizamiento es más elevada en los individuos juveniles y disminuye progresivamente a lo largo del desarrollo de la planta. Esto influye notablemente en la capacidad de propagación del material y son numerosos los trabajos que demuestran la mayor capacidad de enraizamiento y, por tanto, de propagación del material juvenil frente al adulto (Husen y Pal, 2003; 2006; Kibber *et al.*, 2004). Además, hay que tener en cuenta que la capacidad de enraizamiento está influenciada por otros factores, como es el grado de lignificación de las estaquillas (Davies, 1983 citado por Vidoy-Mercado, 2014), la posición de la estaquilla en el árbol madre (Vidal *et al.*, 2003) o

el estado fisiológico del material de partida. Así, Pontikis y Xiroychakis (1985) comprobaron que las estaquillas juveniles no mostraban cambios estacionales significativos, sin embargo, en las adultas sólo enraizaban en primavera.

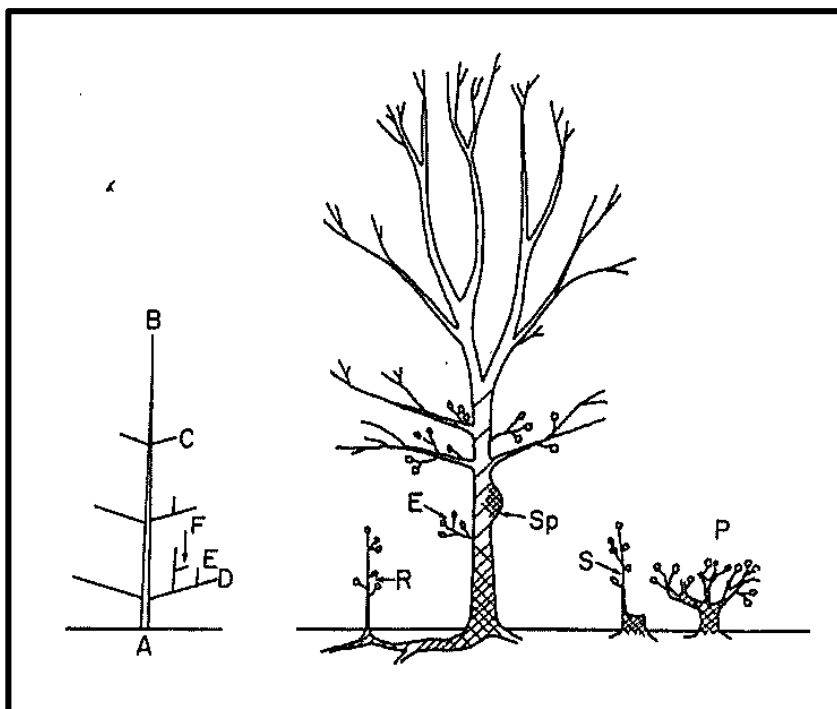
Por otro lado, también se ha observado que, diferentes perfiles proteicos, e incluso proteínas específicas, aparecen en determinadas fases del desarrollo, derivado fundamentalmente por diferencias en los niveles de transcripción génica (Gil *et al.*, 2003). Igualmente, los niveles (Fraga *et al.*, 2002) y patrones de metilación (Baurens *et al.*, 2004) parecen que aumentan a medida que la planta se acerca a la fase adulta.

#### 11.1.3.2.2. Cono de juvenilidad

En un árbol adulto existen tejidos ontogenéticamente juveniles en la base del tronco y en las ramas bajas (Hackett, 1985).

Así, se ha observado un gradiente de juvenilidad de las yemas en función de la distancia de éstas a las raíces (Hackett, 1985; 1987; Fishel *et al.*, 2003). Esto sugiere que características juveniles, tales como el potencial de enraizamiento, pueden conservarse en la parte basal de la planta, 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 semillas (Bonga, 1982). En coníferas, el grado de juvenilidad 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 tejido de la zona B sería el más adulto y el tejido F el más juvenil (**Figura 5-1**). En una planta leñosa con alto grado de ramificación, los brotes epicórmicos (E) esferoblastos (Sp), brotes procedentes de raíz (R) y brotes procedentes de árboles severamente podados (S, P) son los que presentan características juveniles (**Figura 5-2**).



**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, F: meristemos laterales. 2) Árboles de hoja ancha (derecha). E: Brotes epicórmicos. P y S: brotes procedentes de árboles podados severamente. R: brote procedente de la raíz. Sp: Esferoblastos.

#### II.1.3.2.3. Inducción de rejuvenecimiento

Para minimizar los problemas de micropropagación del material adulto, se pueden usar dos estrategias: una es seleccionar los tejidos que presentan características más juveniles dentro del árbol o al menos un potencial morfogénico mayor que el resto del árbol, y otra es inducir rejuvenecimiento en algunas partes del mismo (Bonga, 1982; Hackett, 1985).

Para la propagación de la mayoría de las especies leñosas ha de recurrirse a prácticas que, manteniendo las características genéticas deseadas, impongan una alta capacidad morfogénica. Estas prácticas persiguen el rejuvenecimiento o la revigorización del material adulto de un árbol, con objeto de obtener un material que responda mejor a las técnicas de micropropagación. El término rejuvenecimiento hace referencia al incremento de la capacidad morfogénica de una planta. Este rejuvenecimiento puede ser parcial, que implica la desaparición de algunas características de la madurez y la reaparición de características juveniles en ciertas partes de la planta, las cuales serían capaces de formar raíces y brotes adventicios; o 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 una serie de consideraciones generales sobre el rejuvenecimiento (Pierik, 1990b):

Es difícil diferenciar el verdadero rejuvenecimiento de la reversión del envejecimiento. El verdadero rejuvenecimiento implica una reversión total de la maduración. Sin embargo, dado que casi siempre existe la duda manifiesta sobre si se ha producido realmente, este término suele ser reemplazado por el de revigorización, el cual se utiliza cuando se aumenta la capacidad de enraizamiento y el vigor debido a una poda severa, injerto, etc. El verdadero rejuvenecimiento es más difícil de conseguir que la revigorización.

La eficacia del rejuvenecimiento disminuye con el grado de envejecimiento del árbol. Cuanta más adulta sea la planta, más fuerte deberá ser el tratamiento para conseguir rejuvenecerla.

La selección de yemas jóvenes en crecimiento activo facilita el rejuvenecimiento. Su posterior aislamiento es un prerequisite esencial, y cuanto menor sea el tamaño del material aislado, mayor es la posibilidad de rejuvenecerlo.

La capacidad de enraizamiento disminuye con la edad de la planta, aunque no existe una correlación estricta entre enraizamiento y rejuvenecimiento.

La Benciladenina (BAP), promueve el crecimiento de yemas laterales y en dormancia y además puede inducir la formación de yemas adventicias, a menudo ligadas a un verdadero rejuvenecimiento.

#### [II.1.3.2.4. Técnicas de rejuvenecimiento.](#)

Los métodos para inducir rejuvenecimiento se basan en que las características relacionadas con la maduración son estables pero reversibles, aunque no todas las características lo hacen 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).

Existen distintos métodos o técnicas para conseguir rejuvenecimiento y/o revigorización, tanto *in vivo* como *in vitro*, complementándose ambos.

### 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 (Lyrene, 1981 citado por Vidoy-Mercado, 2014). 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).

En algunas especies se han producido brotes rejuvenecidos a partir de ejemplares adultos forzando el crecimiento desde esferoblastos, nódulos de madera separados del cilindro central. Estos esferoblastos originan brotes adventicios que son verdaderamente juveniles (Hartmann, 1984 citado por Padilla, 1997).

*Injerto de púas adultas sobre patrones juveniles:* Una forma de incrementar el vigor vegetativo y retrasar la floración, es realizar un injerto de brotes de árboles adultos sobre patrones juveniles. Esto 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 *et al.*, 1987).

El éxito de esta técnica depende de múltiples factores como el intervalo de tiempo transcurrido entre injertos sucesivos, la eliminación de hojas adultas tras realizar el injerto (Franclet *et al.*, 1987) y la proximidad entre el ápice adulto y el sistema radicular juvenil (Ballester *et al.*, 1990), pudiéndose explicar el rejuvenecimiento por la producción de citoquininas en la raíz, la cual actuaría sobre el brote adulto (Pierik, 1990b).

*Aplicación de reguladores de crecimiento:* En algunas ocasiones se han utilizado en ramas de árboles adultos pretratamientos consistentes en la utilización de reguladores de crecimiento en forma de spray, pasta o en inyección, para activar partes del árbol o yemas, antes de seleccionar el explanto (Mascarenhas *et al.*, 1988 citado por Padilla, 1997).

El ácido giberélico puede inducir la reversión hacia la fase juvenil, aumentando la capacidad de enraizamiento, aunque en muchos casos, el efecto es temporal (Zimmerman *et al.*, 1985).

También los pretratamientos con BAP promueven el crecimiento de yemas en dormancia y pueden inducir la formación de yemas adventicias (Pierik, 1990a).

*Estaquillado sucesivo:* Las características adultas son estables tras la propagación por estaquillado (Hackett, 1985), y aunque cabría esperar que estas características se acumularan progresivamente, se ha comprobado en generaciones sucesivas que se puede obtener cierto grado de rejuvenecimiento (Bonga, 1982; Davies, 1983; Hackett, 1985).

*Podas repetidas:* La poda repetida de 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. Esta técnica ha producido brotes que mantienen la juvenilidad y con la cual se han obtenido buenos resultados (Pliego-Alfaro y Murashige, 1987; Rey *et al.*, 1998).

#### Técnicas de rejuvenecimiento *in vitro*

El cultivo *in vitro per se* tiene también la capacidad adicional de revigorizar y rejuvenecer plantas adultas. De tal forma que 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 *et al.* (2002) sugieren que este rejuvenecimiento es transitorio y que una vez que las plantas son sacadas de los medios de cultivo recuperan las características de madurez.

*Subcultivo sucesivos:* El grado de rejuvenecimiento obtenido está estrechamente relacionado con el número de subcultivos (Pierik, 1990b) y a su vez también depende de la especie y de la variedad empleada. El subcultivo en serie es un proceso similar a las podas sucesivas, siendo la exposición del material a las citoquininas la principal causa de los efectos rejuvenecedores del cultivo *in vitro* (Francllet *et al.*, 1987).

Diversos trabajos han demostrado este efecto rejuvenecedor de los sucesivos subcultivos (Sánchez y Vieitez, 1991; Tao *et al.*, 1994; Clemens *et al.*, 1999). Por su parte Grant y Hammatt (1999), observaron que las tasas de multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Prunus avium* se incrementaban conforme aumentaba el tiempo de cultivo, pero estos parámetros eran independientes del intervalo entre los subcultivos, así, el material conservado a 4 °C enraizaba con la misma proporción que aquellos incubados a 24 °C, que eran subcultivados frecuentemente.

*Formación de brotes adventicios y embriogénesis somática:* La juvenilidad puede ser restaurada mediante la formación de brotes adventicios o mediante embriogénesis somática (Lyrene, 1981; Rugini y Caricato, 1995; Martínez *et al.*, 2012). Sin embargo, las características juveniles de los brotes originados por estas técnicas pueden provocar un retraso en la floración y la fructificación, resultando un problema para la micropropagación de planta hortofrutícolas.

*Cultivo de meristemos:* A pesar de que no es nada fácil regenerar plantas leñosas a partir del cultivo de meristemos, una vez 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).

*Microinjertos:* El rejuvenecimiento puede ser obtenido a través de microinjertos, injertando meristemos adultos o ápices de brotes adultos sobre un pie de planta juvenil *in vitro*. En plantas leñosas es frecuente la necesidad de realizar injertos sucesivos o en cascada. El grado de rejuvenecimiento viene determinado por la edad y tamaño de la púa, el genotipo del injerto y del pie, la composición del medio nutritivo y el número de injertos. En general, se observa un aumento en la capacidad de enraizamiento y de proliferación de brote microinjertado a media que aumenta el número de injertos sucesivos (Padilla *et al.*, 2007; Farahani *et al.*, 2011a) y que púas procedentes de brotes *in vitro* y de plantas mantenidas en invernadero muestran mayores tasas de prendimiento y menos problemas de oxidación que las de árboles de campo (Rache-Cardenal *et al.*, 2008; Toma y Duhoky, 2010).

En el caso del olivo, Revilla *et al.* (1996), realizó microinjertos de brotes de la variedad 'Arbequina' de 1.0-1.5 cm de longitud sobre estaquillas juveniles, y aumentó el porcentaje de enraizamiento *in vitro* del 2% al 50%. En un segundo ciclo de microinjerto, no se produjo un aumento adicional en el porcentaje de enraizamiento en los brotes derivados del primer microinjerto. Sin embargo, cuando estos brotes eran enraizados y aclimatados y se mantenía su crecimiento en invernadero, las estaquillas derivadas de ellos mostraban porcentajes de enraizamiento del 100%, propio de material juvenil.



## II.1.4. Micropropagación del olivo

### II.1.4.1. Micropropagación por organogénesis axilar

#### II.1.4.1.1. Preparación planta madre y establecimiento de los cultivos

El establecimiento *in vitro* de materiales procedentes de plantas juveniles no ofrece demasiadas dificultades, sin embargo, cuando se parte de árboles adultos, los problemas de contaminación, oxidación, necrosis y falta de reactividad de los explantos son muy frecuentes (Rugini y Baldoni, 2005). En estos casos, una práctica común para restaurar la capacidad morfogénica es la aplicación de diferentes técnicas de rejuvenecimiento, tanto *in vivo* como *in vitro*. Así, se ha utilizado: el crecimiento forzado a partir de segmentos de tallo inducidos a brotar en vermiculita (Rama y Pontikis, 1990), injerto sobre plántulas juveniles (García-Férriz *et al.*, 2001), enraizamiento de estaquillas procedentes del árbol madre (Grigoriadou *et al.*, 2002), podas severas (Roussos y Pontikis, 2002; Peixe *et al.*, 2007) y microinjerto *in vitro* (Revilla *et al.*, 1996), entre otros.

El explanto generalmente utilizado para el establecimiento *in vitro* del material adulto de olivo es la sección nodal (**Tabla 4**), procedente de brotes en crecimiento activo recolectados de los árboles madre inmediatamente después de su brotación en primavera (Rugini, 1984). Previamente a su recolección, es recomendable fumigar con una solución fungicida (Varlaro *et al.*, 2009). El empleo de ápices caulinares no ha sido viable debido a la rápida oxidación que experimentan tras su recolección (Cañas *et al.*, 1992), incluso con el empleo de sustancias antioxidantes, aunque estos problemas desaparecían cuando los explantos provenían de brotes previamente establecidos *in vitro*.

Para solventar los problemas de oxidación de los explantos y el efecto de la acumulación de compuestos fenólicos en los medios de cultivo, se han seguido diversas estrategias como: mantener los explantos sumergidos en agua destilada durante tres horas antes de su establecimiento *in vitro* y cultivarlos posteriormente en oscuridad durante 7 días (Seyhan y Özzambak, 1994) o la adición de 0.2 g/L de polivinilpirrolidona a los medios de cultivo (Ramzan-Kan *et al.*, 2002).

Roussos y Pontikis (2001) analizaron el contenido de diversos compuestos fenólicos en ápices y secciones nodales recolectados de árboles de la variedad 'Koroneiki', mantenidos en campo e invernadero, y relacionaron estos valores con la oxidación que sufrían cuando se establecían *in vitro*. Las mayores cantidades de fenoles y los mayores porcentajes de cultivos con oxidación se observaron en los ápices de ambos tipos de material, respecto a las secciones nodales. Por otra

parte, también observaron que los explantos procedentes de plantas mantenidas en invernadero mostraban mayores porcentajes de supervivencia y menores concentraciones de compuestos fenólicos que los procedentes de árboles de campo, determinándose también, que mientras que las concentraciones de luteolina-7-glucósido, luteolina y quercitina tenían una relación positiva con la oxidación, el contenido en oleuropeína, ácido clorogénico y rutina no tenían ninguna relevancia en este proceso.

Las formulaciones minerales mayoritariamente utilizadas en la fase de inicio 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 McCown, 1980). El medio WPM ha sido más adecuado que los medios OM y QL (Quoirin y Lepoivre, 1977) para la variedad 'Chondrolia Chalkidikis' (Grigoriadou *et al.*, 2002), dando como resultado un mejor aspecto de los brotes obtenidos. En la variedad 'Picholine Marocaine', Brhadda *et al.* (2003), se emplearon con éxito los medios  $\frac{1}{2}$ MS y OM. En la propagación de la variedad 'Koroneiki' la formulación mineral más adecuada era una modificación de DKW (Roussos y Pontikis, 2002).

### II.1.4.1.2. Proliferación del material vegetal

Cozza *et al.* (1997) señalaron que el cultivo *in vitro* del olivo es muy dependiente de la composición del medio de cultivo, lo que implica que para cada variedad tengan que ser ajustadas tanto las concentraciones como el tipo de sales minerales y reguladores de crecimiento (**Tabla 4**).

Al igual que en la fase de inicio, las formulaciones minerales más empleadas han sido OM, MS, DKW y WPM (Quoirin y Lepoivre, 1977; Grigoriadou *et al.*, 2002; Roussos y Pontikis, 2002). Brhadda *et al.* (2003), a pesar de que no se apreciaron diferencias en la fase de establecimiento entre los medios  $\frac{1}{2}$ MS y OM, con unos porcentajes de brotación del 91.6 y 90.9 %, observaron que el medio OM permitía un mayor crecimiento de los brotes, sin síntomas de hiperhidricidad.

En cuanto a la fuente de hidratos de carbono, se ha utilizado tanto la sacarosa como el manitol y sus efectos también parecen depender de la variedad. Así, Leva *et al.* (1994; 2002) comprobaron que el crecimiento *in vitro* de los explantos de la variedad 'Maurino', era dependiente de la concentración de sacarosa, encontrándose el óptimo en 34 g/L (longitud de los brotes 3.9 cm), sin embargo, cuando la sacarosa se sustituía por manitol a la misma concentración, la elongación era mayor (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 multiplicación así como la calidad y uniformidad de los explantos. Sin embargo, en la variedad 'Meski', Chaari *et al.* (2002) obtuvieron 9 brotes/explanto con una longitud media de 12.0 cm cuando utilizaban un medio con una 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 o 14 g/L manitol + 8 g/L sacarosa + 8 g/L glucosa).

En el cultivo *in vitro* del olivo, los reguladores de crecimiento zeatina (Z) y ribósido de zeatina (ZR), son las citoquininas que mejores resultados han dado (Rugini, 1984); las concentraciones utilizadas oscilan entre 2-10 mg/L (Rugini y Fontanazza, 1981; Bartolini *et al.*, 1990; Rama y Pontikis, 1990; Rugini, 1992; Leva *et al.*, 1994, 2002, 2003; Cozza *et al.*, 1997; Briccoli-Bati *et al.*, 1999, 2002, 2006; Chaari *et al.*, 2002; Grigoriadou *et al.*, 2002, 2003, 2007; Lambardi *et al.*, 2002; Roussos y Pontikis, 2002; Brhadda *et al.*, 2003; Sghir *et al.*, 2005; Binet *et al.*, 2007; Donini *et al.*, 2008a, 2008b; Brito *et al.*, 2009; Leva, 2009; Chaari *et al.*, 2011). El proceso de micropropagación se ve encarecido en gran medida por el empleo de dicha citoquinina (ZR), 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 la variedad.

Así, la presencia de dikegulac (ácido 2,3:4,6-di-O-(isopropilideno)- $\alpha$ -L-xilo-2-hexulofuranosónico), 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 las variedades 'Canino', 'Frantoio' y 'Moraiolo' (1.4-2.5; 1.3-2.7 y 1.7-3.1 brotes/explanto en el medio con sólo zeatina frente a zeatina + dikegulac, respectivamente), pero no en las variedades 'Rosciola' y 'Piantone di Moiano' (Mendoza de Gyves *et al.*, 2008). En la variedad 'Moraiolo' se observó que las tasas de multiplicación *in vitro* aumentaban con la adición de BAP (0.5 mg/L) y zeatina (3 mg/L), obteniéndose 2.1 y 0.7 brotes/explanto de una longitud de 4.7 y 2.8 cm, respectivamente (Ali *et al.*, 2009a).

Resultados diferentes se han observado con el uso de zeatina suplementada con ácido giberélico. Así, en la variedad 'Chondrolia Chalkidikis' (Grigoriadou *et al.*, 2002) se observó un aumento de 4.2 a 7.0 en la tasa de multiplicación cuando se utilizaba conjuntamente zeatina (4 mg/L) y GA<sub>3</sub> (3mg/L); por el contrario, en la variedad 'Koroneiki', Donini *et al.* (2008b) observaron que la adición de GA<sub>3</sub> al medio de cultivo producía un descenso del porcentaje de supervivencia

obtenido durante la fase de establecimiento *in vitro* del material, respecto a la utilización sólo de zeatina (1-4 mg/L), con un 53.5% y 82.6% respectivamente.

En la variedad 'Kalamon', la sustitución de zeatina por BAP (1 mg/L) combinada con AIB (1 mg/L) y GA<sub>3</sub> (0.1 mg/L) produjo porcentajes de brotación del 93% con 4 brotes/explanto de 1.0 cm de longitud media; tras dos subcultivos, el número de nuevos brotes/explanto aumentó hasta 10 (Dimassi y Dimassi, 1994). Por su parte, Seyhan y Özzambak (1994) obtuvieron 6 brotes/explanto con una longitud media de 1.4 cm y 7 brotes/explanto de 1.4 cm en las variedades '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 con una longitud considerablemente menor. La sustitución de zeatina por leche de coco (50 ml/L) y BAP (2 mg/L) fue estudiada por Peixe *et al.* (2007) para la multiplicación de la variedad 'Galega Vulgar', obteniendo una media de 3.4 brotes/explanto; sin embargo, el uso de este mismo medio en las variedades 'Arbequina' y 'Picual' (Vidoy-Mercado *et al.*, 2012a) no dio buenos resultados, observándose, tras cuatro subcultivos sucesivos, alta incidencia de necrosis (45%-44% en 'Arbequina' y 'Picual' respectivamente) y aparición de contaminación endógena (55%-50% en 'Arbequina' y 'Picual' respectivamente). Las mayores tasas de multiplicación en la variedad 'Rowghani' se alcanzaron con una concentración de 2iP de 4 mg/L, sin embargo, la tasa de multiplicación disminuía con concentraciones menores de 2iP, aunque estuvieran suplementada con BAP (1 mg/L). Además, se observó una interacción entre la combinación de sales minerales y reguladores de crecimiento, de tal forma que estas diferencias entre los reguladores para la misma variedad sólo fueron apreciadas con el empleo de sales DKW, y no con las sales OM (Peyvandi *et al.*, 2009a). Zacchini y De Agazio (2004) observaron en la variedad 'Nebbiara', que, en las mismas condiciones de cultivo, se producía un aumento significativo de las tasas de multiplicación y de la longitud de los brotes desarrollados cuando se eliminaba la yema apical de los explantos antes de cada subcultivo.

### [II.1.4.1.3. Enraizamiento y aclimatación de los brotes](#)

Se ha observado que mantener los cultivos proliferando *in vitro* durante cierto tiempo, puede elevar los porcentajes de enraizamiento, aunque el olivo presenta resultados variables, incluso con el empleo de la misma técnica (Rugini y Fedeli, 1990). En general, una característica de los medios durante la fase de enraizamiento, es que suelen contener bajas concentraciones de sales minerales;

así las formulaciones más utilizadas en olivo han sido  $\frac{1}{2}$  macros Knop + micros Heller (Rugini y Fontanazza, 1981; Rugini, 1984);  $\frac{1}{2}$ DKW (Revilla *et al.*, 1996);  $\frac{1}{2}$ SH (Briccoli-Bati *et al.*, 1999);  $\frac{1}{2}$ OM (Chaari *et al.*, 2002); WPM (Roussos y Pontikis, 2002);  $\frac{1}{2}$ MS (Zucherelli y Zucherelli, 2002) y  $\frac{1}{2}$ BN (Mendoza de Gyves *et al.*, 2008).

Los hidratos de carbono más utilizados han sido sacarosa, con concentraciones de 15 g/L (Ali *et al.*, 2009b), 20 g/L (Grigoriadou *et al.*, 2002; Sghir *et al.*, 2005) o 30 g/L (Rugini, 1984; Revilla *et al.*, 1996; Ozkaya *et al.*, 2003); y manitol, con concentraciones de 18 g/L (Farahani *et al.*, 2008), 20 g/L (Roussos y Pontikis, 2002; Vidoy-Mercado *et al.*, 2012a), 30 g/L (Chaari *et al.*, 1999) o 36 g/L (Zacchini y De Agazio, 2004) (**Tabla 4**).

En cuanto al procedimiento en sí, la fase de inducción de los primordios radiculares puede ser realizada mediante el cultivo en un medio con auxinas durante un periodo de tiempo determinado, que oscila entre los 5 días (Sghir *et al.*, 2005) a las 4 semanas (Zacchini y De Agazio, 2004), o por inmersión de la base de la microestaquilla durante 8-10 segundos en una solución de AIB (1-3 g/L) (Chaari *et al.*, 2002; Peixe *et al.*, 2007); posteriormente, los explantos son cultivados en medios sin reguladores.

En general, durante el enraizamiento *in vitro* se han utilizados medios de cultivo sólidos con agar (0.6-0.8%) (**Tabla 4**).

Para mejorar los porcentajes de enraizamiento del material adulto, se han propuesto varias estrategias:

1. *Etiolación de los cultivos*: La etiolación de la base de los brotes, mediante adición al medio de cultivo de tintas, gránulos negros de policarbonato o carbón activo, si bien no incrementa el porcentaje de enraizamiento, si previene la senescencia que aparece en esta fase, y, que podría afectar posteriormente al trasplante de la plántula a las condiciones *ex vitro* (Rugini *et al.*, 1987). La etiolación fue utilizada por Mencuccini (2003) para evitar las variaciones estacionales observadas en los porcentajes de enraizamiento *in vitro* en las variedades 'Frantoio', 'Dolce Agogia' y 'Moraiolo', (12-28% en Enero y 56-96% en Mayo-Septiembre). Este autor propuso un método de oscurecimiento total de los medios de cultivo mediante la adición de tinta negra (100-200 mg/L), que evitaba el efecto estacional, permitiendo que los cultivos pudieran ser enraizados en cualquier época del año. La incubación de los cultivos en oscuridad

durante los 5-7 primeros días de la fase de enraizamiento fue también propuesta para las variedades 'Arbequina' (Revilla *et al.*, 1996), 'Koroneiki' (Roussos y Pontikis, 2002), 'Nebbiara' (Zacchini y De Agazio, 2004), 'Luzques' y 'Hazouia' (Sghir *et al.*, 2005).

2. *Adición de diferentes compuestos*: Rugini y Fedeli, (1990), demostraron que la adición de poliaminas a los medios de cultivo, en particular putrescina, en presencia de auxinas favorece el proceso de enraizamiento aumentando el número y la longitud de las raíces. Así, en la variedad '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), ANA (0.5 mg/L) y putrescina (1 mg/L), aunque se observaron problemas de abscisión de ápices y hojas de los brotes enraizados. Grigoriadou *et al.* (2002, 2003) lograron aumentar los porcentajes de enraizamiento hasta el 93% con la adición de putrescina (2.65 mg/L) al medio de enraizamiento con auxinas, evitando, además, la aparición de problemas de necrosis.

La adición de extracto de crudo de olivo obtenido a partir de esferoblastos, al medio con ANA (2 mg/L), permitió elevar el porcentaje de enraizamiento en la variedad 'Kalamon' desde el 65% hasta el 82.5% (Rama y Pontikis, 1990); en la variedad 'Koroneiki', los porcentajes de enraizamiento alcanzados en medio con AIB + ANA (1:1 mg/L), aumentaron desde el 76% hasta el 87% cuando se añadía 50 mg/L de este extracto de crudo (Roussos y Pontikis, 2002).

3. *Infeción artificial con bacterias (Agrobacterium, Pseudomonas)*: Rugini (1992) realizó una serie de experimentos con explantos de la variedad 'Moraiolo' infectados o no con *Agrobacterium rhizogenes*, los cuales fueron enraizados en un mismo medio basal, suplementado con 2.65 mg/L de putrescina; los resultados obtenidos mostraron que tras la infección, el porcentaje de enraizamiento aumento desde el 40% hasta el 70%. Peyvandi *et al.* (2015), también consiguieron resultados positivos en la variedad 'Rowghani', en la que los cultivos inoculados con *Pseudomonas fluorescens*, en los que duplicaban el número y la longitud de las raíces desarrolladas con respecto a los obtenidos sólo con AIB (0.1-0.3 mg/L). Por contrario, Roussos y Pontikis (2002) observaron en la variedad 'Koroneiki' una inhibición en el proceso de rizogénesis, tanto en presencia como en ausencia de auxinas, cuando los explantos eran infectados con *P. savastanoi* pv. *savastanoi*.

4. *Electropulsos*: Pulsos eléctricos (4 $\mu$ s de 250, 1250 o 2500 V/cm), combinados con distintas concentraciones de AIB (0.1 y 1mg/L), fueron utilizados con éxito por Padilla *et al.* (2009a), para el enraizamiento de microestaquillas juveniles, procedentes de semillas, de las variedades 'Arbequina', 'Manzanilla de Sevilla' y 'Gordal'. Con este método se obtuvieron altos porcentajes de enraizamiento, incluso en ausencia de auxina, siendo el pulso de 1250 V/cm el más efectivo para las variedades 'Arbequina' y 'Manzanilla de Sevilla' con un 68% y un 88% de enraizamiento respectivamente, mientras que para la variedad 'Gordal' el pulso más efectivo fue el de 250 V/cm, con un 64% de enraizamiento.

Aunque la mayoría de los trabajos recogidos en la bibliografía utilizan el enraizamiento *in vitro*, los resultados en la mayoría de los casos son muy variable y dependiente de distintos factores: estado juvenil o adulto del material, genotipo, o tipo de auxina y/o su concentración (Leva, 2011). La micropropagación comercial del olivo está limitada por los elevados costes de producción derivados del propio proceso de micropropagación en sí, y particularmente por los bajos porcentajes de enraizamiento y por una pérdida excesiva de plántulas enraizadas durante la fase de aclimatación (Leva, 2011). El 60-80% del coste total se debe a la manipulación intensiva necesaria, y de ella, aproximadamente el 40% se debe al enraizamiento *in vitro* (Leva, 2011). En general, el proceso de enraizamiento *in vitro* es caro (Hazarika, 2003), pudiendo duplicar el precio final de la planta micropropagada (Calamar y De Klerk, 2002), por ello, siempre que sea posible, se recomienda el enraizamiento *ex vitro*, en el que, las plántulas son transferidas directamente del medio de multiplicación a macetas para inducir su enraizamiento (Giles y Friesen, 1994; Leva, 2011).

Leva (2011) puso a punto un protocolo de enraizamiento *ex vitro* con un pretratamiento de los brotes durante 15 días en medio MS pero sin reguladores del crecimiento previo a la fase de enraizamiento *ex vitro*, con el fin de conseguir una reducción progresiva del contenido de zeatina en los tejidos de los explantos. Este método se aplicó a 7 variedades de olivo italianas con distintas habilidades para el enraizamiento: 'Coratina', 'Correggiolo' y 'Frantoio' (con buena capacidad para enraizar); 'Maremmano', 'Maurino' y 'Picholine' (moderada capacidad de enraizamiento) y 'Francesco' (baja capacidad de enraizamiento). Además, testó el efecto del fotoperiodo (0h-16-24h). En sus resultados, concluyó que lo mejor para el enraizamiento *ex vitro* era aplicar luz continua (24 horas), lo que contradice los resultados de Mencuccini (2003) y Brito *et al.* (2010), en los que un pretratamiento de oscuridad favorecía el enraizamiento de los explantos. El protocolo establecido,



mostró buenos resultados, en las variedades testadas, salvo para 'Correggiolo' y 'Frantoio', dos variedades que se presuponían con buena capacidad de enraizamiento y en las que se obtuvieron porcentajes bajos (28% y 40% respectivamente). Sin embargo, en la variedad 'Francesco', con baja capacidad de enraizamiento, alcanzó valores del 76%. En las restantes variedades se obtuvieron porcentajes comprendidos entre 62% -72%. Un aspecto importante a destacar es que la supervivencia de las plántulas enraizadas fue del 90%, por lo que, el enraizamiento *ex vitro* debería ser considerado como alternativa eficaz para reducir los costes derivados de la fase de enraizamiento.

En cuanto a la aclimatación, la inoculación con hongos formadores de micorrizas del género *Glomus* durante el periodo de aclimatación incrementó de forma significativa los porcentajes de supervivencia y el posterior desarrollo y crecimiento de las plantas de la variedad 'Agladau' (Meddad-Hamza *et al.*, 2010), y del ecotipo 05300 (Binet *et al.*, 2007), debido al mayor desarrollo del sistema radicular de las plantas micorrizadas con respecto a las que no lo estaban.

### II.1.4.2. Micropropagación por organogénesis adventicia

Mencuccini y Corona (1990), obtuvieron resultados preliminares prometedores de regeneración *in vitro* por este método. Sin embargo, los resultados posteriores obtenidos no fueron satisfactorios. Posteriormente, Mencuccini y Rugini (1993), trabajaron con tres variedades ('Moraiolo', 'Dolce Agogia' y 'Halkidikis') y probaron distintos tejidos (peciolos, discos de hojas y nervaduras), obteniendo únicamente resultados positivos con el empleo de peciolos, en los cuales consiguieron regenerar brotes adventicios.

De los métodos de micropropagación existentes, en olivo se han utilizado mayormente la organogénesis axilar y la embriogénesis somática, mientras que la organogénesis adventicia ha sido una vía poco utilizada, presentando pobres resultados (Bahrami *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 2009).

### II.1.4.3. Micropropagación por embriogénesis somática

Rugini y Caricato (1995) describieron, en las variedades 'Canino' y 'Moraiolo', un sistema cíclico de embriogénesis somática a partir de tejidos adultos en el que los embriones primarios se originaban a partir de estructuras morfogenéticas derivadas de los peciolos de los brotes adventicios



obtenidos en medio con TDZ (30  $\mu\text{M}$ ) y ANA (0,5  $\mu\text{M}$ ); 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 (Caña y Benbadis, 1988), suplementado con 0,5  $\mu\text{M}$  2iP, 0,44  $\mu\text{M}$  BAP, 0,25  $\mu\text{M}$  AIB y 0,42  $\mu\text{M}$  cefotaxima, y el proceso cíclico pudo ser mantenido durante dos años incubando los cultivos en oscuridad. Mazri *et al.* (2013), en la variedad 'Dahbia', Lopes *et al.* (2009), en *Olea europaea ssp. europaea var. maderensis* (Lopes *et al.*, 2009) y Capelo *et al.* (2010) para *Olea europaea ssp. europaea var. sylvestris*, (Capelo *et al.*, 2010), también obtuvieron embriones somáticos a partir de peciolos y discos de hoja, sin que fuese necesario un proceso de rejuvenecimiento previo *in vitro*, aunque los dos últimos autores no han conseguido aún la conversión de los embriones en plántulas.

Trabelsi *et al.* (2003) consiguieron inducir embriogénesis somática a partir de segmentos de cotiledones en tres variedades, 'Chetoui', 'Chemieli' y 'Arbequina', y los mejores resultados se obtuvieron con cero o bajas concentraciones de reguladores de crecimiento, de hecho, los altos niveles de hormonas inhibían el proceso. Trabajando con la variedad 'Chetoui', Trabelsi *et al.* (2011), obtuvieron embriones globulares a partir de cultivos en suspensión derivados de callo obtenido de tejido adulto.

Por su parte, Cerezo (2012) indujeron procesos de embriogénesis somática (ES) en radículas de semillas de olivo de la variedad 'Picual'. Estos autores estudiaron el efecto de varios factores tales como la formulación basal del medio de cultivo, pretratamiento con medios líquidos o maduración en membranas semipermeables de acetato de celulosa en la proliferación, maduración y germinación de embriones somáticos. Para inducir proliferación, las masas embriogénicas fueron transferidas a dos medios diferentes, por un lado, emplearon medio de olivo modificado (OMc) y, por otro, lado el medio denominado ECO (medio de embriogénesis cíclica de olivo). Aunque, no observaron diferencias en el ratio de crecimiento de los callos en función del medio empleado, sin embargo, si se observaron diferencias en cuanto a la maduración de los mismos, siendo ésta más alta en medio ECO. Mencionar que para la maduración de los mismos emplearon los medios OMc y ECO, sin reguladores de crecimiento y suplementado con 1 g/L de carbón activo.

Para mejorar los ratios de maduración y germinación, estos autores testaron el empleo de membranas semipermeables de acetato de celulosa, llegando a la conclusión de que, por un lado,

el tratamiento con membranas reducía el porcentaje de regeneración de embriones maduros, sin embargo, mejoraba la conversión de los embriones maduros en plantas en un 37.8%.

**Tabla 4:** Micropropagación de material adulto de olivo, mediante brotación de yemas axilares (Vidoy-Mercado, 2014).

| Material Adulto  |                          |                  |                     |                 |                         |                    |                          |  |
|------------------|--------------------------|------------------|---------------------|-----------------|-------------------------|--------------------|--------------------------|--|
| Variedad         | Fuente de explanto       | Explanto inicial | Medio cultivo       |                 |                         |                    | Respuesta morfo genética | Autores                                    |
|                  |                          |                  | Formulación mineral | Hidrato Carbono | Reguladores Crecimiento | Agente Gelificante |                          |  |
| <b>Aglandau</b>  | Estaquillas enraizadas   | SN               | OM mod<br>OM        | Sac<br>*        | ZR<br>AIB               | *<br>*             | Brotos<br>Raíces         | Binet <i>et al.</i> , 2007                 |
|                  | Estaquillas enraizadas   | SN               | OM<br>OM            | Sac<br>*        | ZR<br>ANA/AIB           | *<br>*             | Brotos<br>Raíces         |  |
| <b>Amellau</b>   | Estaquillas enraizadas   | SN               | OM<br>OM            | Sac<br>*        | ZR<br>ANA/AIB           | *<br>*             | Brotos<br>Raíces         | Sghir <i>et al.</i> , 2005                 |
|                  | Estaquillas enraizadas   | SN               | DKW<br>DKW mod      | Sac<br>Sac      | BAP + AIB<br>AIB        | Agar<br>Agar       | Brotos<br>Raíces         |  |
| <b>Arbequina</b> | Yemas adultas injertadas | SN               | OM                  | *               | BAP + TDZ               | *                  | Brotos                   | García-Férriz <i>et al.</i> , 2001, 02, 03 |
|                  | Árboles invernadero      | SN               | MS                  | *               | Z                       | Agar               | Brotos                   |  |
|                  | Árbol adulto podado      | SN               | DKW mod             | Man             | ZR                      | Agar               | Brotos                   | Vidoy-Mercado <i>et al.</i> , 2012a        |
|                  | Ramas Fructíferas        | SN               | OM<br>MS mod        | *<br>Sac-Man    | *<br>ANA+putrescina     | *<br>Agar          | Brotos<br>Raíces         |  |
|                  | Brotos                   | SN               | OM                  | Man             | Z + dikegulac           | Agar               | Brotos                   | Mendoza de Gyves                           |

|                               |  |    |        |     |                  |          |        |  |
|-------------------------------|--|----|--------|-----|------------------|----------|--------|--|
|                               | <i>in vitro</i> <sup>1</sup>           |    | BN mod | Sac | AIB + putrescina | Agar     | Raíces | <i>et al.,2008</i>                             |
| <b>Capolga</b>                | Árboles<br>invernadero                 | SN | MS mod | Man | Z                | Phytigel | Brotos | Varlaro <i>et al.,2009</i>                     |
| <b>Carboncella</b>            | Árboles<br>invernadero                 | SN | MS mod | Man | Z                | Phytigel | Brotos | Varlaro <i>et al.,2009</i>                     |
| <b>Carolea</b>                | Brotos<br><i>in vitro</i> <sup>1</sup> | SN | SH mod | Man | ANA/AIB          | Phytigel | Raíces | Briccoli-Bati <i>et al.,</i><br>1999, 2002     |
|                               | Árboles<br>campo                       | SN | OM mod | Man | Z                | *        | Brotos | Briccoli-Bati <i>et al.,</i><br>2006           |
|                               | Árboles<br>invernadero                 | SN | OM mod | *   | AIB + putrescina | *        | Raíces |  |
|                               | Árboles<br>invernadero                 | SN | OM     | Man | Z                | Phytigel | Brotos | Varlaro <i>et al.,2009</i>                     |
| <b>Cassanese</b>              | Árboles<br>invernadero                 | SN | MS mod | Man | Z                | Phytigel | Brotos | Varlaro <i>et al.,2009</i>                     |
| <b>Chemlali de Sfax</b>       | Brotos<br><i>in vitro</i> <sup>1</sup> | SN | MS     | Man | Z + Kin          | Agar     | Brotos | Chaari <i>et al.,</i><br>1999                  |
| <b>Chetoui</b>                | Brotos<br><i>in vitro</i> <sup>1</sup> | SN | MS     | Man | Z + Kin          | Agar     | Brotos | Chaari <i>et al.,</i><br>1999                  |
| <b>Chondrolia Chalkidikis</b> | Estaquillas<br>enraizadas              | SN | WPM    | Sac | Z                | Agar     | Brotos | Grigoriadou <i>et al.,</i><br>2002, 2003, 2007 |
| <b>Coratina</b>               | Brotos<br><i>in vitro</i> <sup>1</sup> | *  | MS mod | Man | Z                | Gelrite  | Brotos | Leva, 2011                                     |

|                 |                                     |                        |             |     |                        |      |        |  |
|-----------------|-------------------------------------|------------------------|-------------|-----|------------------------|------|--------|--|
| <b>Empeltre</b> | Árboles invernada                   | SN                     | OM          | *   | Z                      | *    | Brotos | Carter, 1997                                   |
|                 | Yemas adultas injertadas            | SN                     | OM          |     | BAP + TDZ              | *    | Brotos | García-Férriz <i>et al.</i> , 2001, 2002, 2003 |
| <b>Dahbia</b>   | Estaquillas enraizadas              | SN                     | OM          | Sac | ZR                     | *    | Brotos | Sghir <i>et al.</i> , 2005                     |
|                 |                                     |                        | OM          | *   | ANA/AIB                | *    | Raíces |  |
| <b>Dolce</b>    | Brotos basales                      | SN                     | MS mod      | Sac | ZR+AIB+GA <sub>3</sub> | *    | Brotos | Rugini y Fontanazza, 1981; Rugini, 1984        |
| <b>Agogia</b>   |                                     |                        | Knop&Heller | Sac | ANA                    | Agar | Raíces |  |
|                 | Brotos <i>in vitro</i> <sup>1</sup> | Secciones subapicales  | MS          | Sac | ANA                    | Agar | Raíces |  |
|                 | Brotos <i>in vitro</i> <sup>1</sup> | Secciones apicales     | OM mod      | *   | AIB                    | *    | Raíces | Haq <i>et al.</i> , 2009                       |
| <b>Domat</b>    | Árboles (5-10 años)                 | SN                     | OM          | *   | BAP                    | *    | Brotos | Seyhan y Özzambak, 1994                        |
| <b>Frantoio</b> | Brotos <i>in vitro</i> <sup>1</sup> | SN                     | OM          | Sac | Z                      | Agar | Brotos | Rugini, 1984                                   |
|                 | Brotos <i>in vitro</i> <sup>1</sup> | *                      | OM mod      | *   | Z                      | *    | Brotos | Lambardi <i>et al.</i> , 2002                  |
|                 | Brotos <i>in vitro</i> <sup>1</sup> | Estaquilla (2/3 nudos) | OM mod      | Man | ANA                    | Agar | Raíces | Lucchesini y Vitagilano, 2002                  |

|                  |                                     |                       |             |         |                          |      |        |  |
|------------------|-------------------------------------|-----------------------|-------------|---------|--------------------------|------|--------|--|
|                  | Ramas fructíferas                   | SN                    | OM          | *       | *                        | *    | Brotos | Zuccherelli y                          |
|                  |                                     |                       | MS mod      | Sac/Man | ANA+putrescina           | Agar | Raíces | Zuccherelli,2002                       |
|                  | Brotos <i>in vitro</i> <sup>1</sup> | Secciones subapicales | MS          | Sac     | ANA                      | Agar | Raíces | Mencuccini, 2003                       |
|                  | Árboles invernadero                 | SN                    | MS          | *       | BAP+GA <sub>3</sub> +AIB | *    | Brotos | Donini <i>et al.</i> ,2008b            |
|                  | Brotos <i>in vitro</i> <sup>1</sup> | SN                    | OM          | Man     | Z+Dikegulac              | Agar | Brotos | Mendoza de Gyves <i>et al.</i> ,2008   |
|                  |                                     |                       | BN mod      | Sac     | AIB+putrescina           | Agar | Raíces |  |
| <b>Haouzia</b>   | Estaquillas enraizadas              | SN                    | OM          | Sac     | ZR                       | *    | Brotos | Sghir <i>et al.</i> ,2005              |
|                  |                                     |                       | OM          | *       | ANA/AIB                  |      | Raíces |  |
| <b>Kalamon</b>   | Brotos de esferoblastos             | SN                    | OM mod      | *       | ZR                       | Agar | Brotos | Rama y Pontikis, 1990                  |
|                  |                                     |                       | OM mod      | *       | ANA                      | *    | Raíces |  |
|                  | Árboles invernadero                 | SN                    | WPM         | Sac     | BAP+GA <sub>3</sub> +AIB | Agar | Brotos | Dimassi y Dimassi, 1994, Dimassi, 1999 |
|                  |                                     |                       | WPM         | *       | AIB                      | *    | Raíces |  |
|                  | Árboles de 18 años                  | SN                    | MS mod      | Sac     | BAP + AIB                | Agar | Brotos | Ozkaya <i>et al.</i> ,2003             |
|                  |                                     |                       | Knop&Heller | Sac     | AIB                      | Agar | Raíces |  |
| <b>Koroneiki</b> | Árboles Podados                     | SN                    | DKW mod     | Man     | ZR/TDZ                   | Agar | Brotos | Roussos y Pontikis, 2002               |
|                  |                                     |                       | WPM         | *       | AIB + ANA                | *    | Raíces |  |
|                  | Árboles (18 años)                   | SN                    | MS mod      | Sac     | BAP + AIB                | Agar | Brotos | Ozkaya <i>et al.</i> ,2003             |
|                  |                                     |                       | Knop&Heller | Sac     | AIB                      | Agar | Raíces |  |



|                  |  |    |                  |          |                            |           |                  |   |
|------------------|--|----|------------------|----------|----------------------------|-----------|------------------|---|
|                  | Árboles<br>invernadero                 | SN | MS               | *        | BAP + GA <sub>3</sub> +AIB | *         | Brotos           | Donini <i>et al.</i> ,2008b                                     |
| <b>Leccino</b>   | Brotos<br><i>in vitro</i> <sup>1</sup> | *  | OM mod           | *        | Z                          | *         | Brotos           | Lambardi <i>et al.</i> ,2002                                    |
|                  | Árboles<br>(10-15 años)                | SN | MS               | *        | GA <sub>3</sub>            | Gelrite   | Brotos           | Ramzan-Kan <i>et al.</i> ,2002                                  |
| <b>Lucques</b>   | Estaquillas<br>Enraizadas              | SN | OM<br>OM         | Sac<br>* | ZR<br>ANA/AIB              | *<br>*    | Brotos<br>Raíces | Sghir <i>et al.</i> , 2005                                      |
| <b>Maremmano</b> | Brotos<br><i>In vitro</i>              | *  | MS mod           | Man      | Z                          | Gelrite   | Brotos           | Leva, 2011  |
| <b>Maurino</b>   | Árbol<br>adulto                        | SN | MS mod<br>MS mod | *<br>Man | Z<br>Z                     | *<br>Agar | Brotos<br>Brotos | Bartolini <i>et al.</i> ,1990<br>Leva <i>et al.</i> ,1994, 2002 |
|                  | Brotos<br><i>in vitro</i> <sup>1</sup> | *  | MS mod           | Man      | Z                          | Gelrite   | Brotos           | Leva, 2011  |
| <b>Memecik</b>   | Árboles<br>(5-10 años)                 | SN | OM               | *        | BAP                        | *         | Brotos           | Seyhan y Özzambak<br>1994                                       |
| <b>Meski</b>     | Brotos<br><i>in vitro</i> <sup>1</sup> | SN | MS mod           | Man      | Z + Kin                    | Agar      | Brotos           | Chaari <i>et al.</i> ,1999                                      |
|                  | Brotos<br><i>in vitro</i> <sup>1</sup> | SN | OM<br>OM mod     | *<br>*   | Z<br>AIB                   | Agar<br>* | Brotos<br>Raíces | Chaari <i>et al.</i> ,2002                                      |

|                                     |                                     |                       |        |                |                        |                |                                  |  |                   |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|--------|----------------|------------------------|----------------|----------------------------------|--|-------------------|
| <b>Mission</b>                      | Árboles                             | SN                    | ½MS    | Sac            | BAP + GA <sub>3</sub>  | Agar           | Brotes                           | Rostami y Shahsavari, 2012               |                   |
|                                     | (9 años)                            |                       | ½MS    | Sac            | AIB                    | Agar           | Raíces                           |  |                   |
| <b>Moraiolo</b>                     | Brotes                              | SN                    | OM     | Sac            | Z                      | Agar           | Brotes                           | Rugini, 1984, 1992                       |                   |
|                                     | <i>in vitro</i> <sup>1</sup>        |                       | BN     | Sac            | ANA                    | Agar           | Raíces                           |  |                   |
|                                     | Ramas fructíferas                   | SN                    | OM     | *              | *                      | *              | Brotes                           | Zuccherelli y                            |                   |
|                                     |                                     |                       |        | MS mod         | Sac+Man                | ANA+putrescina | Agar                             | Raíces                                   | Zuccherelli, 2002 |
|                                     | Brotes <i>in vitro</i> <sup>1</sup> | Secciones subapicales | MS     | Sac            | ANA                    | Agar           | Raíces                           | Mencuccini, 2003                         |                   |
|                                     | Brotes <i>in vitro</i> <sup>1</sup> | SN                    | OM     | Man            | Z+Dikegulac            | Agar           | Brotes                           | Mendoza de Gyves <i>et al.</i> , 2008    |                   |
|                                     |                                     |                       | BN mod | Sac            | AIB+putrescina         | Agar           | Raíces                           |  |                   |
| Brotes <i>in vitro</i> <sup>1</sup> | SN                                  | OM                    | Sac    | Z + BAP        | Agar                   | Brotes         | Ali <i>et al.</i> , 2009a, 2009b |  |                   |
|                                     |                                     |                       | OM mod | Sac            | AIB                    | Agar           | Raíces                           |  |                   |
| <b>Nebbiara</b>                     | Árbol de campo                      | SN                    | OM     | Man            | Z+GA <sub>3</sub> +AIB | Agar           | Brotes                           | Zacchini y De Agazio, 2004               |                   |
|                                     |                                     |                       | OM mod | Sac            | ANA                    | Agar           | Raíces                           |  |                   |
| <b>Nocellara etnea</b>              | Árboles                             | SN                    | OM     | Man            | Z                      | *              | Brotes                           | Cozza <i>et al.</i> , 1997               |                   |
|                                     | Campo                               |                       | OM mod | *              | ANA                    | *              | Raíces                           |  |                   |
|                                     | Brotes <i>in vitro</i> <sup>1</sup> | *                     | SH mod | Man            | ANA/AIB                | Phytigel       | Raíces                           | Briccoli-Bati <i>et al.</i> , 1999, 2002 |                   |
|                                     | Árboles campo                       | SN                    | OM mod | Man            | Z                      | *              | Brotes                           | Briccoli-Bati <i>et al.</i> , 2006       |                   |
|                                     |                                     | OM mod                | *      | AIB+putrescina | *                      | Raíces         |                                  |  |                   |



|                               |                         |    |                  |            |                       |              |                  |                            |
|-------------------------------|-------------------------|----|------------------|------------|-----------------------|--------------|------------------|----------------------------|
| <b>Nocellara del Belice</b>   | Árboles campo           | SN | OM<br>MS mod     | Man<br>*   | Z<br>ANA              | *<br>*       | Brotos<br>Raíces | <i>Cozza et al.,1997</i>   |
| <b>Nocellara Messinese</b>    | Árboles invernadero     | SN | MS mod           | Man        | Z                     | Phytigel     | Brotos           | <i>Varlaro et al.,2009</i> |
| <b>Oueslati</b>               | Árboles campo (50 años) | SN | OM mod<br>MS mod | Man<br>Man | Z<br>AIB              | Agar<br>Agar | Brotos<br>Raíces | <i>Chaari et al.,2011</i>  |
| <b>Galega vulgar</b>          | Árboles campo (8 años)  | SN | OM<br>OM         | Sac<br>*   | BAP+leche coco<br>AIB | Agar<br>*    | Brotos<br>Raíces | <i>Peixe et al.,2007</i>   |
| <b>Orbetana</b>               | Árboles invernadero     | SN | MS mod           | Man        | Z                     | Phytigel     | Brotos           | <i>Varlaro et al.,2009</i> |
| <b>Pianone di Falerone</b>    | Árboles invernadero     | SN | MS mod           | Man        | Z                     | Phytigel     | Brotos           | <i>Varlaro et al.,2009</i> |
| <b>Picholine du Languedoc</b> | Estaquillas enraizadas  | SN | OM<br>OM         | Sac<br>*   | ZR<br>ANA/AIB         | *<br>*       | Brotos<br>Raíces | <i>Sghir et al.,2005</i>   |
| <b>Picholine Marocaine</b>    | Estaquillas Enraizadas  | SN | OM<br>OM         | Sac<br>*   | ZR<br>ANA/AIB         | *<br>*       | Brotos<br>Raíces | <i>Sghir et al.,2005</i>   |
|                               | Árboles campo (30 años) | SN | OM               | *          | Z                     | Agar         | Brotos           | <i>Brhadda et al.,2003</i> |
| <b>Piantone di Mogliano</b>   | Árboles invernadero     | SN | MS mod           | Man        | Z                     | Phytigel     | Brotos           | <i>Varlaro et al.,2009</i> |

|                           |                                     |    |        |     |                        |          |        |  |
|---------------------------|-------------------------------------|----|--------|-----|------------------------|----------|--------|--|
| <b>Piantone di Moiano</b> | Brotos                              | SN | OM     | Man | Z+Dikegulac            | Agar     | Brotos | Mendoza de Gyves et al., 2008                  |
|                           | <i>in vitro</i> <sup>1</sup>        |    | BN mod | Sac | AIB+putrescina         | Agar     | Raíces |  |
| <b>Picual</b>             | Yemas adultas injertadas            | SN | OM     | *   | BAP+TDZ                | *        | Brotos | García-Férriz <i>et al.</i> , 2001, 2002, 2003 |
|                           | Árboles invernadero                 | SN | MS     | *   | BAP+GA+AIB             | *        | Brotos | Donini <i>et al.</i> , 2008b                   |
|                           | Árboles podados                     | SN | OM     | Man | Z+GA <sub>3</sub> +AIB | Agar     | Brotos | Vidoy-Mercado <i>et al.</i> , 2012a            |
| <b>Raggia</b>             | Árboles invernadero                 | SN | MS mod | Man | Z                      | Phytigel | Brotos | Varlaro <i>et al.</i> , 2009                   |
| <b>Rosciola</b>           | Brotos                              | SN | OM     | Man | Z+Dikegulac            | Agar     | Brotos | Mendoza de Gyves <i>et al.</i> , 2008          |
|                           | <i>in vitro</i> <sup>1</sup>        |    | BN mod | Sac | AIB+putrescina         | Agar     | Raíces |  |
| <b>Rowghani</b>           | Árboles invernadero                 | SN | DKW    | Man | ZiP                    | *        | Brotos | Peyvandi <i>et al.</i> , 2009a                 |
| <b>Salonemque</b>         | Estaquillas                         | SN | OM     | Sac | ZR                     | *        | Brotos | Sghir <i>et al.</i> , 2005                     |
|                           | Enraizadas                          |    | OM     | *   | ANA/AIB                | *        | Raíces |  |
| <b>San Francesco</b>      | Brotos <i>in vitro</i> <sup>1</sup> | *  | MS mod | Man | Z                      | Gelrite  | Brotos | Leva, 2011                                     |
| <b>Sargano</b>            | Árboles invernadero                 | SN | MS mod | Man | Z                      | Phytigel | Brotos | Varlaro <i>et al.</i> , 2009                   |



|                    |  |    |              |          |               |          |                  |                             |
|--------------------|--|----|--------------|----------|---------------|----------|------------------|-----------------------------|
| <b>Sevillano</b>   | Árboles<br>invernadero                 | SN | OM           | *        | Z             | *        | Brotes           | Carter, 1997                |
| <b>Sig de Sfax</b> | Brotes<br><i>in vitro</i> <sup>1</sup> | SN | MS mod       | Man      | Z + Kin       | Agar     | Brotes           | Chaari <i>et al.</i> ,1999  |
| <b>Tanche</b>      | Estaquillas<br>enraizadas              | SN | OM mod<br>OM | Sac<br>* | Z<br>AIB      | *<br>*   | Brotes<br>Raíces | Binet <i>et al.</i> ,2007   |
| <b>Tondina</b>     | Árboles<br>invernadero                 | SN | OM mod       | Man      | Z             | Phytigel | Brotes           | Varlaro <i>et al.</i> ,2009 |
| <b>ZDH4</b>        | Estaquillas<br>enraizadas              | SN | OM<br>OM     | Sac<br>* | ZR<br>ANA/AIB | *<br>*   | Brotes<br>Raíces | Sghir <i>et al.</i> ,2005   |

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

<sup>1</sup>-Material proveniente de cultivos previamente establecidos *in vitro*.

SN sección nodal; Sac-Sacarosa; Man-Manitol; Z-Zeatina; Z-Zeatina Ribósido; Kin-Kinetina; GA<sub>3</sub>-Giberelina; TDZ-Tidiazurón; BAP-Benciladenina; ANA-Ácido Naftalenacético; AIB- Ácido indol-3-butírico; 2iP- 2-isopenteniladenina

\*-Componente del medio no especificado

mod--modificado

BN (Bourgin y Nitsch, 1967); DKW (Driver y Kuniyuki, 1984)

MS (Murashige y Skoog, 1962); OM (Rugini, 1984)

SH (Schenk y Hildebrant, 1972); WPM (Lloyd y McCown, 1980)



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

### I.1.5. Variación somaclonal

Larkin y Scowcroft (1981) definieron variación somaclonal como una variación genética observada en plantas que han sido regeneradas *in vitro*. Además, propusieron el término de somaclón para describir a las plantas derivadas del cultivo *in vitro*.

Actualmente, el término de variación somaclonal es universalmente usado para todas las formas y variantes del cultivo de tejidos, sin embargo, existen otras denominaciones tales como variación protoclonal, gametoclonal o mericlonal, para describir variaciones genéticas en los cultivos de protoplastos, gametos y meristemas respectivamente (Bairu *et al.*, 2011). Otro aspecto que muchos científicos adicionan como requisito para considerar una variación genética somaclonal es que la transmisión del cambio se realice mediante el ciclo sexual. Aunque este aspecto no siempre es posible de demostrar debido a problemas de incompatibilidades sexuales, poliploidías, largos ciclos de desarrollo, etc.

El cultivo *in vitro* de material vegetal puede inducir variación en células, tejidos y órganos, de este modo crearía variación distinta dentro del cultivo, los somaclones (Bairu *et al.*, 2011). En teoría, el crecimiento de células *in vitro* y su regeneración en plantas completas es un proceso asexual, que implica sólo división mitótica de las células y esto no debería causar ningún tipo de variación, siendo la aparición de esta variación aleatoria, espontánea y descontrolada, un fenómeno indeseado (Bairu *et al.*, 2011).

Desde la primera observación por Braun (1959), la variación somaclonal ha sido uno de los mayores problemas del cultivo de tejidos en plantas. Varios o todos los somaclones pueden ser físicamente diferentes al stock del cual derivan (Skirvin *et al.*, 1994). La variabilidad puede ser de dos tipos, cambios causados por las células que hayan sufrido cambios genéticos de forma persistente y cambios causados por células que han sufrido cambios temporales, ambos inducidos genéticamente o ambientalmente (Karp, 1994; Neelakandan y Wang; 2012). Los cambios temporales son el resultado de efectos epigenéticos o fisiológicos y son reversibles y no heredables (Kaepler *et al.*, 2000). Sin embargo, los variantes permanentes presentan cambios que son heredables. A pesar de ser un fenómeno muy estudiado, las causas todavía no están bien dilucidadas (Skirvin *et al.*, 1994). Neelakandan y Wang (2012) apoyan la idea de que estos cambios ocurren con el fin de facilitar la adaptación de los explantos a las condiciones *in vitro* y para ayudar en los posteriores procesos de morfogénesis.

Contrariamente a este efecto negativo, la variación somaclonal es de gran utilidad en la mejora genética de cultivos (Mehta y Angra, 2000; Predieri, 2001), constituyendo una importante herramienta para la creación de nuevas variedades, las cuales podrían exhibir resistencias a enfermedades y mejorar la calidad y el rendimiento de los procesos de mejora genética (Karp, 1995; Unai y García, 2004).

Durante mucho tiempo, el papel del cultivo de tejido en la inducción de diferentes mutaciones, junto con mutágenos químicos o físicos, no estaba claro. Sin embargo, muchos estudios han concluido que el cultivo *in vitro* por sí sólo o combinado con mutagénesis inducida por agentes fisicoquímicos o biológicos, puede ser una herramienta de gran utilidad en programas de mejora vegetal, en lo que, precisamente, se busca generar variabilidad con el fin de crear nuevas variedades con características deseables (Jain, 2001; Rasheed *et al.*, 2003; Orbovic *et al.*, 2008).

Las mutaciones son definidas como cambios heredables en la secuencia del ADN que no derivan de la segregación genética o la recombinación (Van Harten, 1998). Estos cambios pueden ser inducidos por cualquier tratamiento específico con mutágenos físicos o químicos o por cultivo de tejidos (Bairu *et al.*, 2011). A diferencia de lo que ocurre en la mutación espontánea *in vivo*, *in vitro* las variaciones generadas ocurren más frecuentemente (Yang *et al.*, 2010) y son detectadas con facilidad porque los variantes pueden ser rápidamente testados en un espacio limitado y en un corto periodo de tiempo (Ahloowalia, 1986 citado por Bairu *et al.*, 2011). Skirvin *et al.* (1994), concluyeron que la exposición a químicos en el medio de cultivo de material genético desprotegido y la supervivencia de los variantes resultantes en un medio no selectivo, se incrementa la tasa de mutación varias veces sobre la obtenida en plantas mantenidas en invernadero o campo. Incluso si la tasa de mutagénesis fuera la misma en el cultivo *in vitro* que en el campo, el gran número de ocurrencias en la población de células ( $10^6$  después de 20 divisiones celulares), haría que la acumulación de mutantes fuera mayor *in vitro* que en campo. Por lo que, las variaciones somaclonales pueden ser detectadas más frecuentemente en el cultivo *in vitro* que las mutaciones lo son en las poblaciones de plantas en campo.

Las condiciones físico-químicas del cultivo *in vitro* pueden ser mutagénicas, y las plantas regeneradas pueden mostrar variaciones de fenotipo y de genotipo (Orbovic *et al.*, 2008). Los mutágenos pueden ser usados en tejidos indiferenciados o en diferentes etapas de la diferenciación de los meristemos (Predieri, 2001), como resultado, los somaclones resultantes pueden poseer rasgos deseables que permanecen estables y son heredables por la progenie (Roy y Mandal, 2005

citado por Bairu *et al.*, 2011). Además, mediante el cultivo *in vitro* se incrementa la eficacia de los tratamientos mutagénicos para la inducción de variación, permitiendo el manejo de grandes poblaciones y el rápido clonaje de los variantes seleccionados (Predieri, 2001).

#### II.1.5.1. Tipos de variaciones somaclonales

Entre los cambios genéticos permanentes asociados al cultivo *in vitro* destacan los cambios en la ploidía cromosómica, rotura y reorganización cromosómica, sustitución de bases en la secuencia de ADN y la activación y movilización de elementos transponibles en el genoma (Gernand *et al.*, 2007; Neelakandan y Wang, 2012). También se ha observado en tejidos cultivados *in vitro* una desregulación genómica resultante de una variación en el patrón de metilación (Kaeppeler *et al.*, 2000).

*Cambios a nivel cromosómico:* La ploidía y la aneuploidía surgen como consecuencia de endorreduplicaciones erróneas que provocan la presencia/ausencia de uno o varios cromosomas, respectivamente (Leal *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2008). Los cambios estructurales cromosómicos surgen como consecuencia de deleciones, duplicaciones, inversiones, o translocaciones de segmentos cromosómicos específicos (Fukuoka *et al.*, 1994) y, en general, en plantas regeneradas *in vitro* es más frecuente la aparición de alteraciones estructurales cromosómicas que cambios en el número de cromosomas (Kaeppeler y Phillips, 1993).

*Cambios en la secuencia genética:* Este tipo de cambios es muy frecuente en la progenie derivada de cultivo *in vitro* (Jiang *et al.*, 2011). Así, en maíz, se ha observado que su cultivo *in vitro* genera mutantes para el gen de la alcohol deshidrogenasa, debido a la modificación de una sola base (Dennis *et al.*, 1987 citado por Neelakandan y Wang, 2012).

*Amplificación genética:* La amplificación selectiva de secuencias específicas de ADN en el genoma, que conducen a repeticiones en tándem en el mismo locus o dispersos por todo el genoma, es otro de los problemas asociados al cultivo de tejidos. Repeticiones de ADN ribosomal, microsatélites y elementos transponibles son más sensibles al estrés y, por lo tanto, podrían considerarse como puntos calientes para las mutaciones (Linacero *et al.*, 2000).

*Metilación de ADN:* La metilación del ADN es uno de los principales cambios epigenéticos heredables, que provocan silenciamiento genético, inactivación del cromosoma X, e intervienen en

la expresión de genes endógenos (Miguel y Marum, 2011). Consiste básicamente en modificación del ADN por metilación del mismo, mediado por la enzima ADN metiltransferasa. La presencia de metilaciones en el ADN de las plantas derivadas del cultivo *in vitro* ha sido observada en cebada (Bednarek *et al.*, 2007); cacao (López *et al.*, 2010); vid (Schellenbaum *et al.*, 2008); o maíz (Yu *et al.*, 2011).

El tipo y la concentración de regulador de crecimiento parece afectar a la metilación del ADN. Así, LoSchiavo *et al.* (1989) relacionaron el aumento en la concentración de 2,4-D con el aumento de la metilación. La fuente de nitrógeno del medio de cultivo también parece afectar a la metilación (Leljak-Levanic *et al.*, 2004).

En definitiva, todos estos cambios se cree que son una manifestación directa de respuesta al estrés celular y la evolución del genoma de las células cultivadas *in vitro* (McClintock, 1984 citado por Neelakandan y Wang, 2012).

### II.1.5.2. Factores que influyen en la variación somaclonal

Durante el cultivo *in vitro*, el método de propagación, el genotipo, el tejido utilizado como material de partida, el tipo y concentración de regulador de crecimiento y el número y la duración de los subcultivos son algunos de los factores que influyen en la frecuencia de aparición de esta variación (Pierik, 1987; Bairu *et al.*, 2011).

*Método de propagación in vitro:* La presencia de una fase de crecimiento de tejido desorganizado (callo) se considera como uno de los principales factores que causan variación somaclonal (Rani y Raina, 2000). Las condiciones de crecimiento *in vitro* pueden ser muy estresantes para las células vegetales y pueden instigar procesos altamente mutagénicos (Kaeppeler y Phillips, 1993; Shepherd y Dos Santos, 1996 citado por Bairu *et al.*, 2011). La organización celular también es importante en términos de la descripción del origen y causa de la variación somaclonal. El cultivo de tejidos implica un crecimiento desorganizado en varios niveles, que van desde aquellos sistemas que menos perturban la organización celular, tales como el cultivo de meristemos, hasta sistemas tales como los protoplastos, la organogénesis adventicia vía callo o el cultivo de células en suspensión (Bairu *et al.*, 2011). Generalmente, cuanto más se descomponga la estructura de la planta (crecimiento desorganizado), mayor es la probabilidad de que ocurran mutaciones (Araújo *et al.*, 2001; Cooper *et al.*, 2006).



*Tipo de explanto:* La fuente de tejido puede afectar a la frecuencia y naturaleza de la variación somaclonal (Kawiak y Lojkowska, 2004; Chuang *et al.*, 2009). Tejidos altamente diferenciados como las raíces, hojas o tallos, generalmente producen más variaciones que si se usan explantos con meristemas preexistentes (Sharma *et al.*, 2007). El uso de tejido indiferenciado, como procambium y cambium, como material de partida para el cultivo de tejidos reduce la posibilidad de variación (Sahijram *et al.*, 2003). Los procesos de diferenciación y rediferenciación pueden implicar tanto cambios cualitativos como cuantitativos en el genoma y diferentes secuencias de ADN pueden ser amplificadas o eliminadas durante estos cambios. Así pues, el estado de la célula está relacionado con la fuente de tejido original y el sistema de regeneración empleado (Lee y Phillips, 1988 citado por Bairu *et al.*, 2011). Además, la variación somaclonal puede surgir a partir de mutaciones somáticas ya presentes en la planta donante (Karp, 1994).

*Tipo y concentración de reguladores de crecimiento:* Una concentración óptima, así como el balance adecuado de auxinas y citoquininas son esenciales para una micropropagación eficiente, pero los reguladores de crecimiento (RC) tienen un efecto mutagénico indirecto a través de la estimulación de un rápido crecimiento desorganizado (Karp, 1994). Los procesos celulares afectados por la aplicación exógena de RC, que a través de la morfogénesis perturban el ciclo celular, pueden inducir variabilidad (Peschke y Phillips, 1992 citado por Bairu *et al.*, 2011). Así, la presencia de una concentración relativamente alta de BAP (15 mg/L) se vio que estaba implicada en el aumento del número de cromosomas en un variante somaclonal derivado del cultivar de plátano 'Williams' (Giménez *et al.*, 2001). También concentraciones muy altas de BA (30 mg/L) provocaban un enorme aumento de variabilidad genética en el cultivo de callo de arroz en comparación con cultivos cultivados en concentraciones más bajas (2mg/L) (Oono, 1985 citado por Bairu *et al.*, 2011).

LoSchiavo *et al.* (1989) comprobaron en cultivo de callos y suspensiones celulares, que las auxinas provocaban un aumento de variaciones genéticas a través del aumento en la tasa de metilación. En concreto, la auxina sintética, 2,4-D, que se usa con frecuencia en el cultivo de callos y células, se asocia a menudo con anomalías genéticas como poliploidía y la estimulación de la síntesis de ADN, que puede resultar en endoreduplicaciones (Bouman y De Klerk, 2001; Ahmed *et al.*, 2004; Mohanty *et al.*, 2008).

Igualmente, niveles de reguladores de crecimiento inferiores o superiores a las óptimas, para una determinada especie, se ha relacionado con la variación somaclonal (Vidal y de García, 2000; Martin *et al.*, 2006). Determinadas variaciones están más relacionadas con el tipo de auxina que con

la concentración de la misma. Usando igual molaridad de diferentes auxinas, el número de variantes fue mayor en los medios que contenían 2,4,5-T o 2,4-D que los que contenían ANA o AIB (Ahmed *et al.*, 2004).

A la vista de estos resultados, el papel del tipo y la concentración de RC, particularmente las auxinas, sobre la variación somaclonal en diferentes especies de plantas parece que requiere un mayor estudio.

*Número y duración de subcultivos:* El aumento del número de subcultivos y de su duración incrementa la tasa de variación somaclonal, especialmente en cultivos de suspensiones celulares y callos (Reuveni e Israeli, 1990; Rodrigues *et al.*, 1998; Bairu *et al.*, 2006). Durante la micropropagación, se logra una alta tasa de multiplicación en relativamente cortos periodos de tiempo que conduce a subcultivos más frecuentes, y tanto la rápida multiplicación de un tejido (Israeli *et al.*, 1995), como los largos plazos de subcultivo (Petolino *et al.*, 2003; Bairu *et al.*, 2006) puede afectar a la estabilidad genética. Rodrigues *et al.* (1998) observaron que las variantes somaclonales de *Musa* aparecían a partir del quinto subcultivo (1.3%) y aumentaba su frecuencia (3.8%) después del undécimo subcultivo.

Contrariamente al efecto de la duración del cultivo en la variación somaclonal, se observó en brotes de guisantes que, tras 24 años de cultivo, estos se mantuvieron estables y comparables con el genotipo original (Smykal *et al.*, 2007). Este hecho también se observó en hinojo (Bennici *et al.*, 2004) después de 17 meses, lo que sugiere un posible efecto del genotipo sobre la variación somaclonal.

*Efecto del estrés y genotipo:* El estrés durante el cultivo de tejidos también puede inducir variación somaclonal. Sin embargo, diferentes genomas responden de manera diferente a este estrés, lo que indica que la variación somaclonal tiene componentes genotípicos (Neelakand y Wang, 2012).

Son muchos los autores que han demostrado la existencia de variación somaclonal en un determinado clon y no en otro, aun usando el mismo protocolo de micropropagación. Devarumath *et al.* (2002) comprobaron que, en té, la estabilidad de las plantas regeneradas a partir de los clones U3 y U27 fue del 100%, mientras que se observaba un 8% de variación en las regeneradas a partir del clon U26, por lo que dedujo que en dicho clon la inestabilidad era inherente bajo condiciones de cultivo *in vitro* o es más propenso a sufrir variación somaclonal por estrés *in vitro*. Similares

resultados se dieron en *Eucalyptus* (Rani y Raina, 1998), en *Populus deltoides* (Rani *et al.*, 2001) y en tejidos de *Musa* (Damasco *et al.*, 1997). Del mismo modo, el genotipo y el tipo de explanto influían fuertemente en la ocurrencia de variación somaclonal en el cultivo de callo de fresa (Popescu *et al.*, 1997). La relación especie/genotipo en respuesta a la estabilidad/inestabilidad bajo condiciones de cultivo *in vitro* está bien documentada en muchos taxones (Mohmand y Nabors, 1990; Rani y Raina, 2000; Devarumath *et al.*, 2002).

#### II.1.5.3. Métodos de detección de la variación somaclonal

Las altas tasas de variación somaclonal durante la micropropagación de muchas plantas sigue siendo un problema importante, especialmente a nivel comercial. La detección temprana y la eliminación de las variantes es, por lo tanto, esencial para reducir las pérdidas.

Las variantes somaclonales se pueden detectar utilizando diversas técnicas, que están categorizadas en: morfológicas, fisiológicas/biológicas y moleculares (Bairu *et al.*, 2011).

*Detección morfológica:* Los caracteres morfológicos han sido utilizados para identificar especies, géneros y familias de plantas. Las variantes pueden ser fácilmente detectadas cuando estas muestran diferencias en rasgos visibles como el porte de la planta, morfología de la hoja o anomalía de la pigmentación (Israeli *et al.*, 1991; Rodrigues *et al.*, 1998; Zaid y Al Kaabi, 2003). Sin embargo, los rasgos morfológicos están a menudo fuertemente influenciados por factores ambientales y pueden o no reflejar el genotipo de una planta (Mandal *et al.*, 2001). Además, el número de marcadores morfológicos utilizados para los caracteres fenotípicos es limitado y su frecuencia está regulada por el desarrollo.

*Detección fisiológica/bioquímica:* En comparación con la detección morfológica, este método es más rápido y puede llevarse a cabo en etapas juveniles reduciendo la posible pérdida económica (Israeli *et al.*, 1995). La respuesta de las plantas a los factores fisiológicos, como las hormonas se puede utilizar como base para diferenciar entre somaclones normales y variantes (Peyvandi *et al.*, 2009b). Por ejemplo, el ácido giberélico regula el crecimiento e influye en diversos procesos de desarrollo, por lo tanto, las perturbaciones en el metabolismo del ácido giberélico y su nivel se han sugerido como uno de los posibles indicadores de variación somaclonal en plantas superiores (Sandoval *et al.*, 1995).

La luz, como fuente de energía para la fotosíntesis, y la temperatura son esenciales para el crecimiento vegetal y su desarrollo. Las plantas han desarrollado mecanismos de adaptación para aclimatarse a las variaciones en el régimen de luz que va, de sombra profunda a luz extremadamente brillante (Long *et al.*, 1994). La fotoinhibición es un estado de estrés fisiológico en plantas y se expresa como una disminución en la capacidad fotosintética (Adir *et al.*, 2003). En general, las plantas tolerantes a la sombra son más susceptibles a la fotoinhibición que las plantas de sol (Long *et al.*, 1994). Basado en la fotoinhibición, Damasco *et al.* (1997) realizó una serie de experimentos en los que constato que los somaclones del tipo enano mostraban una mejoría en la tolerancia a la bajada de temperatura y a la luz en comparación con las plantas normales.

Muchos autores han utilizado diferentes pruebas bioquímicas para distinguir entre somaclones. La síntesis de pigmentos como la clorofila, carotenoides, antocianos, puede ser utilizado como base para la detección de variantes somaclonales (Shah *et al.*, 2003), sin embargo, la mayoría de las pruebas bioquímicas son complejas y requieren una alta especialización.

*Detección molecular:* Las técnicas moleculares son herramientas valiosas utilizadas para el análisis de la fidelidad genética de las plantas micropropagadas. A nivel molecular, las variaciones derivadas del cultivo de tejidos en plantas surgen de los cambios en el número de cromosomas y su estructura o de cambios sutiles en el ADN (Gostimsky *et al.*, 2005). Estos estudios pueden realizarse en etapas tempranas del crecimiento, mientras está todavía en cultivo *in vitro*, antes de lograr la regeneración completa de la planta. El polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) fue la primera técnica de marcadores moleculares utilizada en la detección de polimorfismos de ADN (Botstein *et al.*, 1980). Actualmente, un gran número de técnicas moleculares están disponibles para detectar la secuencia variable entre genomas estrechamente relacionados, incluyendo diferencias entre plantas de origen y somaclones. Estas técnicas implican el uso de marcadores moleculares para comparar el ADN de diferentes muestras. Como resultado de la alta especificidad del ADN, los marcadores moleculares son capaces de identificar un fragmento particular de la secuencia de ADN que está asociada a una parte del genoma y las comparaciones se hacen, generalmente, en base a la presencia o ausencia de una banda de ADN (Bairu *et al.*, 2011).

#### II.1.5.4.1. Marcadores de ADN

Los marcadores de ADN constituyen una herramienta valiosa, basada en las variaciones individuales en la secuencia común del ADN. Estos marcadores abarcan todo el genoma, y con muestras mínimas de material vegetal, que no destruyen al individuo, posibilitan su evaluación en fases muy tempranas, no son influenciados por el ambiente y no presentan interacciones intergenéticas (Dorado *et al.*, 2005).

Los diferentes tipos de marcadores difieren en sus requerimientos técnicos, nivel de polimorfismo detectado, reproductibilidad y coste. Sin embargo, todos ellos tienen acceso a elevados niveles de variabilidad genética, no están influenciados por el ambiente, y pueden ser analizados en las primeras etapas de desarrollo de la planta. Estas ventajas frente a los métodos tradicionales no implican exclusión, sino complementariedad.

Dichos marcadores los clasificaremos en dos grandes grupos: los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: Polymerase Chain Reaction) y el resto. Los primeros a su vez se pueden clasificar según amplifiquen secuencias conocidas o aleatorias, aunque existen marcadores que comparten ambas características.

A continuación, se describirán los marcadores utilizados hasta el momento en el olivo: RFLPs, RAPDs, AFLPs, SCARs, STSs, SSAPs, SSRs, ISSRs y SNPs (Dorado *et al.*, 2005).

#### Marcadores no basados en la PCR

##### RFLPs

El polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs: Restriction Fragment Length Polymorphism) expresa las diferencias entre individuos en sitios concretos de la secuencia de ADN que reconocen diferentes enzimas de restricción (restringidas). Éstas cortan secuencias (puntos de restricción) específicas, dando lugar a fragmentos de tamaños diferentes. La metodología implica los siguientes pasos:

- Extracción de ADN en cantidades significativas (microgramos) y de gran pureza.
- Fragmentación de ADN genómico mediante digestión con enzimas de restricción.
- Separación de los fragmentos por longitud mediante electroforesis en geles de agarosa.
- Transferencia a membranas e inmovilización de los fragmentos de ADN.
- Detección mediante hibridación del ADN en la membrana con sondas marcadas.

Los RFLPs son marcadores extremadamente valiosos puesto que se heredan codominantemente, es decir, es posible distinguir los individuos homocigóticos y heterocigóticos

entre sí y altamente polimórficos (Agarwal *et al.*, 2008). Fueron utilizados por primera vez en la generación de un mapa del genoma humano (Botstein *et al.*, 1980). Los RFLPs son transferibles entre cruzamientos y parcialmente entre especies distintas; la posición marcada en el genoma es la misma entre cruzamientos y relativamente la misma entre especies afines. Fue una de las primeras técnicas utilizadas para estudiar la variación somaclonal y ha sido ampliamente utilizada en varias especies. Así, por ejemplo, Jaligot *et al.* (2002) describieron marcadores RFLP sensibles a la metilación que diferenciaban entre callos embriogénicos normales y anormales en palma. Un inconveniente importante de esta técnica es que, además del elevado coste económico y laboral, requieren mucha información previa a su evaluación. Otro inconveniente importante puede ser la ausencia de polimorfismo en materiales genéticamente próximos.

### Marcadores basados en la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha posibilitado la generación de nuevos marcadores de elaboración más sencilla. La amplificación de fragmentos de ADN y la evaluación directa de las diferencias en longitud de los productos amplificados sin necesidad de transferencia a membranas e hibridación han supuesto un cambio cualitativo en las posibilidades de utilización de los marcadores de ADN en la mejora genética vegetal. Las estrategias seguidas para la obtención de fragmentos de ADN son fundamentalmente dos: utilizar como cebadores secuencias genómicas conocidas o usar cebadores aleatorios. Estos últimos son los que necesitan menos información previa, y por tanto son de utilidad en aquellas especies en la que, por diferentes motivos, no existan estudios genómicos, como es el caso del olivo.

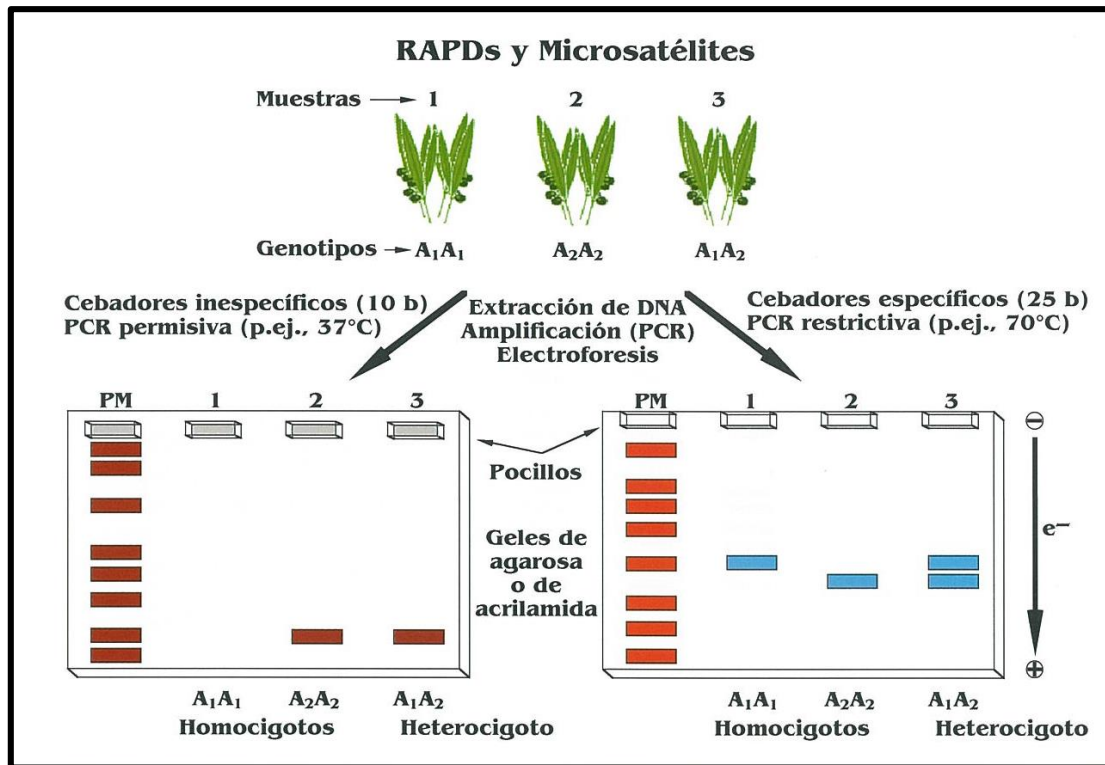
### RAPDs

El polimorfismo de productos amplificados al azar (RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA) es el más sencillo de analizar y por ello estos marcadores han sido utilizados frecuentemente en olivo. Se generan por la amplificación del ADN con un cebador de secuencia corta (10 bases) y aleatoria (Williams *et al.*, 1990; Welsh *et al.*, 1991), no siendo necesario un conocimiento previo de secuenciación y utilizando como sustrato poco ADN (nanogramos), de pureza inferior a la necesaria en los RFLPs. Su sencillez y bajo coste está contrarrestada por sus limitaciones: herencia dominante y baja reproducibilidad entre laboratorios. Además, no son transferibles entre cruzamientos y por tanto menos aún entre especies. La detección en geles de agarosa produce con frecuencia resultados que no se ajustan a segregaciones mendelianas porque el poder de resolución de esta

matriz impide que productos distintos de amplificación (pero de parecida longitud) sean diferenciados (dan lugar a una sola banda en el gel). La ventaja de la utilización de geles de agarosa es la sencillez de la técnica y la facilidad con la que las bandas pueden extraerse, clonarse y secuenciarse (**Figura 6**).

Además de proporcionar una técnica eficiente para detectar polimorfismo y permitir la rápida identificación, también son útiles para el mapeo genético (Venkatachalam *et al.*, 2008). El uso de RAPDs es especialmente beneficioso para discriminar entre los materiales que son genéticamente similares, como evaluar la variabilidad genética dentro de una colección (Piola *et al.*, 1999; Royo e Itoiz, 2004). También se han usado para evaluar la relación genética entre variedades en muchas plantas, como caña de azúcar (Devarumath *et al.*, 2007), sorgo (Singh *et al.*, 2006) y manzana (Royo e Itoiz, 2004). Se ha usado para identificar variantes somaclonales en melocotón (Hashmi *et al.*, 1997), caña de azúcar (Taylor *et al.*, 1995) y plátano (Bairu *et al.*, 2006). Sin embargo, esta técnica no ha sido concluyente en algunas especies. Por ejemplo, no detectaron variación somaclonal en plantas regeneradas a partir de explantos de begoñas tratadas con nitrosometilurea (Bouman y De Klerk, 2001), así como mutantes de ajo inducidos por rayos X (Anastassopoulos y Keil, 1996). A pesar de todas sus limitaciones, los RAPDs se han mantenido útiles para los investigadores cuando la inversión financiera es limitada, ya que el coste es más barato que otros marcadores tales como AFLPs o microsatélites (Belaj *et al.*, 2003a,b; Weising *et al.*, 2005). Además, el problema de la fiabilidad de los RAPDs y su transferibilidad entre laboratorios podría minimizarse siguiendo un protocolo estándar y siguiendo un criterio conservador de selección de bandas (Belaj *et al.*, 2003a,b; Belaj *et al.*, 2004c).





**Figura 6:** Esquema representativo del empleo de marcadores RAPDs y Microsatélites (Dorado *et al.*, 2005).

SCARs, STSs y SSAPs

Por su parte, los marcadores de tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) (Paran y Michelmore, 1993), los STSs (Sequence Tagged Site PCR) (Olson *et al.*, 1989) y los SSAPs (Sequence Specific Amplification Polymorphisms) (Waugh *et al.*, 1997) se basan en la amplificación de una secuencia conocida utilizando cebadores largos (20 bases). Esta secuencia puede proceder de un RAPD clonado y secuenciado, como es el caso de los SCARs y permite la detección específica de este marcador. Las reacciones en estos marcadores se pueden hacer tan específicas que den lugar a un solo producto de amplificación. En este caso, no es necesario el gel para identificar el individuo portador del marcador, es suficiente la tinción con bromuro de etidio que permite detectar la amplificación en el tubo de ensayo (Hernández *et al.*, 2002) porque el complejo ADN-bromuro de etidio fluoresce cuando se expone a la luz UV. Estamos pues, de nuevo, en presencia de marcadores dominantes que describen presencia/ausencia de una amplificación. En olivo, se han desarrollado SCARs que pueden tener distinta utilidad; uno de ellos es una secuencia de retransposición (Hernández *et al.*, 2001b) que puede ser utilizado como control de amplificación y otro parece estar relacionado con la relación pulpa/hueso (Hernández *et al.*, 2001a).



### SSRs

Como los anteriores, el microsatélite (SSR: Simple Sequence Repeat) se basa en la amplificación con cebadores largos de una zona previamente secuenciada. Dicha región incluye un microsatélite, es decir, repeticiones de di-, tri- o tetranucleótidos en tándem (también son posibles algunas combinaciones más complejas), que pueden dar lugar a polimorfismo entre individuos al cambiar el número de repeticiones y generar así fragmentos amplificados de diferentes longitudes. Estos marcadores son, por tanto, codominantes, puesto que los dos alelos de diferente número de repeticiones producirán dos fragmentos de distinta longitud (**Figura 6**). Cuando la diferencia en longitud de los fragmentos amplificados es alta, se puede evaluar en geles de agarosa, aunque es más frecuente su evaluación en geles de poliacrilamida y tinción con plata, o en secuenciadores automáticos de ADN mediante fluorescencia inducida por láser. Los SSRs son transferibles entre cruzamientos porque las secuencias que flanquean las repeticiones se conservan entre individuos de la misma especie y también, aunque parcialmente, entre especies afines. Tienen, por tanto, las ventajas de los RFLPs y además, son marcadores basados en PCR. Sin embargo, tienen un desarrollo extremadamente costoso y su uso está limitado a especies en la que exista dicha información o puedan transferirse desde especies afines.

### ISSRs

Los ISSRs (Intersimple Sequence Repeats) son un tipo de marcador genético que nos permite obtener los niveles de variación en las regiones microsatélites que se encuentran dispersas en el genoma, particularmente el nuclear. Estas regiones consisten en repeticiones en tándem de motivos simples ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte. Los motivos repetidos pueden ser penta-, tetra-, tri- y dinucleótidos. La longitud de las secuencias de microsatélites tiende a ser altamente variable entre individuos debido a las altas tasas de mutación que experimentan, ya que cuando el ADN se replica durante la meiosis, la DNA polimerasa puede “tartamudear” hacia delante o hacia atrás en las unidades repetidas, eliminando o agregando unidades a la cadena. Las cadenas resultantes pueden entonces presentar menos o más unidades de la repetición (o pares de bases) que las cadenas parentales (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Wolfe, 2000).

Los ISSRs son marcadores semiarbitrarios amplificados por PCR a partir de la presencia de un oligonucleótido o primer complementario a un microsatélite, diseñado para unirse a los motivos repetidos de di- y trinucleótidos. En ocasiones es posible agregar a esta secuencia un par de nucleótidos extras arbitrarios en el extremo 3' o en el 5', que jugarán el papel de ancla asegurando

así que la amplificación inicie en el extremo 5' o en el 3' del microsatélite, respectivamente (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Bornet y Branchard, 2001).

La molécula generada, con un tamaño particular (peso molecular), se considera un "locus", que representa el segmento de ADN entre los microsatélites. Se ha visto que los ISSRs frecuentemente amplifican de 25 a 50 bandas en una sola reacción. Este patrón característico de productos de PCR se considera la "huella digital genética" de cada uno de los individuos analizados. El polimorfismo entre individuos de la misma población puede detectarse, ya que el análisis es sensible a la presencia/ausencia del elemento genómico reconocido por el primer y a la longitud de la secuencia intermedia amplificada (Zietkiewicz *et al.*, 1994)

Los ISSRs son considerados marcadores dominantes.

Las ventajas que ofrece esta técnica se centran principalmente en la alta variación que detecta, así como en su reproductibilidad, debida principalmente a las altas temperaturas de alineación utilizadas en la PCR. Asimismo, no son necesarias altas concentraciones de ADN. Por otro lado, para diseñar los primers no es necesario conocer la secuencia del genoma del organismo en estudio. Puede visualizarse tanto en geles de agarosa como de acrilamida. Finalmente, son sencillos de montar, rápidos, eficientes y poco costosos. En cuanto a sus desventajas, la homología de las bandas es incierta. Y al tratarse de marcadores dominantes, no permiten el cálculo de ciertos parámetros que exigen distinguir a los heterocigóticos de los homocigóticos dominantes (como la  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$ , Wright, 1965).

Se han encontrado marcadores microsatélites inmensamente útiles para determinar la estabilidad genética de plantas micropropagadas como el sorgo (Li *et al.*, 2010), el álamo (Rahman y Rajora, 2001), el arroz (Gao *et al.*, 2009), plátanos (Hautea *et al.*, 2004; Ray *et al.*, 2006), vid (Welter *et al.*, 2007), trigo (Khlestkina *et al.*, 2010) o caña de azúcar (Singh *et al.*, 2008).

### AFLP

El polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados aleatoriamente (AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism) se fundamenta en la amplificación selectiva de los fragmentos obtenidos en la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción (Zabeau y Vos, 1993). El proceso consta de los siguientes pasos:

-Digestión del ADN con dos enzimas de restricción que generan dos extremos cohesivos con diferentes secuencias.

-Ligamiento a estos extremos de unos adaptadores (25 a 30pb) que encajan en los extremos cohesivos.

-Amplificación preselectiva de los fragmentos así generados con dos cebadores de secuencia idéntica a cada uno de los adaptadores más un nucleótido en el extremo 3', con lo que se obtiene una preselección de 1 de cada 16 fragmentos presentes.

-Amplificación selectiva con cebadores con dos nucleótidos adicionales al extremo 3', con lo que se obtiene una reducción de 1 de cada 256 fragmentos de la reacción anterior.

De esta forma se generan múltiples bandas que corresponden a fragmentos de distinto origen en el genoma y que se resuelven en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Para la generación de estos marcadores no es necesaria información previa, son generalmente dominantes y no son transferibles, pero permiten la generación de un gran número de marcadores con pocas reacciones. Requieren extracciones de ADN en mayor cantidad y pureza que los RAPDs y el coste de producción es más elevado. Además, su puesta a punto y la interpretación de los datos generados pueden ser complejas. Los AFLPs son una técnica muy sensible y fiable que puede ser útil para la detección de alteraciones genéticas específicas asociadas con las variaciones del cultivo de tejidos. Se han utilizado para estudios de variación somaclonal de muchas especies como café (Sánchez-Teyer *et al.*, 2003), alcornoque (Hornero *et al.*, 2001) o plátano (James *et al.*, 2004). Sin embargo, a menudo requiere más trabajo con la optimización y es relativamente más caro que los RAPD (Weising *et al.*, 2005).

### SNPs

El SNP (Single Nucleotide Polymorphism) es un polimorfismo originado por variaciones de un solo nucleótido en la secuencia de ADN. Tiene su origen en un cambio de base o pequeñas inserciones o deleciones mononucleotídicas. El nivel de polimorfismo puede ser similar entre regiones codificantes y no codificantes. Este tipo de polimorfismo ofrece por tanto la posibilidad de explorar una variación inmensa, pero requiere el conocimiento previo de la secuencia de alelos a investigar. Con los recientes avances en la secuenciación de ADN, que posibilitan la producción masiva de datos, se están sentando las bases para la producción en gran escala de este tipo de polimorfismo en olivo.

### II.1.5.5. Variación somaclonal en el olivo

En olivo se han detectado diferencias morfológicas entre las plantas micropropagadas por organogénesis axilar en las variedades 'Zard', 'Rowghani' (Yari *et al.*, 2011a; Farahani *et al.*, 2011b) y 'Dezful' (Peyvandi *et al.*, 2009b; Yari *et al.*, 2011b; Farahani *et al.*, 2011c), 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; y se detectaron también a nivel genético, de manera que ninguno de los patrones de bandas obtenido mediante RAPDs de las plantas analizadas fueron exactamente igual a los de la planta madre y estas diferencias eran mayores a medida que se incrementaba el número de subcultivos. Por otra parte, el análisis del valor c 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 las variedades 'Arbequina', 'Picual', 'Empeltre' (García-Férriz *et al.*, 2001; Vidoy-Mercado *et al.*, 2012a) y 'Maurino' (Leva *et al.*, 2003; Leva y Petrucchelli, 2012) no se han detectado variaciones morfológicas o genéticas entre el árbol madre y las plantas micropropagadas.

Igualmente, en otras especies del género *Olea*, *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 SSRs entre la planta madre y las plantas micropropagadas de estos genotipos (Brito *et al.*, 2010). Asimismo, ciertos autores observaron que no se apreciaba la variación somaclonal afectara a la entrada en producción de las plantas micropropagadas de olivo y las plantas micropropagadas mostraban caracteres de juvenilidad, pero comenzaban a florecer al mismo tiempo que las plantas obtenidas por estaquillado (Briccoli-Bati *et al.*, 1999, 2002 y 2006; Leva *et al.*, 2002; García-Férriz *et al.*, 2003; Brito *et al.*, 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.

Bradaï (2009) estudió el efecto de la edad y la línea embriogénica sobre el proceso de embriogénesis somática y la estabilidad genética de las plantas regeneradas. Observó una mayor tasa de multiplicación al aumentar la edad de los cultivos, contrarrestado con una disminución en la eficiencia en las fases de germinación y maduración asociada con la edad del cultivo que tuvo como consecuencia un descenso significativo del potencial de regeneración. Asimismo, este autor ha observado una clara influencia del genotipo en la aparición de variación somaclonal, detectando

una relación entre el número de copias de un embrión somático dado y la frecuencia de las variantes fenotípicas observadas, así como la edad del cultivo, de tal forma que observó mayor variación somaclonal en plantas de dos años de edad.

#### II.1.5.5.1. Marcadores moleculares utilizados en olivo.

Los marcadores morfológicos son escasos en el olivo y su utilidad está limitada, además, por la elevada frecuencia con la que los genes que los codifican presentan interacciones con otros, así como la influencia ambiental sobre su expresión (Dorado *et al.*, 2005). Así, en la mayoría de los casos, los marcadores se han utilizado para estudios de filogenia y de diversidad (**Tabla 5**).

Los marcadores de ADN presentan un doble uso en cultivos como el olivo (Dorado *et al.*, 2005). Por un lado, permiten la identificación varietal de forma rápida e inequívoca, incluso en plantones de corta edad, sin necesidad de analizar la flor o el fruto, ejemplos de esta utilidad son los trabajos con isoenzimas de Trujillo y Morales (2005), RAPDs (Belaj y Trujillo, 2005), AFLPs (Valpuesta y Botella, 2005) y SSRs (Rallo *et al.*, 2000; 2005). Esta utilidad tiene gran importancia en la industria viverística y en los Bancos de Germoplasma. Prácticamente, la mayoría de los marcadores reseñados han sido efectivos para identificar variedades. Aunque por su bajo coste y elevado polimorfismo, los RAPDs han sido los más utilizados para este fin hasta la fecha (Belaj *et al.*, 2001; Besnard *et al.*, 2001).

**Tabla 5:** Marcadores y tipos de estudios en el género *Olea* (Dorado *et al.*, 2005).

| Marcador   | Especie   | Estudio                | Autores  |
|------------|---|------------------------|--|
| RFLPs      | spp. europaea var. sylvestris y var. europaea   | Filogenia              | Amane <i>et al.</i> ,2000  |
|            |   | Filogenia              | Lumaret <i>et al.</i> ,2000  |
|            | O. europaea spp. laperrinei; ssp. maroccana; spp cerasiformis; spp europaea var. europaea | Androesterilidad       | Besnard <i>et al.</i> ,2000  |
| RAPDs      | spp. europaea var. europaea   | Diversidad             | Gomes <i>et al.</i> , 2012<br>Belaj <i>et al.</i> ,2001 y 2002<br>Claros <i>et al.</i> ,2000;<br>Fabbri <i>et al.</i> ,1995<br>Hernández <i>et al.</i> ,2001a y b<br>Mekuria <i>et al.</i> ,2001 |
|            | spp. europaea var. sylvestris y var. europaea   |                        | Sanz Cortés <i>et al.</i> ,2001<br>Besnard <i>et al.</i> ,2001   |
| SSRs       | spp. europaea var. europaea   | Diversidad             | Erre <i>et al.</i> , 2012<br>Trujillo <i>et al.</i> , 2012<br>Muzzalupo <i>et al.</i> , 2012<br>Belaj <i>et al.</i> , 2004b<br>Rallo <i>et al.</i> ,2000<br>Sefc <i>et al.</i> ,2000             |
| SCARs      | spp. europaea var. europaea   | Diversidad             | Hernández <i>et al.</i> ,2001 a y b  |
| ISSRs      | O. europaea ssp cuspidata; ssp cerasiformis<br>spp. laperrinei; spp europaea              | Filogenia              | Hess <i>et al.</i> ,2000   |
| AFLPs      | spp. europaea var sylvestris, var europaea, spp laperrinei; spp maroccana                 | Diversidad y Filogenia | Angiolillo <i>et al.</i> ,1999   |
| Isoenzimas | O. europaea spp. europaea   | Diversidad             | Trujillo <i>et al.</i> , 1995  |

## II.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### II.2.1. Condiciones generales

#### Material vegetal

Las variedades de olivo (*Olea europea* L.) con las que se ha realizado este trabajo han sido: ‘Alfajara’, ‘Blanqueta-11’, ‘Blanqueta-48’, ‘Castellana’, ‘Changlot Real’, ‘Cornicabra’, ‘Empeltre’, ‘Farga’, ‘Gordal’, ‘Hojiblanca’, ‘Lechín de Granada’, ‘Lechín de Sevilla’, ‘Manzanilla Cacereña’, ‘Manzanilla de Sevilla’, ‘Morisca’, ‘Morrut’, ‘Picudo’, ‘Sevillena’, ‘Verdial de Badajoz’, ‘Verdial de Huévar’, ‘Verdial de Vélez Málaga’ y ‘Villalonga’.

El inicio de los cultivos *in vitro* se realizó a partir de brotes en crecimiento activo procedentes de plantones certificados mantenidos en maceta en los invernaderos del IFAPA Centro de Churriana, en Málaga.

Los plantones certificados, 3 plantones por variedad, fueron suministrados por el Banco Mundial de Germoplasma de Olivo (BMGO, CAP-UCO-IFAPA), que se encuentra en las parcelas pertenecientes al IFAPA, Centro Alameda del Obispo, en Córdoba, y se obtuvieron a partir de rebrotes de la base de árboles mantenidos en campo, y a partir del crecimiento de ramas procedentes de la poda de estos mismos árboles, que se enraizaron en invernadero en perlita en condiciones de alta humedad.

En el caso de las variedades ‘Verdial de Badajoz’ y ‘Verdial de Huévar’ se utilizaron varetas en crecimiento activo, recogidas directamente de los árboles situados en las parcelas de la colección del BMGO, CAP-UCO-IFAPA, en el IFAPA Centro de Alameda del Obispo (Córdoba).

Durante el tiempo que los plantones estuvieron en el invernadero, fueron abonados y regados periódicamente, además de tratarse con productos fitosanitarios, con el fin de garantizar un óptimo estado fisiológico y fitosanitario de los plantones y por consiguiente de los explantos primarios que se utilizaron para iniciar *in vitro* las distintas variedades.

#### Preparación de medios de cultivo

La composición de los distintos medios de cultivo empleados se indica en la **Tabla 6**. El pH de los medios se ajustó a 5.74 con NaOH y HCl, 0.1 y 1 N, y se solidificaron con 6 g/l de agar (A-1296, Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain). Los medios se distribuyeron en alícuotas de 12.5 ml y

30 ml, respectivamente, en tubos de ensayo de 25 x 150 mm (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain) cerrados con tapones de polipropileno (Bellco Glass INC. Kaputs) o bien en frascos de 55 x 115 mm y se esterilizaron en autoclave durante 15 min (tubos) o 20 min (frascos) a 121 °C y 1.05 atm.

### Condiciones ambientales

Los cultivos se mantuvieron en una cámara bajo condiciones estándares de cultivo, esto es, con una temperatura constante de  $25 \pm 1$  °C, fotoperiodo de 16 horas e intensidad lumínica de  $40 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ , proporcionada por lámparas Sylvania GroLux (F40 tubes Gro-lux, Sylvania, Madrid, Spain).

En cuanto a las condiciones en el invernadero, la humedad relativa en el interior del túnel de aclimatación se mantuvo cercana al 100% y la temperatura entorno a los 20 °-30 °C, mediante un sistema de calefacción y la luminosidad se mantuvo por debajo de los 6000 lux en las horas centrales del día mediante la colocación en el invernadero de una malla de sombreado del 80%.

### Análisis estadístico de los datos

Los datos expresados como porcentajes fueron analizados por tablas de contingencias (Chi-cuadrado), para el resto de datos se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA), estableciendo la diferencia entre medias con el test SNK (software informático SPSS v15.0). El nivel de significación fue para todos los casos de 0.05.

### II.2.2. Establecimiento *in vitro* del material

Los inicios se realizaron en primavera a partir de brotes en crecimiento activo, obtenidos tras la poda de los plantones mantenidos en invernadero.

Para la desinfección del material vegetal se utilizó el protocolo puesto a punto por (Vidoy-Mercado, 2014), para las variedades 'Arbequina' y 'Picual'.

- Recogida de brotes de 5-10 cm y eliminación de hojas.
- Lavado con agua jabonosa y con alcohol 70 % (v/v).



-Desinfección superficial de los tallos con una solución de hipoclorito sódico (1% de cloro activo) y unas gotas de tween-20 durante 10 minutos, que posteriormente, son lavados con agua corriente.

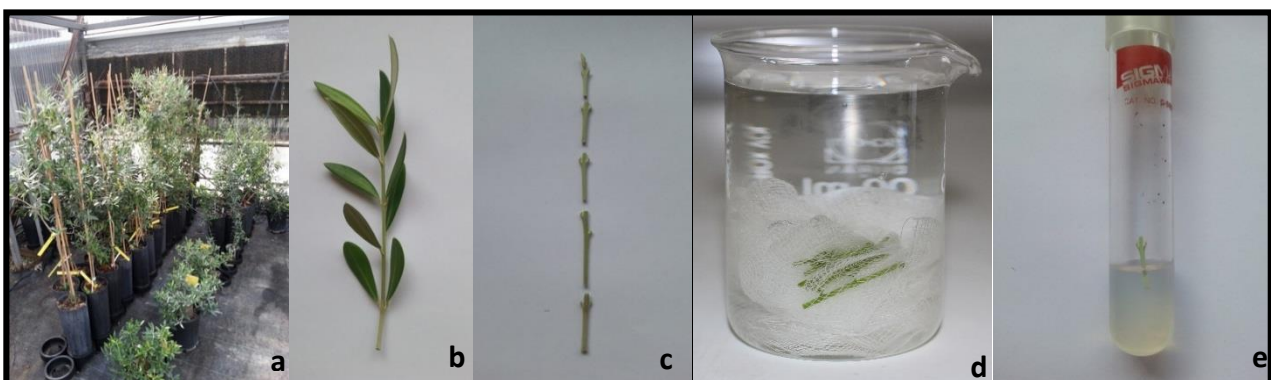
-Las secciones nodales de 1.5-2.0 cm de longitud, y con dos yemas, se individualizaban y se desinfectan por inmersión en una solución de hipoclorito sódico (1% de cloro activo) y unas gotas de tween-20 durante 10 minutos. Posteriormente, se lavaban 3 veces (5 minutos cada una) con agua destilada estéril y se cultivaban individualmente y en posición vertical en el medio de inicio en tubos de ensayo (**Figura 7**). Para cada experimento se realizaron 3 repeticiones en las que se cultivaban 25 secciones nodales de cada variedad en cada medio empleado.

Los brotes establecidos y aparentemente sanos fueron cultivados en Bacterial Screening Medium (Duchefa Biochemie<sup>bv</sup>), para detectar la posible aparición de contaminación endógena. Tras una semana, si no se detectaba la aparición de contaminación, los brotes pasaban a la fase de multiplicación.

Las secciones nodales se cultivaban individualmente en tubos de ensayo (25 x 150 mm) con 12.5 ml de medio de inicio en el que permanecían durante 6 semanas, tras las que se recultivaban en medio fresco permaneciendo en él, otras 6 semanas.

Tras 6 y 12 semanas, se tomaron datos del número de secciones contaminadas, necrosadas y brotadas, así como del aspecto de las mismas y además, tras las 12 semanas, la longitud de los brotes formados.

Puesto que las secciones nodales de olivo poseen dos yemas axilares por nudo, consideramos que una sección había brotado cuando brotaba, al menos, una de sus dos yemas y que estaba necrosada cuando lo estaban las dos yemas.



**Figura 7:** Protocolo de introducción *in vitro* del material. **(a)** Plantones madres en invernadero; **(b)** Brote en crecimiento activo del que se toman las secciones nodales; **(c)** Disección del brote en secciones nodales; **(d)** Desinfección del material en solución de hipoclorito sódico al 1% de cloro activo; **(e)** Cultivo de una sección nodal en tubo con medio de inicio.

### Experimento 1: Comportamiento de distintas variedades de olivo, en la fase de inicio, en el medio RP

En este experimento se evaluó el comportamiento de las distintas variedades de olivo en el medio RP, medio estándar de inicio utilizado por Vidoy-Mercado *et al.* (2014), para las variedades ‘Arbequina’ y ‘Picual’, consistente en el medio DKW (Driver y Kuniyuki, 1984), con las modificaciones introducidas por Roussos y Pontikis (2002) salvo la fuente de hierro, en la que usamos la empleada en el medio DKW (**Tabla 6**).

Las variedades que se estudiaron fueron 22: ‘Alfafara’, ‘Blanqueta-11’, ‘Blanqueta-48’, ‘Castellana’, ‘Changlot Real’, ‘Cornicabra’, ‘Empeltre’, ‘Farga’, ‘Gordal Sevillana’, ‘Hojiblanca’, ‘Lechín de Granada’, ‘Lechín de Sevilla’, ‘Manzanilla Cacereña’, ‘Manzanilla de Sevilla’, ‘Morisca’, ‘Morrut’, ‘Picudo’, ‘Sevillenca’, ‘Verdial de Badajoz’, ‘Verdial de Huévar’, ‘Verdial de Vélez Málaga’ y ‘Villalonga’.

### Experimento 2: Comportamiento de distintas variedades de olivo, en la fase de inicio, en el medio IM

En este experimento se estudió el comportamiento *in vitro* de aquellas variedades que no iniciaron bien en medio RP, en el medio IM, puesto a punto por Rugini (1984) para la fase de inicio en olivo, y utilizado para distintas variedades (**Tabla 6**). En este experimento el medio RP se utilizó como medio control.

Este experimento se realizó con 14 variedades: ‘Alfafara’, ‘Blanqueta-11’, ‘Blanqueta-48’, ‘Changlot Real’, ‘Empeltre’, ‘Farga’, ‘Gordal Sevillana’, ‘Lechín de Granada’, ‘Manzanilla de Sevilla’, ‘Morisca’, ‘Morrut’, ‘Picudo’, ‘Verdial de Badajoz’, ‘Verdial de Huévar’.

Experimento 3: Comportamiento de distintas variedades de olivo, en la fase de inicio, en los medios WPM, MS y B5

Este experimento se llevó a cabo con 14 variedades, las mismas que en el ensayo anterior, y se pretendió determinar el comportamiento de dichas variedades en distintos medios descritos en la bibliografía para el inicio de otras especies leñosas y también utilizados en olivo.

Los medios en los que se cultivaron las secciones nodales fueron el Woody Plant Medium, WPM, (Lloyd y McCown, 1981), el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y el medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968). La composición específica de cada medio viene reflejada en la **Tabla 6**.

En este experimento se utilizó los datos medios obtenidos para el medio RP en los experimentos anteriores como control, debido a la falta de material vegetal.

Tabla 6: Composición de los diferentes medios de cultivo utilizados.

|  | DKW  | RP    | IM      | B5    | MS    | WPM  |
|--|------|-------|---------|-------|-------|------|
| <b>Macronutrientes (mg/L)</b>                        |      |       |         |       |       |      |
| KNO <sub>3</sub>                                     | ***  | ***   | 500     | 2500  | 1900  | ***  |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                      | 1417 | 1417  | 100     | ***   | 1650  | 400  |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O | 1960 | 1960  | ***     | ***   | ***   | 556  |
| CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O                 | 147  | 147   | 40      | 150   | 440   | 96   |
| MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O                 | 740  | 1500  | 250     | 250   | 370   | 370  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 259  | 259   | 50      | ***   | 170   | 170  |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                       | 1560 | 782,3 | ***     | ***   | ***   | 990  |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O   | ***  | ***   | ***     | 150   | ***   | ***  |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | ***  | ***   | ***     | 134   | ***   | ***  |
| <b>Micronutrientes (mg/L)</b>                        |      |       |         |       |       |      |
| MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O                 | 44,6 | 44,6  | 5,575   | 13,2  | 22,3  | 29,4 |
| ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O                 | 16,4 | 16,4  | 2,15    | 2     | 8,6   | 8,6  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 4,8  | 6,2   | 1,55    | 3     | 6,2   | 6,2  |
| KI   | ***  | ***   | 25      | 0,75  | 100   | ***  |
| CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O                 | 0,25 | 0,25  | 0,00625 | 0,025 | 0,025 | 0,25 |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O  | 0,38 | 0,2   | 0,0625  | 0,25  | 0,25  | 0,25 |
| CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O                 | ***  | ***   | 0,00625 | 0,025 | 0,025 | ***  |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                 | 44,6 | 44,6  | 18,6    | 44,6  | 37,5  | 37,3 |
| FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O                 | 33,3 | 33,3  | 13,9    | 33,3  | 27,8  | 27,8 |
| <b>Vitaminas (mg/L)</b>                              |      |       |         |       |       |      |
| Thiamine*H Cl  | 2    | 2     | 10      | 10,1  | 0,1   | 1    |
| Ac. Nicótico   | 1    | 0,5   | 0,25    | 0,98  | 0,5   | 0,5  |
| Glycine  | 2    | ***   | 1       | ***   | 2     | 2    |
| Pyridoxina*H Cl                                      | ***  | 0,5   | 0,25    | 1     | 0,5   | 0,5  |
| Ac. Fólico   | ***  | 0,5   | ***     | ***   | ***   | ***  |
| Cisteína   | ***  | 10    | ***     | ***   | ***   | ***  |
| <b>Reguladores de crecimiento (mg/L)</b>             |      |       |         |       |       |      |
| Zeatina Ribósido                                     | ***  | 2     | 0,5     | ***   | ***   | ***  |
| ANA  | ***  | ***   | ***     | ***   | 0,01  | ***  |
| BAP  | ***  | ***   | ***     | ***   | 0,7   | ***  |
| <b>Polialcoholes (mg/L)</b>                          |      |       |         |       |       |      |
| Mio-inositol   | 1000 | 1000  | 50      | 99,1  | 100   | 100  |
| <b>Aminoácidos (mg/L)</b>                            |      |       |         |       |       |      |
| Glutamina  | ***  | 1200  | ***     | ***   | ***   | ***  |
| <b>Azúcares (g/L)</b>                                |      |       |         |       |       |      |
| Sacarosa   | 30   | ***   | 30      | 30    | 30    | 30   |
| Manitol  | ***  | 20    | ***     | ***   | ***   | ***  |
| <b>Agente gelificante (g/L)</b>                      |      |       |         |       |       |      |
| Agar   | 6    | 6     | 6       | 6     | 6     | 6    |

### II.2.3. Multiplicación

#### Experimento 1: Comportamiento de distintas variedades de olivo durante la fase de multiplicación *in vitro*

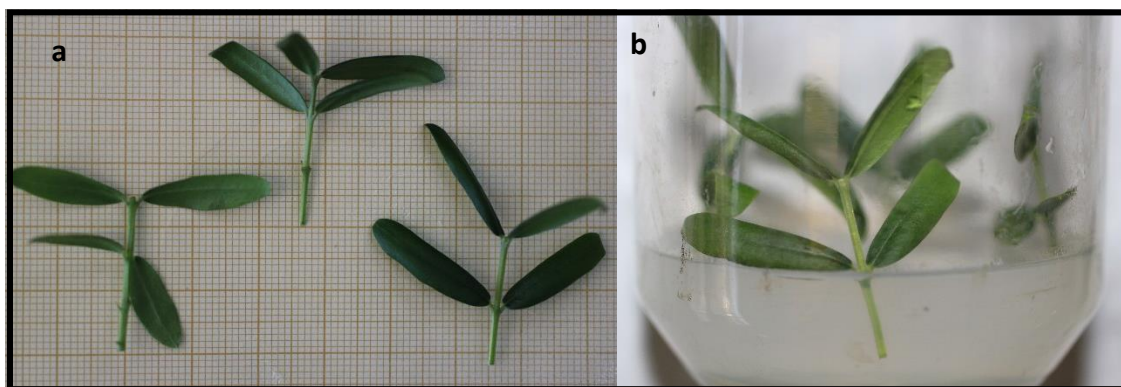
Este experimento se planteó para conocer las diferencias en la capacidad de proliferación de las distintas variedades de olivo y su comportamiento a lo largo del tiempo.

El material de partida para este experimento fueron brotes subapicales procedentes de los distintos stocks en proliferación, con una longitud de 1.5-2.0 cm; con 2-3 nudos y 4 hojas. (**Figura 8**).

Las variedades estudiadas en esta segunda fase fueron 16: 'Arbequina', 'Alfajara', 'Blanqueta-11', 'Blanqueta-48', 'Castellana', 'Cornicabra', 'Hojiblanca', 'Lechín de Granada', 'Lechín de Sevilla', 'Manzanilla Cacereña', 'Morrut', 'Sevillena', 'Verdial de Badajoz', 'Verdial de Huévar', 'Verdial de Vélez Málaga' y 'Villalonga'.

El medio utilizado durante esta fase fue el medio RP (**Tabla 6**).

Los explantos se cultivaban en posición vertical en frascos con 30 ml de medio (4 explantos/frasco), y se mantenían en cámara de cultivo, bajo condiciones estándar, durante 8 semanas, periodo tras el cual se tomaban datos y se recultivaban en medio fresco.



**Figura 8:** (a) Brotes subapicales (explanto primario) de la variedad 'Arbequina'; (b) Inicio de los experimentos de multiplicación, explanto de la variedad 'Arbequina'.

Los datos tomados fueron el número de unidades de multiplicación (UM) por subcultivo y variedad y la tasa de multiplicación se determinó de la siguiente forma (**Figura 9**):

El explanto inicial constituía lo que hemos denominado una unidad de multiplicación (UM). Se partían de 20 UM (4 UM/frasco) que tras 8 semanas se subcultivaban de forma que aquellas yemas

que brotaban dando lugar a brotes  $\geq 1.5$  cm se individualizaban constituyendo una nueva UM. Los brotes  $\leq 1.5$  cm se dejaban unidos al explanto inicial y pasaban al siguiente subcultivo. La tasa de multiplicación se calculaba dividiendo el número total de UM al final del subcultivo entre el número de UM iniciales (20). Para los siguientes subcultivos se procedió de idéntica forma.

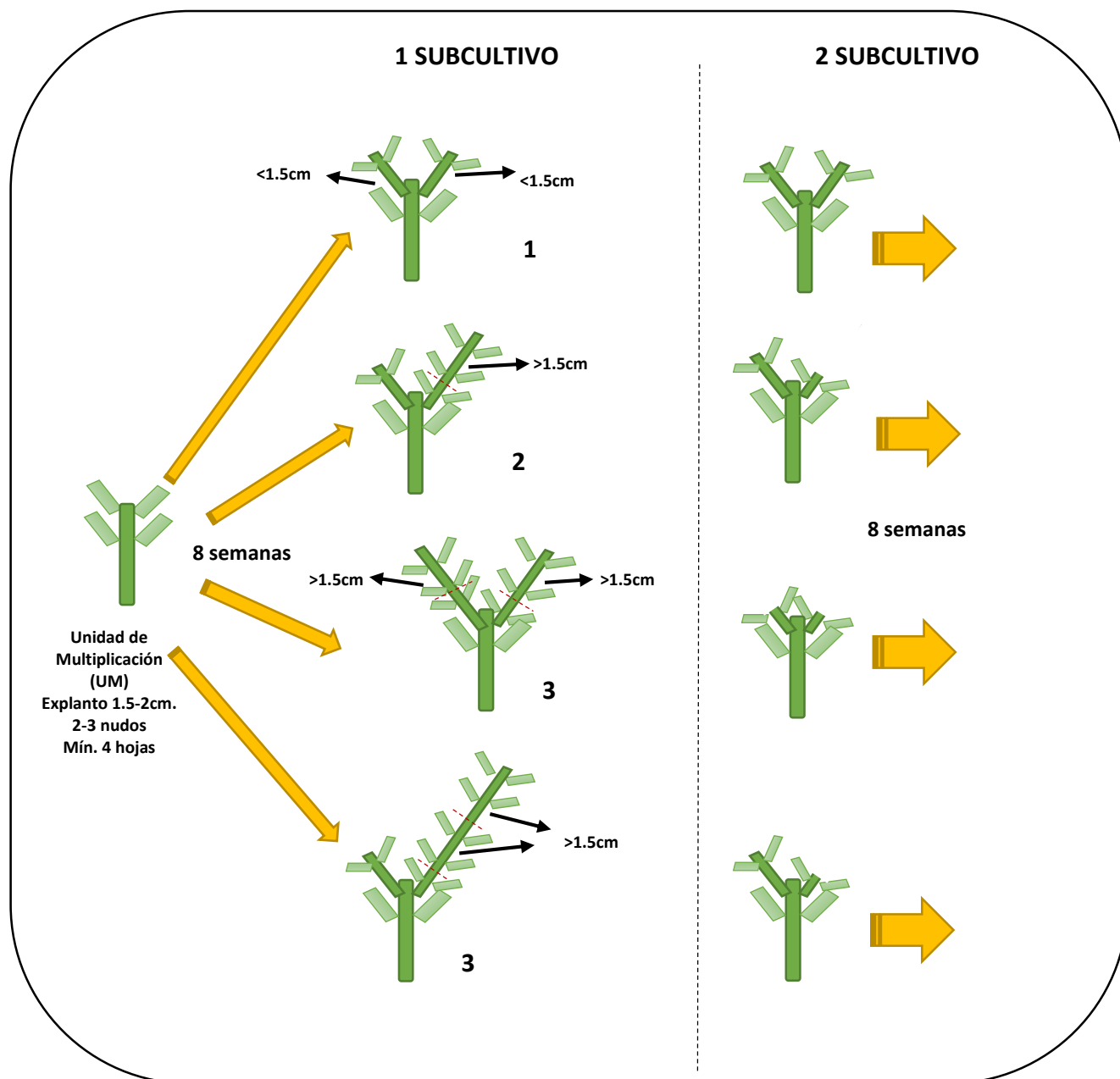


Figura 9: Esquema de la multiplicación de brotes subapicales de olivo.

La tasa de multiplicación se calculó para las 15 variedades con las que se pudo formar un stock en proliferación. El olivo, al igual que otros muchos frutales presenta variaciones en la tasa de multiplicación con los subcultivos. Se evaluó la tasa de multiplicación (T1) de los brotes durante los primeros subcultivos una vez formado el stock (los brotes, previo al cálculo de la tasa de multiplicación, habían sido subcultivados de 1 a 5 veces), dicha tasa se calculó en 4 subcultivos sucesivos a partir del subcultivo 1 al 5. Transcurridos más de 15 subcultivos se volvió a calcular la tasa de multiplicación de nuevo en las distintas variedades durante 4 subcultivos sucesivos, a esta tasa se denominó tasa de multiplicación final (T2).

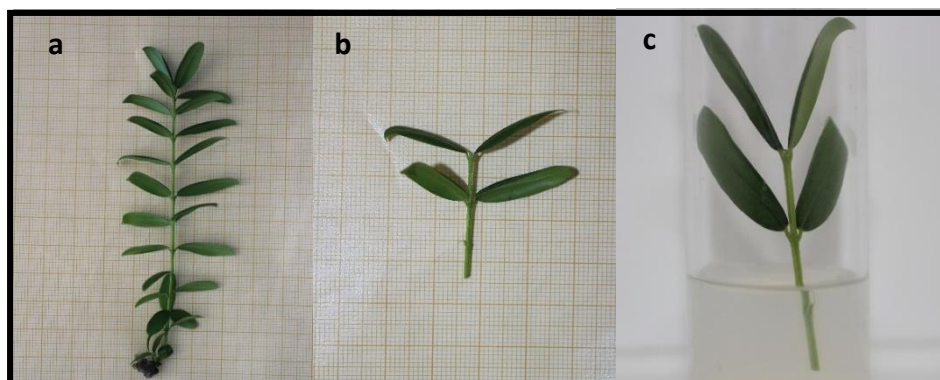
De este experimento se realizaron 3 repeticiones, en cada una de las cuales se cultivaron 20 UM de cada variedad.

#### II.2.4. Enraizamiento

En los experimentos de enraizamiento se utilizaron brotes subapicales procedentes del stock en proliferación de las distintas variedades, con una longitud de 2.0-2.5 cm, 2 nudos y 4 hojas (**Figura 10**).

Las variedades ensayadas fueron 13: 'Arbequina', 'Alfajara', 'Blanqueta-11', 'Castellana', 'Cornicabra', 'Hojiblanca', 'Lechín de Granada', 'Lechín de Sevilla', 'Manzanilla Cacereña', 'Sevillena', 'Verdial de Huévar', 'Verdial de Vélez Málaga' y 'Villalonga'.

Para cada uno de los experimentos de enraizamiento realizados, se realizaron 3 repeticiones, usándose en cada una de ellas 25 brotes de cada variedad.



**Figura 10:** (a) Brote procedente del stock de proliferación del cual se obtienen los explantos para el enraizamiento; (b) Explanto utilizado para los experimentos de enraizamiento; (c) Explanto cultivado en medio de enraizamiento.



### Experimento 1: Efecto del medio DKWr sobre el enraizamiento *in vitro* de diferentes variedades de olivo

Para comprobar el efecto del medio DKWr en el enraizamiento de las variedades, nos basamos en el método descrito por Revilla *et al.* (1996).

Para ello, se cultivaban los brotes de forma individualizada en tubos de ensayo con 25 ml de medio de enraizamiento DKWr, el cual consistía en el medio basal de Driver y Kuniyuki (1984) pero con la mitad de sales, sin vitaminas ni aminoácidos, y suplementado con 0.1 mg/L de AIB (**Tabla 7**). Los explantos se mantuvieron durante una semana en la cámara de cultivo con una temperatura de  $25 \pm 1$  °C y en oscuridad.

Transcurrida la primera semana, los cultivos se colocaban bajo un fotoperiodo de 16 horas donde permanecían durante 7 semanas.

Durante las 8 semanas de cultivo (1 semana oscuridad + 7 semanas con fotoperiodo de 16 horas) se tomaban datos cada dos semanas del número de brotes que enraizaban, número de raíces y longitud de las mismas y aspecto general de los brotes.

### Experimento 2: Efecto de los medios OMr/e en el enraizamiento *in vitro* de diferentes variedades de olivo

Para comprobar el efecto de los medios OMr/e en el enraizamiento de las variedades, nos basamos en el método descrito por Cañas *et al.* (1987).

Este método está dividido en dos fases, una primera fase en la que se pretende inducir el enraizamiento y otra fase en la que una vez ha enraizado se busca la elongación de las raíces inducidas. En cada fase se usa un medio diferente, aunque ambos están basados en el medio basal de olivo (OM) descrito por Rugini *et al.* (1984). Por un lado, el medio de inducción al enraizamiento (OMr) lleva la mitad de las sales del medio OM, sin vitaminas ni aminoácidos y suplementado con 1 mg/L de AIB (**Tabla 7**). Y, por otro lado, el medio de elongación (OMe) cuya composición de sales es una cuarta parte del medio OM y suplementado con la mitad de vitaminas de dicho medio y 0.1 mg/L de zeatina (**Tabla 7**).

Primera fase: Se cultivaban los explantos en tubos de ensayo con 25 ml de medio OMr y se colocaban en cámara de cultivo bajo condiciones estándar. Los brotes fueron mantenidos bajo estas



condiciones durante 2 semanas, momento en el cual los brotes pasaban a la segunda fase del protocolo.

Segunda fase: Los brotes fueron cultivados en tubos de ensayo con 25 ml de medio OMe en las mismas condiciones de cultivo durante 6 semanas.

Se tomaron datos del número de brotes enraizados, el número de raíces y la longitud de las mismas, así como el aspecto general de los explantos cada dos semanas durante las 8 semanas de duración del ensayo.

**Tabla 7:** Composición de los medios empleados durante la fase de enraizamiento *in vitro*.

|  | DKW  | DKWr  | OM    | OMr    | OMe    |
|--|------|-------|-------|--------|--------|
| <b>Macronutrientes (mg/L)</b>                        |      |       |       |        |        |
| KNO <sub>3</sub>                                     | ***  | ***   | 1100  | 550    | 275    |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                      | 1417 | 708,5 | 412   | 206    | 103    |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O | 1960 | 980   | 600   | 300    | 150    |
| CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O                 | 147  | 73,5  | 440   | 220    | 110    |
| MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O                 | 740  | 370   | 1500  | 750    | 375    |
| K Cl   | ***  | ***   | 500   | 250    | 125    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 259  | 129,5 | 340   | 170    | 85     |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                       | 1560 | 780   | ***   | ***    | ***    |
| <b>Micronutrientes (mg/L)</b>                        |      |       |       |        |        |
| MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O                 | 33   | 16,5  | 22.3  | 11,15  | 5,57   |
| ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O                 | 17   | 8,5   | 14.3  | 7,15   | 3,57   |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 4.8  | 2,4   | 12.4  | 6,2    | 3,1    |
| KI   | ***  | ***   | 100   | 50     | 25     |
| CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O                 | 0.25 | 0,125 | 0,25  | 0,125  | 0,0625 |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O  | 0.38 | 0,19  | 0,25  | 0,125  | 0,0625 |
| CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O                 | ***  | ***   | 0,025 | 0,0125 | 0,0063 |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                 | 44.6 | 22,3  | 37.5  | 18,75  | 9,37   |
| FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O                 | 33.3 | 16,65 | 27.8  | 13,9   | 6,95   |
| <b>Vitaminas (mg/L)</b>                              |      |       |       |        |        |
| Thiamine*H Cl  | 2    | ***   | 0.5   | ***    | 0,25   |
| Ac. Nicótico   | 1    | ***   | 5     | ***    | 2,5    |
| Glycine  | 2    | ***   | 2     | ***    | 1      |
| Pyridoxina*H Cl                                      | ***  | ***   | 0.5   | ***    | 0,25   |
| Ac. Fólico   | ***  | ***   | 0.5   | ***    | 0,25   |
| Biotina  | ***  | ***   | 0.05  | ***    | 0,025  |
| <b>Reguladores de crecimiento (mg/L)</b>             |      |       |       |        |        |
| Zeatina  | ***  | ***   | 4     | ***    | 0,1    |
| AIB  | ***  | 0,1   | ***   | 1      | ***    |
| <b>Polialcoholes (mg/L)</b>                          |      |       |       |        |        |
| Mio-inositol   | 1000 | 1000  | ***   | ***    | 50     |
| <b>Aminoácidos (mg/L)</b>                            |      |       |       |        |        |
| Glutamina  | ***  | ***   | 2.19  | ***    | 550    |
| <b>Azúcares (g)</b>                                  |      |       |       |        |        |
| Sacarosa   | 30   | 30    | 30    | 30     | 30     |
| <b>Agente gelificante (g)</b>                        |      |       |       |        |        |
| Agar   | 6    | 6     | 6     | 6      | 6      |

Experimento 3: Evaluación de la capacidad de enraizamiento *ex vitro* de microestaquillas de diferentes variedades de olivo, procedentes del cultivo *in vitro*

Se ensayó el enraizamiento *ex vitro* para las variedades estudiadas en esta fase siguiendo el protocolo de Vidoy-Mercado (2014).

En un recipiente grande se mezclaban en una proporción 1:1 los distintos sustratos empleados, Turba y Perlita, y se le añadía una pequeña cantidad de abono de liberación lenta (Osmocote® Exact® Mini, Scotts Internacional B.V., The Netherlands). Se viertía agua y se mezclaba y amasaba todo perfectamente hasta crear un sustrato homogéneo.

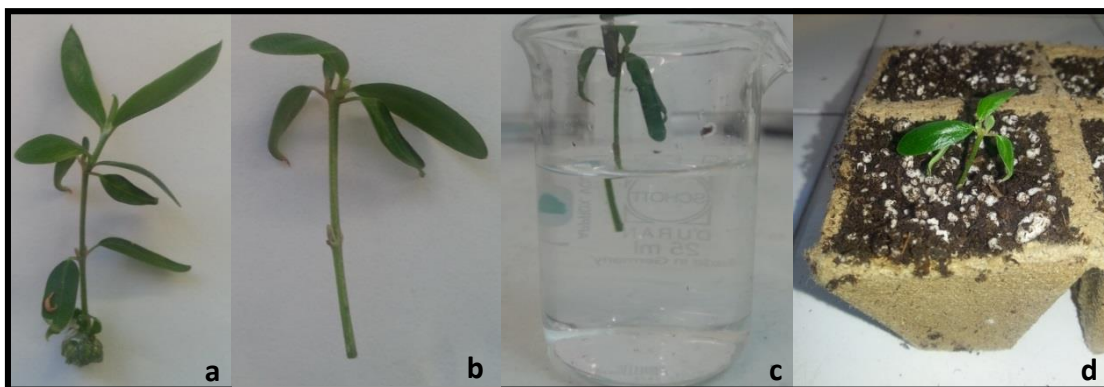
Una vez preparado el sustrato se introducía en alveolos de turba prensada de 4.5 cm (Jiffyspot, Jiffygroup Kristiansand, Noruega) y se le realizaba un pequeño agujero para introducir los brotes (**Figura 11**).



**Figura 11:** Preparación de los jiffys con sustrato para el enraizamiento *ex vitro*.

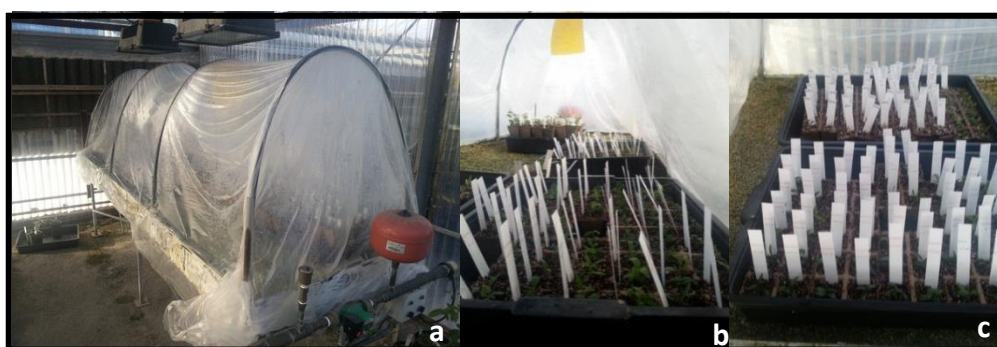
Se cortaban los brotes con la medida establecida (2.0-2.5 cm) y se les eliminaba la parte apical, el callo basal y las hojas basales para dejar un pequeño trozo de tallo limpio para sumergirlo en la solución con la hormona.

Una vez preparados los explantos, se procedía a realizar el dipping, para lo cual se sumergía el tallo del explanto durante 10 segundos en una solución con AIB (3 g/L) a pH 5,74. Y tras ello se colocaban los explantos en el sustrato (**Figura 12**).



**Figura 12:** Enraizamiento *ex vitro*: **(a)** Brote inicial; **(b)** Explanto primario, una vez eliminado la parte apical, el callo basal y las hojas basales; **(c)** Dipping del brote de olivo en solución de 3g/L de AIB; **(d)** Trasplante del explanto al sustrato.

Los brotes fueron mantenidos en tuneles de aclimatación situados en un invernadero climatizado durante 12 semanas (**Figura 13**). Cada dos semanas se realizaba una inspección visual para observar el aspecto general de las plántulas y tomar datos del número de plántulas enraizadas. En caso de no observarse raíces se seguían dejando dentro del tunel hasta que conseguían enraizar, y en caso de que se observara la presencia de raíces las plántulas eran transferidas individualmente a macetas de 250 ml conteniendo el mismo sustrato indicado anteriormente y pasados a una mesa de aclimatación semiabierto, la cual no disponía del sistema de calefacción ni humidificación, pero si estaba cubierta por un túnel de polietileno el cual permanecía abierto durante 3-5 horas al día. Allí se mantuvieron durante una semana, para conseguir endurecer las plántulas, antes de colocarlas en bancadas abiertas dentro del invernadero.



**Figura 13:** Proceso de enraizamiento *ex vitro*: **(a)** Túnel de aclimatación **(b y c)** interior del túnel de aclimatación con los brotes de olivo.

### II.2.5. Estabilidad Genética

Las variedades analizadas fueron 8: ‘Blanqueta-11’, ‘Castellana’, ‘Cornicabra’, ‘Hojiblanca’, ‘Lechín de Granada’, ‘Sevillenca’, ‘Verdial de Vélez Málaga’ y ‘Villalonga’.

Se analizó tejido foliar (i) de los plantones madres de los cuales procedía el material micropropagado, y (ii) de las plántulas micropropagadas y aclimatadas.

#### Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando el método de Torres *et al.* (1993), reemplazando el buffer de extracción por uno adaptado a plantas leñosas (Cheng *et al.*, 1997). El protocolo aparece descrito en el ANEXO I (pag. 323).

La cantidad y calidad del ADN obtenido se determinó por espectrofotometría (A260, A280 y A230) y electroforesis en gel de agarosa.

#### Selección de los cebadores ISSR

Se realizaron pruebas iniciales con 82 cebadores ISSR (University of British Columbia –UBC- ISSR primer serie 9) de los que finalmente seleccionamos 15, que dieron lugar a patrones de amplificación complejos y repetibles, para realizar las reacciones y el análisis de las plantas micropropagadas.

Las secuencias de los cebadores seleccionados se indican en la **Tabla 8**.

**Tabla 8:** Cebadores ISSR empleados y secuencia nucleotídica.

| ISSR | Secuencia           | ISSR | Secuencia            | ISSR | Secuencia            |
|------|---------------------|------|----------------------|------|----------------------|
| 808  | (AG) <sub>8</sub> C | 827  | (AC) <sub>8</sub> G  | 855  | (AC) <sub>8</sub> YT |
| 810  | (GA) <sub>8</sub> T | 834  | (AG) <sub>8</sub> YT | 864  | (ATG) <sub>6</sub>   |
| 811  | (GA) <sub>8</sub> C | 836  | (AG) <sub>8</sub> YA | 868  | (GAA) <sub>6</sub>   |
| 813  | (CT) <sub>8</sub> T | 842  | (GA) <sub>8</sub> YG | 885  | BHB(GA) <sub>7</sub> |
| 825  | (AC) <sub>8</sub> T | 844  | (CT) <sub>8</sub> RC | 887  | DVD(G)               |

Reacción PCR

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de 25  $\mu$ l.

-Cantidad ADN: 25 ng

-Cantidad cebador ISSR: 0.05  $\mu$ M

-Volumen DNA AmpliTools Master Mix 2X (Biootols): 12.5  $\mu$ l.

-Agua estéril: hasta 25  $\mu$ l.

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador DNA Engine® Peltier Thermal Cycler (BioRad, Berkeley, CA) (**Figura 14**) con las condiciones descritas en la **Tabla 9**.

Cada amplificación ISSR se realiza al menos dos veces con cada muestra y cebador incluyéndose un control negativo para comprobar posibles contaminaciones. En aquellos casos, en los que tras dos repeticiones no quedaba claro el patrón obtenido, se repetía una tercera vez.

**Tabla 9:** Condiciones de PCR utilizadas en el análisis mediante marcadores ISSR.

|     | Fase                      | Tiempo   | Tª    | N ciclos |
|-----|---------------------------|----------|-------|----------|
| I   | Desnaturalización Inicial | 5 min    | 94 °C | 1        |
| II  | Desnaturalización         | 30 seg   | 94 °C | 40       |
|     | Hibridación               | 45 seg   | 52 °C |          |
|     | Extensión                 | 2 min    | 72 °C |          |
| III | Extensión Final           | 6 min    | 72 °C | 1        |
| IV  | Enfriamiento              | $\infty$ | 4 °C  | ***      |



**Figura 14:** Aparatos usados para llevar a cabo el estudio de estabilidad genética: (a) Termociclador; (b) Transiluminador; (c) Cubetas para electroforesis.

### Electroforesis

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,7% en TAE 1x (40mM Tris, 20mM ácido acético, y 1mM EDTA) que contenían RedSafe™ como agente intercalante. Se aplicó un voltaje de 100-110 v durante 2,30-3 horas (**Figura 14**).

Los geles, teñidos con el tinte RedSafe™, fueron observados en un transiluminador Gel Doc™ XR System (BioRad, Berkeley, CA). A continuación, se procedió a la toma de fotografías de los geles mediante el propio sistema de captura que presentaba el transiluminador. Se determinaron los patrones de bandas con la ayuda del programa Quantity One (BioRad, Berkeley, CA).

### Experimento 1: Estudio de la variabilidad genética intervarietal en olivo

Para este estudio seguimos el procedimiento antes descrito, para lo cual una vez extraído el ADN de los plántones madres y realizadas las respectivas PCR, con los 15 cebadores escogidos (**Tabla 8**), se determinaron los patrones de bandas con la ayuda del programa *Quantity One*, de forma que la presencia de banda se representaba con un 1 y la ausencia con un 0 en una matriz binaria, no considerándose la intensidad de la banda. Se usó un criterio conservador ya que sólo las bandas bien definidas y reproducibles fueron incluidas en las matrices. De forma general las bandas mayores a 1700 pb fueron descartadas, al igual que los fragmentos más pequeños que 300 pb. Así el rango de conteo de bandas osciló entre los 1700 pb y los 300 pb. Se compararon los patrones de marcadores obtenidos para cada cebador en cada variedad y así de esta forma se determinó las diferencias entre las distintas variedades.

Las distancias genéticas entre las variedades se estimaron utilizando el coeficiente de Jaccard (1908) recomendado cuando se utilizan marcadores dominantes. Para la representación gráfica en forma de dendograma se utilizó como método de agrupamiento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), mediante el programa PHYLIP.

### Experimento 2: Estudio de la estabilidad genética de las plantas micropropagadas

Para detectar posibles diferencias, en este experimento se compararon los perfiles obtenidos en la planta madre, con los perfiles obtenidos en las plantas micropropagadas. El procedimiento para el estudio y comparación de los perfiles es igual al seguido en el experimento anterior, solo que en lugar de comparar distintas variedades se comparó una planta madre con 5 plantas micropropagadas para cada variedad.

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





## II.3. RESULTADOS

### II.3.1. Establecimiento *in vitro* del material

Experimento 1: Comportamiento de distintas variedades de olivo, en la fase de inicio, en el medio RP

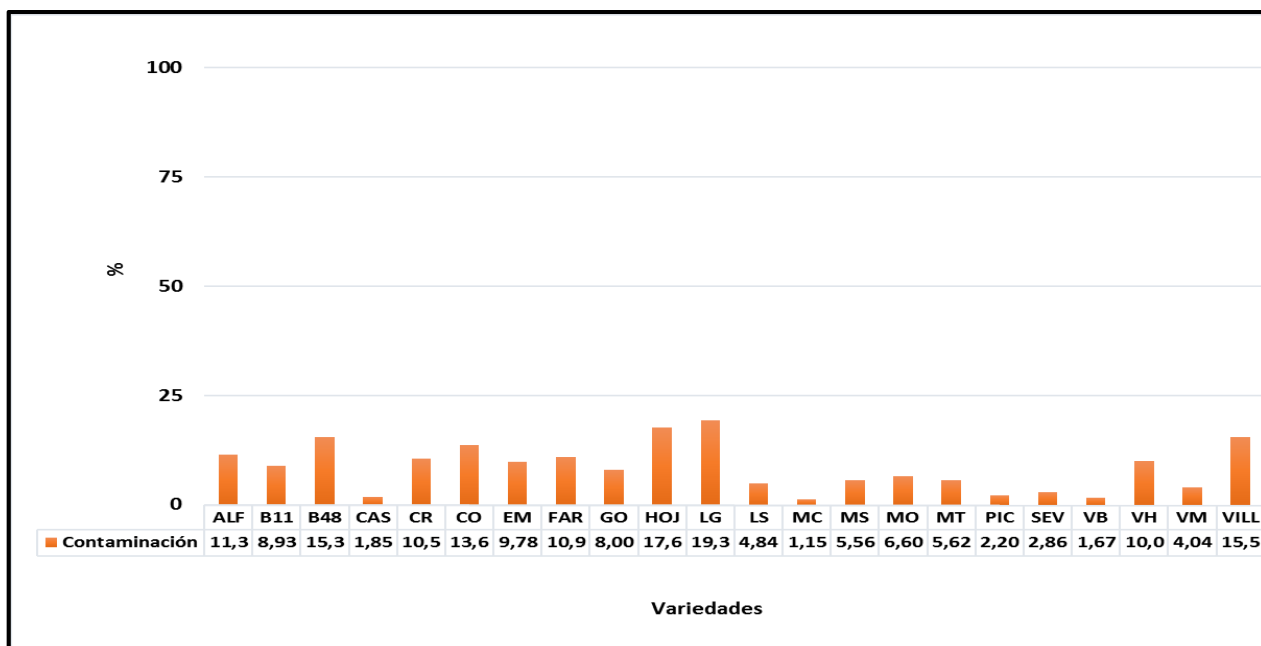
#### Desinfección del material vegetal

El protocolo de desinfección desarrollado por nuestro grupo de investigación para las variedades ‘Arbequina’ y ‘Picual’ se ha mostrado igual de eficaz en las variedades estudiadas, lo que se corrobora por los datos de contaminación obtenidos, que tras 12 semanas de cultivo presentaban valores medios, en las 22 variedades iniciadas, del 8.5%, observándose un rango que oscila entre el 19.4% de la variedad ‘Lechín de Granada’ y el 1.2% de la variedad ‘Manzanilla Cacereña’ (**Figura 15**). La contaminación observada en los cultivos fue producida mayormente por hongos y la utilización de un medio específico para el crecimiento bacteriano (ver Material y Métodos sección “Detección de contaminación endógena”), puso de manifiesto el buen estado fitosanitario de las plantas madres, ya que, salvo en los explantos procedentes de una de las tres plantas madre de la variedad ‘Gordal’, no se observó presencia de contaminación bacteriana endógena en los cultivos *in vitro*.

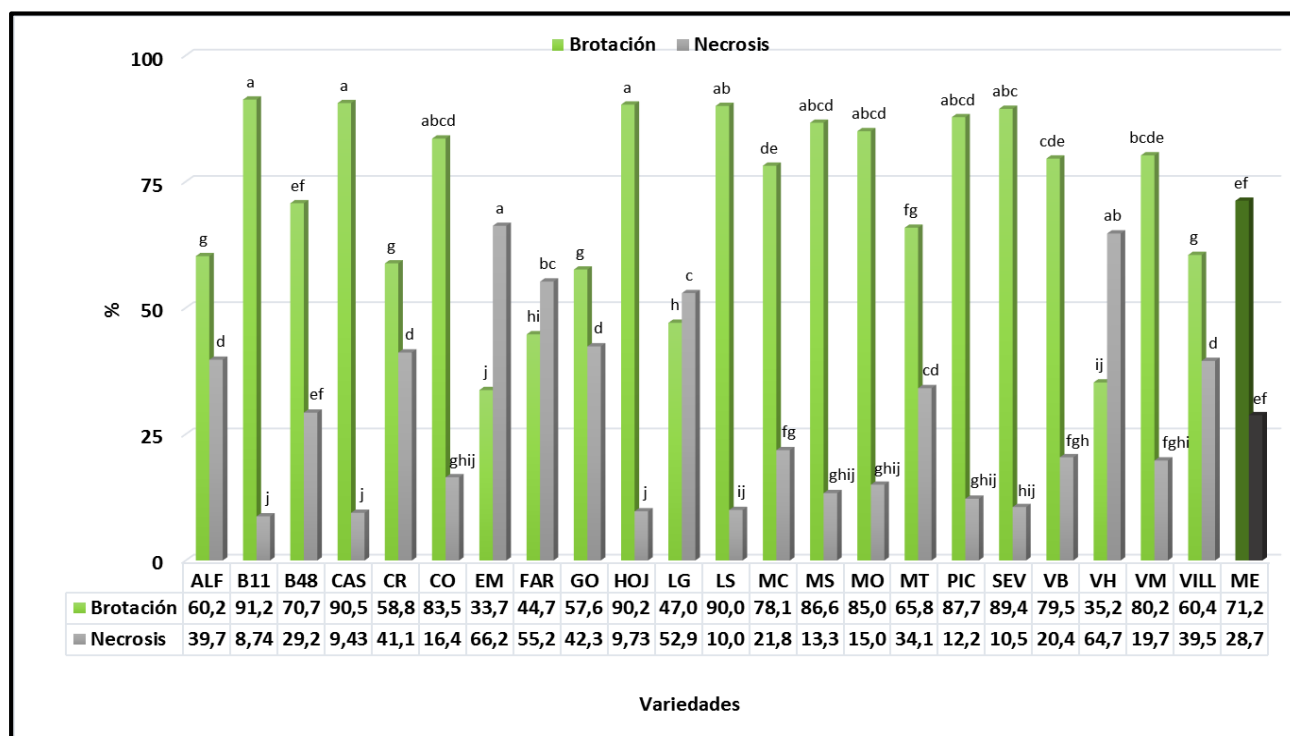
#### Brotación del material

La brotación obtenida a las 6 semanas fue muy heterogénea (**Figura 16**), con valores que oscilaron entre el 91.3% de ‘Blanqueta-11’ y el 33.7% de ‘Empeltre’, siendo la brotación media para todas las variedades en su conjunto del 71,2%, y, de las 22 variedades estudiadas, en 18 se alcanzaban valores de brotación superiores al 50% (**Figura 16**). En cuanto a la necrosis, se observó que aquellos explantos que a las 6 semanas no brotaban eran porque presentaban necrosis de las yemas axilares o de toda la sección nodal. Los valores observados oscilaron entre 66.2% de ‘Empeltre’ y el 8.7% de ‘Blanqueta-11’, siendo la necrosis media conjunta para todas las variedades del 28.8% (**Figura 16**).

En cuanto a la brotación de las yemas, no se observó ningún patrón específico en ninguna variedad, es decir, a veces se observó la dominancia de una de las yemas del nudo sobre la otra, mientras que en otros casos ambas yemas se desarrollaban de forma similar.



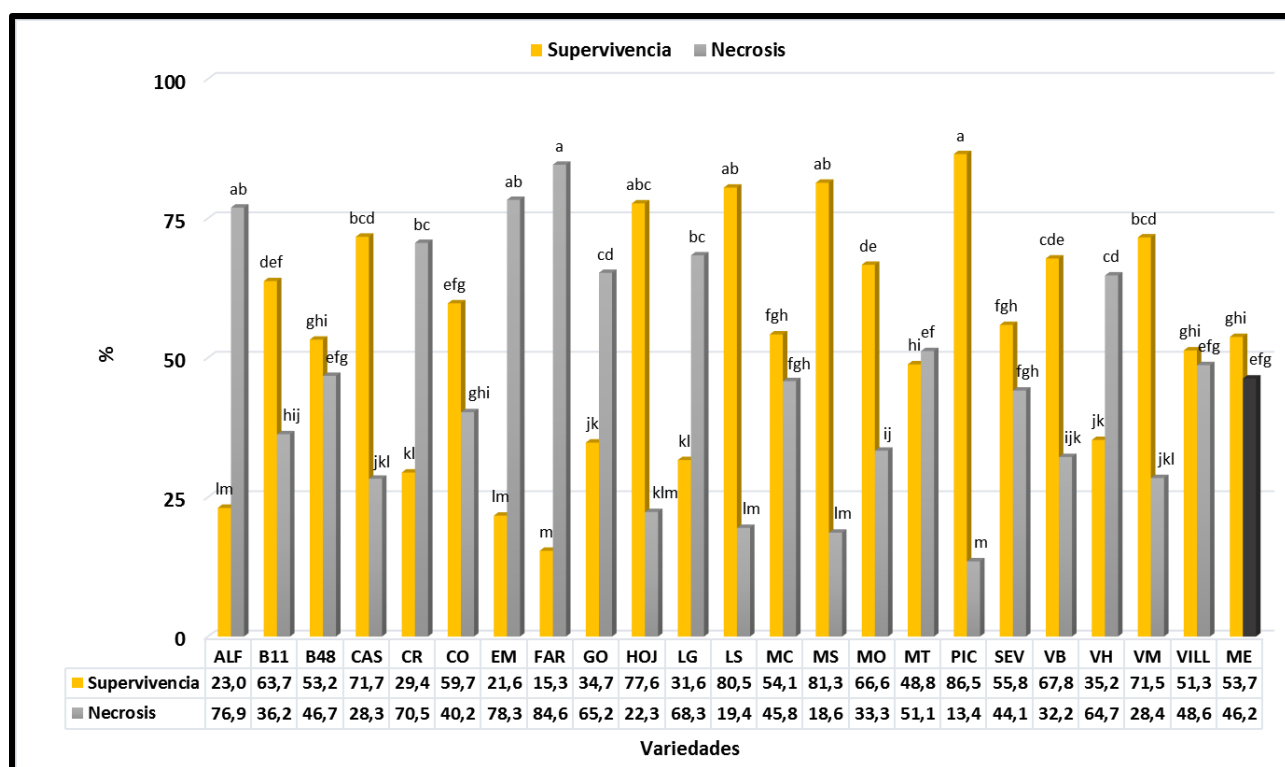
**Figura 15:** Porcentajes de contaminación observados en las distintas variedades de olivo iniciadas *in vitro* en medio RP. Datos de 12 semanas. ALF: ‘Alfajara’; B11: ‘Blanqueta-11’; B48: ‘Blanqueta-48’; CAS: ‘Castellana’; CR: ‘Changlot Real’; CO: ‘Cornicabra’; EM: ‘Empeltre’; FAR: ‘Farga’; GO: ‘Gordal’; HOJ: ‘Hojiblanca’; LG: ‘Lechín de Granada’; LS: ‘Lechín de Sevilla’; MC: ‘Manzanilla Cacereña’; MS: ‘Manzanilla de Sevilla’; MO: ‘Morisca’; MT: ‘Morrut’; PIC: ‘Picudo’; SEV: ‘Sevillena’; VB: ‘Verdial de Badajoz’; VH: ‘Verdial de Huévar’; VM: ‘Verdial de Vélez Málaga’; VILL: ‘Villalonga’.



**Figura 16:** Porcentajes de brotación y necrosis observados en las distintas variedades de olivo iniciadas *in vitro* en medio RP. Datos de 6 semanas. Columnas con letras diferentes entre variedades para una misma variable indican diferencias significativas según el test  $\chi^2$  ( $p < 0,05$ ). ALF: ‘Alfajara’; B11: ‘Blanqueta-11’; B48: ‘Blanqueta-48’; CAS: ‘Castellana’; CR: ‘Changlot Real’; CO: ‘Cornicabra’; EM: ‘Empeltre’; FAR: ‘Farga’; GO: ‘Gordal’; HOJ: ‘Hojiblanca’; LG: ‘Lechín de Granada’; LS: ‘Lechín de Sevilla’; MC: ‘Manzanilla Cacereña’; MS: ‘Manzanilla de Sevilla’; MO: ‘Morisca’; MT: ‘Morrut’; PIC: ‘Picudo’; SEV: ‘Sevillena’; VB: ‘Verdial de Badajoz’; VH: ‘Verdial de Huévar’; VM: ‘Verdial de Vélez Málaga’; VILL: ‘Villalonga’.

Los explantos que brotaban a las 6 semanas, se recultivaban en medio fresco otras 6 semanas para completar así 12 semanas de cultivo. Se observó que los explantos que no habían brotado a las 6 semanas no lo hacían posteriormente, y que parte de los explantos que habían brotado se necrosaban. Así, los valores de supervivencia obtenidos tras las 12 semanas de cultivo fueron muy diferentes para las distintas variedades estudiadas, oscilando entre el 86.5% de 'Picudo' y el 15.3% de 'Farga', siendo la supervivencia media de las 22 variedades del 53.7% (**Figura 17**). El número de variedades con porcentajes de supervivencia superiores al 50% fue de 14.

En cuanto a la necrosis final acumulada (necrosis durante las primeras 6 semanas de cultivo más necrosis tras el recultivo), el valor medio de las 22 variedades fue de 46.1%, alcanzándose los valores más altos en las variedades 'Farga' (84.6%), 'Empeltre' (78.3%) y 'Alfafara' (76.9%), y los valores más bajos en las variedades 'Picudo' (13.4%), 'Manzanilla de Sevilla' (18.6%) y 'Lechín de Sevilla' (19.4%).

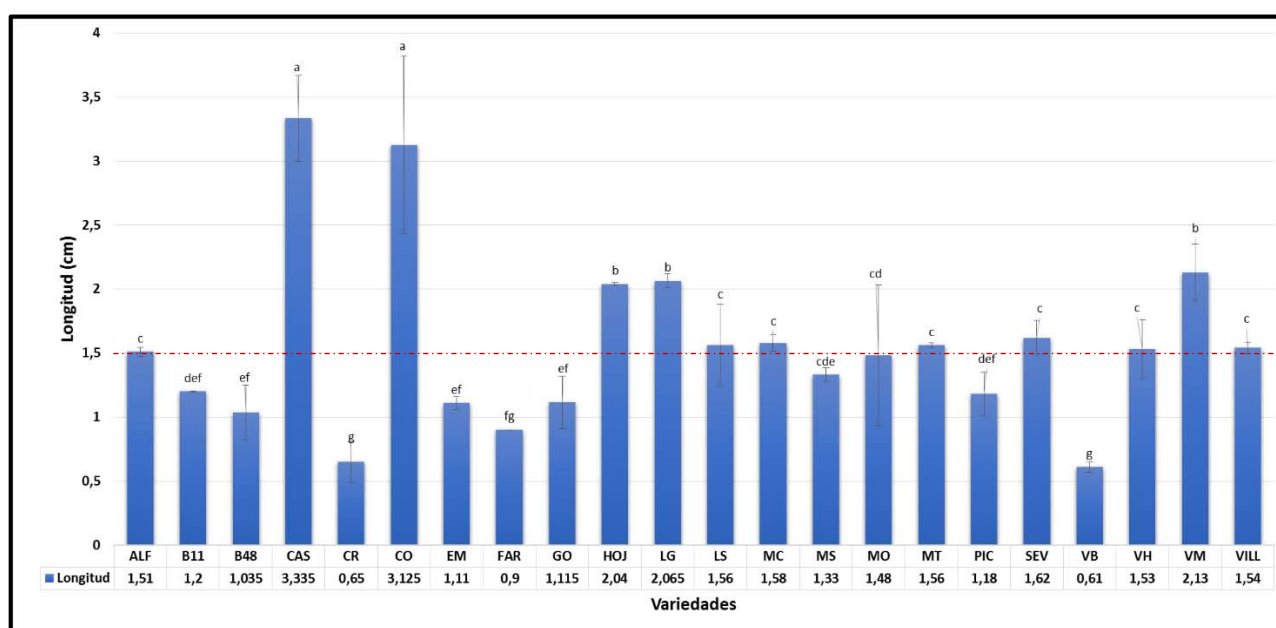


**Figura 17:** Porcentajes de supervivencia y necrosis observados en las distintas variedades de olivo iniciadas *in vitro* en medio RP. Datos de 12 semanas. Columnas con letras diferentes entre variedades para una misma variable indican diferencias significativas según el test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ). ALF: 'Alfafara'; B11: 'Blanqueta-11'; B48: 'Blanqueta-48'; CAS: 'Castellana'; CR: 'Changlot Real'; CO: 'Cornicabra'; EM: 'Empeltre'; FAR: 'Farga'; GO: 'Gordal'; HOJ: 'Hojiblanca'; LG: 'Lechín de Granada'; LS: 'Lechín de Sevilla'; MC: 'Manzanilla Cacereña'; MS: 'Manzanilla de Sevilla'; MO: 'Morisca'; MT: 'Morrut'; PIC: 'Picudo'; SEV: 'Sevillena'; VB: 'Verdial de Badajoz'; VH: 'Verdial de Huévar'; VM: 'Verdial de Vélez Málaga'; VILL: 'Villalonga'; ME: media.

Longitud de los brotes

Los brotes obtenidos alcanzaron longitudes muy diferentes dependiendo de la variedad (**Figura 18**). De forma general, cabe destacar las variedades ‘Castellana’, ‘Cornicabra’, ‘Hojiblanca’, ‘Lechín de Granada’ y ‘Verdial de Vélez Málaga’ cuyos brotes alcanzaron longitudes medias superiores a 2 cm.

El método estándar que utilizamos considera 1.5 cm la longitud mínima de un brote para poder subcultivarlo, con lo que podemos diferenciar dos grandes grupos de variedades en función de este criterio: el primero, formado por 12 variedades en las que los brotes formados tienen una longitud media mayor o igual a 1.5 cm; y el segundo, formado por 10 variedades cuyos brotes alcanzaban longitudes medias inferiores a 1.5 cm (**Figura 18**).



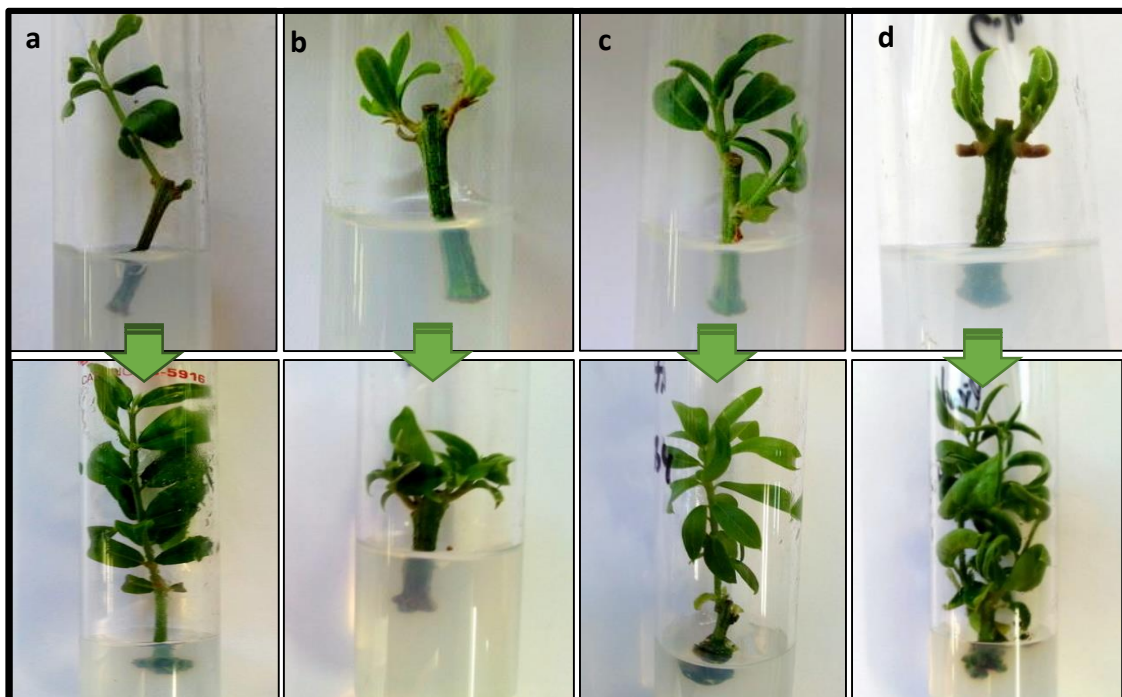
**Figura 18:** Longitud de los brotes axilares formados en la fase de inicio en medio RP. Datos de 12 semanas. Los datos representan la media  $\pm$  SE. Columnas con letras diferentes indican diferencias significativas según el test SNK ( $p < 0.05$ ). ALF: ‘Alfajara’; B11: ‘Blanqueta-11’; B48: ‘Blanqueta-48’; CAS: ‘Castellana’; CR: ‘Changlot Real’; CO: ‘Cornicabra’; EM: ‘Empeltre’; FAR: ‘Farga’; GO: ‘Gordal’; HOJ: ‘Hojiblanca’; LG: ‘Lechín de Granada’; LS: ‘Lechín de Sevilla’; MC: ‘Manzanilla Cacereña’; MS: ‘Manzanilla de Sevilla’; MO: ‘Morisca’; MT: ‘Morrut’; PIC: ‘Picudo’; SEV: ‘Sevillanca’; VB: ‘Verdial de Badajoz’; VH: ‘Verdial de Huévar’; VM: ‘Verdial de Vélez Málaga’; VILL: ‘Villalonga’. La línea roja, marca el valor de longitud mínima (1.5 cm)

### Aspecto de los cultivos

El aspecto general de los cultivos fue bueno (**Figura 19**), salvo en determinadas variedades como 'Farga', 'Empeltre' o 'Changlot Real' (**Figura 19-b**), que mostraban peor aspecto y cierto deterioro de las yemas brotadas.

Los brotes mostraban un color de hojas y tallo verde intenso, tanto a las 6 semanas de cultivo como a las 12.

Mención aparte requiere la variedad 'Morrut', puesto que fue la única variedad en la que a pesar de que se consiguió iniciar y establecer su cultivo, se observó un desarrollo anómalo de las hojas, que se curvaban y arrugaban hasta caerse definitivamente pasados varios subcultivos, aunque resultó llamativo que este hecho no le impidió elongar y multiplicarse (**Figura 19-d**).

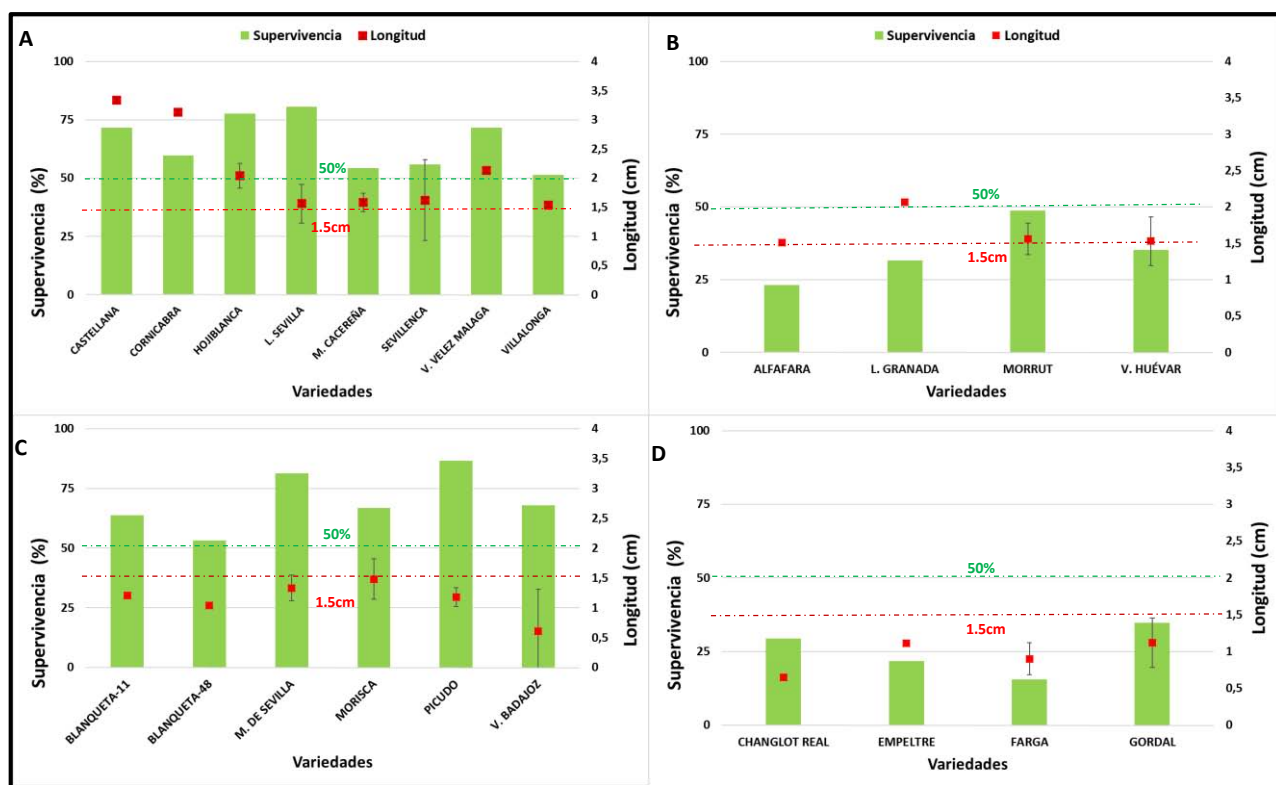


**Figura 19:** Aspecto de los cultivos de las variedades: **(a)** 'Hojiblanca'; **(b)** 'Changlot Real'; **(c)** 'Verdial de Vélez Málaga'; **(d)** 'Morrut', tras 6 semanas (arriba) y 12 semanas (abajo) en el medio de inicio RP.

Establecimiento de cultivos asépticos

Al analizar los resultados obtenidos con el protocolo estándar, basándonos en los valores de supervivencia y longitud de los brotes obtenidos tras 12 semanas de cultivo, podemos agrupar las 22 variedades estudiadas en 4 grandes grupos (**Figura 20**).

Un primer grupo constituido por 8 variedades (**Figura 20-A**) caracterizadas porque alcanzaban porcentajes de supervivencia superiores al 50% y longitud media de los brotes igual o superior a 1.5 cm. Un segundo grupo (**Figura 20-B**) formado por 4 variedades que alcanzaban porcentajes de supervivencia inferiores al 50%, pero la longitud media de los brotes era superior a 1.5 cm. El tercer grupo está constituido por 6 variedades (**Figura 20-C**), que alcanzaban porcentajes de supervivencia superiores al 50%, pero sus brotes no se desarrollaban de forma correcta y presentaban poco crecimiento, inferior a 1.5 cm. Por último, podemos diferenciar un cuarto grupo formado por aquellas variedades que tanto la supervivencia como la longitud de los brotes obtenidos eran bajos. Este grupo lo forman 4 variedades: ‘Changlot Real’, ‘Empeltre’, ‘Farga’ y ‘Gordal’ (**Figura 20-D**).



**Figura 20:** Distribución de las 22 variedades de olivo, iniciadas *in vitro* en el medio RP, según sus porcentajes de supervivencia y la longitud de los brotes obtenidos. Datos de 12 semanas. **(A)** Variedades del grupo 1: supervivencia >50% y longitud media brote > 1.5 cm; **(B)** Variedades grupo 2: supervivencia <50% pero longitud media brote >1.5 cm; **(C)** Variedades grupo 3: supervivencia >50% pero longitud media brote <1.5 cm; **(D)** Variedades grupo 4: supervivencia <50% y longitud media brote <1.5 cm. Los datos de longitud representan las medias  $\pm$  SE.

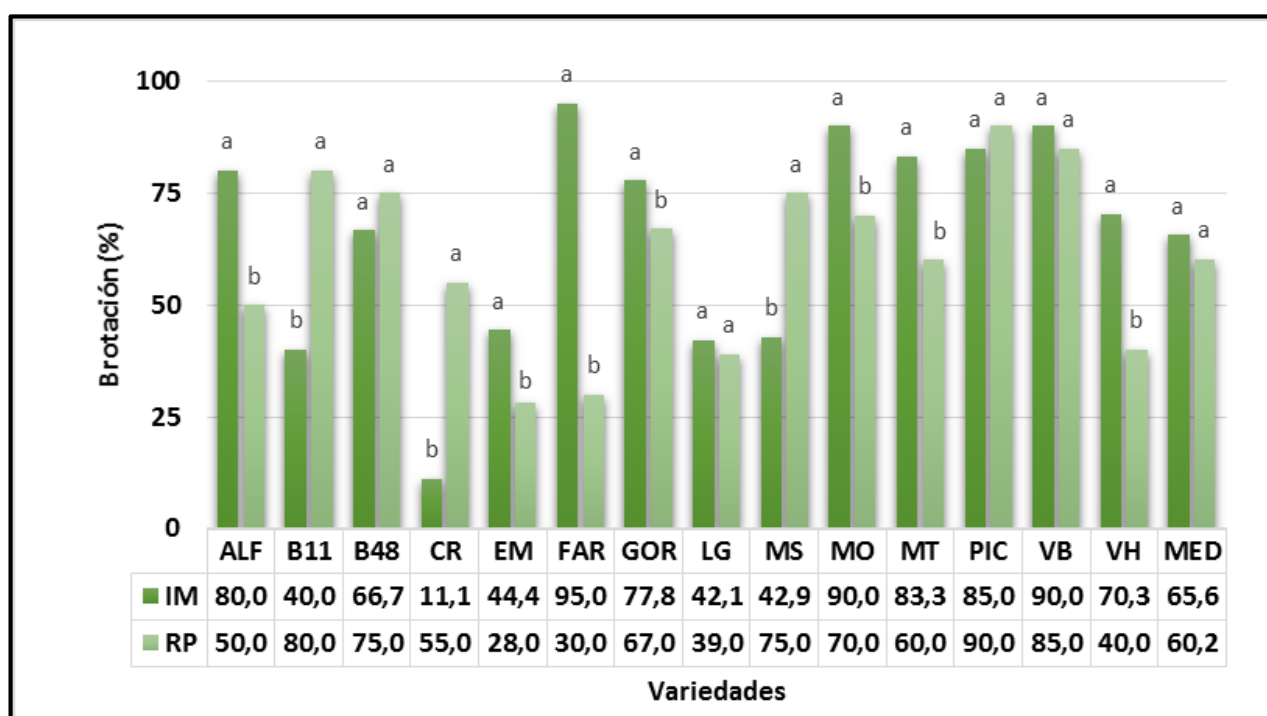


Terminada la fase de inicio, 12 variedades formaron brotes con longitud suficiente para poder ser subcultivados y pasar a formar un stock de proliferación: ‘Alfafara’, ‘Castellana’, ‘Cornicabra’, ‘Hojiblanca’, ‘Lechín de Granada’, ‘Lechín de Sevilla’, ‘Manzanilla Cacereña’, ‘Morrut’, ‘Sevillenca’, ‘Verdial de Huévar’, ‘Verdial de Vélez Málaga’ y ‘Villalonga’. Las 10 variedades restantes cuyos brotes no alcanzaban el tamaño mínimo necesario, se recultivaron sucesivamente. De ellas, ‘Blanqueta-11’, ‘Blanqueta-48’ y ‘Verdial de Badajoz’, pudieron pasar a la fase de proliferación tras 5-7 subcultivos, respectivamente. Por lo que, fueron 15 las variedades que pasaron a la fase de proliferación, utilizando únicamente el método estándar de inicio *in vitro*. Con las 7 variedades restantes, ‘Changlot Real’, ‘Empeltre’, ‘Farga’, ‘Gordal’, ‘Manzanilla de Sevilla’, ‘Morisca’ y ‘Picudo’, y con las que no alcanzaron buenos porcentajes de brotación, supervivencia y longitud, se ensayaron otros medios para intentar mejorar los resultados obtenidos.

#### Experimento 2: Comportamiento de distintas variedades de olivo, en la fase de inicio, en el medio IM

En este experimento estudiamos la respuesta en la fase de inicio al medio estándar frente al medio IM (Rugini, 1984), de las variedades con las que no se obtuvieron buenos resultados en el experimento anterior.

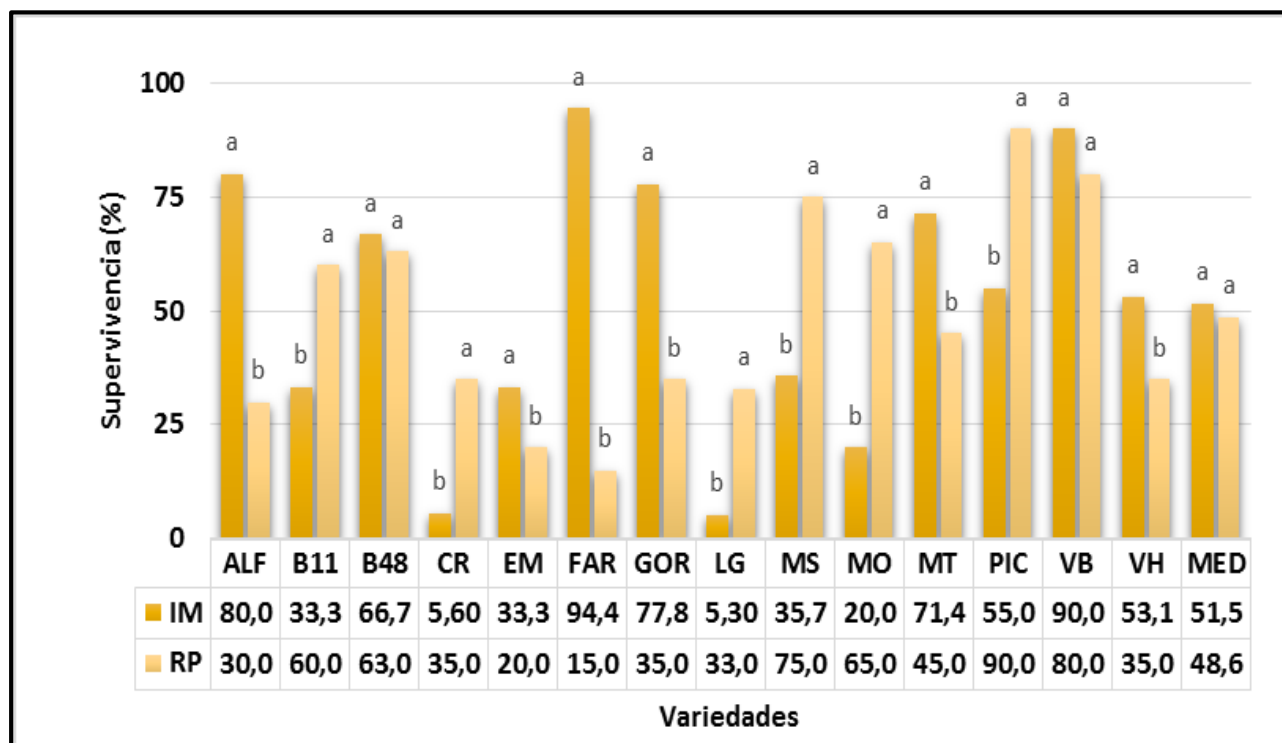
Al igual que para el experimento anterior, a las 6 semanas de cultivo se realizó una toma de datos (contaminación, brotación y necrosis) y el recultivo de las secciones nodales para mantener los explantos un total de 12 semanas en cultivo. Sólo se recultivaron los explantos que mostraban signos de brotación a las 6 semanas, puesto que aquellos que no brotaban estaban totalmente necrosados. En relación a la brotación observada a las 6 semanas, destacan 7 variedades en las que los porcentajes de brotación en el medio IM fueron significativamente superiores a los obtenidos en el medio RP (**Figura 21**).



**Figura 21:** Porcentajes de brotación observados en las distintas variedades de olivo iniciadas *in vitro* en el medio estándar RP y medio IM. Datos de 6 semanas. En cada variedad, columnas con letras diferentes indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) según el test  $\chi^2$ . ALF: ‘Alfafara’; B11: ‘Blanqueta-11’; B48: ‘Blanqueta-48’; CR: ‘Changlot Real’; EM: ‘Empeltre’; FAR: ‘Farga’; GOR: ‘Gordal’; LG: ‘Lechín de Granada’; MS: ‘Manzanilla de Sevilla’; MO: ‘Morisca’; MT: ‘Morrut’; PIC: ‘Picudo’; VB: ‘Verdial de Badajoz’; VH: ‘Verdial de Huévar’; ME: media.

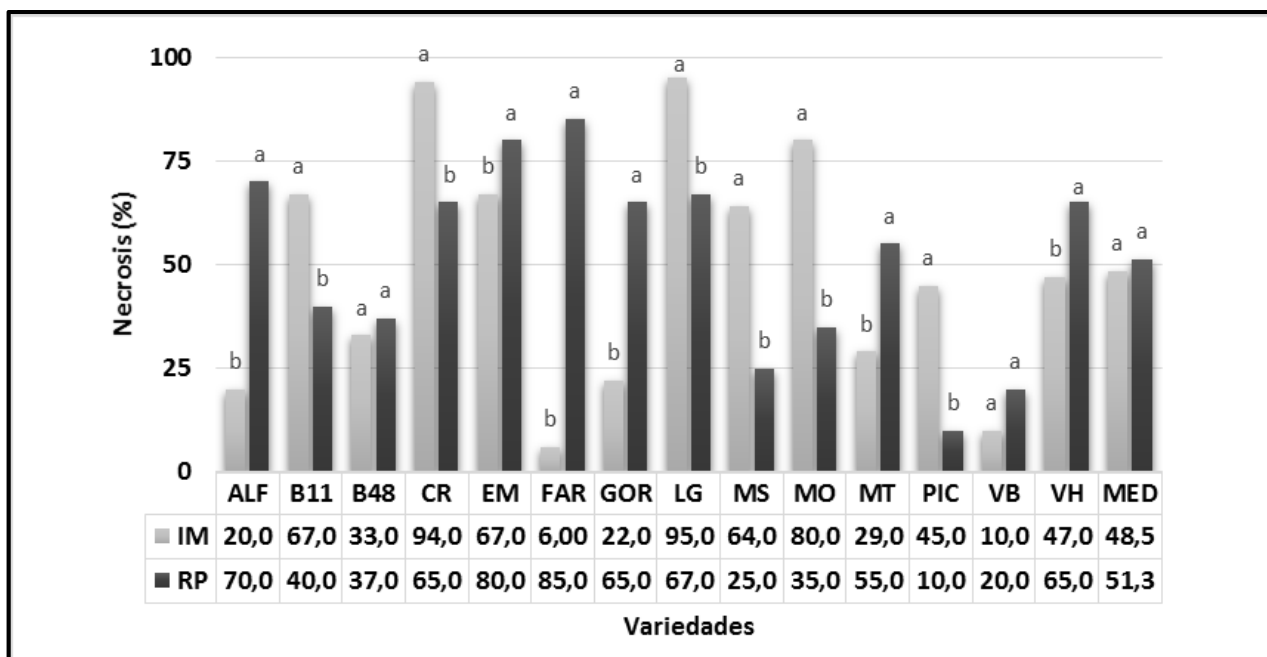
Analizando la supervivencia de las variedades estudiadas tras 12 semanas (**Figura 22**), se pueden diferenciar tres grupos: a) el formado por variedades que mejoran su brotación y supervivencia en el medio IM, como ‘Alfafara’, ‘Empeltre’, ‘Farga’, ‘Gordal’, ‘Morrut’ y ‘Verdial de Huévar’; b) un grupo formado por variedades que no mejoran su brotación y supervivencia en medio IM, como las variedades ‘Blanqueta-48’ y ‘Verdial de Badajoz’, y c) el formado por variedades que empeoran su brotación cuando se utiliza el medio IM, como ‘Blanqueta-11’, ‘Changlot Real’, ‘Lechín de Granada’, ‘Manzanilla de Sevilla’, ‘Morisca’ o ‘Picudo’.





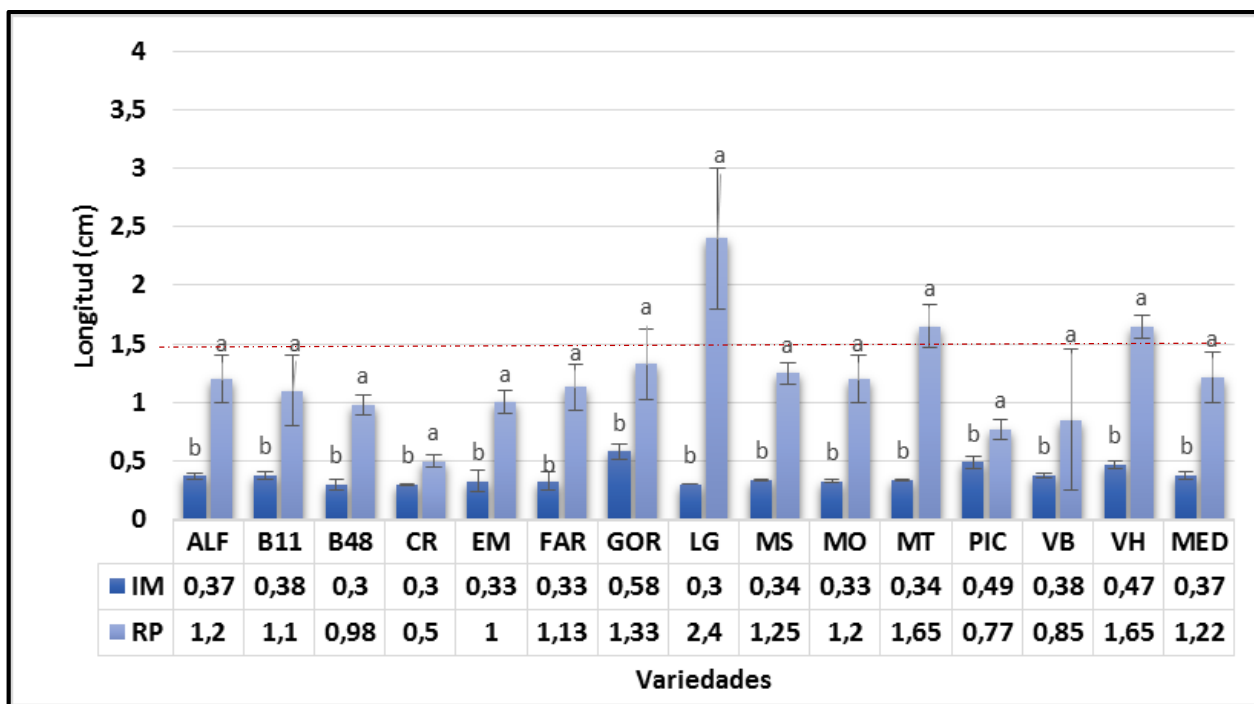
**Figura 22:** Porcentajes de supervivencia observados en las distintas variedades de olivo iniciadas *in vitro* en el medio estándar RP y medio IM. Datos de 12 semanas. En cada variedad, columnas con letras diferentes indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) según el test  $\chi^2$ . ALF: ‘Alfafara’; B11: ‘Blanqueta-11’; B48: ‘Blanqueta-48’; CR: ‘Changlot Real’; EM: ‘Empeltre’; FAR: ‘Farga’; GOR: ‘Gordal’; LG: ‘Lechín de Granada’; MS: ‘Manzanilla de Sevilla’; MO: ‘Morisca’; MT: ‘Morrut’; PIC: ‘Picudo’; VB: ‘Verdial de Badajoz’; VH: ‘Verdial de Huévar’; ME: media.

En cuanto a los porcentajes de necrosis, tras 12 semanas de cultivo el uso del medio IM redujo significativamente los porcentajes de necrosis en 6 variedades (‘Alfafara’, ‘Empeltre’, ‘Farga’, ‘Gordal’, ‘Morrut’ y ‘Verdial de Huévar’), mientras que, en otras 6 estos porcentajes aumentaron (‘Blanqueta-11’, ‘Changlot Real’, ‘Lechín de Granada’, ‘Manzanilla de Sevilla’, ‘Morisca’ y ‘Picudo’) (Figura 23).



**Figura 23:** Porcentajes de necrosis observados en las distintas variedades de olivo iniciadas *in vitro* en el medio estándar RP y medio IM. Datos de 12 semanas. En cada variedad, columnas con letras diferentes indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) según el test  $\chi^2$ . ALF: ‘Alfajara’; B11: ‘Blanqueta-11’; B48: ‘Blanqueta-48’; CR: ‘Changlot Real’; EM: ‘Empeltre’; FAR: ‘Farga’; GOR: ‘Gordal’; LG: ‘Lechín de Granada’; MS: ‘Manzanilla de Sevilla’; MO: ‘Morisca’; MT: ‘Morrut’; PIC: ‘Picudo’; VB: ‘Verdial de Badajoz’; VH: ‘Verdial de Huévar’; ME: media.

Respecto a la longitud de los brotes formados en el medio IM, ninguna de las variedades estudiadas presentaba brotes con longitud superior a los brotes obtenidos en el medio RP (**Figura 24**). De hecho, en medio IM, ninguna variedad, salvo ‘Gordal’, alcanzaba longitudes medias superiores a 0.5 cm, contrariamente a los valores obtenidos en el medio RP, en el que todas las variedades alcanzaron valores iguales o superiores a 0.5 cm (**Figura 24**). Sin embargo, respecto al tamaño mínimo requerido (1.5 cm), sólo las variedades ‘Lechín de Granada’, ‘Morrut’ y ‘Verdial de Huévar’, consiguieron superarlo.

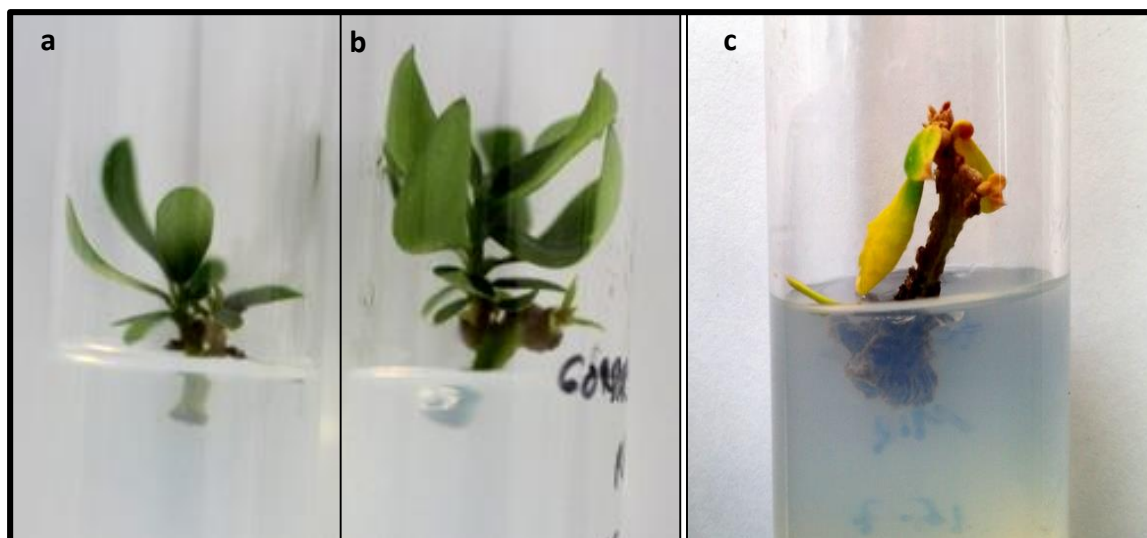


**Figura 24:** Longitud de los brotes axilares formados en la fase de inicio en medio RP y medio IM. Datos de 12 semanas. Los datos muestran la media  $\pm$  SE. En cada variedad, columnas con letras diferentes indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). ALF: 'Alfafara'; B11: 'Blanqueta-11'; B48: 'Blanqueta-48'; CR: 'Changlot Real'; EM: 'Empeltre'; FAR: 'Farga'; GOR: 'Gordal'; LG: 'Lechín de Granada'; MS: 'Manzanilla de Sevilla'; MO: 'Morisca'; MT: 'Morrut'; PIC: 'Picudo'; VB: 'Verdial de Badajoz'; VH: 'Verdial de Húévar'; ME: media.

En lo referente al aspecto de los explantos, no se apreciaron diferencias entre los cultivados en ambos medios para ninguna de las variedades estudiadas, más allá del tamaño de los propios explantos (**Figura 25 A y B**).

Una vez finalizadas las 12 semanas de cultivo, los explantos que habían sobrevivido siguieron recultivándose o subcultivándose, según el caso, siempre en el mismo medio en el cual fueron iniciados.

Se apreció que los explantos iniciados en medio IM (12 semanas) y que seguían recultivándose en dicho medio empeoraban de aspecto de forma drástica, apareciendo brotes con necrosis de los tallos, hojas amarillentas y caída de hojas, hasta finalmente producirse la necrosis total del explanto (**Figura 25-C**). Este hecho se apreció en todas las variedades estudiadas. Sin embargo, en aquellos explantos iniciados en medio RP y que tras 12 semanas se siguieron recultivando en dicho medio, este efecto no era tan marcado, habiendo variedades en las que tal deterioro no ocurría y tras varios recultivos mejoraban su aspecto y desarrollo, por ejemplo, 'Alfafara', 'Blanqueta-11 y 48', 'Lechín de Granada' y 'Verdial de Húévar'.



**Figura 25:** (a) Aspecto de las secciones nodales brotadas de la variedad 'Gordal' tras 12 semanas en medio IM y (b) en medio RP. (c) Aspecto de un explanto de la variedad 'Farga' tras 18 semanas en medio IM.

Experimento 3: Comportamiento de distintas variedades de olivo, en la fase de inicio, en los medios WPM, MS y B5

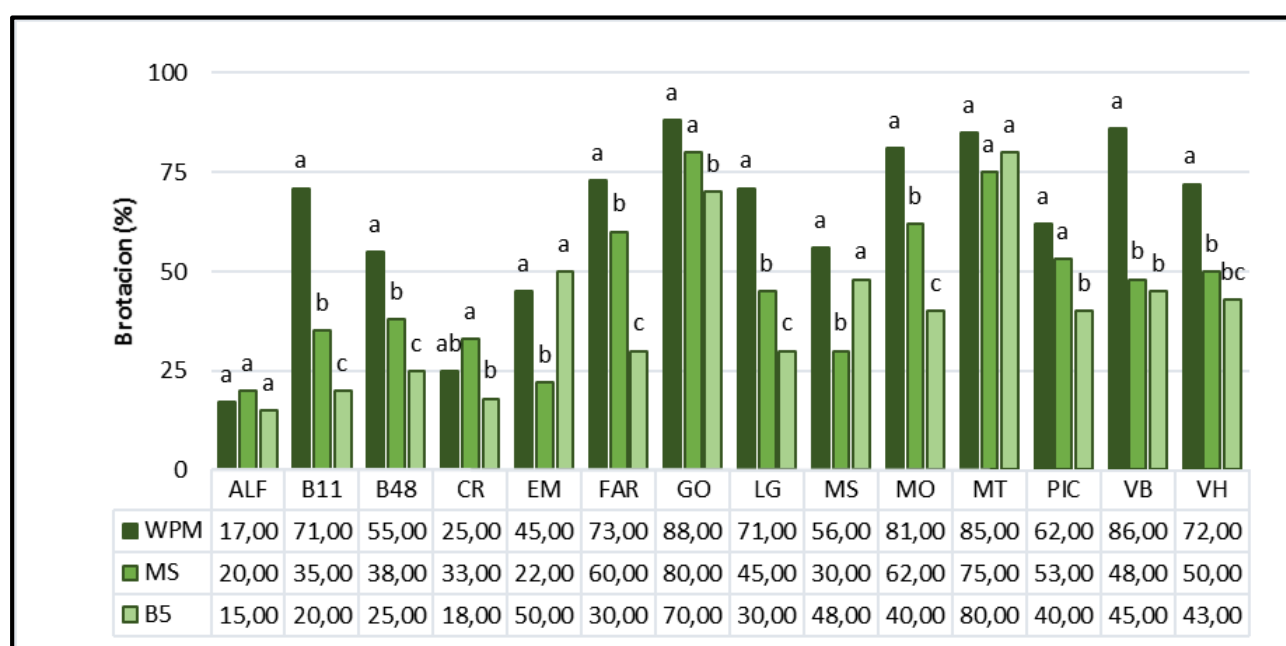
A pesar de que el medio IM mejoraba la supervivencia obtenida en ciertas variedades, producía brotes de escasa longitud, por lo que decidimos probar en esas 14 variedades otros medios citados en la bibliografía que también se han empleado, en mayor o menor medida, en el inicio de determinadas variedades de olivo: WPM (McCown y Lloyd, 1981), medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968).

Al no poder disponer de material suficiente para realizar el inicio a la vez en los cuatro medios, sólo se realizó con los medios WPM, MS y B5, y los resultados obtenidos en estos medios se compararon con la media de los resultados que dichas variedades obtuvieron en los dos ensayos anteriores en los que se usó el medio RP. Se tomaron datos de brotación tras 6 semanas y realizó un recultivo en el mismo medio hasta las 12 semanas, momento en el que se tomaron los datos finales.

En cuanto a la brotación del material, en términos generales, de los medios testado, el que presentaba mejores resultados de brotación media fue el WPM (63.3%) que era significativamente superiores a los mostrados por los medios MS (46.5%) y B5 (39.6%). Esto concuerda con lo observado al analizar las variedades de forma individual (**Figura 26**), pues de las 14 variedades analizadas, en 11 de ellas, los mejores resultados se obtuvieron en el medio WPM ('Blanqueta-11',

'Blanqueta-48', 'Farga', 'Gordal', 'Lechín de Granada', 'Manzanilla de Sevilla', 'Morisca', 'Morrut', 'Picudo', 'Verdial de Badajoz' y 'Verdial de Huévar'), y en las 3 restantes, ('Alfajara' y 'Changlot Real' en MS y 'Empeltre' en B5), las diferencias entre el medio en el que obtuvieron los mejores porcentajes de brotación y el medio WPM no fueron significativas (**Figura 26**).

Si comparamos los datos obtenidos en este experimento, con los datos obtenidos por estas variedades en el medio RP en los experimentos anteriores (**Figura 16 y Figura 21**), 6 variedades ('Alfajara', 'Farga', 'Gordal', 'Lechín de Granada', 'Morrut' y 'Verdial de Huévar') mejoraron los porcentajes de brotación en el medio WPM, respecto al medio estándar RP, y las restantes 8 variedades no mejoraron los resultados obtenidos en medio RP.



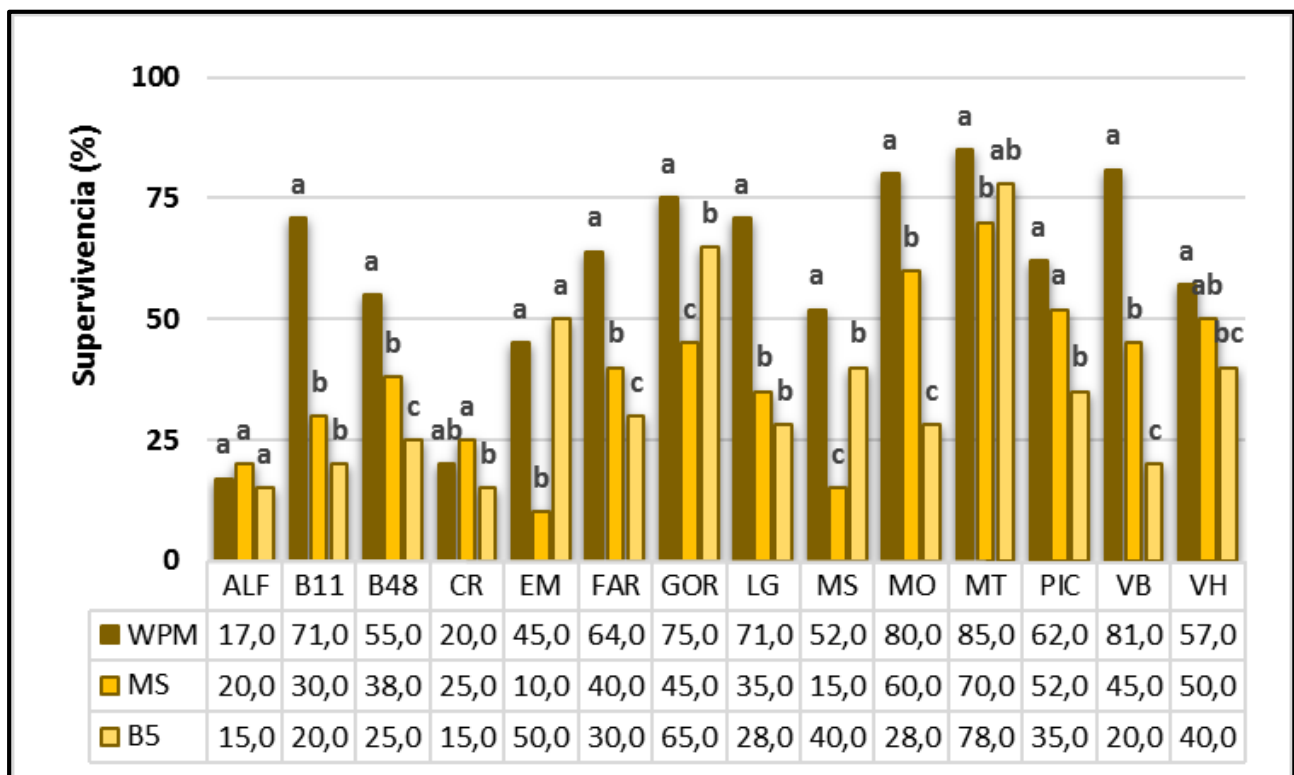
**Figura 26:** Porcentajes de brotación observados en las distintas variedades de olivo iniciadas *in vitro* en los medios WPM, MS y B5. Datos de 6 semanas. En cada variedad, columnas con letras diferentes indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) según el test  $\chi^2$ . ALF: 'Alfajara'; B11: 'Blanqueta-11'; B48: 'Blanqueta-48'; CR: 'Changlot Real'; EM: 'Empeltre'; FAR: 'Farga'; GOR: 'Gordal'; LG: 'Lechín de Granada'; MS: 'Manzanilla de Sevilla'; MO: 'Morisca'; MT: 'Morrut'; PIC: 'Picudo'; VB: 'Verdial de Badajoz'; VH: 'Verdial de Huévar'.

Con aquellos explantos que brotaban, se realizó el recultivo y se valoró su supervivencia tras 12 semanas de cultivo.

En general, el medio que provocó una tasa de supervivencia media mayor fue el WPM (59.5%), superior significativamente a los obtenidos en el resto de medios testados MS (38.2%) y B5 (34.9%)

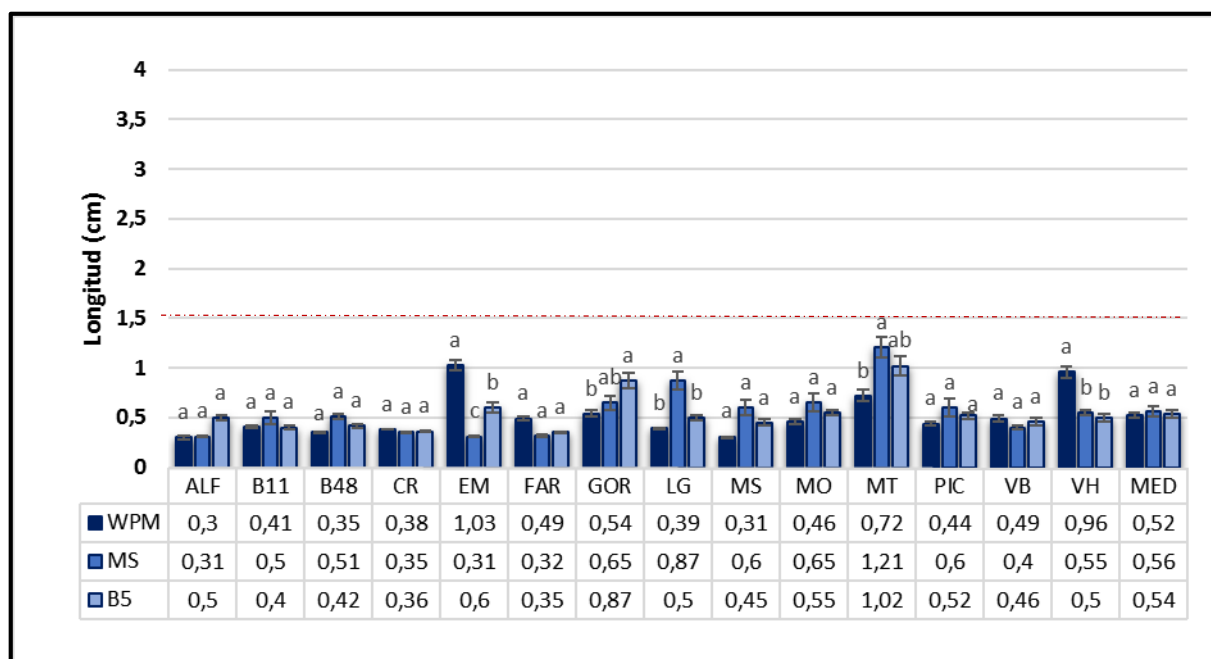
Al analizar las variedades de forma individualizada, se seguía manteniendo el comportamiento observado a las 6 semanas, así, las 11 variedades que mostraban mejor brotación a las 6 semanas en WPW ('Blanqueta-11', 'Blanqueta-48', 'Farga', 'Gordal', 'Lechín de Granada', 'Manzanilla de Sevilla', 'Morisca', 'Morrut', 'Picudo', 'Verdial de Badajoz' y 'Verdial de Huévar'), a las 12 semanas también mostraba mejores porcentajes de supervivencia (**Figura 27**), e igualmente, las restantes 3 variedades, que obtuvieron mejores porcentajes de supervivencia en otro medio, ('Alfajara' y 'Changlot Real' en MS y 'Empeltre' en B5), estas diferencias no fueron significativas respecto a los porcentajes obtenidos en WPM (**Figura 27**).

Si comparamos los datos obtenidos en este experimento con los datos obtenidos por estas variedades en el medio RP en los experimentos anteriores (**Figura 17 y Figura 22**), 7 variedades ('Empeltre', 'Farga', 'Gordal', 'Lechín de Granada', 'Morisca', 'Morrut' y 'Verdial de Huévar') mejoraron los porcentajes de supervivencia en el medio WPM, respecto al medio estándar RP, y las restantes 7 variedades no mejoraron los resultados obtenidos en medio RP.



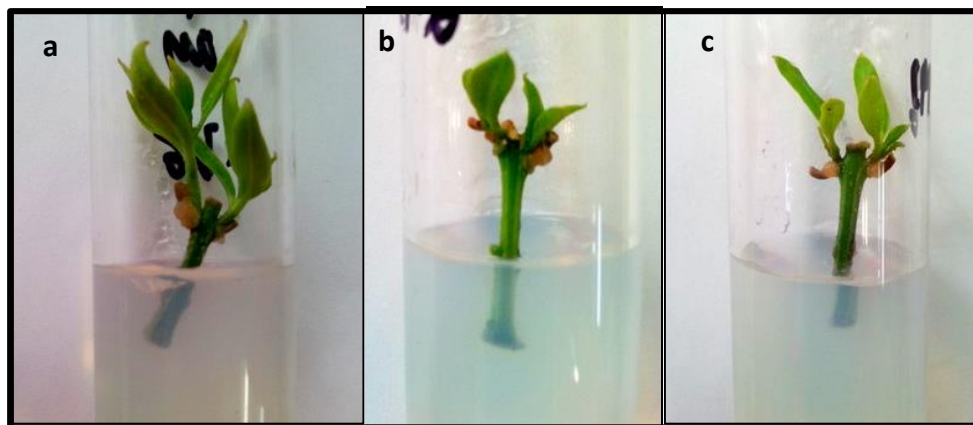
**Figura 27:** Porcentajes de supervivencia observados en las distintas variedades de olivo iniciadas *in vitro* en los medios WPM, MS y B5. Datos de 12 semanas. En cada variedad, columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los distintos medios según el test  $\chi^2$ . ALF: 'Alfajara'; B11: 'Blanqueta-11'; B48: 'Blanqueta-48'; CR: 'Changlot Real'; EM: 'Empeltre'; FAR: 'Farga'; GOR: 'Gordal'; LG: 'Lechín de Granada'; MS: 'Manzanilla de Sevilla'; MO: 'Morisca'; MT: 'Morrut'; PIC: 'Picudo'; VB: 'Verdial de Badajoz'; VH: 'Verdial de Huévar'.

Ninguno de estos medios consiguió que los explantos formaran brotes con el tamaño mínimo requerido de 1.5 cm (**Figura 28**). Así que, aunque la supervivencia de los brotes en algunas variedades fue superior en el medio WPM a la obtenida en el medio RP en los experimentos anteriores, la longitud de los brotes obtenidos en este y en los otros medios volvió a ser inferior a los valores alcanzados en el medio RP en experimentos previos (**Figura 18 y Figura 24**).



**Figura 28:** Longitud de los brotes axilares formados en la fase de inicio en los medios WPM, MS y B5. Datos de 12 semanas. Los datos muestran la media  $\pm$  SE. En cada variedad, columnas con letras diferentes indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) según el test SNK. ALF: 'Alfajara'; B11: 'Blanqueta-11'; B48: 'Blanqueta-48'; CR: 'Changlot Real'; EM: 'Empeltre'; FAR: 'Farga'; GOR: 'Gordal'; LG: 'Lechín de Granada'; MS: 'Manzanilla de Sevilla'; MO: 'Morisca'; MT: 'Morrut'; PIC: 'Picudo'; VB: 'Verdial de Badajoz'; VH: 'Verdial de Huévar'; ME: media. La línea roja, marca el tamaño mínimo (1.5 cm)

Los explantos presentaban buen aspecto y desarrollo en todos los medios ensayados (**Figura 29**), y no se apreciaron diferencias visibles entre brotes de distintos medios. En 'Morrut' ninguno de los medios alternativos probados mejoró el problema del desarrollo anómalo de sus hojas.



**Figura 29:** Aspecto de los inicios de la variedad 'Empeltre' a las 12 semanas de ensayo en los distintos medios empleados: **(a)** RP; **(a)** WPM; **(b)** MS y **(c)** B5.

Transcurridas las 12 semanas de cultivo, los explantos siguieron recultivándose en el mismo medio, pero en ninguno de los medios alternativos se consiguieron establecer ninguna de las variedades y tras 4-5 recultivos terminaron por morir.



### II.3.2. Multiplicación

#### Experimento 1: Comportamiento de distintas variedades de olivo durante la fase de multiplicación *in vitro*

La tasa de multiplicación se calculó para las 15 variedades con las que se pudo formar un stock en proliferación, más la variedad 'Arbequina' (control). El olivo, al igual que otros muchos frutales presenta variaciones en la tasa de multiplicación con los subcultivos. Se evaluó la tasa de multiplicación (T1) de los brotes durante los primeros subcultivos una vez formado el stock (los brotes, previo al cálculo de la tasa de proliferación, habían sido subcultivados de 1 a 5 veces), dicha tasa se calculó en 4 subcultivos sucesivos a partir del subcultivo 1. Transcurridos más de 15 subcultivos se volvió a calcular la tasa de multiplicación de las distintas variedades durante 4 subcultivos sucesivos, a esta tasa se denominó tasa de multiplicación final (T2).

La T1 de las distintas variedades estudiadas, a lo largo de los cuatro subcultivos sucesivos analizados, permite diferenciar variedades que muestran un comportamiento tipo "sierra", es decir, alternan tasas de multiplicación altas y bajas a lo largo de los subcultivos, como es el caso de 'Arbequina', 'Castellana', 'Manzanilla Cacereña' y 'Villalonga' entre otras; y variedades cuyas T1 muestran un comportamiento estable sin sufrir apenas variaciones a lo largo de los subcultivos, como se puede apreciar en las variedades 'Sevillenca' y 'Verdial de Badajoz' (**Figura 30**).

Observando la T2, destaca que la mayoría de las variedades presenta tasas de multiplicación bastante estables a lo largo de los subcultivos, desapareciendo el patrón tipo "sierra", en aquellas variedades que lo presentaban (**Figura 30**).

Comparando ambas tasas observamos que en algunos casos la T2 es ligeramente inferior a la T1, como en 'Morrut' y 'Cornicabra' (**Figura 30**) y en otras variedades es al contrario, como es el caso de 'Sevillenca' o 'Verdial de Vélez Málaga' (**Figura 30**).

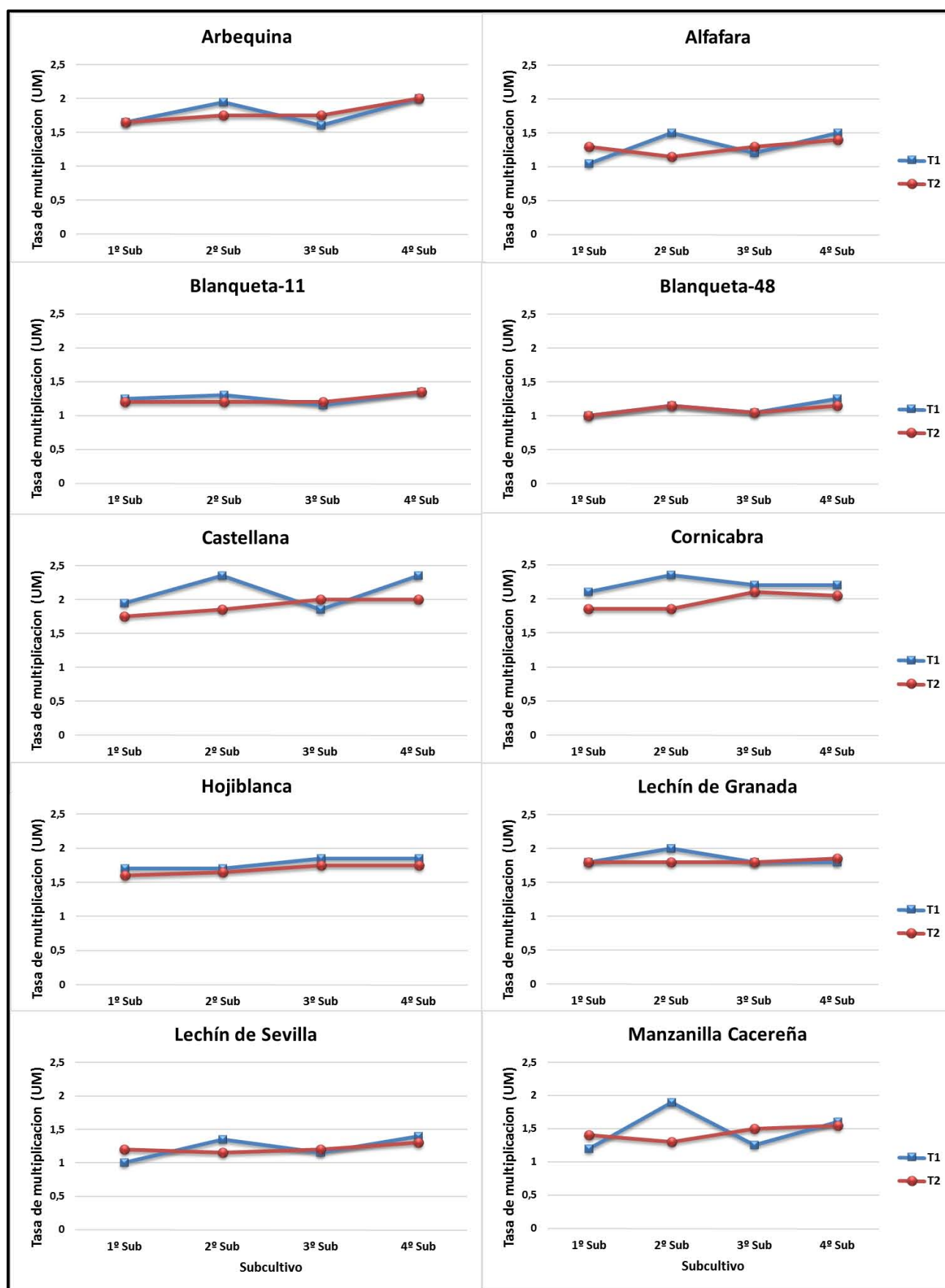
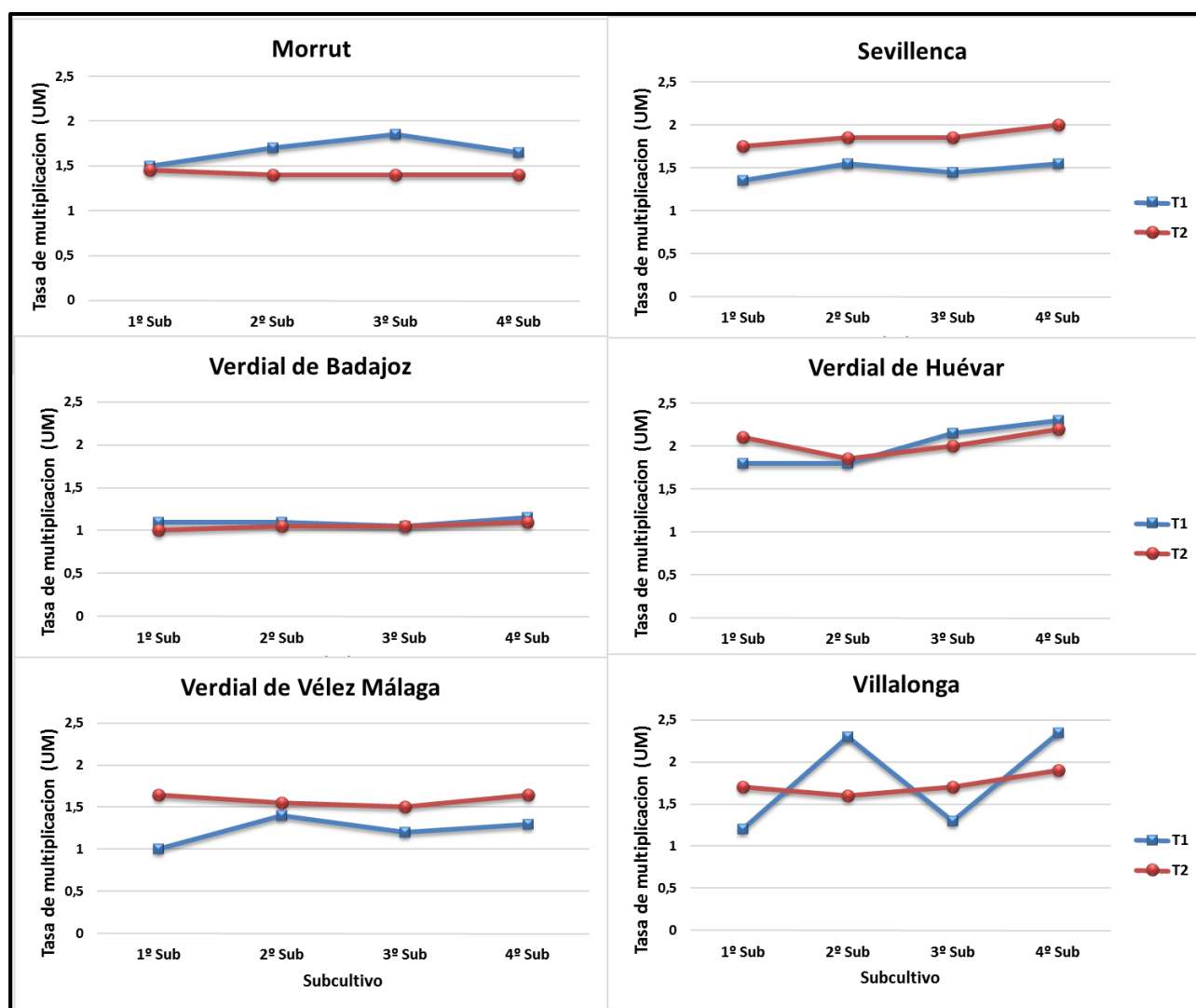


Figura 30: Tasas de multiplicación, medida en unidades de multiplicación (UM), inicial (T1) y final (T2) en las variedades de olivo durante la fase de multiplicación en medio RP. Datos de 4 subcultivos.

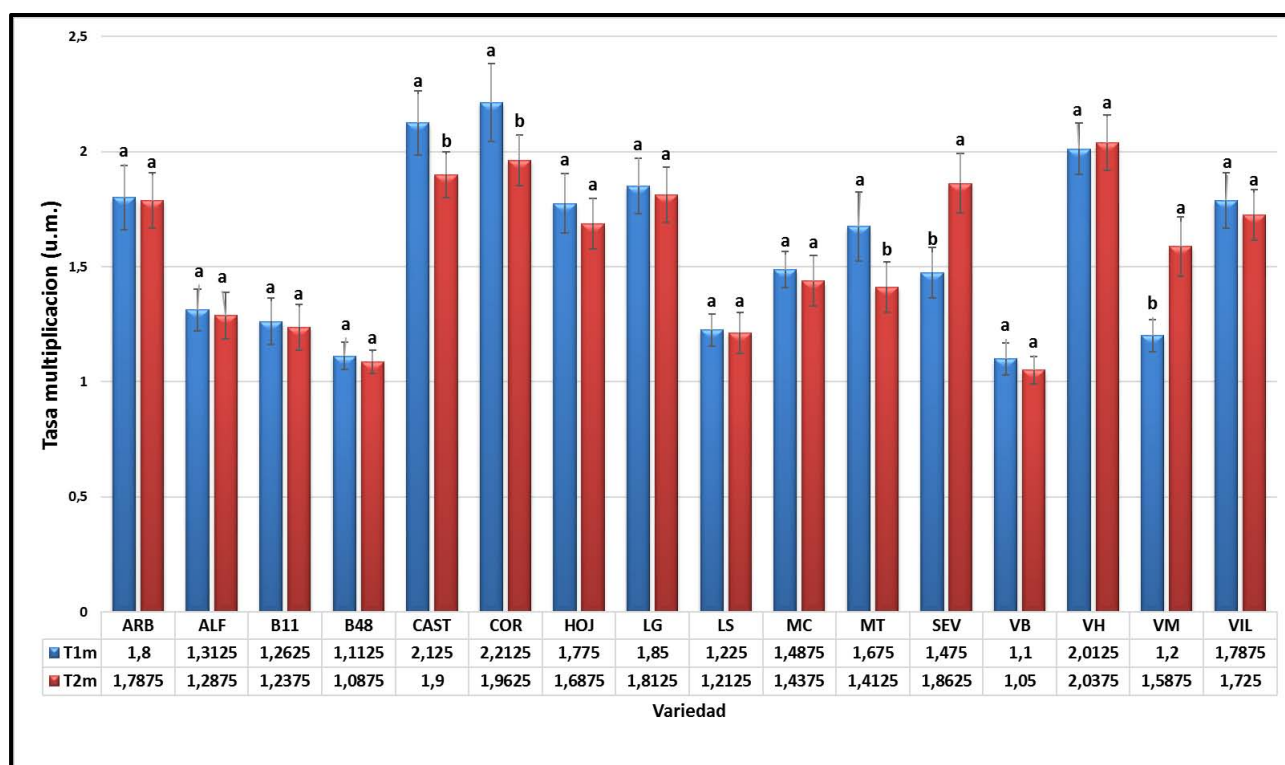




**Figura 30 (continuación):** Tasas de multiplicación, medida en unidades de multiplicación (UM), inicial (T1) y final (T2) en las variedades de olivo durante la fase de multiplicación en medio RP. Datos de 4 subcultivos.

Comparando las tasas medias iniciales (T1m) y finales (T2m) de los cuatro subcultivos, podemos observar que tanto la T1m como la T2m son muy heterogéneas entre variedades. Así, la T1m oscila entre 1.1 en 'Verdial de Badajoz' y 2.2 en 'Cornicabra'. Mientras que la T2m varía entre 1.1 en 'Verdial de Badajoz' y 2.0 en 'Verdial de Huévar' (**Figura 31**).

Comparando T1m y T2m para cada variedad, podemos observar que las variedades 'Castellana', 'Cornicabra' y 'Morrut' presentan diferencias significativas entre la T1m y la T2m, la tasa de multiplicación ha disminuido tras los subcultivos (**Figura 31**), mientras que, en las variedades 'Sevillena' y 'Verdial de Huévar' ocurre lo contrario, la tasa de multiplicación aumenta al aumentar el número de subcultivos (**Figura 31**).



**Figura 31:** Tasas de multiplicación medias tanto iniciales (T1m color azul) como finales (T2m color rojo) de distintas variedades de olivo. Para cada variedad, columnas con distinta letra indica diferencias significativas entre tasa inicial y final ( $p < 0.05$ ). ARB: ‘Arbequina’; ALF: ‘Alfajara’; B11: ‘Blanqueta-11’; B48: ‘Blanqueta-48’; CAST: ‘Castellana’; COR: ‘Cornicabra’; HOJ: ‘Hojiblanca’; LG: ‘Lechín de Granada’; LS: ‘Lechín de Sevilla’; MC: ‘Manzanilla Cacereña’; MT: ‘Morrut’; SEV: ‘Sevillena’; VB: ‘Verdial de Badajoz’; VH: ‘Verdial de Huévar’; VM: ‘Verdial de Vélez Málaga’; VIL: ‘Villalonga’.

El aspecto de los explantos, fue muy bueno en la mayoría de las variedades, como puede observarse como ejemplo en ‘Sevillena’ (Figura 32). ‘Morrut’, seguía mostrando un desarrollo anómalo de sus hojas (curvas, arrugadas y excesiva caída de hojas) y ‘Verdial de Badajoz’ y ‘Blanqueta-48’ prácticamente no crecían e, incluso, ‘Verdial de Badajoz’ fue empeorando con los subcultivos.



**Figura 32:** Aspecto de los brotes de la variedad ‘Sevillena’ durante la fase de proliferación. En la imagen de la izquierda, se muestran los brotes al inicio del ensayo, y en la imagen de la derecha, los mismos brotes tras las 6 semanas de cultivo.

De las 15 variedades que iniciaron la fase de multiplicación (sin incluir la variedad control ‘Arbequina’), 12 pudieron pasar a la fase de enraizamiento. Con ‘Blanqueta-48’, ‘Morrut’ y ‘Verdial de Badajoz’, no se consiguió crear un stock que proliferara más allá de los 20 subcultivos. 8 variedades presentaron unas tasas medias de multiplicación superiores a 1.5 um, por lo que fue relativamente sencillo obtener suficiente stock, y, sólo 4 variedades, ‘Alfajara’, ‘Blanqueta-11’, ‘Lechín de Sevilla’ y ‘Manzanilla Cacereña’, presentaron tasas inferiores a 1.5 um, a pesar de lo cual, tras subcultivos y/o recultivos sucesivos, se consiguió crear un stock en proliferación para disponer de material suficiente para abordar la fase de enraizamiento.

### II.3.3. Enraizamiento

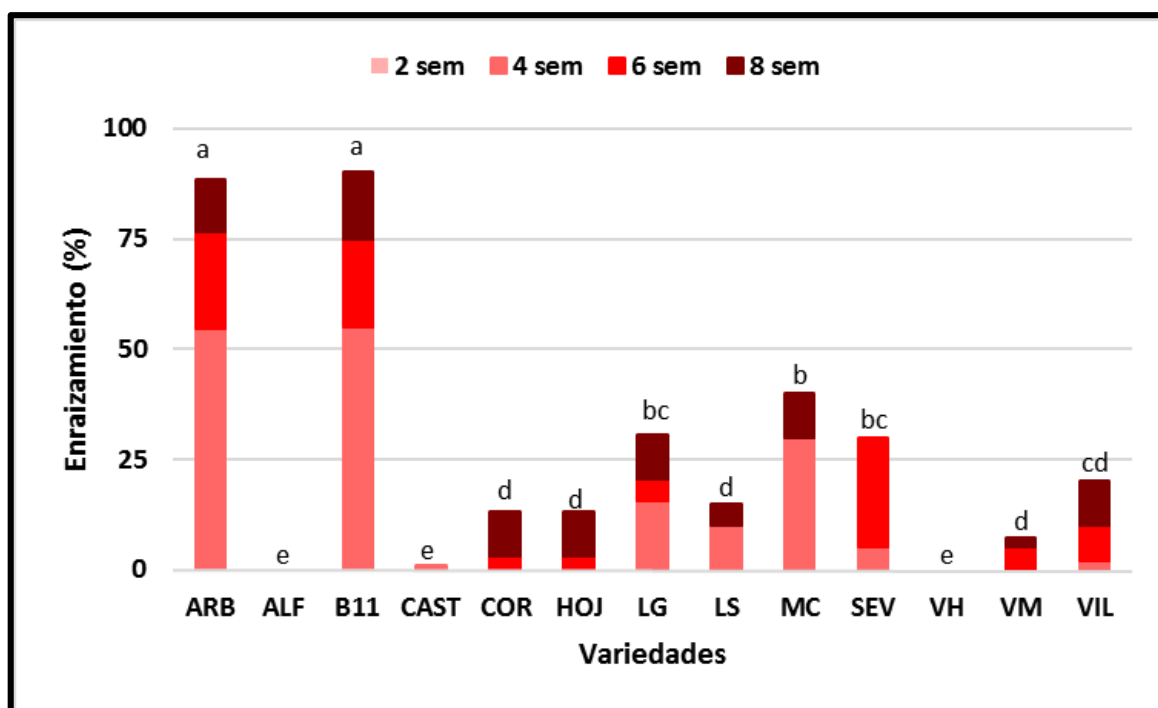
Quisimos estudiar la capacidad de enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de aquellas variedades que habían superado la fase de multiplicación.

#### Experimento 1: Efecto del medio DKWr sobre el enraizamiento *in vitro* de diferentes variedades de olivo

El protocolo estándar de enraizamiento (Vidoy-Mercado, 2014) utiliza el medio DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) suplementado con AIB (0.49  $\mu$ M). Los brotes se incuban una semana en oscuridad seguida de 7 semanas en condiciones de luz.

Las variedades estudiadas en este experimento mostraban comportamientos muy diferentes en respuesta al protocolo estándar (**Figura 33**). La variedad con mejores resultados fue 'Blanqueta-11', que tras 8 semanas de cultivo alcanzó un porcentaje de enraizamiento del 90%, similares a los alcanzados por la variedad 'Arbequina', utilizada como control. Además, esta variedad tenía un comportamiento similar a 'Arbequina', ya que a las 4 semanas ambas variedades alcanzaban porcentajes de enraizamiento superiores al 50%. Comportamientos opuestos mostraron las variedades 'Castellana' y 'Verdial de Huévar', en las que no se produjo enraizamiento (**Figura 33**).

Las restantes variedades estudiadas, alcanzaron porcentajes de enraizamiento siempre inferiores al 40% (**Figura 33**).

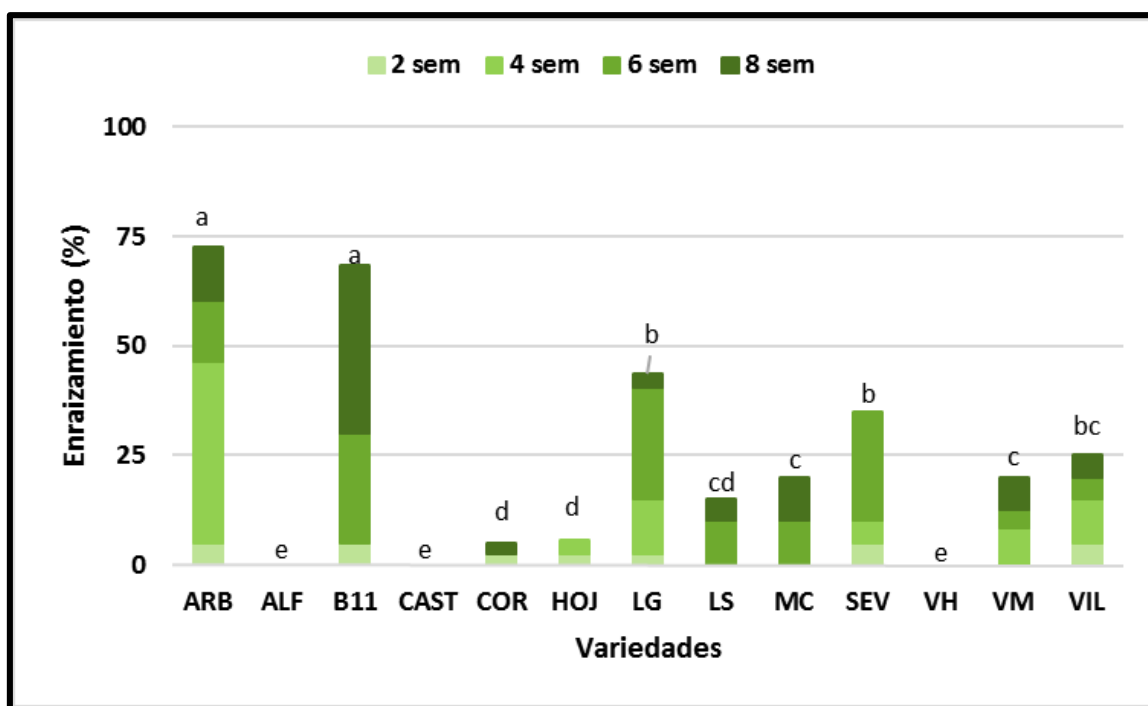


**Figura 33:** Porcentaje de enraizamiento *in vitro* de distintas variedades de olivo, en el medio DKWr. Datos a las 2, 4, 6 y 8 semanas. Columnas con distintas letras indican diferencias significativas según el test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ). ARB: 'Arbequina'; ALF: 'Alfajara'; B11: 'Blanqueta-11'; CA: 'Castellana'; CO: 'Cornicabra'; HOJ: 'Hojiblanca'; LG: 'Lechín de Granada'; LS: 'Lechín de Sevilla'; MC: 'Manzanilla Cacereña'; SE: 'Sevillena'; VH: 'Verdial de Huévar'; VM: 'Verdial de Vélez Málaga'; VIL: 'Villalonga'.

### Experimento 2: Efecto de los medios OMr/e en el enraizamiento *in vitro* de diferentes variedades de olivo

El protocolo de Cañas *et al.* (1987) utilizan el enraizamiento en dos fases. En la primera, la inducción de raíces se realiza en el medio OMr (Rugini, 1984) suplementado con  $4.9 \mu\text{M}$  de AIB. Tras cultivar los brotes 2 semanas en este medio, se pasa a la segunda fase, en la cual, se transfieren los explantos al medio de elongación de raíces OMe, sin suplemento de auxina (AIB), y con zeatina ( $6.8 \mu\text{M}$ ). Los brotes se mantienen en este medio durante 6 semanas.

Los medios OMr/e no mejoran los resultados de enraizamiento producidos por el medio estándar en las variedades estudiadas, y sólo las variedades 'Arbequina' y 'Blanqueta-11', alcanzaron porcentajes superiores al 50%, 72.5% y 68.4% respectivamente. De igual manera, las variedades 'Castellana' y 'Verdial de Huévar' no mostraron respuesta alguna a los medios OMr/e, con 0% de enraizamiento en ambas (**Figura 34**).



**Figura 34:** Porcentaje de enraizamiento *in vitro* de distintas variedades de olivo, en los medios OMr/e. Datos a las 2, 4, 6 y 8 semanas. Columnas con distintas letras indican diferencias significativas según el test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ). ARB: 'Arbequina'; ALF: 'Alfajara'; B11: 'Blanqueta-11'; CA: 'Castellana'; CO: 'Cornicabra'; HOJ: 'Hojiblanca'; LG: 'Lechín de Granada'; LS: 'Lechín de Sevilla'; MC: 'Manzanilla Cacereña'; SE: 'Sevillenca'; VH: 'Verdial de Huévar'; VM: 'Verdial de Vélez Málaga'; VIL: 'Villalonga'.

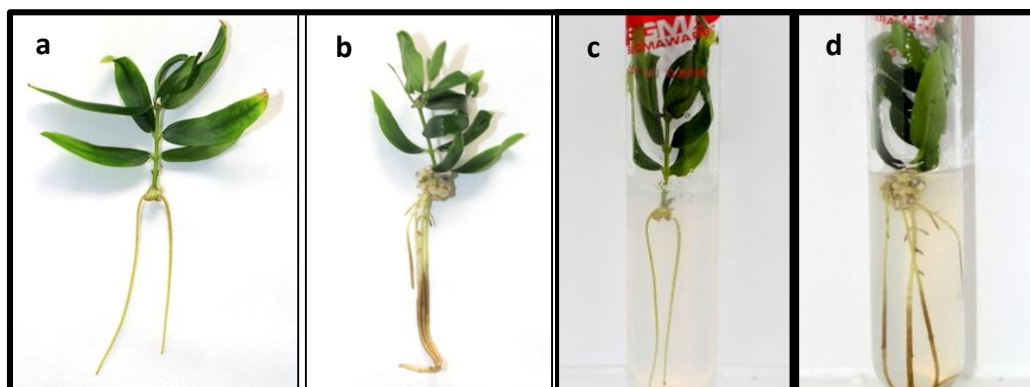
Si comparamos los resultados de enraizamiento *in vitro* de los dos protocolos utilizados (**Figura 33 y Figura 34**), podemos observar que en las variedades 'Arbequina', 'Blanqueta-11' y 'Manzanilla Cacereña' el medio DKWr es el que provoca mayores porcentajes de enraizamiento, mientras que en las variedades 'Lechín de Granada' y 'Verdial de Vélez Málaga' es en los medio OMr/e en los que se obtienen los mejores porcentajes de enraizamiento. En el resto de variedades los dos protocolos empleados producen resultados similares.

En cuanto al aspecto de los brotes tras el enraizamiento, fue bueno y similar en ambos medios. Sólo la variedad 'Cornicabra' presentaba síntomas de marchitez foliar, caída de hojas y necrosis de yemas axilares en medio estándar, mientras que exhibió un aspecto bueno en los medios OMr/e.

En cuanto a la parte radicular, si se observaron diferencias entre un protocolo y otro. Así, mientras que los brotes cultivados en medio estándar, presentaban en general, un menor número de raíces y más finas, los explantos cultivados en los medios OMr/e presentaban más raíces y mucho más gruesas y largas, y además desarrollaban raíces secundarias. En lo referente al desarrollo de callos, ocurre algo parecido, de forma general en los medios OMr/e los callos que se formaban en



la base del brote fueron más grandes que en medio estándar para todas las variedades estudiadas (Figura 35).



**Figura 35:** Aspecto de los brotes tras la fase del enraizamiento *in vitro*: Explantos de la variedad 'Arbequina' y 'Blanqueta-11' enraizados con el método estándar DKWr (a y c, respectivamente) y las mismas variedades enraizadas con el método OMr/e (b y d, respectivamente) tras 8 semanas de cultivo.

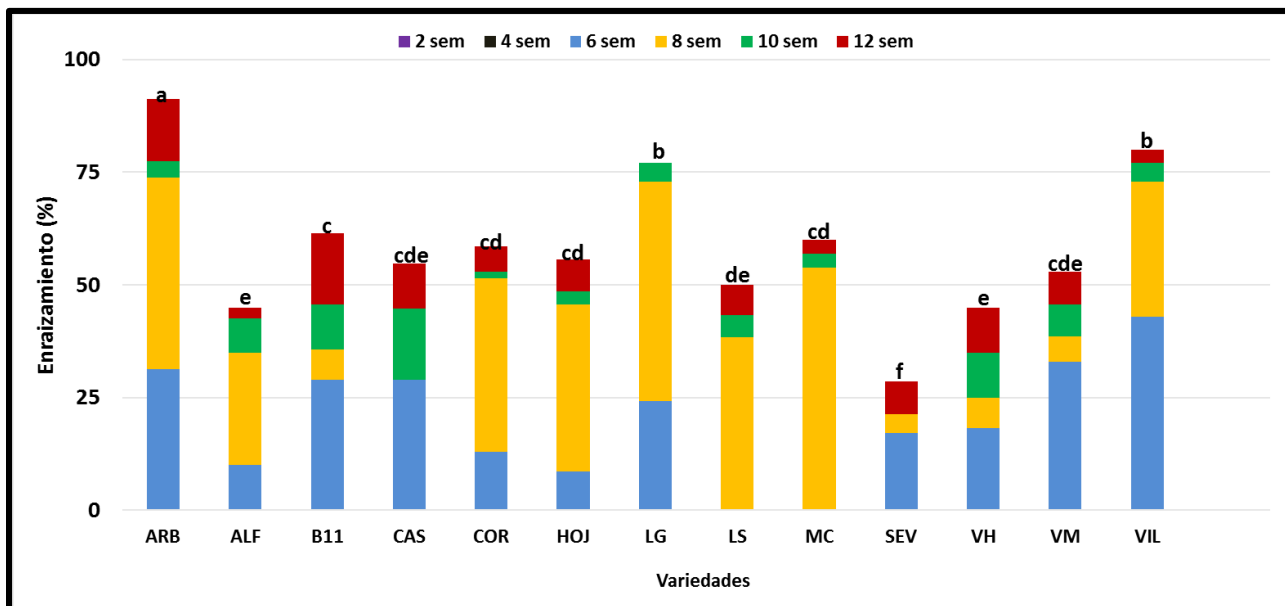
### Experimento 3: Evaluación de la capacidad de enraizamiento *ex vitro* de microestaquillas de diferentes variedades de olivo, procedentes del cultivo *in vitro*

Debido a los bajos porcentajes de enraizamiento *in vitro* obtenidos en la mayoría de las variedades, tanto con el protocolo estándar (Vidoy-Mercado, 2014) como con el protocolo de Cañas *et al.* (1987), decidimos probar el enraizamiento *ex vitro*, para lo cual nos basamos en el protocolo estándar desarrollado en nuestro grupo (Vidoy-Mercado, 2014).

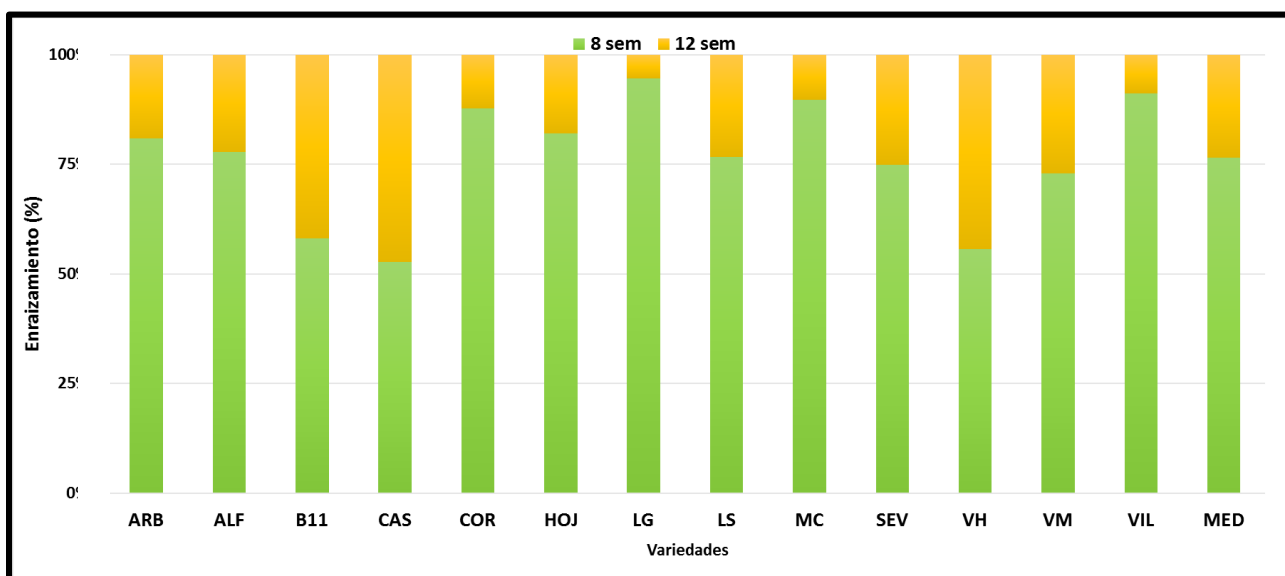
El protocolo de enraizamiento *ex vitro* se mostró mucho más eficaz que los protocolos de enraizamiento *in vitro*, y así, 10 de las 13 variedades con las que se llevó a cabo el experimento, incluida la variedad 'Arbequina' control, alcanzaron porcentajes de enraizamiento iguales o superiores al 50%. Las variedades 'Alfajara' y 'Verdial de Huévar' alcanzaron porcentajes del 45% y sólo 'Sevillanca' mostraron un porcentaje inferior al 40% (Figura 36).

El experimento de enraizamiento *ex vitro* se mantuvo durante 12 semanas, observándose que durante las primeras 4 semanas no se produjeron enraizamiento en ninguna de las variedades estudiadas, siendo entre la 6 y 8 semanas cuando se desarrolló el mayor número de raíces, de forma que el 76.5% del enraizamiento total se produjo en las 8 primeras semanas y el restante 23.5% se produjo durante las últimas 4 semanas. Cabe destacar las variedades 'Lechín de Granada' y 'Villalonga', en las que más del 90% del enraizamiento total se produce en las primeras 8 semanas

(94.4% y 91.1% respectivamente). En el otro extremo, encontramos las variedades ‘Blanqueta-11’, ‘Castellana’ y ‘Verdial de Huévar’, donde durante las primeras 8 semanas el enraizamiento acumulado respecto al total es inferior al 60% (**Figura 37**).

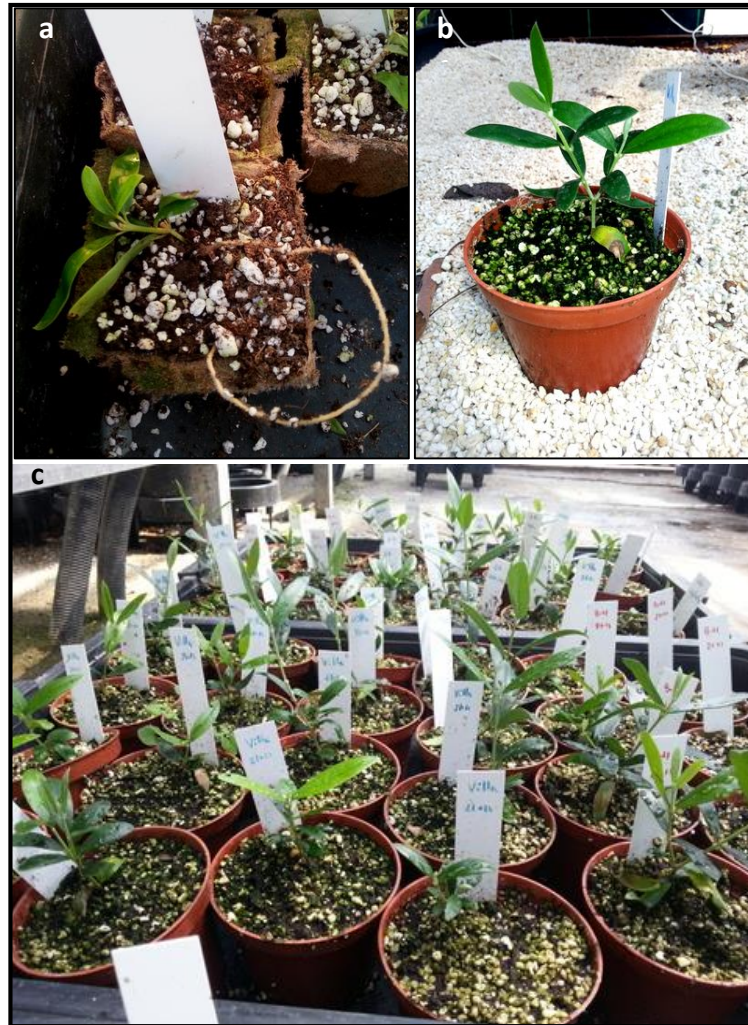


**Figura 36:** Porcentaje de enraizamiento *ex vitro* de distintas variedades de olivo. Datos a las 2, 4, 6, 8, 10 y 12 semanas. Columnas con distintas letras indican diferencias significativas según el test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ). ARB: ‘Arbequina’; ALF: ‘Alfafara’; B11: ‘Blanqueta-11’; CA: ‘Castellana’; CO: ‘Cornicabra’; HOJ: ‘Hojiblanca’; LG: ‘Lechín de Granada’; LS: ‘Lechín de Sevilla’; MC: ‘Manzanilla Cacereña’; SE: ‘Sevillena’; VH: ‘Verdial de Huévar’; VM: ‘Verdial de Vélez Málaga’; VIL: ‘Villalonga’.



**Figura 37:** Porcentaje de enraizamiento *ex vitro* acumulado de distintas variedades de olivo. Datos a las 8 y 12 semanas. ARB: ‘Arbequina’; ALF: ‘Alfafara’; B11: ‘Blanqueta-11’; CA: ‘Castellana’; CO: ‘Cornicabra’; HOJ: ‘Hojiblanca’; LG: ‘Lechín de Granada’; LS: ‘Lechín de Sevilla’; MC: ‘Manzanilla Cacereña’; SE: ‘Sevillena’; VH: ‘Verdial de Huévar’; VM: ‘Verdial de Vélez Málaga’; VIL: ‘Villalonga’.

En cuanto al aspecto de las plántulas, aquellas que enraizaban tenían un aspecto excelente (**Figura 38**). Por el contrario, aquellas que no enraizaban, evidenciaban síntomas de deterioro, por ejemplo, marchitez foliar, clorosis foliar, caída de hojas y por último con el paso de las semanas necrosis total del explanto.



**Figura 38:** Aspecto de plántulas de la variedad 'Villalonga' tras 8 semanas **(a)** y tras 10 semanas **(b)** y tras 12 semanas **(c)** de enraizamiento *ex vitro* utilizando el método estándar.

Comparando los datos obtenidos en el enraizamiento *in vitro* y *ex vitro*, en términos generales, en el enraizamiento *ex vitro* se alcanzaron los mejores resultados (**Figura 33, Figura 34 y Figura 36**). Así, 10 de las 13 variedades estudiadas alcanzan porcentajes de enraizamiento más elevados si éste se realiza *ex vitro*. Incluso variedades que *in vitro* no presentan enraizamiento, si el proceso se

realiza *ex vitro* si consiguen enraizar, como es el caso de las variedades 'Alfafara', 'Castellana' y 'Verdial de Huévar'.

En las variedades 'Arbequina' y 'Sevillena' no se apreciaron diferencias entre los distintos métodos empleados, mientras que en la variedad 'Blanqueta-11' se obtuvieron mejores resultados *in vitro*, con un 90% de enraizamiento, frente a 61.4% de enraizamiento *ex vitro*

### II.3.4. Estabilidad Genética

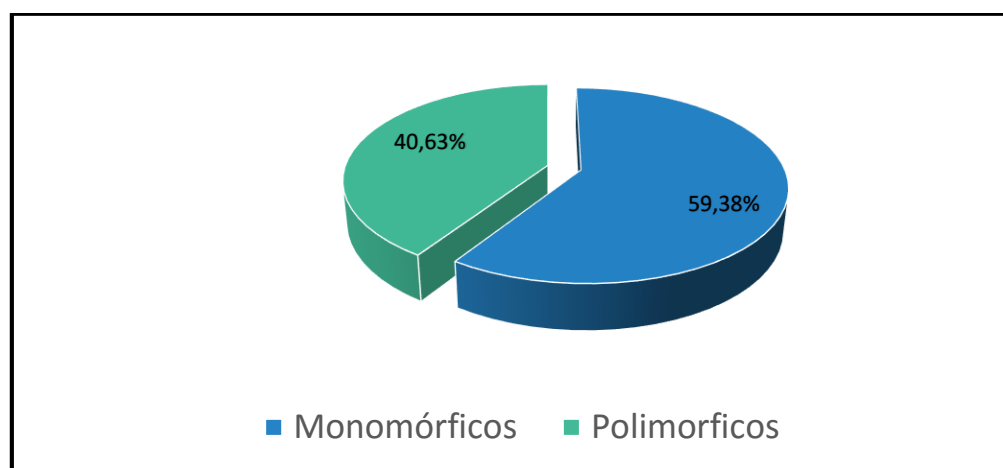
#### Experimento 1: Estudio de la variabilidad genética intervarietal en olivo

De forma previa al análisis de la estabilidad genética de las plantas micropropagadas se ha analizado la utilidad de los marcadores ISSR para detectar variabilidad intervarietal en olivo. Para ello se han analizado los perfiles de amplificación obtenidos en 8 variedades de esta especie: 'Blanqueta-11' (B11), 'Castellana' (CA), 'Cornicabra' (CO), 'Hojiblanca' (H), 'Lechín de Granada' (LG), 'Sevillena' (S), 'Verdial de Vélez Málaga' (VM), y 'Villalonga' (V).

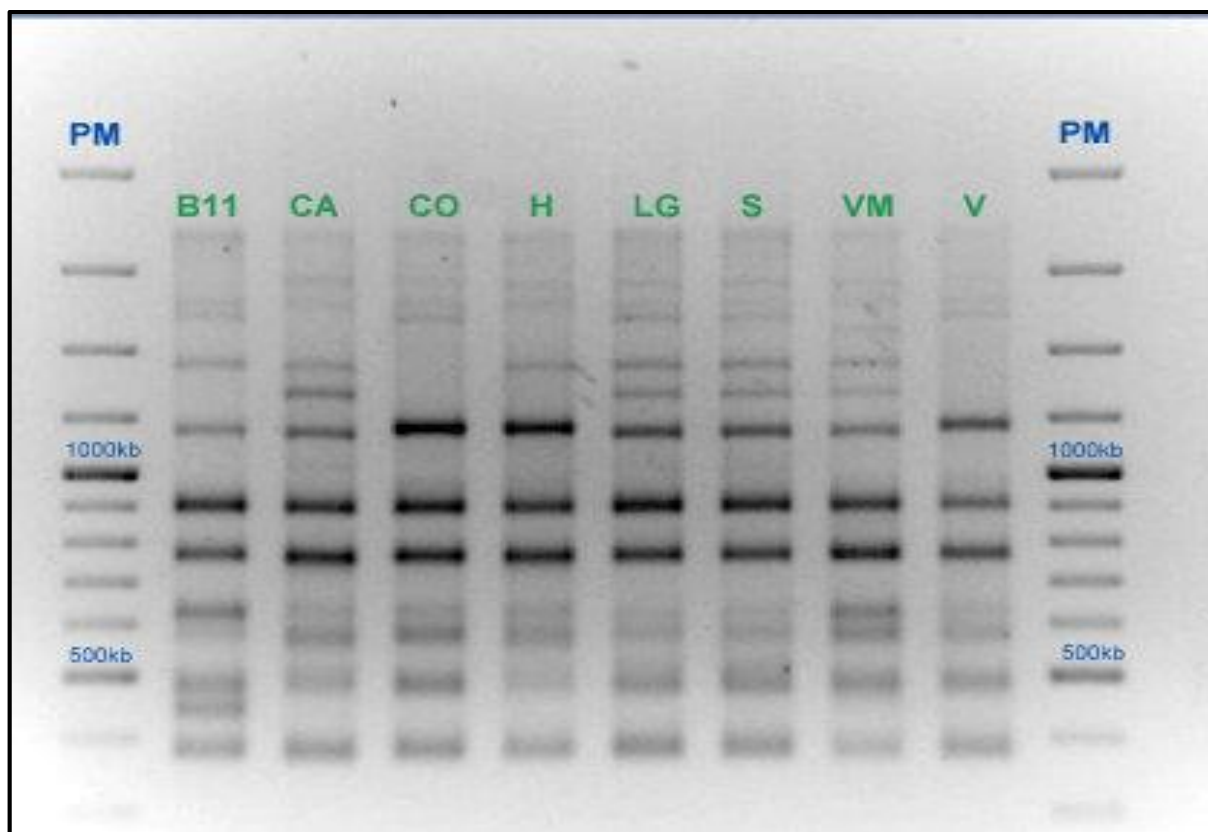
El número de marcadores obtenidos por cebador oscila desde los 16 de los cebadores 808 y 827, hasta los 6 del cebador 885 (**Tabla 10**). En total se han analizado 160 bandas, obteniéndose un valor medio de 10.67 marcadores por cebador ISSR. De estos 160 marcadores, 65 (40.63%) son polimórficos, es decir, no están presentes en todas las variedades; y 95 (59.38%) son monomórficos, es decir, están presentes en todas las variedades estudiadas (**Figura 39**). El análisis de los marcadores polimórficos por cebador varía entre 0 (844, 864 y 865) y 11 (813) (**Figura 40**).

**Tabla 10:** Número de marcadores totales, polimórficos y monomórficos obtenidos por cada cebador ISSR al comparar los perfiles de 8 plantones madres.

|              | Nº Marcadores<br>totales | Nº Marcadores<br>Polimórficos (%) | Nº Marcadores<br>Monomórficos (%) |
|--------------|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 808          | 16                       | 7                                 | 9                                 |
| 810          | 11                       | 7                                 | 4                                 |
| 811          | 15                       | 7                                 | 8                                 |
| 813          | 15                       | 11                                | 4                                 |
| 825          | 8                        | 5                                 | 3                                 |
| 827          | 16                       | 9                                 | 7                                 |
| 834          | 9                        | 1                                 | 8                                 |
| 836          | 9                        | 4                                 | 5                                 |
| 842          | 9                        | 4                                 | 5                                 |
| 844          | 8                        | 0                                 | 8                                 |
| 855          | 8                        | 3                                 | 5                                 |
| 864          | 8                        | 0                                 | 8                                 |
| 868          | 12                       | 4                                 | 8                                 |
| 885          | 6                        | 0                                 | 6                                 |
| 887          | 10                       | 3                                 | 7                                 |
| <b>TOTAL</b> | <b>160 (100%)</b>        | <b>65 (40.63%)</b>                | <b>95 (59.38%)</b>                |



**Figura 39:** Representación gráfica del tipo de marcadores (monomórficos y polimórficos), respecto al total.



**Figura 40:** Perfiles de bandas obtenidos con el cebador 813 a partir de ADN de 8 plantones madre: B-11-Blanqueta-11; CA-Castellana; CO-Cornicabra; H-Hojiblanca; LG-Lechín de Granada; S-Sevillena; VM-Verdial de Vélez Málaga; V-Villalonga. PM-Patrón de Peso Molecular (Gene Ruler 100pb plus DNA Ladder. Fermentas-Thermo Scientific).

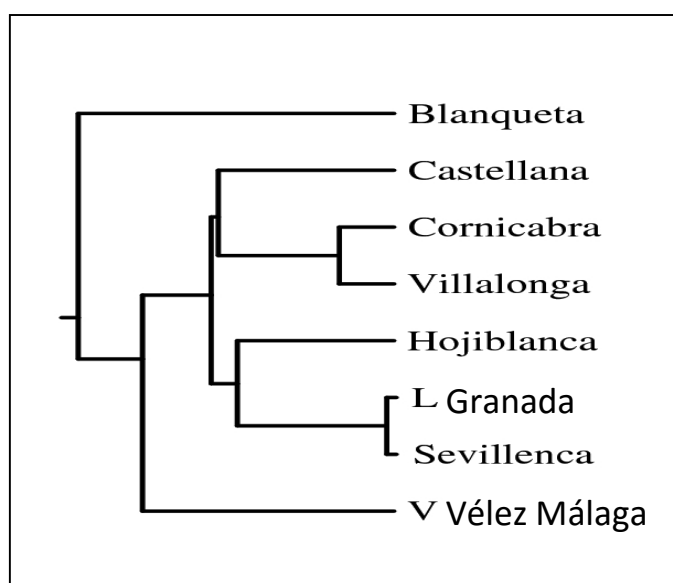
El análisis de los 160 marcadores permite diferenciar todas las variedades analizadas entre sí, cada una de ellas presenta un perfil de bandas que no se repite en el resto de las variedades analizadas. Las distancias genéticas se estiman por pares (**Tabla 11**), observándose que las variedades 'Sevillena' y 'Lechín de Granada' son las más cercanas (distancia 0.008).

El dendograma obtenido usando UPGMA como método de agrupamiento y el coeficiente de Jaccard permite presentar de forma gráfica las relaciones entre las variedades (**Figura 41**). Se observan dos clados diferenciados con buen soporte de bootstrap. En uno se agrupan las variedades 'Castellana', 'Cornicabra' y 'Villalonga' y en el otro 'Hojiblanca', 'L. Granada' y 'Sevillena'. Las variedades 'Verdial de Vélez Málaga' y 'Blanqueta-11' son las que aparecen más alejadas tal y como reflejan sus distancias genéticas con el resto de las analizadas.

**Tabla 11:** Distancias genéticas estimadas al comparar las variedades de olivo por parejas.

|                        | B-11 | CAS   | COR   | HOJ   | LG    | SEV   | VM    | VILL  |
|------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>Blanqueta-11</b>    | 0    | 0.284 | 0.269 | 0.270 | 0.279 | 0.272 | 0.257 | 0.271 |
| <b>Castellana</b>      |      | 0     | 0.148 | 0.142 | 0.160 | 0.166 | 0.223 | 0.149 |
| <b>Cornicabra</b>      |      |       | 0     | 0.150 | 0.155 | 0.161 | 0.207 | 0.045 |
| <b>Hojiblanca</b>      |      |       |       | 0     | 0.136 | 0.129 | 0.234 | 0.151 |
| <b>L. Granada</b>      |      |       |       |       | 0     | 0.008 | 0.181 | 0.169 |
| <b>Sevillenca</b>      |      |       |       |       |       | 0     | 0.174 | 0.175 |
| <b>V. Vélez Málaga</b> |      |       |       |       |       |       | 0     | 0.221 |
| <b>Villalonga</b>      |      |       |       |       |       |       |       | 0     |

B11: 'Blanqueta-11'; CAS: 'Castellana'; COR: 'Cornicabra'; HOJ: 'Hojiblanca'; LG: 'Lechín de Granada'; SEV: 'Sevillenca'; VM: 'Verdial de Vélez Málaga'; VILL: 'Villalonga'



**Figura 41:** Dendrograma donde se muestran la distancia genética entre las 8 variedades de olivo analizadas estimadas mediante el coeficiente de Jaccard y representadas mediante el método de agrupamiento UPGMA (programa PHYLIP). Se utilizaron 160 marcadores ISSR.



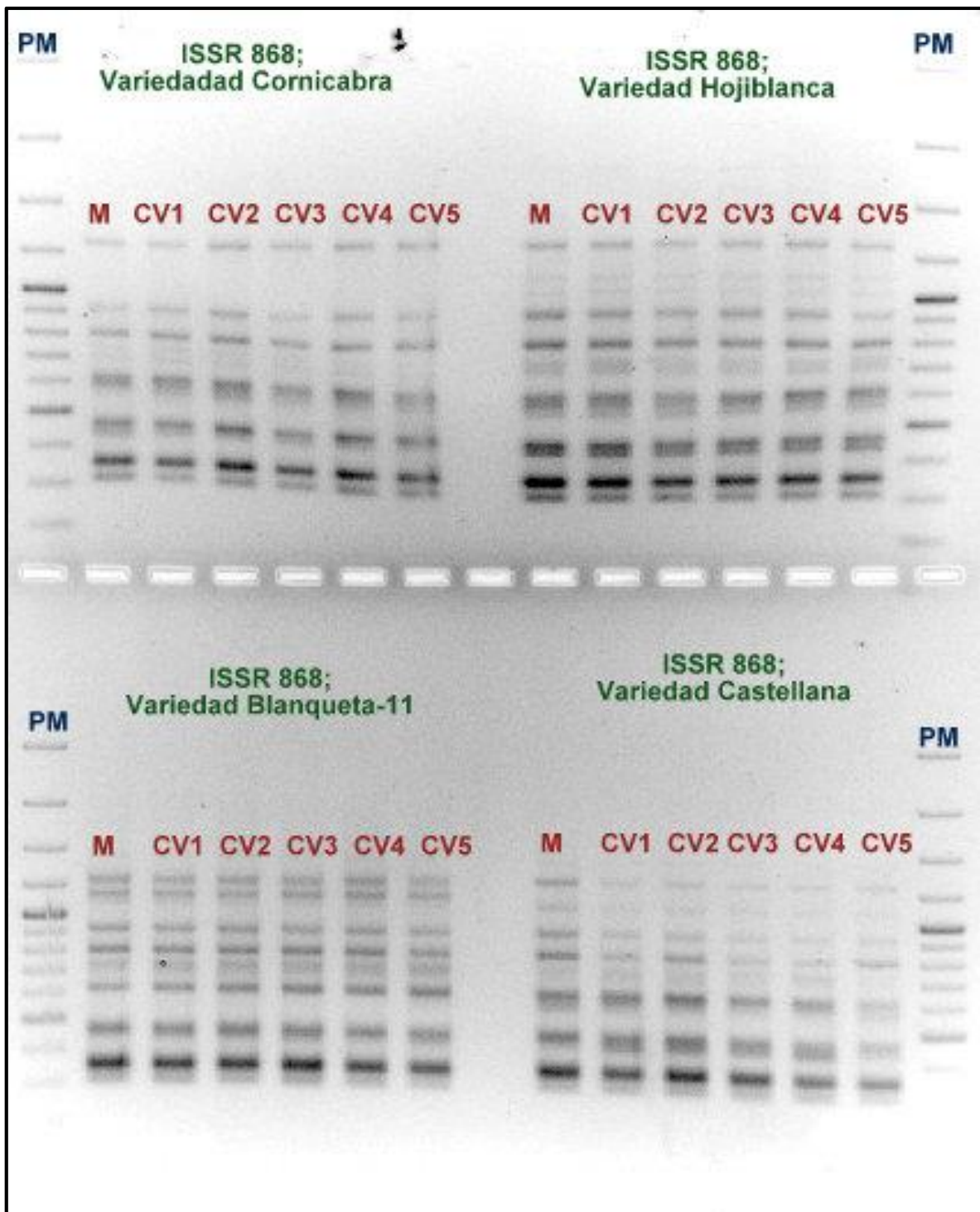
Experimento 2: Estudio de la estabilidad genética de las plantas micropropagadas

Para amplificar el ADN procedente de las plantas madres y de las plantas micropropagadas de las 8 variedades de olivo analizadas en este estudio, se utilizaron 15 cebadores ISSR (UBC primers serie 9), incluyendo repeticiones de di- y trinucleótidos. El número total de marcadores analizados en este estudio oscila entre los 160 para la variedad ‘Blanqueta-11’ y los 141 de la variedad ‘Cornicabra’ (**Tabla 12**). Al comparar los perfiles obtenidos en la planta madre con los perfiles obtenidos en las plantas micropropagadas no se observan diferencias en ninguno de los casos. Las bandas o marcadores presentes en los plantones madres también lo están en las plantas micropropagadas (**Figura 42**), lo que indicaría que los marcadores analizados se comportan como monomórficos, y por lo tanto no existiría variación somaclonal.

**Tabla 12:** Número de marcadores obtenidos por variedad con los 15 cebadores ISSR estudiados.

| Variedad                    | Nº Marcadores totales |
|-----------------------------|-----------------------|
| <b>Blanqueta-11</b>         | 160                   |
| <b>Castellana</b>           | 144                   |
| <b>Cornicabra</b>           | 141                   |
| <b>Hojiblanca</b>           | 157                   |
| <b>L. Granada</b>           | 147                   |
| <b>Sevillenca</b>           | 149                   |
| <b>Verdial Vélez Málaga</b> | 149                   |
| <b>Villalonga</b>           | 143                   |





**Figura 42:** Perfil de bandas obtenido con el cebador 868, para las variedades 'Cornicabra', 'Hojiblanca', 'Blanqueta-11' y 'Castellana'. (M) plantón madre, (CV1 al CV5) plantas micropropagadas. (PM) Patrón de peso molecular (Gene Ruler 100pb plus DNA Ladder. Fermentas-Thermo Scientific).

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## II.4. DISCUSIÓN

El objetivo de este capítulo era estudiar la aptitud para la micropropagación de las variedades principales de olivo, utilizando para ello el protocolo de micropropagación puesto a punto en nuestro laboratorio por Vidoy-Mercado (2014) para las variedades 'Arbequina' y 'Picual'

Conocer la respuesta de materiales tan diversos genéticamente, a un único protocolo con el que ya trabajamos de forma rutinaria en el laboratorio, nos daría una información muy valiosa acerca de la posibilidad real de aplicar los métodos de conservación *in vitro* al BGMO, CAP-UCO-IFAPA, objetivo último de nuestro trabajo.

### II.4.1. Establecimiento *in vitro* del material

En el olivo, igual que ocurre en otras especies leñosas, se produce una pérdida de capacidad morfogénica del material al alcanzar la fase adulta de desarrollo. Peña-Ramírez *et al.* (2010), atribuye esta pérdida de capacidad morfogénica del material adulto a la especialización de los tejidos, reduciendo así su plasticidad y capacidad de diferenciación celular. Por su parte, Valdés *et al.* (2003) señalan que durante el desarrollo tiene lugar una reducción en los niveles endógenos de citoquininas, lo que provoca que se reduzcan las divisiones celulares e inducción de las yemas, lo que explicaría el retraso observado en las respuestas de las yemas adultas.

En nuestro caso, con el fin de mejorar el comportamiento del material adulto, los árboles madre se podaron severamente, utilizándose para el inicio del cultivo secciones nodales procedentes de las nuevas brotaciones que surgen tras la poda. Este proceso ha demostrado ser un método eficaz para incrementar la capacidad morfogénica en diferentes especies leñosas (Howard *et al.*, 1989; Selby *et al.*, 1990), y su efecto ha sido atribuido tanto al incremento del vigor fisiológico de la planta (Fortanier y Jonkers, 1976 citado por Vidoy-Mercado, 2014), como a que los nuevos brotes que emergen procedan de yemas que permanecían en estado de dormancia, manteniendo así características juveniles (Franclet, 1983). Esta técnica usada de forma rutinaria para forzar la brotación de nuevas ramas, en el olivo se ha utilizado en las variedades 'Koroneiki' (Roussos y Pontikis, 2002), 'Galega vulgar' (Peixe *et al.*, 2007), y en 'Arbequina' y 'Picual' (Vidoy-Mercado, 2014).

La gran heterogeneidad en la respuesta de las distintas variedades de olivo estudiadas ante la aplicación de un mismo protocolo de micropropagación, pone de manifiesto la gran influencia del genotipo en dicho proceso. Así ante un mismo medio (RP) y en las mismas condiciones de cultivo, de las 22 variedades de olivo estudiadas, en 14 variedades se han conseguido porcentajes de brotación superiores al 50%: ‘Blanqueta-11’, ‘Blanqueta-48’, ‘Castellana’, ‘Cornicabra’, ‘Hojiblanca’, ‘Lechín de Sevilla’, ‘Manzanilla Cacereña’, ‘Manzanilla Sevillana’, ‘Morisca’, ‘Picudo’, ‘Sevillenca’, ‘Verdial de Badajoz’, ‘Verdial de Vélez Málaga’ y ‘Villalonga’, siendo inferiores en las 8 variedades restantes: ‘Alfafara’, ‘Changlot Real’, ‘Empeltre’, ‘Farga’, ‘Gordal’, ‘Lechín de Granada’, ‘Morrut’ y ‘Verdial de Huévar’. Resultados similares se obtienen cuando se analiza la longitud de los brotes formados, que en las 12 variedades alcanzan longitudes superiores a 1.5cm, mientras que en las 10 variedades restantes no alcanzan dicho tamaño. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores que trabajaron simultáneamente con un número elevado de variedades. Zuccherelli y Zuccherelli (2002) al estudiar la propagación *in vitro* de 50 variedades de olivo de la cuenca mediterránea, y utilizando el protocolo descrito por Rugini (1984), clasificaron las variedades en tres grandes grupos en función de su respuesta de adaptación al protocolo de propagación: Variedades difíciles (13 variedades en las que se encuentran ‘Gordal’, ‘Manzanilla’ y ‘Picual’), Variedades con dificultad media (16 variedades, entre las que está ‘Cornicabra’) y variedades fáciles (21 variedades, entre las que están ‘Arbequina’ y ‘Hojiblanca’). En el trabajo de Vidoy-Mercado (2014), también se observó la influencia del genotipo, así aun aplicando el mismo medio (RP) y las mismas condiciones de cultivo, se obtuvo un 82% de brotación en la variedad ‘Arbequina’, mientras que para la variedad ‘Picual’ el porcentaje obtenido fue inferior, 67%. Por el contrario, García-Férriz *et al.* (2002) no observaron diferencias en cuanto al porcentaje de brotación entre las tres variedades estudiadas ‘Arbequina’, ‘Picual’ y ‘Empeltre’, en todas ellas se alcanzaron valores entorno al 80%, utilizando medio OS, medio de inicio establecido por Rugini (1984) con las sales reducidas a la mitad.

Estos resultados contrastan con lo observado por Revilla *et al.* (1996) y Otero y Docampo (1998), los cuales no logran establecer *in vitro* las secciones nodales procedente de material adulto de la variedad ‘Arbequina’, describiendo problemas de abscisión de hojas y desecación y oxidación de explantos. En nuestro caso, este efecto sólo se observó en la variedad ‘Morrut’, pero a pesar de estos problemas el material conseguía establecerse. En otros trabajos (Donini *et al.*, 2008a) tampoco consiguieron establecer *in vitro* secciones nodales de ‘Arbequina’ por problemas de contaminación en ninguno de los tres medios de cultivo que emplearon (MS, OM y WPM). En nuestro caso no

obtuvimos excesivos problemas de contaminación y tras aplicar el protocolo de desinfección la contaminación media para las 22 variedades estudiadas fue del 8.53%.

Puesto que para cada variedad es necesario ajustar las concentraciones de sales y reguladores de crecimiento que se emplean (Cozza *et al.* (1997), en nuestro caso además del medio RP (Roussos y Pontikis, 2002) utilizando el medio estándar, testamos otros medios recogidos en la bibliografía para el establecimiento *in vitro* : MS (Murashige y Skoog, 1962), B5 (Gamborg *et al.*, 1968), WPM (McCown y Lloyd, 1981) e IM (Rugini, 1984), con el fin de que en aquellas variedades en las que no se obtuvieron los resultados deseados, ya fuera referente a la brotación/supervivencia de los explantos o bien en cuanto a la longitud de los brotes formados, mejoraran en estos parámetros.

En el medio IM, si se analizan las variedades de forma independiente, comprobamos que en 6 de ellas ('Alfajara', 'Empeltre', 'Farga', 'Gordal', 'Morrut' y 'Verdial de Huévar') sí se observó que los porcentajes de supervivencia de los explantos eran significativamente mayores significativamente, frente al medio RP, aunque la longitud de los brotes formados, era inferior a 0.6cm en todas las variedades. Estos resultados, junto al enorme deterioro que sufrían los explantos tras los sucesivos subcultivos este medio IM, nos hicieron descartarlo como una alternativa eficaz al protocolo estándar. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Vidoy-Mercado (2014), y que aunque el material propagado en IM alcanzaba porcentajes de brotación (98%) superiores a los obtenidos con medio RP (80%), la longitud de los brotes era mucho menor, 0.4 cm en IM frente a 1.4 cm en RP.

Por otro lado, el medio IM (Rugini, 1984) ha sido usado en Italia para la producción de más de 50 variedades de olivo con unos buenos resultados en cuanto a la calidad y rapidez de crecimiento de las plantas (Rugini, 2006), pero, en todos los casos el medio IM era sustituido por el medio OM (Rugini, 1984) una vez los explantos conseguían brotar inicialmente. Esto explicaría la ausencia de deterioro del material en los subcultivos posteriores que, si observamos en nuestro caso, al seguir utilizando la formulación inicial.

En cuanto al resto de medios de cultivo utilizados en este estudio (MS, WPM y B5), sólo el empleo de WPM consiguió mejorar los resultados en cuanto a supervivencia de los explantos frente al protocolo estándar con RP (59.5% frente a 47.9%). Así, 7 de las variedades estudiadas mejoraron significativamente los porcentajes de supervivencia con el empleo de WPM ('Empeltre', 'Farga',

‘Gordal’, ‘Lechín de Granada’, ‘Morisca’, ‘Morrut’ y ‘Verdial de Huévar’), aunque igual que ocurría con el medio IM, ninguna conseguía formar brotes con el tamaño mínimo necesario. Resultados similares, en cuanto a brotación, obtuvieron Grigoriadou *et al.* (2002) en la variedad griega ‘Chondrolia Chalkidikis’, en la que el empleo del medio WPM resultó más efectivo que el OM (Rugini, 1984) o el QL (Quoirin y Lepoivre 1977). Tanto el medio WPM como el IM, son pobres en sales comparados con el medio RP, lo que podría indicar cierta toxicidad de algunas sales del medio RP, que afectaría a la brotación de las yemas de algunas variedades.

En relación a esto, se ha podido observar que en nuestro caso el empleo de otros medios de cultivo ha mejorado los porcentajes de brotación y supervivencia en ciertas variedades, pero ninguno mejoró los datos de longitud de los brotes formados. Una posible explicación a los pobres resultados en cuanto a la longitud de los brotes formados podría ser por los reguladores de crecimiento utilizados, puesto que en el caso del medio IM se usa ZR, pero en una concentración mucho menor que en el medio RP, y en el caso del medio WPM, no se emplean reguladores de crecimiento. Por tanto, parece importante combinar en estas variedades un medio pobre en algunas sales con una dosis media de reguladores de crecimiento. Peixe *et al.* (2007) ya puso de manifiesto la importancia del empleo de los reguladores de crecimiento en todas las fases del protocolo de propagación del olivo, incluida la de establecimiento. En una línea similar, el trabajo de Grigoriadou *et al.* (2002) también pone de manifiesto la necesidad de los reguladores de crecimiento durante la fase de establecimiento, el WPM resultó ser el medio más eficaz, pero tras la adición de reguladores de crecimiento, concretamente 20  $\mu\text{M}$  de zeatina, 1  $\mu\text{M}$  de BAP y 0.3  $\mu\text{M}$  de ANA.

Adicionalmente, Dimassi (1999), trabajando con la variedad ‘Kalamon’, puso de manifiesto la importancia del balance entre los distintos reguladores, así los mejores resultados tanto de brotación como de longitud de los brotes en el medio WPM, se obtuvieron con un ratio  $\text{GA}_3/\text{BAP}$  de 1. Además, observó que con la adición de 10 mg/L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  al medio incrementaba el número de brotes y la longitud fue del doble, mientras que con una adición de 20 mg/L fue de cuatro veces. El rol del  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en la proliferación de los brotes y su longitud no está bien definido, pero de acuerdo a Rugini (1984) el olivo requiere de  $\text{NO}_3^-$  y de  $\text{NH}_4^+$  con el fin de desarrollar rápidamente las yemas axilares. El hecho de que el medio RP tenga una concentración muy superior de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1417 mg/L) que el IM (100 mg/L) y el WPM (400 mg/L), podría explicar la escasa longitud de los brotes formados en IM y WPM frente a RP.

Siguiendo la línea de Zuccherelli y Zuccherelli (2002) una posible solución para aquellas variedades en las que se ha probado que los medios IM o WPM son más efectivos que el protocolo estándar (en cuanto a brotación y supervivencia de los explantos se refiere), que en total serían 8 ('Alfajara', 'Empeltre', 'Farga', 'Gordal', 'Lechín de Granada', 'Morisca', 'Morrut' y 'Verdial de Huévar') podría ser intentar iniciarlas en estos medios y tras 6 semanas, recultivarlas y/o subcultivarlas en otros medios más ricos en sales y reguladores de crecimiento, que en el caso de las variedades 'Lechín de Granada' y 'Verdial de Huévar' podría ser perfectamente el medio RP pues, en él, presentan buenas tasas de crecimiento y elongación de los brotes. Esta idea se ve apoyada por el trabajo de Santos *et al.* (2003) en el que se inició material de *Olea europaea* spp. *maderensis*, testando dos medios diferentes DKW y OM, comprobándose en medio OM el número de brotes formados era mayor significativamente, pero su longitud menor, por lo que estos explantos necesitaban ser transferidos a medio DKW para obtener una máxima elongación de los mismos.

#### II.4.2. 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 la longitud de estos nuevos brotes. En el caso del olivo, las tasas de multiplicación se ven limitadas por una fuerte dominancia apical, que habitualmente produce el desarrollo de un solo brote y una escasa o nula producción de brotes axilares (Rugini y Panelli, 1993; Mendoza de Gyves *et al.*, 2008). En el trabajo de Zacchini y de Agazio (2004) se puso de manifiesto que la eliminación del ápice influye de manera positiva en el desarrollo de las yemas laterales. Resultados similares obtuvo Vidoy-Mercado (2014) al cultivar brotes apicales frente a secciones subapicales, estableciendo como estándar en su protocolo la eliminación de la yema apical de los explantos en la fase de proliferación.

Una posibilidad para mejorar la tasa de multiplicación en aquellas variedades en las cuales el protocolo estándar no se ha mostrado eficaz es la aplicación de pulsos eléctricos a los brotes antes de ponerlos en multiplicación para vigorizarlos y romper la dominancia apical, propia del olivo cuando se cultiva *in vitro*. Padilla *et al.* (2009) observaron que, al aplicar pulsos eléctricos, con y sin AIB, mediante electroporación, en brotes apicales de olivo procedentes de la germinación *in vitro* de semillas de tres variedades de olivo ('Arbequina', 'Manzanilla de Sevilla' y 'Gordal'), además de



obtener altos porcentajes de enraizamiento, se produjo la rotura de la dominancia apical de los brotes y la formación de brotes axilares en mayor proporción que en el control sin electroporar.

En cuanto a nuestras observaciones, se vuelve a apreciar el fuerte efecto del genotipo durante la fase de proliferación y así de las 14 variedades con las que se llevó a cabo el estudio podemos diferenciar 8 variedades en las que se obtienen tasas de multiplicación superiores a 1.5 um utilizando el protocolo estándar ('Castellana', 'Cornicabra', 'Hojiblanca', 'Lechín de Granada', 'Sevillena', 'Verdial de Huévar', 'Verdial de Vélez Málaga' y 'Villalonga'), mientras con las restantes aun usando el mismo medio y las mismas condiciones las tasas eran inferiores a 1.5 um.

Este marcado efecto del genotipo concuerda con otros trabajos recogidos en la bibliografía en los que se obtienen grandes diferencias en las tasas de multiplicación entre las variedades estudiadas (Mendoza-de Gyves *et al.*, 2008; Sghir *et al.* (2005)

Resultados similares obtuvo Vidoy-Mercado (2014), que utilizando el medio RP obtenía tasas de multiplicación significativamente diferentes para las variedades 'Arbequina' y 'Picual', sin embargo, estas diferencias desaparecían al utilizar otros medios de cultivo como ZAD (Zacchini y De Agazio, 2004) o SS (Sghir *et al.*, 2005), donde se obtenían tasas similares.

El comportamiento de las variedades 'Blanqueta-48' y 'Verdial de Badajoz', que no mostraban síntomas de crecimiento y tras el primer subcultivo, estaría en concordancia con lo observado por Roussos y Pontikis (2002) en la variedad 'Koroneiki', en la que los explantos detenían su crecimiento tras el primer subcultivo en presencia de formulaciones minerales OM y WPM, mientras que con las sales minerales DKWm, se alcanzaban tasas de proliferación de 1.5.

Nuestros resultados ponen de manifiesto una interacción genotipo-medio de cultivo durante la fase de proliferación *in vitro* de los brotes de las variedades de olivo estudiadas, que ha sido ampliamente descrita en la bibliografía Brhadda *et al.* (2003), Grigoriadou *et al.* (2002), Peyvandi *et al.* (2009a) y Zacchini y De Agazio (2004). Así, en nuestras observaciones al emplear el medio RP, observamos que en 7 variedades no se obtenían tasas de proliferación adecuadas lo que sugiere que dicha formulación mineral no es la óptima para dichas variedades. En nuestro caso, el protocolo empleado utiliza el medio RP, que contiene la formulación mineral DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) modificada por Roussos y Pontikis (2002) para la variedad 'Koroneiki', en la que obtuvo una media de 1.5 brotes por explanto. Vidoy-Mercado (2014), trabajando con el mismo medio con las



variedades 'Arbequina' y 'Picual' obtuvo tasas de multiplicación de 2.2 um y 1.4 um respectivamente, y los resultados obtenidos al testar otras formulaciones minerales (RV, RP, ZAD, SS, Px), fueron diferentes para las dos variedades estudiadas. Así, mientras que para 'Arbequina' los mejores resultados se obtenían en medio RP, para la variedad 'Picual' las mejores tasas se obtuvieron con el medio ZAD.

En cuanto a los reguladores de crecimiento, en nuestro caso, la citoquinina empleada fue ribósido de zeatina (ZR), ya que se mostró como la más efectiva durante la fase de multiplicación en las variedades 'Arbequina' y 'Picual' (Vidoy-Mercado, 2014). Esto concuerda con los resultados obtenidos por otros autores en distintas variedades (Briccoli-Bati, 2002 y 2006; Chaari *et al.*, 2002; Grigoriadou *et al.*, 2002, 2003 y 2007; Lambardi *et al.*, 2002; Leva *et al.*, 2002 y 2003; Roussos y Pontikis, 2002; Brhadda *et al.*, 2003; Sghir *et al.*, 2005; Donini *et al.*, 2008b; Brito *et al.*, 2009; Padilla *et al.*, 2009a; Chaari *et al.*, 2011). Sin embargo, el uso de esta citoquinina encarece los procesos de micropropagación, por lo que se ha intentado sustituir por, BAP y leche de coco (Peixe *et al.*, 2007), BAP y GA<sub>3</sub> (Grigoriadou *et al.*, 2002; Zacchini y De Agazio, 2004), TDZ (García-Férriz *et al.*, 2002) o combinarla con BAP (Ali *et al.*, 2009a; Grigoriadou *et al.*, 2002) para así reducir su concentración en el medio.

Otra factor importante a tener en cuenta en la proliferación *in vitro* del material es la fuente de carbono, en nuestro trabajo, se utilizó manitol, que había sido utilizado con éxito en el cultivo *in vitro* de diferentes cultivares de olivo: 'Manzanillo' (García *et al.*, 2002); 'Koroneiki' (Roussos y Pontikis, 2002); 'Nebbiara' (Zacchini y De Agazio, 2004); 'Rowghani' (Farahani *et al.*, 2008; Peyvandi *et al.*, 2009a); 'Canino', 'Moraiolo', 'Frantoio', 'Piantone di Moiano' y 'Rosciola' (Mendoza-De Gyves *et al.*, 2008); 'Arbequina' y 'Picual' (Vidoy-Mercado, 2014). 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 *et al.*, 2007). Sin embargo, otros autores como Chaari *et al.* (2002) señalaron que la fuente de carbono que proporcionaba las mayores tasas de multiplicación en la variedad 'Meski' era la glucosa (30 g/L).

### II.4.3. Enraizamiento

El enraizamiento *in vitro* puede ser realizado en una o dos fases. En este trabajo se han realizado los dos sistemas de enraizamiento. El enraizamiento en una fase se realizó utilizando el protocolo de Revilla *et al.* (1996), en el que los brotes se cultivan en medio DKWr ( $\frac{1}{2}$  sales DKW y suplementado con AIB-0.49  $\mu$ M) y se incuban una semana en oscuridad, seguida de 7 semanas en condiciones de luz. Para el enraizamiento en dos fases se siguió el protocolo de Cañas *et al.* (1987) en el que la fase de inducción de los primordios se realiza 2 semanas en medio OMr ( $\frac{1}{2}$  sales OM y suplementado con AIB-4.9  $\mu$ M) y la fase de elongación de las raíces (6 semanas), se realiza en ausencia de auxina en el medio OMe ( $\frac{1}{4}$  sales OM y suplementado con zeatina -6.8  $\mu$ M).

De las 12 variedades estudiadas, sólo la variedad 'Blanqueta-11' muestra porcentajes de enraizamiento superiores al 50% (90% en DKWr y 68.4% en OMr/e), resultados similares a los obtenidos en la variedad 'Arbequina', nuestro control, (88% en DKWr y 72.5% en OMr/e). Ninguna de las restantes variedades alcanzó porcentajes de enraizamiento *in vitro* aceptables en ninguno de los protocolos testados, especialmente las variedades 'Alfafara', 'Castellana' y 'Verdial de Huévar', con 0% de enraizamiento. Estas diferencias de comportamiento entre las variedades, muestran nuevamente el marcado efecto del genotipo, sobre la respuesta del material en todas las fases de la micropropagación, que explica la gran variedad de protocolos y medios de enraizamiento *in vitro* descritos en la bibliografía (Chaari *et al.*, 2002; Grigoriadou *et al.*, 2002; Peixe *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2002; Zacchini y De Agazio, 2004).

Estos datos no hacen más que confirmar la importancia de la composición del medio de cultivo y las condiciones ambientales para el éxito del enraizamiento, lo que explicaría las grandes diferencias observadas en nuestro estudio, en el enraizamiento *in vitro* entre las distintas variedades y para una misma variedad entre los distintos medios empleados.

El enraizamiento *ex vitro* se había realizado en olivo, con buenos resultados en las variedades 'Arbequina' (80% enraizamiento) y 'Picual' (70% enraizamiento) (Vidoy-Mercado, 2014).

Los resultados obtenidos al aplicar el protocolo descrito por Vidoy-Mercado (2014) a las 12 variedades estudiadas, muestran que en general es un buen protocolo para enraizar el material, ya que todas las variedades enraizaron, en 3 de ellas ('Blanqueta-11', 'Lechín de Granada' y 'Villalonga') se alcanzaron altos porcentajes de enraizamiento (60-80%), otras 8 variedades ('Alfafara',

'Castellana', 'Cornicabra', 'Hojiblanca', 'Lechín de Sevilla', 'Manzanilla Cacereña', 'Verdial de Huévar' y 'Verdial de Vélez Málaga) muestran una capacidad para enraizar media (40-60%) y sólo en la variedad 'Sevillenca' se obtuvo un bajo enraizamiento (<40%). Por otro lado, a pesar de que todas las variedades consiguieron enraizar, los porcentajes fueron muy variables, oscilando entre el 80.0% de 'Villalonga' y el 28.6% de 'Sevillenca', lo cual corrobora la fuerte dependencia del genotipo ya observada en el enraizamiento *in vitro*. Resultados similares obtuvo Leva, (2011) con las variedades 'Coratina', 'Maremmano', 'Maurino', 'Picholine' y 'S. Francesco', en las que obtuvo porcentajes de enraizamiento que oscilaban entre el 62% y el 76%, mientras que con las variedades 'Frantoio' y 'Correggiolo', estos porcentajes disminuían al 40% y 28% respectivamente.

Es importante señalar que Vidoy-Mercado (2014), observó que existía un efecto estacional en el enraizamiento *ex vitro* de olivo, de forma que cuando este se realizaba en otoño los resultados eran superiores a los obtenidos que cuando se realizaba en primavera. Este efecto estacional observado, incluso en material procedente de material *in vitro*, también ha sido descrito por Mencuccini, (2003), que comprobó que los porcentajes de enraizamiento de las variedades 'Frantoio', 'Dolce Agogia' y 'Moraiolo' eran menores durante enero, incrementándose progresivamente en mayo, para alcanzar los valores máximos en septiembre. En nuestro caso para evitar este efecto estacional, todos los experimentos se realizaron durante el otoño, época en la que Vidoy-Mercado (2014) obtenía los mejores resultados.

Nuestros resultados muestran que el protocolo de enraizamiento *ex vitro* es más eficaz que el enraizamiento *in vitro* (DKWr y OMr/e), de hecho, salvo para la variedad 'Blanqueta-11', en la que los mayores porcentajes se obtienen *in vitro* y para 'Sevillenca', en la que no se encuentran diferencias entre ambos métodos, para las restantes 10 variedades, los porcentajes de enraizamiento son muy superiores *ex vitro* que *in vitro*. Este hecho también fue descrito por Vidoy-Mercado (2014), en la variedad 'Picual' (60% *in vitro* vs 83% *ex vitro*). Además, en las variedades 'Alfajara', 'Castellana' y 'Verdial de Huévar', que no enraizaban *in vitro*, alcanzan *ex vitro* porcentajes del 45%, 54.3% y 45% respectivamente

Debergh y Maene (1983) recomendaron el enraizamiento *ex vitro* siempre que este fuese posible y aunque el enraizamiento *ex vitro* no sea una práctica común en los procesos de micropropagación de olivo, en este trabajo se ha demostrado que se trata de un proceso más eficaz y eficiente que el enraizamiento *in vitro*, y proporciona mejores porcentajes de enraizamiento y

permite llevar a cabo simultáneamente los procesos de enraizamiento y aclimatación, acortando así trabajo y tiempo.

No se ha observado una relación entre los resultados obtenidos de enraizamiento *ex vitro* y los obtenidos por Del Río y Caballero *et al.* (2005) en el enraizamiento mediante la técnica del estaquillado semileñoso. Sólo en la variedad ‘Hojiblanca’ se obtienen valores similares (57.5% estaquillado vs 55.7% *ex vitro*), mientras que en las restantes variedades se observan grandes diferencias entre ambos métodos. Así para 5 variedades (‘Lechín de Granada’, ‘Manzanilla Cacerreña’, ‘Verdial de Huévar’, ‘Verdial de Vélez Málaga’ y ‘Villalonga’) el método *ex vitro* mejoró los resultados obtenidos por estaquillado. Por el contrario, en 6 variedades, el enraizamiento *ex vitro* daba resultados inferiores respecto al estaquillado, así las variedades ‘Alfajara’, ‘Blanqueta-11’, ‘Castellana’, ‘Cornicabra’ y ‘Lechín de Sevilla’ pasan de una alta capacidad de enraizamiento por estaquillado a una capacidad media, y la variedad ‘Sevillenca’ de una capacidad media a una baja.

Leva (2011), en un estudio de enraizamiento *ex vitro* con 7 variedades de olivo, concluyó que para garantizar el éxito de éste es necesario que los explantos de partida, los cuales provienen del cultivo *in vitro*, 15 antes de su paso a la fase de enraizamiento *ex vitro*, sean cultivados en medio sin reguladores de crecimiento, para que se produzca una reducción progresiva del contenido de zeatina, o de otros reguladores en los tejidos, que puedan influir de manera negativa en el enraizamiento. Este hecho, podría explicar los bajos porcentajes de enraizamiento *ex vitro* mostrado en las variedades que por estaquillado si mostraban alto enraizamiento.

#### II.4.4. Estabilidad genética

Los microsatélites (SSRs y ISSRs) son uno de los marcadores más utilizados en la actualidad para la identificación varietal (Ortiz *et al.*, 2000), debido a la alta variabilidad que detectan y su reproductibilidad. Belaj *et al.* (2003b) testó la utilidad de distintas técnicas de identificación molecular (RAPDs, AFLPs y SSRs) para el caso del olivo y, aunque con las tres técnicas fue capaz de diferenciar 32 genotipos diferentes, solo los microsatélites diferenciaron las variedades ‘Frantoio’ y ‘Cellina’, las cuales se encuentran genéticamente muy emparentadas, poniendo así de manifiesto el alto poder de discriminación de los estos marcadores. Incluso los SSRs se han utilizado también para la realización de test de paternidad en determinados individuos procedentes de semillas utilizados

en los procesos de mejora (De la Rosa *et al.*, 2004). Por su parte, los marcadores ISSRs han resultado de gran utilidad en la detección de variación somaclonal en plantas de café (Rani *et al.*, 2000) en la planta de té (Devarumath *et al.*, 2002), sorgo (Li *et al.*, 2010), álamo (Rahman y Rajora, 2001), arroz (Gao *et al.*, 2009), plátano (Hautea *et al.*, 2004; Ray *et al.*, 2006), vid (Welter *et al.*, 2007), trigo (Khlestkina *et al.*, 2010) y caña de azúcar (Singh *et al.*, 2008).

### Variabilidad intervarietal

De forma previa al análisis de la estabilidad genética de las plantas micropropagadas se ha analizado la utilidad de los marcadores ISSR para detectar variabilidad intervarietal en olivo. Como cabría esperar los resultados muestran diferencias intervarietales, lo que nos permitió agrupar las variedades en un dendograma en el cual se diferencian dos clados y en que aparecen las variedades ‘Verdial de Vélez Málaga’ y ‘Blanqueta-11’ más separadas del resto.

En el primero de los clados se agrupan las variedades ‘Castellana’, ‘Cornicabra’ y ‘Villalonga’. Si se observa la distribución geográfica de estas variedades (Ver Introducción General apartado “Origen y distribución geográfica”), observamos que ocupan principalmente la franja media peninsular, básicamente Castilla la Mancha y Valencia [‘Cornicabra’ (Toledo y Ciudad Real), ‘Castellana’ (Cuenca y Albacete) y ‘Villalonga’ (Valencia)] y por tanto son variedades con localizaciones geográficas próximas. Rallo *et al.* (2005) comenta que la propagación vegetativa del material vegetal de olivo aceleró el proceso de selección y difusión de las variedades de olivo españolas, de tal forma que los agricultores fijaban caracteres de interés en la descendencia de los genotipos elegidos, lo que provocó que a partir de ese momento la selección y el cultivo se aceleraran recíprocamente. A estas primeras variedades de olivo, al ser interfértiles con el acebuche, se les incorporarían progresivamente por introgresión genes de poblaciones silvestres muy diversificadas (Rallo *et al.*, 2005), dando lugar con el tiempo a nuevas variedades mejor adaptadas al cultivo. Esto podría explicar que variedades geográficamente próximas como sería este caso, pudieran compartir una mayor similitud genética respecto a otras variedades más alejadas. Además, las tres variedades en cuestión se caracterizan por su elevada producción, y por ser variedades denominadas rústicas, es decir, que presentan gran capacidad para adaptarse a suelos pobres y a condiciones de sequía y frío, además de ser de fácil propagación, con lo cual reúnen una serie de características que facilitarían la selección y difusión por parte de los agricultores.

Este hecho también podría explicar la relación existente en el otro clado obtenido en nuestro dendograma, pero sólo para las variedades ‘Hojiblanca’ y ‘Lechín de Granada’, pues ambas variedades se extienden por zonas contiguas en Andalucía y Murcia [‘Hojiblanca’ (zona central de Andalucía) y ‘Lechín de Granada’ (Granada, Almería y Murcia) e igualmente comparten características agronómicas (alta producción y fácil adaptación a suelos pobres y zonas frías). Sin embargo, la proximidad geográfica no explicaría el agrupamiento de la variedad ‘Sevillenca’ dentro de este clado, pues esta variedad se cultiva en una pequeña zona al norte de Valencia y Castellón y estaría más emparentada con el anterior clado, si a proximidad geográfica nos referimos.

Para las restantes dos variedades, ‘Blanqueta-11’ y ‘Verdial de Vélez Málaga’, las cuales no se agrupan con ningún clado de los anteriores mencionados ni entre ellas, una posible explicación radique en que se tratan de variedades con una nula o escasa difusión limitada a su zona de origen [‘Verdial de Vélez Málaga’ (concentra su cultivo en la población de Vélez Málaga’ con unas 11.000 ha) y ‘Blanqueta-11’ (17.000 ha en la zona de Alicante)]. Barranco *et al.* (2005a) comenta que precisamente el confinamiento de determinadas variedades es una de las características del material vegetal de olivo español. Esta limitación de la difusión obedece al desconocimiento del comportamiento de las mismas en otras zonas de cultivo y a las grandes cantidades de material vegetal que requerían los sistemas tradicionales de propagación. Además de este aspecto, otra característica que define al material vegetal del olivo es la homogeneidad de las variedades debido a la baja ocurrencia de variaciones genéticas en esta especie (Barranco *et al.*, 2005a). Estas características provocan una disminución en el intercambio genético de estas variedades con variedades colindantes y por tanto presentarían mayores diferencias genéticas respecto al resto de variedades. Todo lo contrario que ocurre con aquellas variedades que presentan grandes superficies de cultivo y una gran difusión, al tratarse de variedades que destacan por sus características agronómicas y comerciales, pues estas variedades han podido sufrir mayor intercambio genético con especies colindantes, y por tanto aquellas variedades próximas geográficamente entre sí presentarían una mayor relación genética entre ellas. Este sería el caso de las variedades ‘Castellana’, ‘Cornicabra’, ‘Villalonga’, ‘Hojiblanca’ y ‘Lechín de Granada’, lo que permite poder agruparlas en diferentes clados según su grado de similitud.

### Estabilidad genética

Uno de los principales inconvenientes de los procesos de micropropagación es la aparición de variación somaclonal (Larking y Scowcroft, 1981; Bairu *et al.*, 2011). Durante el cultivo *in vitro*, el método de propagación, el genotipo, la naturaleza del tejido utilizado como material de partida, el tipo y concentración de reguladores de crecimiento y el número, así como la duración de los subcultivos son algunos de los factores que determinan la frecuencia de dicha variación (Bairu *et al.*, 2011). Entre los métodos de micropropagación, la realizada mediante organogénesis axilar se considera de bajo riesgo en cuanto a la aparición de variación somaclonal (Rugini y Pesce, 2006; Bairu *et al.*, 2011). Para considerar exitoso un protocolo de micropropagación y que este pueda ser usado con fines comerciales, debe garantizar que en las plantas micropropagadas no se producen fenómenos de variación genética.

En nuestro caso, las amplificaciones realizadas con los 15 cebadores empleados generaron un elevado número de marcadores ISSRs, con una media de 149 marcadores por variedad, en los cuales no se detectó la presencia de variación somaclonal en las variedades analizadas durante todo el proceso de micropropagación, lo que se puede considerar como un indicio de estabilidad genética, poniendo de manifiesto que los marcadores ISSRs pueden ser utilizados para determinar la estabilidad genética de variedades de olivo micropropagadas y que el protocolo de micropropagación desarrollado en nuestro laboratorio sería un método eficaz que no provoca alteraciones en la estabilidad genética del material, al menos en los genotipos testados.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores y con el empleo de distintos tipos de marcadores. Así, Brito *et al.* (2010) y Vidoy-Mercado (2014), emplearon marcadores SSRs con los cuales tampoco observaron la presencia de variación somaclonal en los individuos micropropagados. García-Férriz (2002) obtuvo resultados similares, con las variedades 'Arbequina', 'Picual' y 'Empeltre' y el empleo de marcadores RAPDs; mismos marcadores y con idéntico resultado obtuvieron Leva *et al.* (2002; 2003) y Leva y Petruccelli (2012) en la variedad 'Maurino'. Sin embargo, usando los mismos marcadores y el mismo tipo de explanto, Peyvandi *et al.* (2009a) detectó variación somaclonal en plantas micropropagadas de la variedad 'Dezfu'. La ocurrencia de variación somaclonal, ha sido detectada en múltiples especies leñosas como por ejemplo *Eucalyptus tereticornis* (Tripathi *et al.*, 2006) con el empleo de RAPDs y AFLPs; en *Populus tremuloides* usando SSRs (Rahman y Rajora, 2001) y en *Robinia ambigua* usando ISSRs (Guo *et al.*, 2006).

Es importante tener en cuenta que, aunque en nuestros resultados no se ha detectado la presencia de variación somaclonal, no se puede descartar la existencia de esta. Esto es debido a que el empleo de los microsatélites tiene una serie de limitaciones, entre las cuales está que sólo analizan determinadas regiones del genoma, no esté en su totalidad. Por lo que, para un análisis más exhaustivo, sería conveniente el empleo de varios tipos de marcadores combinados como RAPDs SSRs y AFLPs (Belaj *et al.*, 2003a,b; Cipriani *et al.*, 2003; De la Rosa *et al.*, 2003; Rallo *et al.*, 2003), los cuales son métodos puesto a punto y empleados en diversas variedades de olivo, con el fin de abarcar un mayor espectro del genoma y poder garantizar la estabilidad genética del material micropropagado.

En definitiva, los resultados obtenidos en nuestro estudio, ponen de manifiesto que el protocolo de micropropagación puesto a punto en nuestro laboratorio, parece garantizar la estabilidad genética del material, permitiendo conservar los recursos genéticos de olivo, solventando así la aparición de variación somaclonal, uno de los principales problemas asociados al proceso de micropropagación (Bairu *et al.*, 2011; Miguel y Marum, 2011; Neelakandan y Wang, 2012).



# *CAPITULO III: CONSERVACIÓN IN VITRO*

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## III.1. INTRODUCCIÓN

### III.1.1. Conservación *in vitro*

La propagación *in vitro* requiere de subcultivos frecuentes con la finalidad de renovar los nutrientes del medio, multiplicar los cultivos que se han desarrollado y mantenerlos por tiempo indefinido. Esto genera un coste considerable de mano de obra, tiempo y medios de cultivo que deben emplearse, además del riesgo existente de pérdidas por contaminación (Bhojwani y Dantu, 2013b).

Definimos como conservación *in vitro* a la conservación del material vegetal que implica el cultivo de tejidos, para un mantenimiento prolongado y un almacenamiento de sistemas biológicos ya establecidos cultivados *in vitro*, a través de procesos que implica una disminución o cese de la división celular y el metabolismo de las células sin afectar a su estabilidad genética bajo unas condiciones climáticas controladas (Becerril *et al.*, 2010; Bhojwani y Dantu, 2013b). Básicamente, la conservación *in vitro* consiste en cambios en el medio de cultivo junto con una disminución de la temperatura, con el fin de disminuir o suprimir el crecimiento de células, tejidos y órganos de las plantas, maximizando así el intervalo entre los subcultivos, lo que permite reducir la mano de obra, los gastos, el espacio de almacenamiento y la posible contaminación, a la vez que se mantenga la capacidad de crecimiento de los cultivos una vez concluido el proceso y el riesgo de daño o muerte del material durante la conservación sea lo más bajo posible (Bhojwani y Dantu, 2013b).

La conservación *in vitro* representa un método de conservación alternativo, eficaz y totalmente imprescindible para aquellas especies que no forman semillas, forman semillas recalcitrantes o no son representativas de los genotipos parentales, como por ejemplo la patata, los frutales y la mayoría de las plantas ornamentales. Surge con el fin de solventar los problemas ocasionados tanto por la conservación *in situ* como *ex situ* y también como salvaguarda, para crear copias de seguridad de las colecciones conservadas *in vivo* (Becerril *et al.*, 2010; Bhojwani y Dantu, 2013b).

Entre sus principales ventajas destaca que permite el saneamiento del material, permite y facilita su distribución, es independiente del medio ambiente, en un método relativamente económico, pues en poco espacio se puede almacenar un gran número de plantas multiplicadas clonalmente (Bhojwani y Dantu, 2013b).

### III.1.2. Métodos de conservación *in vitro*

Los métodos de conservación *in vitro* se pueden agrupar en dos grandes categorías: Una formada por aquellos métodos basados en el crecimiento mínimo (o lento) de los brotes cultivados *in vitro*, entre los que destacan la frigoconservación y la encapsulación-refrigeración, y que permiten la conservación del material a medio plazo, y otra formada por aquellos métodos basados en un crecimiento nulo o crioconservación, los cuales permiten la conservación del material vegetal a mas largo plazo (Llácer y Badenes, 2010; Bhojwani y Dantu, 2013b).

#### III.1.2.1 Conservación mediante crecimiento mínimo

Los métodos de crecimiento mínimo o lento, consisten, como su nombre indica, en aplicar unas condiciones de cultivo que permitan mantener los brotes en niveles mínimos de crecimiento (Llácer y Badenes, 2010; Bhojwani y Dantu, 2013b). La tasa de crecimiento puede verse afectada por la reducción de la temperatura, la intensidad de la luz y/o la adición de compuestos osmóticos, tales como manitol o sacarosa en el medio de cultivo, y/o retardantes del crecimiento (Grout, 1995), etc. La edad del material a conservar, el tamaño del explanto utilizado o el estado fisiológico de los brotes, entre otros, también pueden afectar al tiempo máximo de almacenamiento (Ozudogru *et al.*, 2010), por lo que es necesario definir estos factores para cada especie.

Por ello, como parte de las estrategias empleadas para disminuir el crecimiento de los explantos y aumentar los intervalos entre subcultivos, está el reducir la temperatura de la cámara de crecimiento, aunque siempre por encima de los 0 °C. En muchos casos, las bajas temperaturas se combinan con poca intensidad de luz o incluso oscuridad para limitar el crecimiento (Bhojwani y Dantu, 2013b).

Otras estrategias seguidas son el cambio en la composición del medio de cultivo mediante el uso de: inhibidores del crecimiento, con el propósito de limitar el crecimiento, o la adición de azúcares como el manitol o la sacarosa para disminuir el potencial osmótico del medio y conseguir así una deshidratación de los tejidos que les permita soportar mejor las bajas temperaturas. Ambas estrategias se combinan frecuentemente con el fin de minimizar el crecimiento y desarrollo de los cultivos conservados (Bhojwani y Dantu, 2013b).

En general, el rango de período de conservación mediante crecimiento mínimo es de algunos meses a un año y, en definitiva, lo que pretenden estos métodos es maximizar los periodos de subcultivos o extenderlos indefinidamente, con el fin de facilitar y abaratar la conservación a medio plazo.

#### III.1.2.1.1. Frigoconservación

La frigoconservación es un método de conservación de colecciones *in vitro* a medio plazo en la que se consigue ralentizar el crecimiento mediante el empleo principalmente de bajas temperaturas, ya que así disminuye la tasa de crecimiento de las plantas y se prolonga el ciclo celular (Xia *et al.*, 2009).

Como en la mayoría de las técnicas *in vitro*, el éxito de la técnica requiere el establecimiento de protocolos específicos para cada tipo de explanto, variedad y especie. El rango de temperatura empleado varía según la sensibilidad de la especie que se quiera conservar, así para especies tolerantes al frío el rango varía entre los 0 °-5 °C, mientras que para especies tropicales el rango oscila entre los 15 °-20 °C (Rao, 2004).

Frecuentemente, en los protocolos de frigoconservación, el empleo de bajas temperaturas se combina con el empleo de agentes que disminuyen el potencial osmótico del medio como manitol, sacarosa, sorbitol (Sarkar y Naik, 1998) y con la adición de retardantes del crecimiento al medio de cultivo como ancimidol y ABA (Kovalchuk *et al.*, 2009). Diversos trabajos han demostrado el papel de las fitohormonas y del ácido salicílico en la capacidad de las plantas para sostener el crecimiento y desarrollo a bajas temperaturas. Así, Xia *et al.* (2009) postulan que cuando las plantas son sometidas durante mucho tiempo a bajas temperaturas, se produce un ajuste entre los niveles endógenos de ácido salicílico, el cual se incrementa, y los niveles de citoquinina, los cuales disminuyen y de este balance se regula la expresión de genes implicados en el desarrollo y crecimiento de la planta. Se ha observado que a bajas temperaturas se estimula la actividad de la citoquinina oxidasa, y por tanto puede disminuir el contenido de las citoquininas endógenas (Veselova *et al.*, 2005). Además, el contenido de ABA aumenta, lo que podría inducir la expresión de genes relacionados con la aclimatación al frío (Xiong *et al.*, 2001). Por su parte, Capuana y Di Lonardo (2013), demostraron que para la conservación del material de *Castanea sativa*, era mejor la aplicación de BA en el medio de cultivo, que no usarla, pues mejoraba notablemente los porcentajes de supervivencia tras 12 meses de conservación (56% -32% respectivamente).

Un protocolo general de frigoconservación constaría de los siguientes pasos:

1-Establecer un stock de material en crecimiento activo en condiciones óptimas de cultivo.

2-Se cultivan brotes de dicho stock en un medio de cultivo modificado a baja temperatura por un tiempo determinado. La temperatura de conservación, el medio de cultivo, así como el tiempo de almacenaje hay que ponerlo a punto para cada especie y variedad.

3-Una vez concluida la fase de conservación se procede a recuperar el material y se transfiere a un medio de proliferación volviendo a las condiciones óptimas de crecimiento.

4-Se enraíza una parte del material y se aclimata a invernadero.

5-Se analiza la estabilidad genética del material.

6-Tras un par de subcultivos donde se comprueba el correcto desarrollo del material, se puede volver a conservar en condiciones de crecimiento mínimo.

Entre los daños más frecuentemente apreciables en los cultivos tras su almacenaje en frío destacan la etiolación, frecuente si se han conservado en oscuridad, síntomas de quemado, brotes oscurecidos, excesiva elongación intermodal y necrosis en el ápice de los brotes. Entre los objetivos de un buen protocolo de frigoconservación está evitar la aparición de esos síntomas, además de que los explantos almacenados mantengan su viabilidad y un buen desarrollo posterior, y, fundamentalmente, evitar la aparición de cambios genéticos en el material (variación somaclonal).

Lambardi *et al.* (2002) realizaron trabajos de frigoconservación con dos variedades de olivo 'Leccino' y 'Frantoio', con los cuales consiguieron porcentajes de supervivencia tras 12 meses de conservación a 4 °C y oscuridad del 66% y 40% respectivamente. Estos porcentajes caían drásticamente al 0% si la conservación se hacía con un fotoperiodo de 8h de luz. Resultados similares se apreciaron en otras especies leñosas (Lambardi y De Carlo, 2002 citado por Lambardi *et al.*, 2002). Sin embargo, Imbroda *et al.* (2014) obtuvieron mejores resultados cuando conservaron brotes del cultivar 'Arbequina' a 8 °C en luz. Estos autores pusieron a punto un protocolo de frigoconservación para dicha variedad para lo cual testaron distintas temperaturas (4 ° y 8 ° C), distintos fotoperiodos (16 horas y 0 horas) y distintas concentraciones de hormona (completas o reducidas a la mitad). Los resultados de supervivencia obtenidos tras 12 meses de conservación fueron muy variables en función de los tratamientos desde un 91% en el material que fue mantenido a 8 °C y fotoperiodo de 16 horas frente a porcentajes inferiores al 16.1% en el resto de tratamientos. La concentración de

reguladores en el medio durante la incubación en frío no pareció influir en la supervivencia ni en la capacidad de recuperación del material, que se recuperó rápidamente tras su establecimiento en el medio de proliferación. El porcentaje de enraizamiento del material alcanzó hasta un 47% tras 2 subcultivos, inferior al alcanzado en el control no frigoconservado (71%). Sin embargo, dichos porcentajes se equiparaban cuando se realizaba el enraizamiento tras 6 subcultivos.

#### III.1.2.1.2. Encapsulación-Refrigeración

La técnica de la encapsulación surgió con la idea de crear semillas sintéticas o artificiales para el desarrollo de embriones somáticos y así protegerlos durante su transporte y manipulación. De hecho, Murashige (1978), dio la primera definición de semilla sintética como “embrión somático encapsulado”. Actualmente, cada vez más son los estudios que emplean propágulos no embriogénicos, como secciones nodales o apicales de 3-4 mm con una yema, para la creación de semillas sintéticas (Pattnaik *et al.*, 1995; Capuano *et al.*, 1998; Micheli *et al.*, 2007a; Standardi, 2009; Ara *et al.*, 2000, Rai *et al.*, 2009). Así Micheli *et al.* (2007a) y Standardi (2009) añadieron el término de cápsula, como un producto derivado de la técnica de la encapsulación y que se define como “encapsulación de una porción de tejido vegetal derivado del cultivo *in vitro*, el cual posee capacidad de brotar (aunque no de formar una planta entera), el cual puede ser usado para la micropropagación, para almacenar o transportar”.

La técnica de encapsulación es una herramienta que puede ser muy útil en micropropagación. Por un lado, puede emplearse para la conservación de germoplasma (siempre y cuando se establezcan las condiciones óptimas para el almacenamiento) o como un método para disminuir la necesidad de recultivar el material durante un periodo de tiempo, puesto que las secciones encapsuladas almacenadas a bajas temperaturas no requieren la transferencia a medio fresco (West *et al.*, 2006). La encapsulación puede también actuar como fuente de material aséptico, y ser usado en caso de contaminación del material stock (West *et al.*, 2006; Preece y West, 2009).

Otra aplicación importante es su enorme utilidad para el intercambio de germoplasma y material vegetal axénico entre laboratorios, tanto privados como públicos (Danso y Ford-Lloyd, 2003; Naik y Chand, 2006). En el caso del olivo, existe en la actualidad una gran demanda de plantas, lo que genera importantes intercambios a nivel global. No obstante, muchos países tienen leyes muy restrictivas al respecto para la introducción de material vegetal, debido a que esto puede conllevar la introducción indeseada de enfermedades, las cuales pueden estar en la tierra o en la

propia planta transportada. En este sentido, la micropropagación puede solventar dicho problema. Sin embargo, el transporte de plantas micropropagadas presenta una serie de dificultades, debido a los cambios de temperatura y las fluctuaciones en la humedad relativa que sufre la planta durante su transporte, los cuales pueden provocar graves daños. Por ello, la tecnología de la encapsulación es una herramienta muy útil con la cual producir propágulos vegetativos encapsulados con capacidad de crecimiento y proliferación, para poder intercambiar material vegetal entre laboratorios de diferentes países (Standardi y Piccioni, 1998).

El procedimiento de la encapsulación consiste básicamente en tres pasos (Standardi y Micheli, 2013) (**Figura 43**):

*Recubrimiento*: Consiste en colocar el explanto a encapsular en la solución de encapsulación. El alginato es el mayormente utilizado, debido a su moderada viscosidad, nula toxicidad para los explantos, gelificación rápida, bajo coste y biocompatibilidad. Sin embargo, otras muchas sustancias se han empleado en sustitución del alginato de sodio, como alginato de potasio, carboximetil celulosa, Gelrite, etc. (Saiprasad, 2001; Rai *et al.*, 2009).

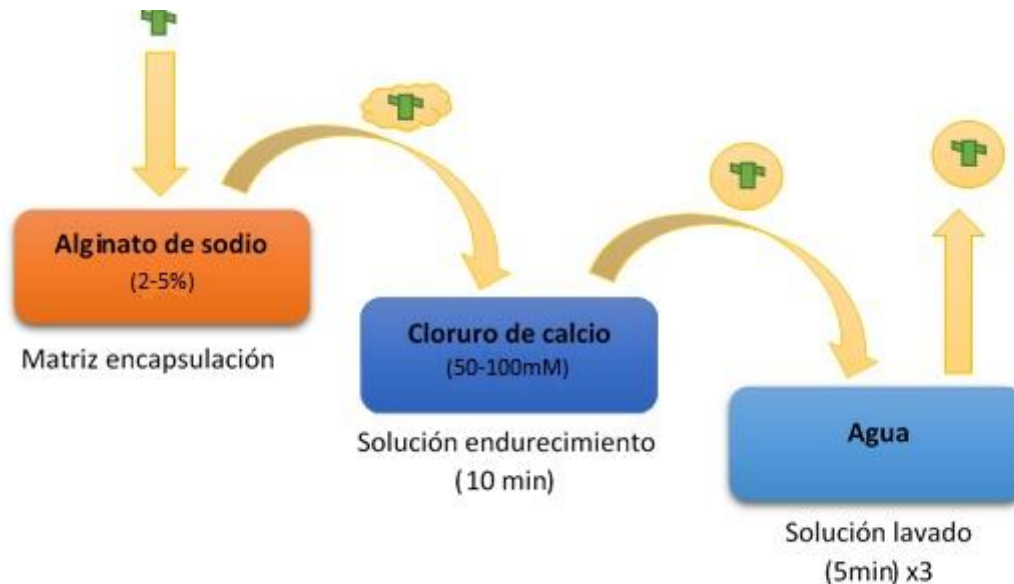
*Endurecimiento*: El alginato recubriendo el explanto se deja caer en una solución de cloruro de calcio durante 20-30 min. Durante este proceso, se produce un intercambio iónico, lo que resulta en el reemplazo del sodio de la matriz por el calcio, formándose alginato de calcio. Así, el revestimiento adquiere la consistencia necesaria para asegurar la protección contra daños mecánicos y evitar riesgo de deshidratación del explanto. Esta etapa de endurecimiento está afectada por la concentración de alginato empleada y la de la solución de cloruro de calcio, así como del tiempo de polimerización. Por lo general, una mayor textura proporciona mayor protección durante el transporte y la manipulación, pero podría presentar mayor dificultad para que el explanto consiga romper el recubrimiento y así poder brotar y desarrollarse, por lo que hay que buscar el equilibrio ideal.

*Aclarado*: Consiste en lavar los encapsulados formados. Se recomienda realizarlo varias veces con el fin de eliminar todos los restos de iones de calcio.

Una vez lavado el encapsulado, este puede ser almacenado o transferido a un sustrato. En cualquier caso, el encapsulado debe mantener su viabilidad, es decir, no sufrir necrosis, ni cualquier otro síntoma de daño a lo largo del periodo comprendido entre la encapsulación y su uso; su



capacidad de brotación (el explanto durante su crecimiento debe ser capaz de romper la capsula y continuar con su desarrollo); y su capacidad de conversión en planta completa (en caso de que el explanto encapsulado fuera un propágulo bipolar).



**Figura 43:** Esquema general representativo con las tres etapas del proceso de la encapsulación.

La evolución de los encapsulados depende del tipo de tejido, del genotipo del material vegetal, de las condiciones nutritivas de la matriz, de las condiciones de cultivo y de los tratamientos que sufren los explantos antes y después de la encapsulación (Standardi y Micheli, 2013).

Así, la composición de la matriz de alginato es un factor muy importante, que afecta a la capacidad de crecimiento y desarrollo de los encapsulados. Los requerimientos de dicha matriz (inorgánicos, orgánicos, reguladores de crecimiento, carbohidratos, etc.) son dependientes y específicos para cada especie (Tsvetkov *et al.*, 2006). Como se puede apreciar en la **Tabla 13**, donde se recogen los parámetros en cuanto a la formación de los encapsulados, las concentraciones de alginato más utilizadas en la matriz suele oscilar entre 2.5% y 4%, la concentración de cloruro de calcio oscila entre 75 mM y 100 mM y el medio mayormente empleado en la matriz es el MS, aunque también se emplean otros en función de los requerimientos específicos para cada especie.

Evitar la deshidratación del material conservado, así como que el crecimiento de los explantos vuelva a sus valores normales una vez estos se incuben bajo las condiciones estándar de

crecimiento, son las claves para el éxito de la conservación a baja temperatura. La matriz de alginato que rodea al explanto ralentiza los procesos de desecación y proporciona una presión mecánica necesaria para retener el tejido dentro del medio de encapsulación durante largos periodos de almacenaje. Además, la matriz crea una capa nutritiva que alimenta directamente a las yemas (Micheli *et al.*, 2007a). Esta matriz, sin embargo, se seca lentamente durante el almacenaje a menos que sea mantenida en un ambiente con alta humedad, para lo cual normalmente las cápsulas se almacenan en placas de Petri o recipientes sellados (West *et al.*, 2006).

West *et al.* (2006) determinaron que el tamaño del explanto encapsulado no afectaba a la brotación del mismo ni a su longitud, por lo cual el empleo de explantos más pequeños (4 mm) son más útiles porque son más fáciles de encapsular, ya que con tamaños superiores no se consigue envolver todo el explanto en el interior de la cápsula. Micheli y Standardi (2005), determinaron que, para el olivo, el explanto adecuado para su encapsulación eran secciones nodales con un tamaño entre 3-4 mm. Además, un pretratamiento de la sección nodal con GA<sub>3</sub> antes de la encapsulación, mejoraba los niveles de viabilidad y crecimiento (Micheli y Standardi, 2005).

En cuanto a los resultados derivados del empleo de la encapsulación para la conservación del material a baja temperatura, los trabajos realizados en fresa y frambuesa (Lisek y Orlikowska, 2004) donde tras 9 meses de conservación a 4 °C la viabilidad de los encapsulados fueron del 58% y 60% respectivamente; y en *Hibiscus* (Preece y West, 2006) donde consiguieron una viabilidad de los explantos del 80% tras 6 meses de conservación a 5 °C y oscuridad, avalan la teoría de la utilidad de esta técnica para la conservación del material.

Estos trabajos contrastan con otros realizados en otras especies (**Tabla 13**), en la que no se han obtenido resultados aceptables de viabilidad de los encapsulados más allá de los 3 meses de conservación. Para el caso del olivo, Micheli *et al.* (2007b) e Ikhlaq *et al.* (2010), trabajaron con secciones nodales de la variedad 'Moraiolo' y consiguieron una viabilidad de los explantos a 4° C del 100% y del 60% durante 1 y 2 meses respectivamente, no pudiendo extender la conservación a tiempos mayores.

La técnica de la encapsulación es una alternativa eficaz a los métodos clásicos de conservación *in vitro* (frigoconservación y crioconservación). Frente a la frigoconservación es una técnica que requiere menos espacio para almacenar el material y permite un menor manejo de las colecciones conservadas. Frente a la crioconservación es una técnica más sencilla y económica, permite un

mejor transporte e intercambio del material y es un método útil para muchas especies sensibles al frío o la desecación.

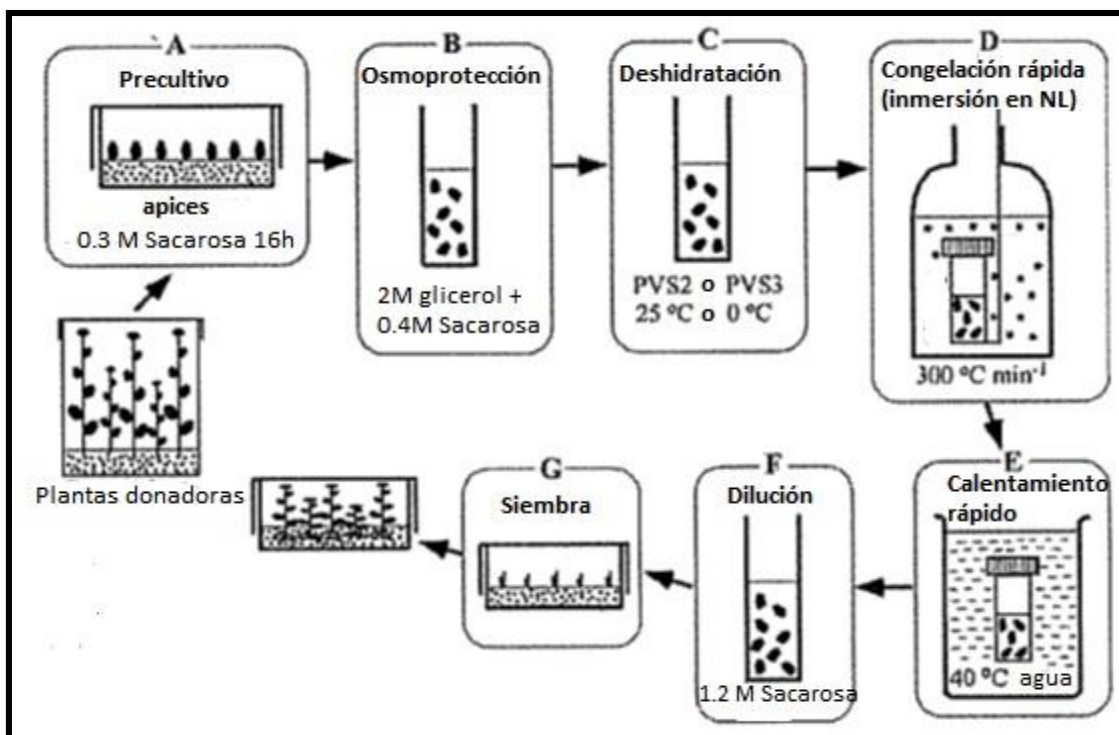
Entre los inconvenientes que se han sugerido están la pérdida de viabilidad de los explantos conservados propiciada por múltiples causas entre las que destacan la deficiente oxigenación del explanto, la deshidratación, su limitada difusión y la limitación mecánica que implica la propia cápsula. No obstante, no existen datos publicados que corroboren ninguna de estas causas. De hecho, en el caso de la limitación mecánica, en un estudio realizado con cápsulas con distintos tiempos de polimerización y encapsulados de albaricoquero y neem (*Azadirachta indica*), se observó que conforme aumentaba el tiempo de polimerización la resistencia a la presión y penetración de las cápsulas era mayor de forma significativa, sin embargo, esto no afectaba posteriormente a la brotación de los propágulos encapsulados (Padilla *et al.*, 2007).

**Tabla 13:** Encapsulación y conservación de distintas especies.

| Especie                            | Explantos              | Alginato | CaCl <sub>2</sub> | Matriz        | Tiempo  | Temp              | Viabilidad | Autor                         |
|------------------------------------|------------------------|----------|-------------------|---------------|---------|-------------------|------------|-------------------------------|
| <i>Cedrela fissilis</i>            | s.a.                   | 4%       | 100mM             | MS            | 6 meses | 25 °C             | 44%        | Nunes <i>et al.</i> , 2003    |
| <i>Dalbergia sisoo</i>             | s.n.                   | 3%       | 75mM              | MS            | 3 meses | 4 °C              | 30%        | Chand y Singh, 2004           |
| <i>Drimiopsis kirkii</i><br>Baker. | Tejido<br>embriogénico | 2.5%     | 75mM              | MS            | 6 meses | 15 °C             | 15%        | Haque y Ghosh, 2014           |
| Eucalipto                          | s.n.                   | 3%       | 75mM              | azúcar<br>3mM | 3 meses | 10 °C             | 47%        | Watt <i>et al.</i> , 2000     |
| Fresa                              | s.a.                   | 3%       | 75mM              | MS            | 9 meses | 4 °C              | 58%        | Lisek y Orlikowska, 2004      |
| Frambuesa                          | s.a.                   | 3%       | 75mM              | Boxus         | 9 meses | 4 °C              | 60%        | Lisek y Orlikowska, 2004      |
| Granado                            | s.n.                   | 3%       | 100mM             | MS            | 1 mes   | 4 °C              | 51%        | Naik y Chand, 2006            |
| Guayaba                            | s.n.                   | 3%       | 100mM             | MS + Sac      | 1 mes   | 4 °C              | 25%        | Rai <i>et al.</i> , 2008a     |
| <i>Hemidesmus indicus</i>          | Tejido<br>embriogénico | 3%       | 75mM              | MS            | 4 meses | 5 °C              | 86%        | Cheruvathur y Najeeb, 2013    |
| <i>Hibiscus moscheutos</i>         | s.n.                   | 2,75%    | 50mM              | DKW           | 6 meses | 5 °C<br>oscuridad | 80%        | Preece y West, 2009           |
| <i>Morus spp</i>                   | s.n.                   | 4%       | 75mM              | MS            | 3 meses | 4 °C              | 13-18%     | Pattniak y Chand, 2000        |
| Olivo                              | s.n.                   | 2,50%    | 1,10%             | OMM           | 1 mes   | 4 °C              | 100%       | Micheli <i>et al.</i> , 2007b |
| Olivo                              | s.n.                   | 2,50%    | 1,10%             | OMM           | 2 meses | 4 °C              | 60%        | Ikhtlaq <i>et al.</i> , 2010  |
| <i>Phyllanthus amarus</i>          | s.n.                   | 3%       | 75mM              | MS            | 2 meses | 4 °C              | 47%        | Singh <i>et al.</i> , 2006    |
| <i>Populus</i>                     | s.n.                   | 4%       | 1,40%             | MS            | 1 mes   | 24 °C             | 100%       | Tsvetkov <i>et al.</i> , 2006 |
| Roble                              | s.n.                   | 4%       | 1,40%             | GD            | 1 mes   | 4 °C              | 95%        | Tsvetkov y Hausman, 2005      |
| <i>Solanum Nigrum</i>              | s.n.                   | 3%       | 100mM             | MS            | 2 meses | 4 °C<br>oscuridad | 25%        | Verma <i>et al.</i> , 2010    |
| <i>Vitex negundo</i>               | s.n.                   | 3%       | 100mM             | MS            | 2 meses | 4 °C              | 50%        | Ahmad y Anis, 2010            |

### III.1.2.2. Crioconservación

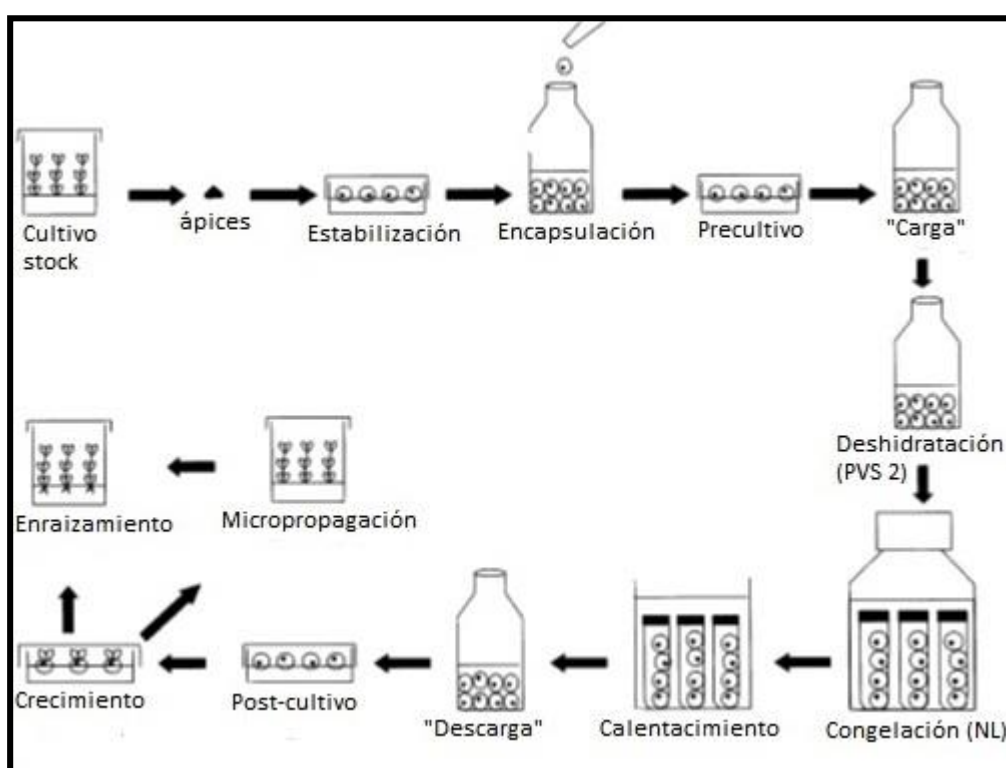
La crioconservación es la conservación a largo plazo (años), de explantos vivos a temperaturas ultra bajas ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), normalmente mediante el empleo de nitrógeno líquido, con el objetivo de llevar al material vegetal hasta un estado de metabolismo cero, donde la división celular y los procesos metabólicos están suspendidos, pero sin causar ningún daño físico o fisiológico. Por lo tanto, la crioconservación debe evitar la formación de grandes cristales de hielo que puedan romper los compartimentos celulares, provocando así la muerte celular. La metodología existente se puede agrupar en dos grandes categorías: Aquellas que siguen el método tradicional, en los que se lleva a cabo un acondicionamiento previo de los tejidos con crioprotectores, para a continuación efectuarse un proceso de enfriamiento progresivo pero lento (ratio de  $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) hasta alcanzar los  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$  y finalmente transferir los explantos a nitrógeno líquido. Por otro lado, se encuentran aquellos que siguen una metodología no convencional. Dentro de estos están aquellos métodos basados en la vitrificación (**Figura 44**) y los basados en la encapsulación/deshidratación (**Figura 45**). En los basados en la vitrificación, el objetivo es reemplazar el agua de los tejidos de la fase líquida a una fase vítrea, evitando así la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelación.



**Figura 44:** Esquema representativo del método de crioconservación por vitrificación (Reed, 2008).

En este caso, los tratamientos vitrificantes permiten una rápida inmersión en nitrógeno líquido. Mientras, en aquellos métodos basados en la encapsulación/deshidratación, las células o tejidos a conservar son encapsulados en alginato. A continuación, los encapsulados se someten a tratamientos de deshidratación que pueden ir acompañados de tratamientos para inducir la tolerancia a la desecación y finalmente son introducidos en nitrógeno líquido (**Figura 45**).

En la mayoría de estos métodos se utilizan crioprotectores, que son sustancias que evitan la formación de grandes cristales de hielo, protegiendo así a las células durante la congelación. Esto lo consiguen porque bajan el punto de congelación del tejido y disminuyen la concentración salina celular.



**Figura 45:** Esquema representativo del método de criopreservación por encapsulación-deshidratación (Reed, 2008).

El crioprotector más utilizado es el dimetilsulfóxido (DMSO), ya que es fácilmente miscible, es absorbido rápidamente por las células, su toxicidad a bajas concentraciones es nula y es fácilmente eliminado mediante lavado. Otros crioprotectores también muy utilizados son el glicerol, etilenglicol, polietilenglicol, sorbitol o la sacarosa.

Para minimizar posibles problemas de toxicidad en los tejidos por el empleo de un crioprotector a alta concentración, se suelen emplear mezclas de diferentes crioprotectores a baja concentración. Los más empleados son el PVS2 (30% glicerol, 15% etilenglicol, 15% DMSO) y el PVS3 (40% glicerol, 40% sacarosa).

Otro aspecto a tener en cuenta en la crioconservación es la edad y estado fisiológico de los cultivos *in vitro*, ya que para crioconservar no es válido cualquier tipo de tejido. Los tejidos más adecuados son aquellos con células en la fase de crecimiento exponencial, jóvenes, con citoplasma denso y pequeñas vacuolas, porque así tendrán la menor cantidad de agua posible. Por ello, los meristemas y los embriones son los más usados en crioconservación debido a su alta proporción de células de este tipo.

Cada método de crioconservación tiene sus ventajas y desventajas (**Tabla 14**), por lo que se podría decir que el éxito de la crioconservación depende de la capacidad para optimizar todos los parámetros que intervienen en el proceso, como son la velocidad de enfriamiento, la concentración y tipo de crioprotector, el tiempo de almacenamiento y la forma de recuperación.

En el caso del olivo se han realizado varias investigaciones en las que se han comparado distintas metodologías de crioconservación. Benelli *et al.* (2001), por su parte, comparó el comportamiento de ápices de la variedad 'Frantoio' ante la crioconservación por vitrificación o por encapsulación/deshidratación. Los resultados de supervivencia obtenidos tras la descongelación oscilaron entre el 15 % para el caso de vitrificación y 0 % para el caso de la encapsulación/deshidratación. Resultados similares obtuvieron Lynch *et al.* (2007), también con la variedad 'Frantoio', donde sólo con la crioconservación a través de la vitrificación obtuvieron supervivencia de los explantos (6.6%-13.6%), siendo también nula para los métodos de encapsulación/deshidratación.

**Tabla 14:** Principales ventajas y desventajas de los diferentes métodos de crioconservación (Reed, 2001).

| Técnica                                   | Ventaja  | Desventaja  |
|---|--|---|
| Control de la temperatura de enfriamiento | Procedimiento relativamente sencillo.<br>Crioprotectores no tóxicos.   | Requiere de equipamiento especial.<br>Baja aplicabilidad a especies tropicales  |
| Vitrificación                             | No requiere equipamiento especial.<br>Método rápido<br>Rápida recuperación.  | Las soluciones de vitrificación son tóxicas para muchas especies.<br>Requiere un cuidadoso procedimiento (tiempo y cambios de soluciones) |
| Encapsulación/<br>Deshidratación          | No requiere equipamiento especial<br>Crioprotectores no tóxicos.<br>Fácil método de descongelación.<br>Rápida recuperación | Alta manipulación de las cápsulas.<br>Muchas plantas no toleran las altas concentraciones de sacarosa.                                    |

Este estudio, además, comprobó que la adición de zeatina (46  $\mu$ M) mejoraba los resultados del desarrollo posterior de los explantos, ya que en su ausencia los brotes paraban su crecimiento y morían pasado 8-10 semanas, pero en su presencia un 38% de los brotes continuaban con su desarrollo. Resultados similares obtuvieron Lambardi *et al.* (2002) al crioconservar ápices de brotes de la variedad ‘Frantoio’ (15% de supervivencia).

Este método, sin embargo, se ha mostrado muy útil para la conservación de tejido embriogénico de olivo. Shibli y Al-Juboory (2000), trabajando con tejido embriogénico de la variedad ‘Nabali’, obtuvieron unos porcentajes de supervivencia del 48% para la encapsulación/deshidratación y de un 64% para la vitrificación. Además, dichos porcentajes de supervivencia aumentaban a un 58% y un 68% respectivamente con un tratamiento térmico del callo durante 1 día a 30 °C. Por su parte, Lambardi *et al.* (2002), obtuvieron resultados similares con la crioconservación de tejido embriogénico de la variedad ‘Canino’ (38% de supervivencia). Otros autores, como Martínez *et al.* (1999) y Nisi *et al.* (2006), con la variedad ‘Arbequina’, también obtuvieron porcentajes de supervivencia similares (35% y 30% respectivamente), pero en estos estudios, los explantos pasado un tiempo mostraban poco desarrollo y su crecimiento terminaba cesando. Sánchez Romero *et al.* (2009), estudiaron el efecto de la crioconservación clásica, con una



congelación lenta (-1 °C/min), la crioconservación clásica por vitrificación, y un método de congelación ultrarrápida por vitrificación a través de microgotas en cultivo embriogénico de la variedad 'Picual'. Aunque observó 100% de supervivencia en todos los casos, sí que observó diferencias en los porcentajes de crecimiento del callo, donde para el método de congelación lenta fue del 10%, para el caso de la vitrificación clásica (78-100%) y del 100% en la vitrificación por microgotas.

Por otro lado, estudios más recientes muestran el efecto negativo de la crioconservación en la germinabilidad de granos de polen de 12 variedades diferentes de olivo (Alba *et al.*, 2011), en los que se observó que en todas ellas se producía un descenso muy acusado de la germinabilidad del polen tras la inmersión en nitrógeno líquido.

### III.1.3. Factores que afectan a la conservación *in vitro*

#### III.1.3.1. Temperatura

La temperatura y, concretamente las bajas temperaturas, son uno de los factores ambientales más importantes que limitan y condicionan la productividad y distribución de las plantas. Existen especies de clima templado que de forma natural resisten al frío, con lo cual su conservación a baja temperatura no supone, *a priori*, grandes problemas. Sin embargo, para las especies tropicales y subtropicales, o aquellas especies sensibles al frío, es necesario llevar a cabo un proceso de adaptación previo a la conservación. Puesto que al someterlas a bajas temperaturas éstas sufren daño, podemos hablar de daño por enfriamiento, que tiene lugar cuando las temperaturas son demasiado bajas para un crecimiento normal, pero no lo suficiente como para formar hielo, y de daño por congelación que se produce cuando las temperaturas son inferiores al punto de congelación del agua.

Uno de los daños más frecuentes en las plantas expuestas a bajas temperaturas se produce en las membranas celulares (Levitt, 1980 citado por Thomashow, 1999). Está bien establecido que dicho daño se produce debido a la fuerte deshidratación asociada a la congelación. Cuando las temperaturas caen por debajo de 0 °C se produce la formación de cristales de hielo que generalmente se inician en los espacios intercelulares, debido a que a que el fluido extracelular presenta un punto de congelación más alto (menor concentración de solutos). Este daño en las membranas también puede derivar del aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno

(ROS), que se produce también durante la congelación, dando lugar a una lesión oxidativa severa, que provoca la peroxidación lipídica, y, con ello, un deterioro acusado en las membranas, degradación proteica e interrupción metabólica (Lin *et al.*, 2005). Las plantas dañadas por frío muestran inhibición de la fotosíntesis, reducción del transporte de carbohidratos, menor intensidad de respiración, inhibición de síntesis de proteínas y degradación de las existentes. Así, una de las funciones clave de la aclimatación al frío es estabilizar las membranas contra la congelación.

La aclimatación al frío es un proceso complejo que implica una serie de cambios drásticos tanto a nivel genético como a nivel fisiológico y bioquímico (Thomashow, 1999; Byun *et al.*, 2014). Entre esos cambios se incluyen la inducción de genes que codifican cambios en los lípidos y otros componentes de la pared celular, reducción de la fotosíntesis, aumento en los niveles de azúcares, activación de mecanismos antioxidantes, activación de proteínas de defensas “anticongelantes” (endoquitinasas y endoglucanasas) y proteínas como las dehidrinas, implicadas en la tolerancia a la desecación. Igualmente, se observa una estrecha relación del ABA, del ácido salicílico y otra serie de fitohormonas implicadas en la aclimatación al frío (Xia *et al.*, 2009; Kosová *et al.*, 2012).

En muchas especies, la exposición por un tiempo determinado a bajas temperaturas les permite adaptarse al estrés por frío y congelación, es lo que se conoce como endurecimiento o aclimatación al frío (Byun *et al.*, 2014). La mayoría de las plantas de climas templados pasan por ciclos repetitivos de aclimatación al frío, desaclimatación y reaclimatación. El término desaclimatación se define como una reducción en los niveles de aclimatación al frío (Kalberer *et al.*, 2006). La reaclimatación es, una vez la planta se ha desaclimatado, volver a exponerla a bajas temperaturas, con lo que vuelve a desarrollar la resistencia de forma más rápida, lo que supondría la existencia de una “memoria al estrés por frío” (Byun *et al.*, 2014), que implicaría que durante todo este proceso la expresión de genes implicados está en continuo dinamismo, lo que agilizaría las respuestas. Esta desaclimatación puede producirse debido a cambios ambientales, como la vuelta a temperaturas cálidas.

No todos los tejidos u órganos de la planta son adecuados para ser conservados a baja temperatura, con lo cual para cada especie y tipo de tejido los protocolos de conservación deben ser adaptados en relación a la resistencia al frío que posea dicha especie y/o tejido. Así, las semillas, y otros tejidos parcialmente deshidratados, pueden mantenerse indefinidamente a temperaturas próximas al cero absoluto. Las células vegetativas totalmente hidratadas pueden mantener su viabilidad si se enfrían muy rápidamente, evitando la formación de grandes cristales de hielo. Así

mismo, hay que descongelar los tejidos con extremada rapidez para evitar la conversión de los pequeños cristales de hielo que se forman en cristales con un tamaño dañino.

En el caso del olivo, diversos estudios han mostrado que ciertas características como la densidad y el tamaño de los estomas (Roselli *et al.*, 1992), la fuga iónica (Barranco *et al.*, 2005b; Azaarello *et al.*, 2009), los azúcares solubles (Bartolozzi *et al.*, 2001; Gulen *et al.*, 2009) y las proteínas solubles (Eris *et al.*, 2007; Cansev *et al.*, 2009) están estrechamente relacionadas con la tolerancia al frío y la congelación de diversas variedades de olivo. Además, estudios actuales relacionan la actividad de enzimas antioxidantes y la tolerancia al frío en ciertas variedades de olivo (Cansev *et al.*, 2009; Ortega-García y Peragón, 2009; Hashempour *et al.*, 2014).

### III.1.3.2. Carbohidratos

Las plantas poseen una serie de osmolitos para estabilizar las membranas celulares y mantener la conformidad de las proteínas entre los que se encuentran los carbohidratos.

Entre los múltiples cambios que se producen durante la aclimatación de una planta al frío, las modificaciones en la concentración de metabolitos son clave, incluyendo los carbohidratos. De hecho, los hidratos de carbono son conocidos por sus propiedades crioprotectoras y a menudo se acumulan en los tejidos de las plantas sometidas a baja temperatura. Sin embargo, no siempre hay una relación directa entre los carbohidratos y la resistencia al frío (Stuiver *et al.*, 1995).

Se han propuesto diversas hipótesis del mecanismo de acción de los azúcares y su relación con la aclimatación al frío. El más común es que actúan aumentando la presión osmótica del medio y limita, así, la disponibilidad de agua para el explanto, deshidratándolo. Al provocar una disminución del contenido de agua en el interior de las células, evita así la formación de cristales de hielo que provoquen daños (Suzuki *et al.*, 1997). Danyluk *et al.* (1998) sugiere que, además de este papel en la osmosis, los carbohidratos protegen macromoléculas específicas durante la deshidratación. Además, los cambios en su concentración intracelular y su distribución proporcionarían un mecanismo para proteger compartimentos específicos o para regular sus volúmenes durante la expansión celular o deshidratación (Jacobsen *et al.*, 2005). También se ha demostrado que los azúcares interactúan con los fosfolípidos de la membrana de manera que ayuda a su estabilización. Finalmente, Choi y Jeong (2012), sugieren la implicación de altos niveles de

carbohidratos en la inducción artificial de dormancia en embriones, mejorando así enormemente la resistencia de estos a la deshidratación y, por tanto, su conservación.

En los procesos de conservación *in vitro* de material vegetal, los carbohidratos más empleados son la sacarosa, el manitol y el sorbitol (Akdemir *et al.*, 2010; Marino *et al.*, 2010; Sá *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2011; Cordeiro *et al.*, 2014). Otros carbohidratos que también se han empleado con éxito, por ejemplo, en la frigoconservación, son la fructosa y la glucosa (Suzuki *et al.*, 1997; Cordeiro *et al.*, 2014). Sin embargo, también se han observado flacidez y anomalías en los cultivos tras el empleo de altas concentraciones de carbohidratos (López Delgado *et al.*, 1998; Sarkar y Naik, 1998; Bartolozzi *et al.*, 2001; Renau-Morata *et al.*, 2006), e, incluso, se ha demostrado que el manitol provoca hipermetilación del ADN (Harding, 1994).

### III.1.3.3. Retardantes del crecimiento

El crecimiento de los órganos de la planta depende principalmente de una combinación de división y expansión celular, las cuales están altamente reguladas por factores medioambientales como la luz, la temperatura etc., y también por factores endógenos como las fitohormonas. Sin embargo, en el cultivo *in vitro*, los explantos se encuentran expuestos a concentraciones no fisiológicas de reguladores de crecimiento. Los reguladores de crecimiento son considerados como los factores más importantes implicados en la regulación del desarrollo del explanto bajo condiciones *in vitro* (Feher *et al.*, 2003).

Dentro de los reguladores del crecimiento nos encontramos con los retardantes de crecimiento, compuestos sintéticos que modifican el crecimiento y desarrollo de las plantas. Una amplia gama de ellos retrasa o inhiben la elongación de los brotes sin causar malformaciones o daños en la planta. Debido a ello, los retardantes del crecimiento son ampliamente usados en agricultura, ya que pueden reducir el crecimiento no deseado de las plantas, sin reducir su productividad. Sin embargo, también se han usado para el mantenimiento de cultivos *in vitro* (Jarret *et al.*, 1997).

A parte de las modificaciones morfológicas, los retardantes también provocan alteraciones fisiológicas, entre ellas destacan el retraso de la senescencia, reducen el consumo de agua y mejora la resistencia al estrés medioambiental, lo cual hace potencialmente útil el empleo de estas sustancias para la conservación *in vitro* de material vegetal. Además, muchas de estas sustancias

actúan inhibiendo la división celular en la zona subapical del meristemo (Sauerbrey *et al.*, 1987), con lo cual parece probable que se induzca una cierta “dormancia” en la zona meristemática. La dormancia es el mecanismo utilizado por las plantas para proteger el tejido sensible de las condiciones climáticas desfavorables tales como las bajas temperaturas. En este sentido, los retardantes podrían ser de gran utilidad en los protocolos de conservación del material en condiciones de crecimiento reducido (Padilla *et al.*, 2015).

#### III.1.3.3.1. ABA

Aunque el ABA es un regulador esencial del crecimiento de las plantas, que se encuentra en pequeñas cantidades en todos los tejidos vegetales, y presenta efectos fisiológicos implicados en repuestas al estrés y en procesos de desarrollo (**Figura 46**), su respuesta más común es la inhibición del crecimiento, por lo que el ABA actuaría como un retardante. La dormancia de las yemas se ha relacionado con la acumulación de ABA, sin embargo, el efecto de la hormona parece estar directamente relacionado con la inhibición del desarrollo, pues no induce otras características relacionadas con la dormancia de las yemas (Shiota y Kamada, 2008). Este efecto del ABA no se da en todas las especies, probablemente debido a que otros compuestos, especialmente las giberelinas, pueden actuar contrarrestando la acción del ABA. La inhibición del crecimiento parece ser consecuencia del efecto del ABA sobre la extensibilidad de la pared celular (Zacarías y Lafuente, 2008).

Además, la aplicación exógena de ABA mejora la conservación *in vitro* (Burrirt, 2008; Kovalchuk *et al.*, 2009) y las respuestas adaptativas de las células y tejidos de la planta a varios estreses medioambientales (Rai *et al.*, 2008b).

Una de las respuestas características de las plantas frente al estrés hídrico es el incremento en el contenido de ABA, que actúa reduciendo la transpiración mediante el cierre de los estomas e induciendo la síntesis de proteínas que favorecen la resistencia a la desecación. El ABA también se incrementa en respuesta a otros tipos de estreses, como el salino y el térmico. Todos ellos tienen en común que pueden causar deshidratación, siendo esta la señal que indujera la transcripción de los genes responsables de su síntesis.

Diversos estudios han demostrado la implicación del ABA en la aclimatación al frío. Chen *et al.* (1983) observaron que en plantas de *Solanum commersonii* que se aclimatan al frío, se producían

aumento en los niveles de ABA de forma transitoria en respuesta a la baja temperatura. Además, corroboró que la aplicación exógena de ABA aumentaba la tolerancia a la congelación. Estos hechos le llevaron a postular la hipótesis de que la aclimatación al frío se activa gracias a la acción del ABA, el cual a baja temperatura aumenta sus niveles, lo que desencadena la activación de los mecanismos de tolerancia. Estudios posteriores han determinado que el ABA presenta otras funciones protectoras, especialmente estabilizando las membranas, protegiendo frente a estrés oxidativo y mejorando el estatus hídrico, por aumento de la conductividad hidráulica en raíces y cierre de estomas (Galiba *et al.*, 1993; Veisz *et al.*, 1996 citados por Kosová *et al.*, 2012). Además, el ABA parece jugar un papel fundamental en la activación de genes implicados en la defensa de la planta frente a estrés por frío (Thomashow, 1999; Gusta *et al.*, 2005; Kosová *et al.*, 2012). Sin embargo, aunque el ABA regula la expresión de genes que confieren protección frente al frío y la deshidratación, no es el único regulador implicado, ya que muchos de los cambios inducidos por el estrés no se inducen cuando se aplica ABA de forma exógena o no confieren la misma aclimatación que cuando esta se alcanza por someterse a bajas temperaturas, por lo que sugiere la existencia de vía de aclimatación al frío independiente de ABA (Churchill *et al.*, 1994).

### III.1.3.3.2. Triazoles (Paclobutrazol y Flurprimidol)

Los triazoles son considerados como multiprotectores vegetales debido a su capacidad para inducir tolerancia en las plantas, tanto a estrés ambientales como químicos (Fletcher y Gilley, 2000). Entre sus acciones, la principal es que actúan inhibiendo la biosíntesis de las giberelinas, que son las responsables de regular el crecimiento y desarrollo vegetal, provocando así una reducción en el crecimiento de los brotes (Singh, 2001; Williams *et al.*, 2003; Bai *et al.*, 2004; Kozak, 2006; Singh *et al.*, 2015; Padilla *et al.*, 2015). Los triazoles, entre los que se encuentran el paclobutrazol (PBZ) y el flurprimidol (FMD), son compuestos ampliamente utilizados en la agricultura y la horticultura como regulador de crecimiento vegetal y como fungicida (**Figura 46**).

Diversos estudios han mostrado como los triazoles incrementan la producción de clorofila y con ello la de carbohidratos (Zheng *et al.*, 2012). Se ha sugerido que el aumento en la síntesis de clorofila podría estar mediado por el efecto que tienen los triazoles de aumentar los niveles de citoquinina endógena en la planta (Yiu *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2011). También provocan el aumento en los niveles de ABA y disminuye el contenido de etileno (Suttle *et al.*, 2012; Hsu y Kao, 2005; Sharma *et al.*, 2011). De ahí, que diversos estudios han demostrado que estos compuestos

puedan ayudar a aumentar la tolerancia de las plantas a diversos tipos de estreses tanto de origen biótico como abiótico (Fletcher y Gilley, 2000; Lin *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2007; Baninasab, 2009; Sharma *et al.*, 2011; Baninasab y Ghobadi, 2010; Zhou *et al.*, 2012; Hajjhashemi y Ehsanpour, 2013).

En relación al estrés por frío, los triazoles actúan reduciendo los daños oxidativos derivados, bien al aumentar los niveles de proteínas antioxidantes o por la reducción de la actividad de las enzimas oxidativas (Fletcher y Gilley, 2000; Lin *et al.*, 2006; Baninasab, 2009). En cuanto al estrés por altas temperaturas, Baninasab y Ghobadi, (2010), determinaron que estos compuestos mejoran la tolerancia a altas temperaturas debido a que provocan un aumento en los niveles de prolina y evitan la fuga de electrolitos.

En trabajos de conservación de germoplasma de piña, se han realizado pretratamientos de PBZ (0-0.5 mg/L y 1 mg/L), siendo efectiva su utilización en la fase inicial y luego eliminándose del medio. Así, los brotes conseguían conservarse de forma adecuada. Aunque el tratamiento con PBZ producía brotes con aspecto de roseta (lo que muestra el efecto inhibitorio del crecimiento del PBZ), una vez el PBZ era eliminado del medio, los explantos mostraban un desarrollo correcto y uniforme, no existiendo un efecto residual del mismo (Canto *et al.*, 2004). Oka y Niino (1997) también consiguieron mejorar la conservación *in vitro* de peral mediante la adición al medio de PBZ.

Estudios más recientes sugieren también un papel del PBZ sobre el desarrollo de la raíz, mejorando así los procesos de enraizamiento *ex vitro* (Wen *et al.*, 2013).

#### III.1.3.3.3. Ácido Triiodobenzoico

El ácido triiodobenzoico (TIBA) (**Figura 46**) actúa interfiriendo en el transporte polar de las auxinas, al competir directamente con el ácido indolacético (AIA), inhibiendo así el crecimiento de las plantas (Lomax *et al.*, 1995; Jarret, 1997; Dhaliwal *et al.*, 2004). El transporte polar de auxinas está implicado en numerosos procesos de desarrollo muy importantes para la planta, como el crecimiento, la dominancia apical y la rizogénesis (Marks *et al.*, 2002). Además, el transporte de auxinas es importante porque ésta interactúa con otros reguladores de crecimiento, como las citoquininas, en la regeneración de órganos y tejidos (Ventatachalam y Jayabalan, 1997).

Kucharska *et al.* (2012) demostraron que la adición de TIBA a medio de regeneración con BAP, intensificaba la generación de brotes adventicios en cultivares de rosa. Ali y Afrasiab (2014), por su

parte, comprobaron que el suplemento del medio MS con 6 $\mu$ M de TIBA, mejoraban la inducción de callos en *Carthamus tinctorius* L.

Otros efectos sobre las plantas cultivadas *in vitro*, que se han atribuido al uso del TIBA en los medios de cultivo, son el incremento de la síntesis de clorofila, y el engrosamiento del sistema radicular de los brotes (Jarret, 1997). Por otra parte, en el cultivo *in vitro*, diversos estudios han demostrado efectos negativos en el desarrollo de la planta tras ser sometidas a tratamientos con TIBA, como malformaciones en las hojas, tallos y peciolo (Roussy *et al.*, 1996; Jarret *et al.*, 1997; Padilla *et al.*, 2015), mientras que autores como Singh *et al.* (2015) no observaron malformaciones algunas aun empleando altas concentraciones de TIBA (10<sup>-3</sup>M), por lo que parece muy importante regular la concentración antes de su uso. El TIBA también se ha ensayado en la conservación *in vitro* de diversas especies, como batata o la calabaza puntiaguda aunque con resultados dispares (Jarret *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 2014).

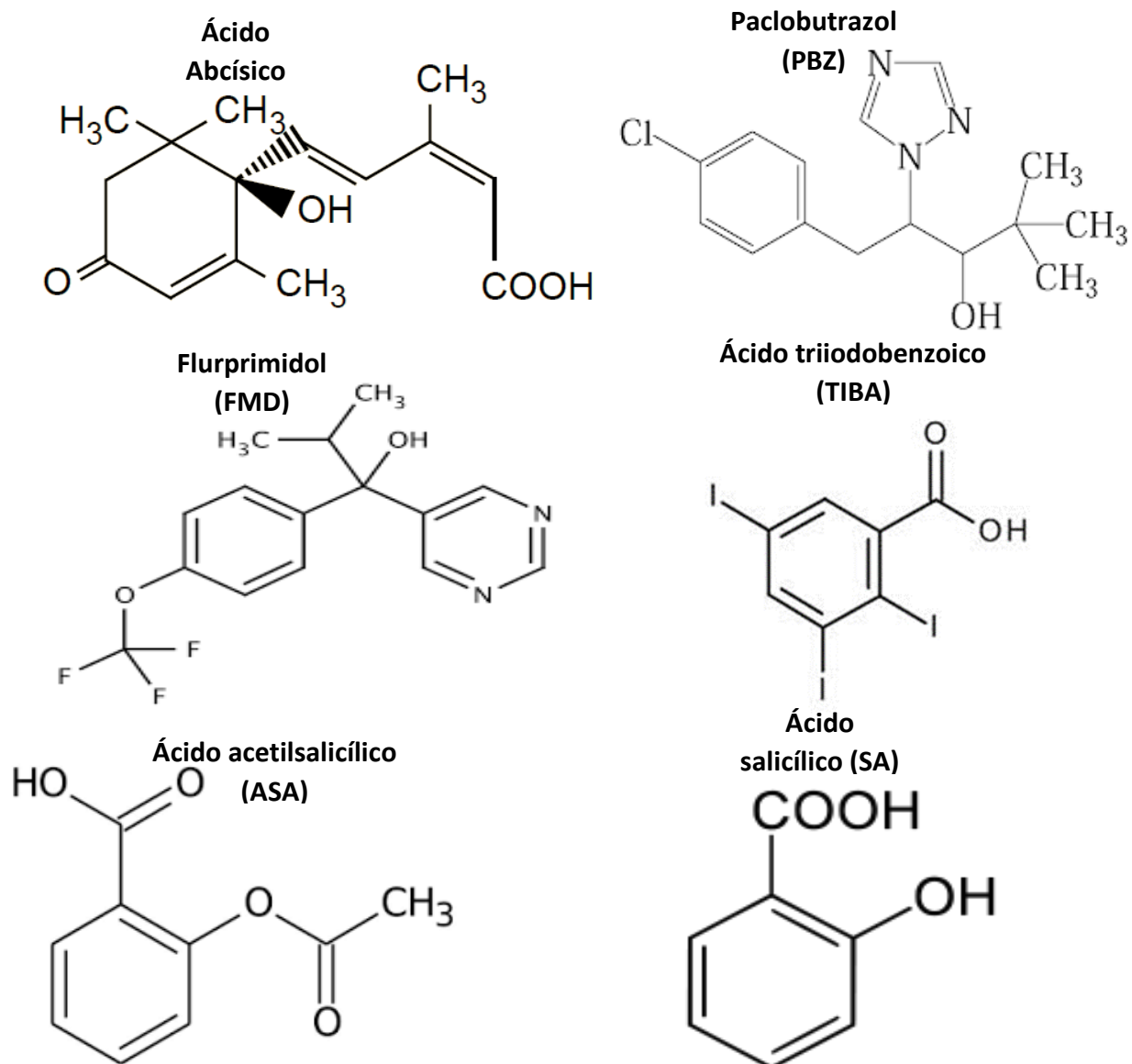
#### III.1.3.3.4. Ácido acetilsalicílico

El ácido acetilsalicílico (ASA), es un derivado de un compuesto metabólico natural de las plantas, el ácido salicílico (SA) (**Figura 46**). El SA es un compuesto fenólico similar a las hormonas que está implicado en la respuesta de defensa de la planta a estrés tanto bióticos como abióticos (Gunes *et al.*, 2007; He y Zhu, 2008; Yuan y Lin, 2008; Eraslan *et al.*, 2008; Ashraf *et al.*, 2010; Moussa y El-Gamal, 2010). La mayoría de estos estudios sugieren que el SA actúa mediante la regulación de la síntesis de enzimas antioxidantes. El estrés oxidativo está estrechamente relacionado con los daños ocasionados por frío, de tal forma que numerosas ROS se generan en las plantas cuando éstas son sometidas a bajas temperaturas. Así, pretratamientos con SA pueden directa o indirectamente provocar cambios en la tolerancia al frío de la planta al modificar la actividad de las enzimas antioxidantes (Fujita *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2013). Otros autores señalan que el modo de acción del SA se produce porque provoca una acumulación de ABA en la planta (Shakirova *et al.*, 2003), el cual desencadena la expresión de genes relacionados con la aclimatación al frío (Xiong *et al.*, 2001). Xia *et al.* (2009) sugieren que, al someter a la planta a baja temperatura, disminuyen los niveles endógenos de SA, y esto provoca una mejora en la capacidad de las células de la planta de expandirse y, por tanto, favorecería el crecimiento de la misma. En definitiva, actúa como una señal endógena que media la expresión de genes de defensa y resistencia a enfermedades y daños en la planta.



En cuanto a su efecto sobre el crecimiento, Kovacik *et al.* (2009) comprobaron que a bajas concentraciones (50  $\mu\text{M}$ ) el SA actuaba como un estimulador del crecimiento, pero a altas concentraciones (250  $\mu\text{M}$ ) el efecto era el contrario y lo inhibía.

El efecto de la aplicación de SA depende de numerosos factores, como son la especie, el modo de aplicación y su concentración (Vanacker *et al.*, 2001; Horvath *et al.*, 2007; Eraslan *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008; Kovacik *et al.*, 2009; Padilla *et al.*, 2015). En la mayoría de estos trabajos se mencionan los efectos negativos del uso de SA a elevadas concentraciones, como son la necrosis y clorosis, lo cual indicaría un papel del SA en la síntesis de clorofila. Debido a las múltiples respuestas, tanto del SA como del ASA, son muchas las aplicaciones que se han surgido para su utilización en el cultivo *in vitro*.



**Figura 46:** Estructura molecular de los distintos reguladores de crecimiento.

Así, López-Delgado *et al.* (1998a), utilizó ASA para estudios de frigoconservación de patata, donde mostró un efecto retardante del crecimiento y desarrollo de la planta, que permitió almacenar el material hasta 6 meses sin producir anomalías en los cultivos. También se comprobó que inducía termotolerancia a altas temperaturas, útil para tratamientos de termoterapia y cultivo de meristemas para la obtención de material libre de patógenos (López-Delgado *et al.*, 1998b).

Padilla *et al.* (2009b), usando un pretratamiento con ASA, mejoraron la conservación *in vitro* a baja temperatura de secciones nodales de *neem* (*Azadirachta indica*).

## III.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### III.2.1. Condiciones generales

#### Material vegetal

Los estudios llevados a cabo en este capítulo fueron realizados con olivo de las variedades 'Arbequina', 'Blanqueta-11', 'Castellana', 'Cornicabra', 'Hojiblanca', 'Lechín de Granada', 'Sevillenca', 'Verdial de Vélez Málaga' y 'Villalonga'.

El explanto primario para la realización de los ensayos de frigoconservación fueron brotes subapicales de 2-2.5 cm de longitud y para los ensayos de encapsulación se utilizaron secciones nodales de 0.5 cm provenientes, en ambos casos, de brotes procedentes de nuestros stocks *in vitro* en proliferación activa.

#### Preparación de medios de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó fue el medio DKW modificado por Roussos y Pontikis (2002), que llamamos medio RP (la composición de este medio se describe en el capítulo II, en la página 124). El pH del medio se ajustó a 5.74 con NaOH (0.1 y 1 N) y HCl (0.1 y 1 N) y se gelificó con agar (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain). A continuación, el medio se autoclavó durante 7 min a 121 °C y 1.05 kg·cm<sup>2</sup> para disolver el agar. Una vez esto, se distribuyó 25 ml en tubos de ensayo de 25 x 150mm (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain) cerrados con tapones de polipropileno (Bellco Glass INC. Kaputs) o bien 30 ml en frascos de 55 x 115 mm cerrados con tapaderas de plástico. Finalmente, el medio se autoclavó durante 15 min (tubos) o 20 min (frascos) en las mismas condiciones de temperatura y presión citadas anteriormente.

#### Condiciones estándares de cultivo

Los cultivos se mantienen en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas con una temperatura constante de 25 ± 1 °C y un fotoperiodo de 16h de luz, a una intensidad luminosa de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, proporcionada por lámparas Sylvania Grolux (F40 tubes Gro-lux, Sylvania, Madrid, Spain).

### Fases de cultivo

En todos los ensayos realizados podemos diferenciar una fase de tratamiento y una fase de recuperación. La fase de tratamiento es aquella fase en la que se aplica el factor cuyo efecto queremos constatar y presenta una duración de 4 semanas. Una vez terminada la fase de tratamiento los explantos se recultivan y pasan a la fase de recuperación, con una duración de 8 semanas, que es aquella en la que a los explantos le hemos eliminado la influencia del factor a estudiar y pasan a cultivarse en las condiciones estándares de cultivo en medio RP.

### Toma de datos y análisis estadístico

Para la frigoconservación se realizaron 2 repeticiones con 25 explantos por tratamiento. En la encapsulación, de cada experimento se realizaron 3 repeticiones y se emplearon 20 explantos para cada tratamiento estudiado. Salvo para el último experimento de encapsulación, del cual solo se realizó una repetición, empleando 25 explantos para cada tratamiento estudiado.

En cuanto a la toma de datos, en la frigoconservación se realizó a la salida de la fase de conservación en frío y tras la recuperación. Se tomaron datos del número de explantos que sobrevivieron o necrosaban, así como la longitud de los brotes y el aspecto de los mismos. En la encapsulación, la toma de datos se realizó siempre al término de la fase de tratamiento, en la que se tomaron datos del número de explantos (o encapsulados), contaminados, necrosados, parados, hinchados y brotados (**Figura 47**). Además de la longitud de los brotes formados, si es que los hubiera y su aspecto. Durante la fase de recuperación se procedió a tomar de nuevo los mismos datos a las 4, 6 y 8 semanas.

En cuanto al análisis estadístico, para estudiar el efecto de los factores de forma individualizada realizamos análisis por tablas de contingencia (Chi-cuadrado) para los datos de porcentajes y un análisis de la varianza (ANOVA) para el resto de datos, estableciendo la diferencia entre medias con el test SNK. Para el estudio de la interacción entre los factores, usamos modelos lineales generalizados (software informático SPSS v15.0). El nivel de significación fue para todos los casos de 0.05.



**Figura 47:** Representación esquemática del tipo de explanto, brotado, hinchado, parado o necrosado.

### III.2.2. Frigoconservación

Los experimentos de frigoconservación se realizaron con las variedades ‘Arbequina’, ‘Blanqueta-11’, ‘Castellana’, ‘Cornicabra’, ‘Hojiblanca’, ‘Lechín de Granada’, ‘Sevillena’, ‘Verdial de Vélez Málaga’ y ‘Villalonga’, siguiendo el protocolo descrito por Imbroda *et al.* (2014) para la variedad ‘Arbequina’. De acuerdo con este protocolo, los brotes, con una longitud entre 2-2.5 cm, fueron cultivados en medio RP en tubos (1 brote/tubo). A continuación, se colocaron en un fitotrón con una temperatura de 8 °C y fotoperiodo de 16h de luz. Allí fueron mantenidos durante 6 o 12 meses. Y una vez terminado el periodo de frigoconservación, los explantos fueron recultivados en dos ocasiones (cada recultivo con una duración de 6 semanas), y mantenidos en condiciones estándares de cultivo, para valorar su recuperación.

### III.2.3. Encapsulación

Preparación de la matriz de encapsulación

[Matriz de alginato](#)

La matriz de encapsulación consistió en las sales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 30 g/L de sacarosa, 0.2 g/L de MES y alginato de sodio (Sigma-Aldrich Química

S.A., Madrid, Spain). Para la preparación del medio se utilizó una batidora para homogeneizarlo y disolver el alginato. Posteriormente, la matriz de alginato se autoclavó durante 20 min.

### Solución de polimerización

La solución de polimerización utilizada para solidificar la matriz y formar las capsulas estaba constituida por  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Dicha solución se autoclavó durante 20 min.

### Obtención de cápsulas de alginato

Vertemos en una placa de petri estéril la matriz de alginato, y con ayuda de una pipeta y una goma de silicona de 1cm de diámetro de luz (que actúa a modo de punta), pipeteamos 400  $\mu\text{l}$  y lo vertemos en un frasco con la solución de polimerización. Una vez transcurrido el tiempo necesario se forman las capsulas y con ayuda de unas pinzas se colocan en agua estéril durante 5 minutos para eliminar los restos de la solución de polimerización. Finalmente secamos las cápsulas en papel de filtro estéril.

### Experimento 1: Establecimiento del proceso de encapsulación

Para la puesta a punto del proceso de encapsulación se testaron los distintos factores que intervienen en el mismo.

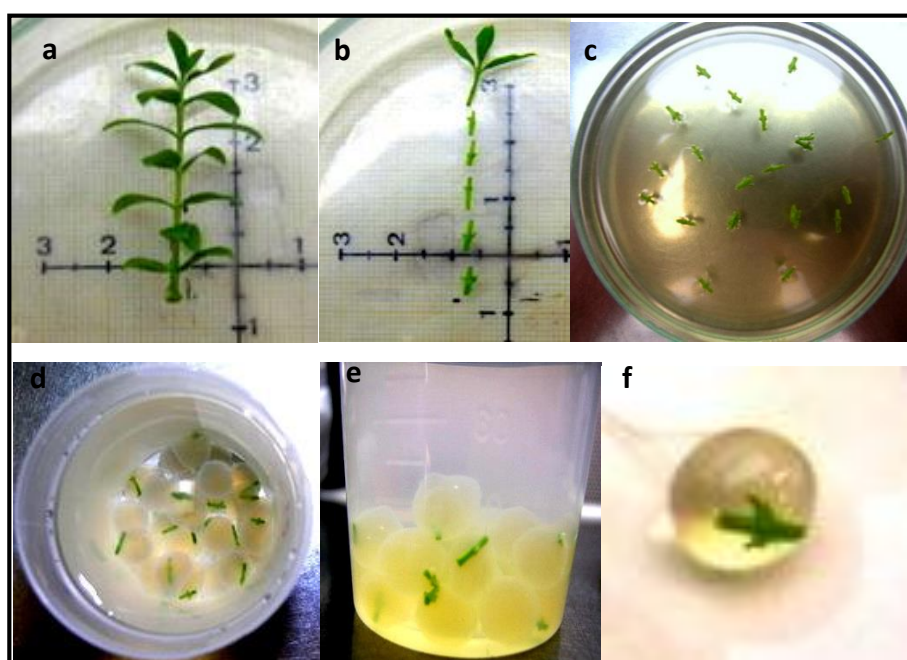
Para ello se realizó un ensayo donde se testaron distintas concentraciones de alginato (2.5%-3%-3.5%-4%-5%-6%), combinado con distintas concentraciones de la solución de polimerización,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , (75 mM-100 mM-150 mM) y con distintos tiempos de solidificación (10 min-20 min-30 min) en la formación de cápsulas de alginato. Una vez terminado el proceso se valoró la forma y la consistencia de las capsulas formadas.

### Experimento 2: Matriz de encapsulación, cápsula y brotación de los encapsulados

Se encapsularon secciones nodales utilizando las mejores condiciones en cuanto a concentración de alginato, cloruro de calcio y tiempo de polimerización que se habían determinado en el experimento 1 (**Figura 48**). Por tanto, se testaron las concentraciones de alginato 4 y 5 %, combinado con las concentraciones 100 y 150 mM de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  con un único tiempo de polimerización (10 min).

El procedimiento para la formación de las capsulas en este caso fue exactamente igual que el anterior, con la salvedad de que una vez vertida la matriz de alginato en la placa de petri, se

colocaron secciones nodales de 0.5 cm sobre dicha matriz (**Figura 48-c**) y al pipetear se aseguraba que se cogía además de la matriz una sección nodal antes de verterlo sobre la solución de polimerización y que se formaran correctamente los encapsulados (**Figura 48-f**). Los encapsulados se cultivaron en medio RP en condiciones estándares de cultivo durante 4 y 6 semanas para valorar el efecto de la encapsulación en la brotación de las secciones nodales. De tal forma que podemos definir 8 tratamientos diferentes (**Tabla 15**). Al finalizar el experimento, tras 4 y 6 semanas, se tomaron los datos.

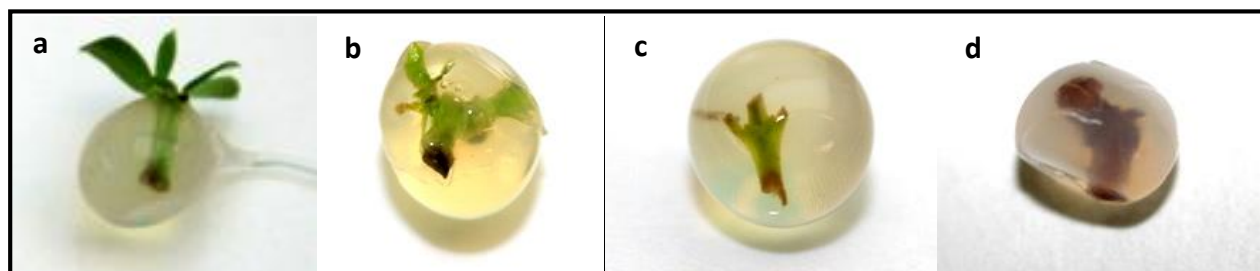


**Figura 48:** Imágenes del proceso de la encapsulación. **(a)** Aspecto del brote inicial del cv. 'Arbequina' del cual se extraerán las secciones nodales; **(b)** Corte en secciones nodales del brote; **(c)** Disposición de las secciones nodales en la matriz de alginato; **(d)** Proceso de solidificación de la matriz de alginato; **(e)** Lavado de las cápsulas en agua; **(f)** Aspecto del encapsulado final.

**Tabla 15:** Diferentes tratamientos empleados para la formación de los encapsulados.

| Tratamiento | Alginato (%) | CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O | Tiempo    |
|-------------|--------------|--------------------------------------|-----------|
| 1           | 4            | 100 mM                               | 4 semanas |
| 2           | 4            | 150 mM                               | 4 semanas |
| 3           | 5            | 100 mM                               | 4 semanas |
| 4           | 5            | 150 mM                               | 4 semanas |
| 5           | 4            | 100 mM                               | 6 semanas |
| 6           | 4            | 150 mM                               | 6 semanas |
| 7           | 5            | 100 mM                               | 6 semanas |
| 8           | 5            | 150 mM                               | 6 semanas |

Se consideraba que un encapsulado estaba brotado cuando al menos una de las yemas emergía de la cápsula; Se consideraba hinchado cuando la/s yema/s empezaban a brotar, pero no conseguían salir o romper la capsula; Se consideraba parado cuando ninguna de las yemas brotaban y el explanto tenía buen aspecto; Se consideraba necrosado, cuando el explanto o las yemas lo estaban y ninguna conseguía emerger de la cápsula (**Figura 49**).



**Figura 49:** Aspecto de los encapsulados tras su desarrollo; **(a)** Encapsulado brotado; **(b)** Encapsulado hinchado; **(c)** Encapsulado parado; **(d)** Encapsulado necrosado.

### Experimento 3: Desarrollo de secciones nodales encapsuladas y sin encapsular

Para determinar el efecto de la encapsulación en la brotación de las secciones nodales, se compararon secciones nodales sin encapsular con los encapsulados en el mismo medio (medio RP) y en las condiciones estándares de cultivo. Se tomaron datos a las 4, 6 y 8 semanas de la brotación y la longitud de los brotes y el porcentaje de secciones nodales o encapsulados brotados, hinchados o necrosados.

### Experimento 4: Temperatura

Con estos ensayos queremos determinar cómo afecta la temperatura en el desarrollo de las secciones nodales tanto en su cultivo estándar como encapsuladas.

#### *Experimento 4.1: Temperatura y desarrollo de las secciones nodales*

Las secciones nodales se cultivaron en medio y condiciones estándares y se ensayaron dos temperaturas de incubación: 25 °C (temperatura estándar) y 4 °C. Los explantos se mantuvieron en esas condiciones durante 4 semanas.

A continuación, las secciones se recultivaron, y se dejaron en condiciones estándares de cultivo durante 8 semanas.



#### Experimento 4.2: Temperatura, desarrollo y recuperación de los encapsulados

Los encapsulados se cultivaron en medio y condiciones estándares y se ensayaron dos temperaturas de incubación: 25 °C (temperatura estándar) y 4 °C. Se mantuvieron en esas condiciones durante 4 semanas. Transcurrido ese tiempo se procedió a tomar datos del porcentaje de encapsulados brotados, hinchados, parados y necrosados, así como del aspecto que mostraban los cultivos.

En este experimento se estudió también la recuperación del material dejándolo encapsulado o extrayendo la sección nodal de la cápsula. Los encapsulados o las secciones nodales desencapsuladas se recultivaron y se incubaron a temperatura estándar durante 8 semanas. Se tomaron datos del porcentaje de encapsulados o secciones nodales brotadas, hinchadas, paradas o necrosadas a las 4, 6 y 8 semanas, así como de la longitud de los brotes y su aspecto.

#### Experimento 5: Fotoperiodo

Con estos ensayos se quiso determinar cómo afectaba el fotoperiodo al desarrollo de las secciones nodales tanto en cultivo estándar como encapsuladas.

#### Experimento 5.1: Fotoperiodo y desarrollo de las secciones nodales

Las secciones nodales se cultivaron en medio y condiciones estándares y se ensayaron dos fotoperiodos: 16 horas (fotoperiodo estándar) y 0 horas. Los explantos se mantuvieron en esas condiciones durante 4 semanas. Transcurrido ese tiempo se procedió a tomar datos del porcentaje de secciones nodales con yemas brotadas, hinchadas o paradas, así como del aspecto que mostraban los cultivos.

A continuación, las secciones se recultivaron en medio fresco y se incubaron bajo fotoperiodo estándar, 16 horas, durante 8 semanas, tras el cual se tomaron los datos.

#### Experimento 5.2: Fotoperiodo, desarrollo y recuperación de encapsulados

Las secciones nodales se encapsularon con una matriz de alginato al 5% con polimerización en  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  100 mM durante 10 minutos (encapsulación estándar), se cultivaron en medio RP. Se ensayaron dos fotoperiodos: 16h (fotoperiodo estándar) y 0h de luz. Se mantuvieron en esas condiciones durante 4 semanas.

En este experimento se estudió también la recuperación del material dejándolo encapsulado o extrayendo la sección nodal de la cápsula. Los encapsulados o las secciones nodales desencapsuladas se recultivaron y se dejaron con el fotoperiodo estándar durante 8 semanas.

### Experimento 6: Fotoperiodo, temperatura y tipo de recuperación en el desarrollo de los encapsulados

El objetivo de este ensayo fue comprobar el efecto de la combinación de ambos factores sobre la viabilidad de los encapsulados, con el fin de definir las condiciones óptimas para posteriores ensayos de conservación a baja temperatura.

Para este ensayo lo primero que se realizó fue la encapsulación de las secciones nodales siguiendo el protocolo ya establecido (ver apartado “II.2.3.4.2. Experimento 4.2”). Estos encapsulados son colocados en frascos estériles sin medio de cultivo. Dichos frascos fueron sometidos a 4 tratamientos diferentes:

Tratamiento 1: fotoperiodo de 16 horas y temperatura de 25 °C.

Tratamiento 2: fotoperiodo de 0 horas y temperatura de 25 °C.

Tratamiento 3: Fotoperiodo de 16 horas y temperatura de 4 °C.

Tratamiento 4: Fotoperiodo de 0 horas y temperatura de 4 °C.

Transcurrido 4 semanas, se procedió a tomar datos, para, posteriormente, pasar a la fase de recuperación, para lo cual los explantos fueron recultivados y, para cada tratamiento, se valoró la recuperación de las secciones, tanto si seguían encapsuladas como si se desencapsulaban. Durante la recuperación, los explantos se mantuvieron en condiciones estándares de cultivo durante 8 semanas.

### Experimento 7: Sacarosa

El objetivo de estos ensayos fue estudiar el efecto de un pretratamiento con sacarosa en la brotación y desarrollo de las secciones nodales encapsuladas y sin encapsular.

#### *Experimento 7.1: Sacarosa y desarrollo de las secciones nodales*

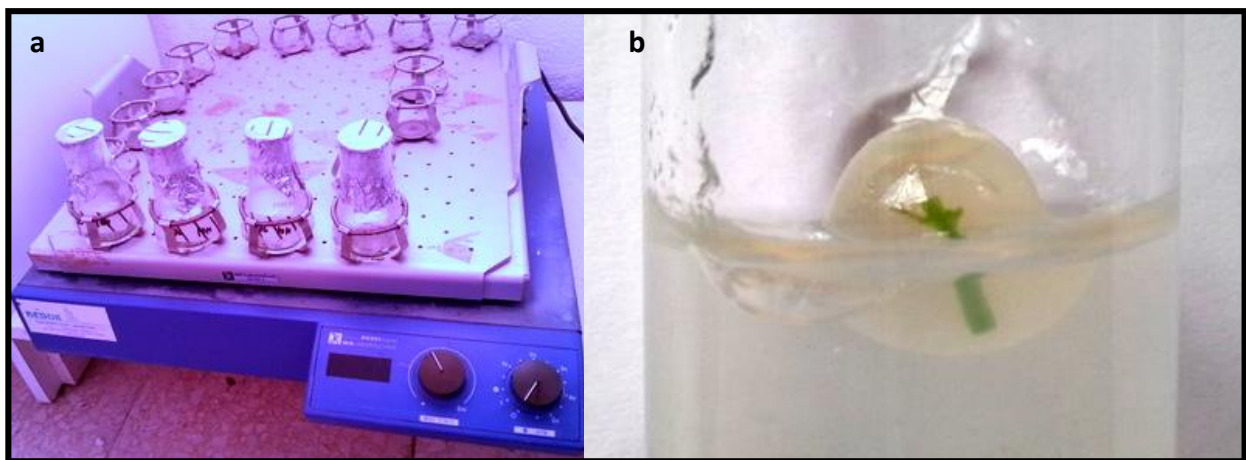
Se trataron secciones nodales de olivo con una solución a distintas concentraciones de sacarosa (0-70-100-130 g/L) durante distinto tiempo de exposición (1-5-10 horas) previamente a su

cultivo. Posteriormente, transcurrido el tiempo de exposición, las secciones nodales se cultivaron en medio RP en las condiciones estándares.

Para ello, se procedió de la siguiente manera: Se cortaban secciones nodales con tamaño de 0.5 cm y se introducían en pequeños matraces con 15 ml de la solución de sacarosa, consistente en la cantidad de sacarosa anteriormente indicada disuelta en agua destilada y esterilizada mediante autoclavado. Los matraces se colocaban en agitación a 20 rpm (**Figura 50-a**). Una vez finalizado el tiempo de exposición, se cultivaron en medio RP en tubo y se mantuvieron en condiciones estándares de cultivo. Transcurridas 6 semanas se tomaron datos del número de secciones contaminadas, necrosadas o brotadas, así como de la longitud de los brotes y su aspecto.

#### Experimento 7.2: Sacarosa y desarrollo de los encapsulados

Para llevar a cabo este ensayo seguimos los mismos pasos del experimento 1, pero a la hora de cultivar las secciones nodales tras el pretratamiento con sacarosa, estas fueron encapsuladas (**Figura 50-b**) según el protocolo estándar (ver apartado “Experimento 4.2”). Los encapsulados se cultivaron en medio RP y se mantuvieron durante 8 semanas en condiciones estándares de cultivo.



**Figura 50:** (a) Secciones nodales en los matraces con la solución de sacarosa en agitación; (b) Sección nodal encapsulada y cultivada en medio RP, tras el pretratamiento de sacarosa.

#### Experimento 8: Sacarosa, baja temperatura y tipo de recuperación sobre el desarrollo de los encapsulados

En este ensayo se sometieron a las secciones nodales a un pretratamiento con distintas concentraciones de sacarosa (0-70 y 100 g/L) durante distintos tiempos de exposición (0-1-5 y 10 horas). Tras ello, se encapsularon las secciones nodales siguiendo el protocolo establecido y se

colocaron en el interior de frascos estériles a 4 °C durante 4 semanas. Transcurrido dicho tiempo se tomaron datos del número de encapsulados brotados, hinchados, parados o necrosados.

A continuación, se pasó a la fase de recuperación, la cual se realizó tanto cultivando los encapsulados sobre medio de cultivo RP, como desencapsulando la sección nodal y cultivando esta sobre el mismo medio. En ambos casos se colocaron en condiciones estándares de cultivo durante 8 semanas, tomándose datos de encapsulados o secciones nodales brotadas, hinchadas, paradas o necrosadas, así como del aspecto de los mismos.

### Experimento 9: Retardantes del crecimiento

El objetivo de estos ensayos era comprobar el efecto de distintos retardantes del crecimiento a distintas concentraciones en el desarrollo de las secciones nodales de olivo.

Este ensayo estaba dividido en dos fases, una primera fase de tratamiento en la que se valoraba el efecto del retardante sobre la sección nodal, y una segunda fase de recuperación en la que se valoraba como se recuperaba la sección nodal una vez eliminado el retardante del medio.

Durante la fase de tratamiento se usaron 5 retardantes del crecimiento diferentes y 4 concentraciones para cada uno, estableciéndose los siguientes experimentos:

- Experimento 9.1: Efecto del paclobutrazol (PBZ): 0-0.1-1-10 mg/L
- Experimento 9.2: Efecto del flurprimidol (FMP): 0-0.1-1-10 mg/L
- Experimento 9.3: Efecto del ácido triiodobenzoico (TIBA): 0-10<sup>-6</sup>-10<sup>-5</sup>-10<sup>-4</sup> μM
- Experimento 9.4: Efecto del ácido acetil salicílico (ASA): 0-25-100-400 μM
- Experimento 9.5: Efecto del ácido abcísico (ABA): 0-1-10-50 μM.

El medio de cultivo empleado en todos los casos fue RP, el cual fue suplementado con la cantidad correspondiente de retardante y posteriormente autoclavado. Los retardantes se disolvieron en: DMSO (paclobutrazol y flurprimidol), etanol (TIBA), agua (ASA) o metanol (ABA) antes de ser añadidos al medio de cultivo.

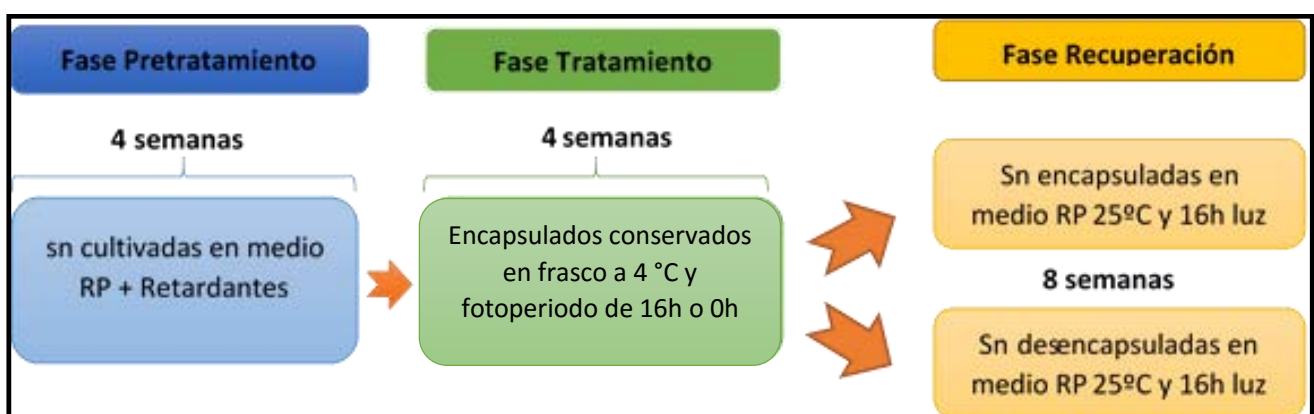
Las secciones nodales se cultivaron sobre el medio y se incubaron en condiciones estándares de cultivo durante 4 semanas.

A continuación, las secciones nodales se recultivaban a medio fresco sin retardante, para estudiar su recuperación, y se colocaban en condiciones estándares de cultivo durante 4 semanas. Finalmente, se tomaron datos del número de explantos brotados, hinchados, parados o necrosados, así como del número de yemas brotadas por explanto, longitud y número de hojas de los brotes y aspecto de los mismos.

Experimento 10: Efecto combinado de los retardantes del crecimiento, baja temperatura, fotoperiodo y tipo de recuperación sobre el desarrollo de los encapsulados

En este ensayo se quiso combinar el efecto de un pretratamiento con los retardantes seleccionados (Paclobutrazol 10 mg/L; Flurprimidol 1 mg/L; ABA 1  $\mu$ M; ASA 25  $\mu$ M) y baja temperatura (4 °C). Para llevar a cabo dicho ensayo, en primer lugar, las secciones nodales fueron sometidas durante 4 semanas a un pretratamiento con dichos retardantes (**Figura 51**).

Transcurrido ese período de tiempo se encapsularon siguiendo el protocolo establecido y se conservaron en frascos estériles a 4 °C con un fotoperiodo de 16 o 0 horas durante 4 semanas. Pasado ese tiempo se procedió a tomar datos del número de encapsulados brotados, hinchados, parados o necrosados, y el aspecto de los mismos. A continuación, se pasaba a la fase de recuperación, para lo cual se cultivaban los explantos tanto encapsulados como desencapsulados, en medio y condiciones estándar de cultivo (**Figura 51**). Durante esta fase se tomaron datos del número de explantos brotados, hinchados, parados o necrosados, así como de la longitud de los brotes y su aspecto a las 4, 6 y 8 semanas.



**Figura 51:** Esquema representativo del experimento en el que se evalúa el efecto e interacción entre los retardantes, el fotoperiodo, la baja temperatura y el tipo de recuperación en el desarrollo de los encapsulados. RP: medio de Roussos y Pontikis (2002); sn: sección nodal.

#### III.2.4. Conservación a medio plazo de secciones nodales de olivo mediante encapsulación a baja temperatura

El objetivo de este estudio era aplicar los mejores resultados obtenidos en los experimentos anteriores a la conservación del material de olivo a medio plazo.

En primer lugar, se realizó una fase de pretratamiento en la cual se colocaron las secciones nodales en medio RP suplementado con 1 mg/L de flurprimidol. Estos explantos se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo durante 4 semanas. Transcurrido dicho periodo se pasó a un segundo pretratamiento con sacarosa (100 g/L durante 5 horas) para posteriormente pasar a la fase de conservación, en la cual se procedió a encapsular los explantos resultantes y a conservarlos en frascos estériles a 4 °C, donde se testó el efecto del fotoperiodo, para lo cual se incubaron a 16 o a 0 horas. Los encapsulados fueron mantenidos en estas condiciones durante 3, 6, 9 y 12 meses. Tras el periodo de conservación se procedió a la fase de recuperación, en la cual se evaluó el tipo de recuperación (sección nodal encapsulada o desencapsulada), cultivándose los explantos en medio RP en condiciones estándares de cultivo durante 8 semanas. Se tomaron datos de la supervivencia de los explantos, así como de la longitud y aspecto de los brotes.

En este ensayo testamos 8 combinaciones diferentes que se realizaron a la vez:

- 1: Pretratamiento: Sin flurprimidol y sin sacarosa; Conservación: 16 h luz
- 2: Pretratamiento: Sin flurprimidol y sin sacarosa; Conservación: Oscuridad
- 3: Pretratamiento: Sin flurprimidol y con sacarosa; Conservación: 16 h luz
- 4: Pretratamiento: Sin flurprimidol y con sacarosa; Conservación Oscuridad
- 5: Pretratamiento: Con flurprimidol y sin sacarosa; Conservación: 16 h luz
- 6: Pretratamiento: Con flurprimidol y sin sacarosa; Conservación: Oscuridad
- 7: Pretratamiento: Con flurprimidol y con sacarosa; Conservación: 16 h luz
- 8: Pretratamiento: Con flurprimidol y con sacarosa; Conservación Oscuridad

Adicionalmente, en cada una de las combinaciones, durante la fase final de recuperación se realiza tanto encapsulada como desencapsulada (**Figura 52**).



**Figura 52:** Esquema representativo de los ensayos de conservación a baja temperatura en alginato. RP: medio Roussos y Pontikis (2002); sn: sección nodal.

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

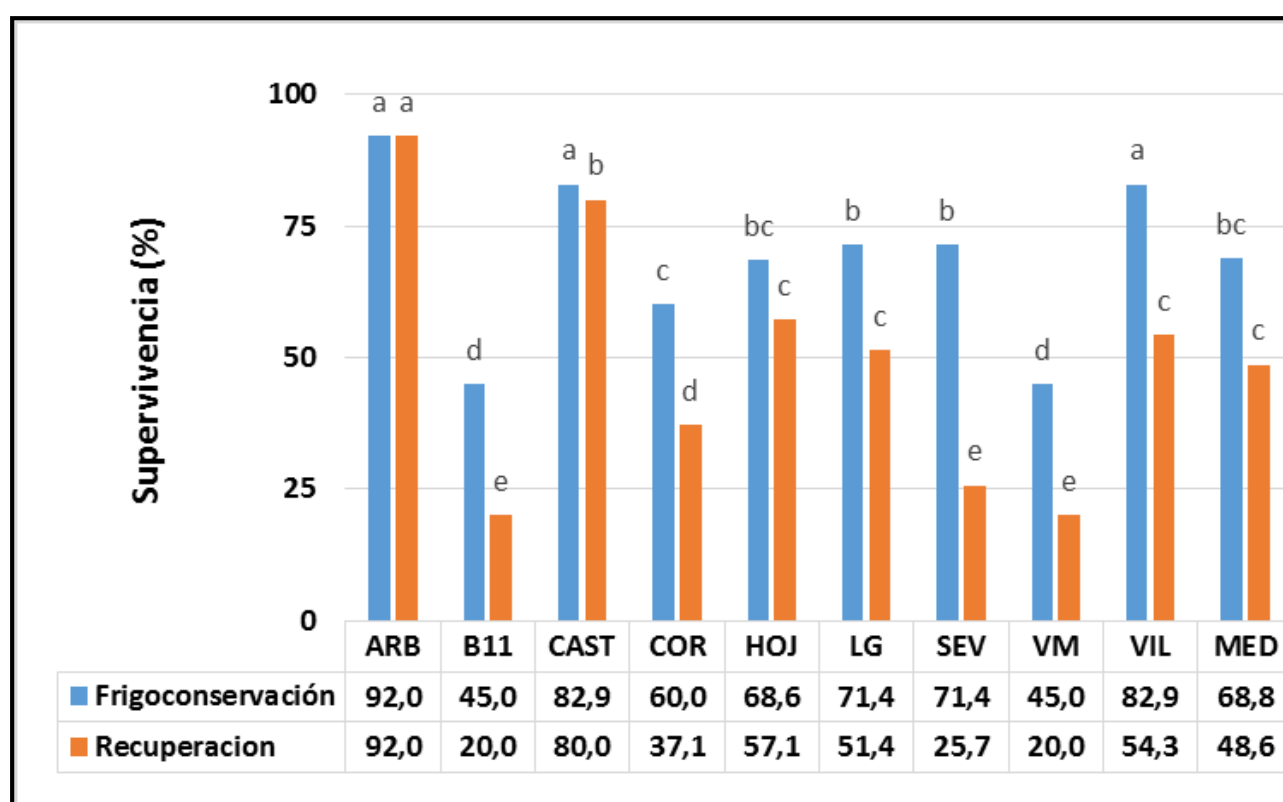




### III.3. RESULTADOS

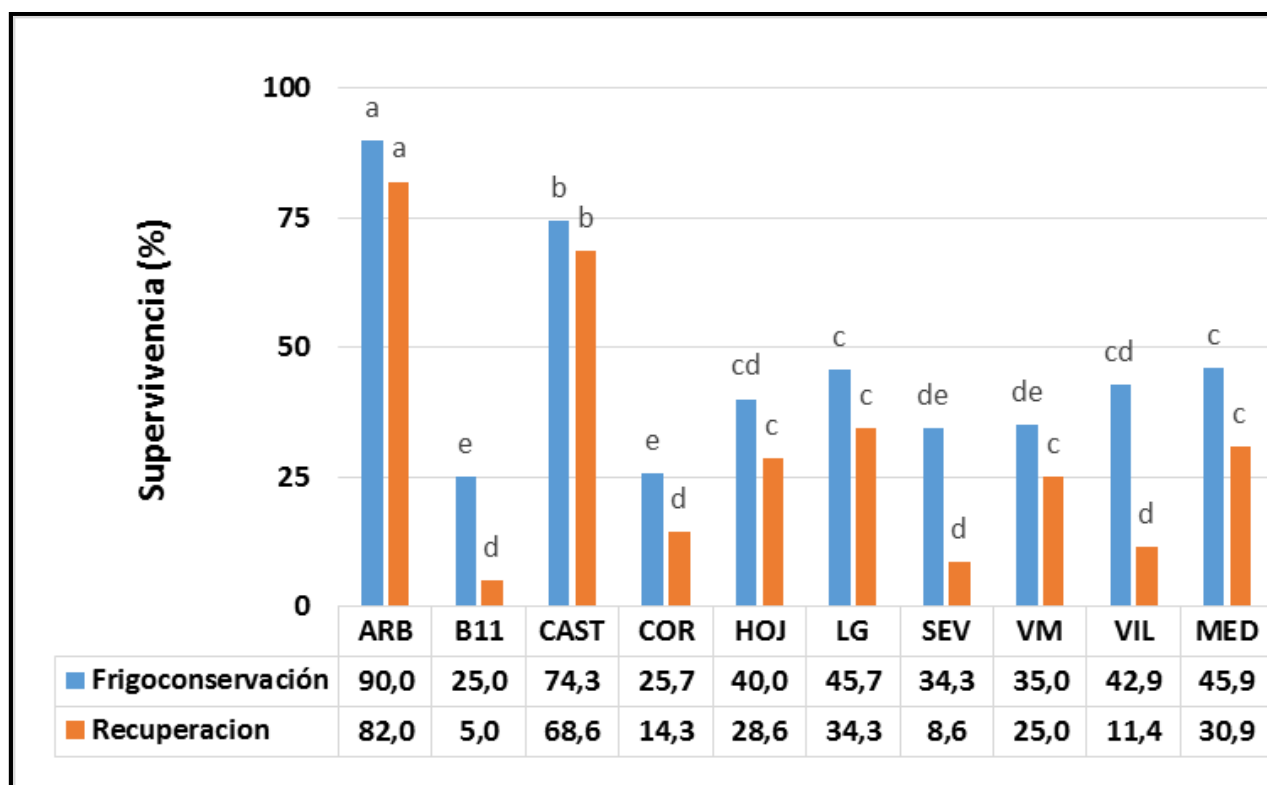
#### III.3.1. Frigoconservación

Todas las variedades sobrevivieron tras los 6 meses de conservación en frío. En 6 de las 8 variedades estudiadas la supervivencia de los brotes tras 6 meses de conservación en frío fue superior al 50% (**Figura 53**), sin embargo, tras la fase de recuperación en condiciones estándares de cultivo, el porcentaje descendió significativamente y sólo 4 de las 8 variedades estudiadas ('Castellana', 'Hojiblanca', 'Lechín de Granada' y 'Villalonga') mostraron porcentajes superiores al 50%, pero siempre inferiores a la variedad control, 'Arbequina' (**Figura 53**).



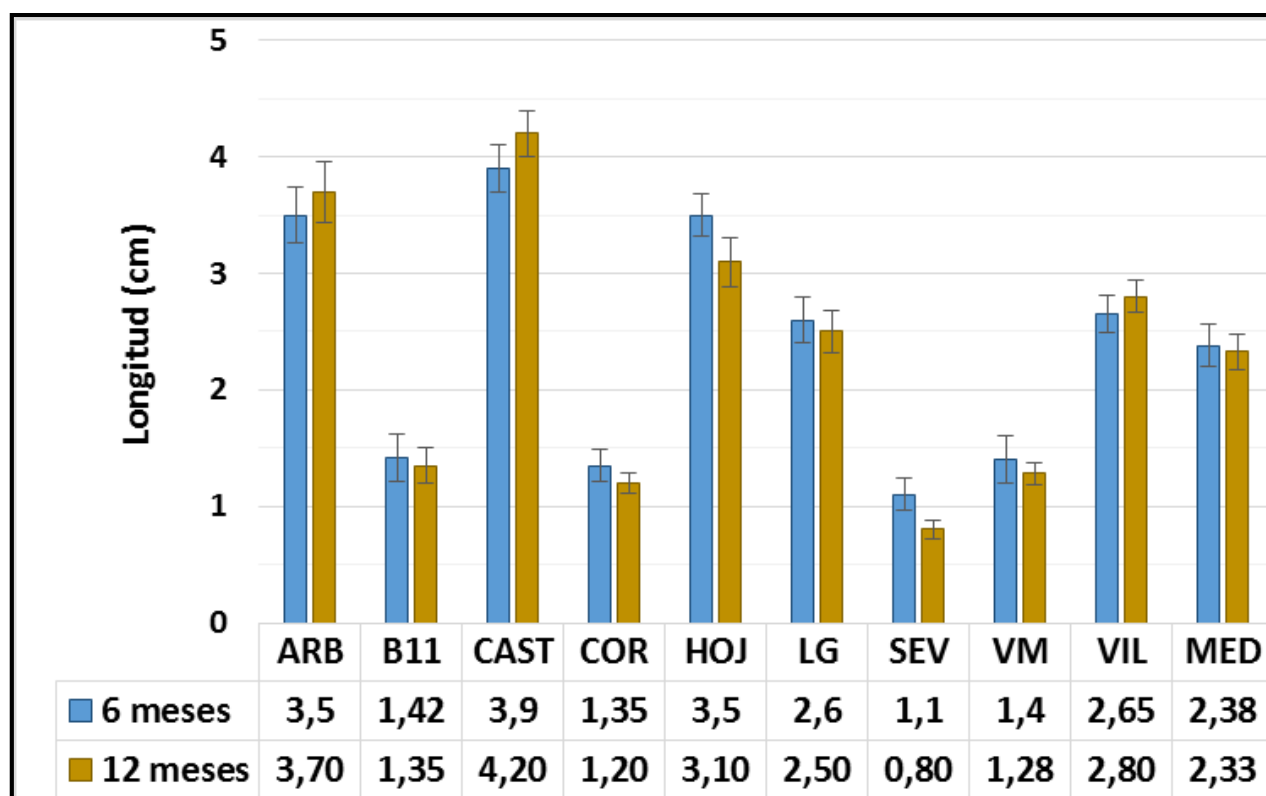
**Figura 53:** Supervivencia de los brotes de olivo tras 6 meses de frigoconservación a 8 °C y 12 semanas de recuperación en condiciones estándares de cultivo. En cada fase, letras distintas sobre las columnas indican diferencias significativas en supervivencia de acuerdo al test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ). ARB: 'Arbequina'; B11: 'Blanqueta-11'; CAST: 'Castellana'; COR: 'Cornicabra'; HOJ: 'Hojiblanca'; LG: 'Lechín de Granada'; SEV: 'Sevillena'; VM: 'Verdial de Vélez Málaga'; VIL: 'Villalonga'; MED: media.

Los brotes frigoconservados durante 12 meses mostraron una supervivencia entre el 25% y el 75%, pero inferior en todos los casos al control 'Arbequina', (**Figura 54**). Tras la fase de recuperación, de todas las variedades se pudo recuperar material, pero sólo la variedad 'Castellana' (68.6%) mostró un porcentaje superior al 50%. Por su parte 'Arbequina' mostró una supervivencia del 82%.



**Figura 54:** Supervivencia de los brotes de olivo tras 12 meses de frigoconservación a 8 °C y 12 semanas de recuperación en condiciones estándares de cultivo. En cada fase letras distintas sobre las columnas de una misma fase indican diferencias significativas de acuerdo al test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ). ARB: 'Arbequina'; B11: 'Blanqueta-11'; CAST: 'Castellana'; COR: 'Cornicabra'; HOJ: 'Hojiblanca'; LG: 'Lechín de Granada'; SEV: 'Sevillena'; VM: 'Verdial de Vélez Málaga'; VIL: 'Villalonga'; MED: media.

Se tomaron datos de la longitud de los nuevos brotes que surgían de las yemas del explanto original frigoconservado 6 y 12 meses, tras finalizar la fase de recuperación, y no se observaron diferencias significativas en la longitud de los mismos en función del tiempo de frigoconservación (**Figura 55**). La longitud media de los brotes fue desigual para las 8 variedades estudiadas, con valores entre 1,1 cm y 3.9 cm para el material que se había frigoconservado 6 meses y valores entre 0.8 cm y 4.2 cm para el frigoconservado 12 meses (**Figura 55**). La mayoría de variedades mostraron brotes con longitudes inferiores a 'Arbequina' con la excepción de la variedad 'Castellana'.

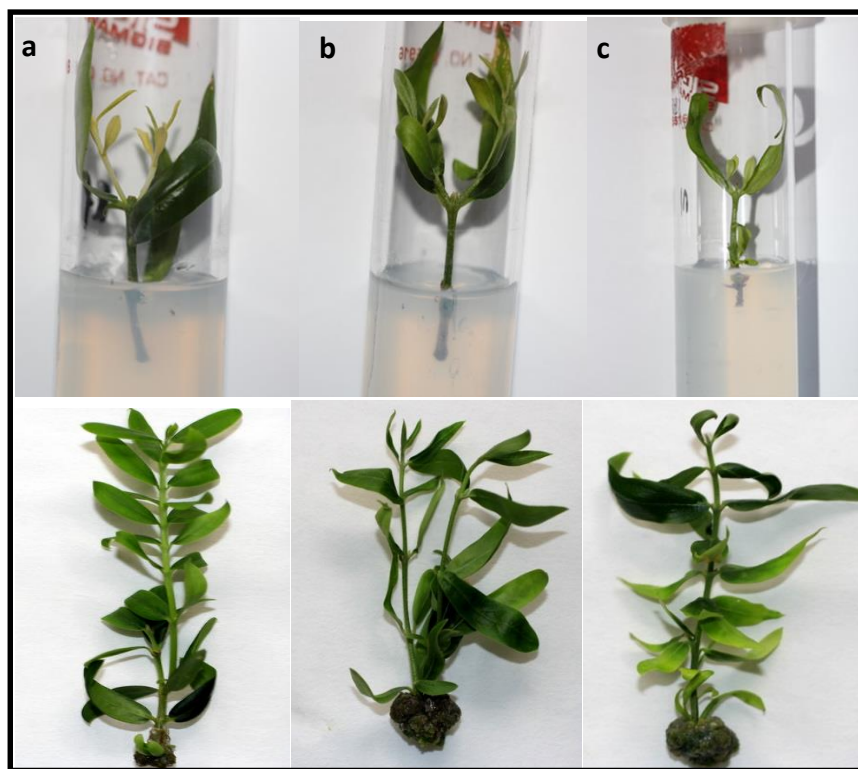


**Figura 55:** Longitud de los brotes en las distintas variedades de olivo analizadas tras 6 y 12 meses de conservación a 8 °C y tras 6 semanas de recuperación en condiciones estándar. Los valores representados corresponden a la media  $\pm$  SE. ARB: ‘Arbequina’; B11: ‘Blanqueta-11’; CAST: ‘Castellana’; COR: ‘Cornicabra’; HOJ: ‘Hojiblanca’; LG: ‘Lechín de Granada’; SEV: ‘Sevillena’; VM: ‘Verdial de Vélez Málaga’; VIL: ‘Villalonga’; MED: Media.

En cuanto al aspecto de los brotes, tras el periodo de conservación fue bueno en general a excepción de las variedades ‘Blanqueta-11’ y ‘Sevillena’, en las que los brotes presentaban cierta clorosis y síntomas de marchitez en sus hojas. En el lado opuesto se situaban las variedades ‘Castellana’ y ‘Villalonga’, las cuales presentaban brotes con un aspecto muy saludable e incluso con crecimiento del brote durante el periodo de conservación en frío, aunque con aspecto clorótico (**Figura 56-a y b**). Además, en todas las variedades se producía necrosis basal en algunos de los brotes cultivados, sin embargo, en las variedades ‘Sevillena’, ‘Verdial de Vélez Málaga’ y ‘Villalonga’ estos porcentajes eran más elevados (100%, 77.8% y 62.2% respectivamente). Estos porcentajes en las restantes variedades eran menores y oscilaban entre el 23.3% y el 34.4%. En todos los casos, la necrosis afectaba a la parte del explanto que se encontraba dentro del medio de cultivo. Al pasar los explantos a la fase de recuperación se eliminaba la parte basal necrosada de los mismos antes de recultivarlos en medio fresco.

Tras la fase de recuperación, la mayoría de las variedades presentaban brotes con gran desarrollo de callos en la zona basal, y el aspecto en general era bueno, e independientemente de

que el crecimiento en ellos fuera mayor o menor, no se observó ningún comportamiento anómalo en ninguna variedad. Destacar que en la variedad 'Blanqueta-11' las hojas de nueva formación presentaban buen aspecto y color, sin embargo, las hojas que procedían del explanto original mostraban síntomas de clorosis (**Figura 56-c**).



**Figura 56:** Aspecto de los brotes tras el proceso de frigoconservación a 8 °C durante 12 meses (arriba) de las variedades: **(a)** 'Castellana'; **(b)** 'Villalonga' y **(c)** 'Blanqueta-11'. Abajo se muestra el aspecto de los brotes de las mismas variedades tras 12 semanas de recuperación en condiciones estándares de cultivo.

### III.3.2. Encapsulación

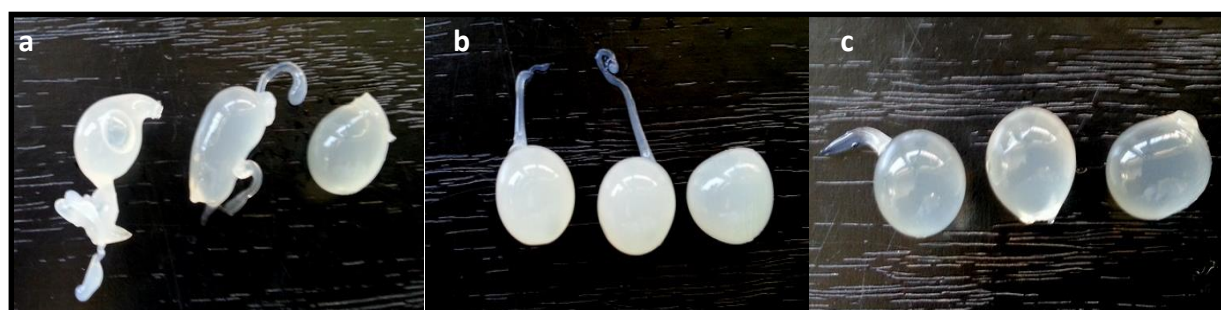
#### Experimento 1: Establecimiento del proceso de encapsulación

De las distintas condiciones testadas para la formación de las cápsulas (**Tabla 16**), sólo en las concentraciones de alginato de sodio comprendidas entre 4-5% se produjo la formación de cápsulas uniformes y suficientemente firmes. Por debajo de dicha concentración las cápsulas formadas eran muy frágiles y no presentaban uniformidad (**Figura 57**). Por encima del 5% las cápsulas eran demasiado viscosas e igualmente poco uniformes. Referente a la solución de polimerización, se descartó el empleo de 75 mM, por no provocar una correcta solidificación de las capsulas; y en cuanto a los tiempos de polimerización, los mejores resultados se obtuvieron con tiempos comprendidos entre 10-20 minutos (**Tabla 16**), ya que a los 30 minutos las capsulas se mostraron muy rígidas y duras (**Figura 57**).

**Tabla 16:** Efecto de la concentración de alginato, cloruro de calcio y tiempo de polimerización en la formación de cápsulas viables.

|              |     | 75mM  |       |       | 100mM |       |       | 150mM |       |       |
|--------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|              |     | 10min | 20min | 30min | 10min | 20min | 30min | 10min | 20min | 30min |
| Alginato (%) | 2.5 | X     | X     | X     | X     | X     | X     | X     | X     | X     |
|              | 3   | X     | X     | X     | X     | X     | X     | X     | X     | X     |
|              | 3.5 | X     | X     | X     | X     | X     | X     | X     | X     | X     |
|              | 4   | X     | X     | X     | √     | √     | X     | √     | √     | X     |
|              | 5   | X     | X     | X     | √     | √     | X     | √     | √     | X     |
|              | 6   | X     | X     | X     | X     | X     | X     | X     | X     | X     |

**X:** Cápsula no viable (inconsistencia o deformidad) **√:** Cápsula viable

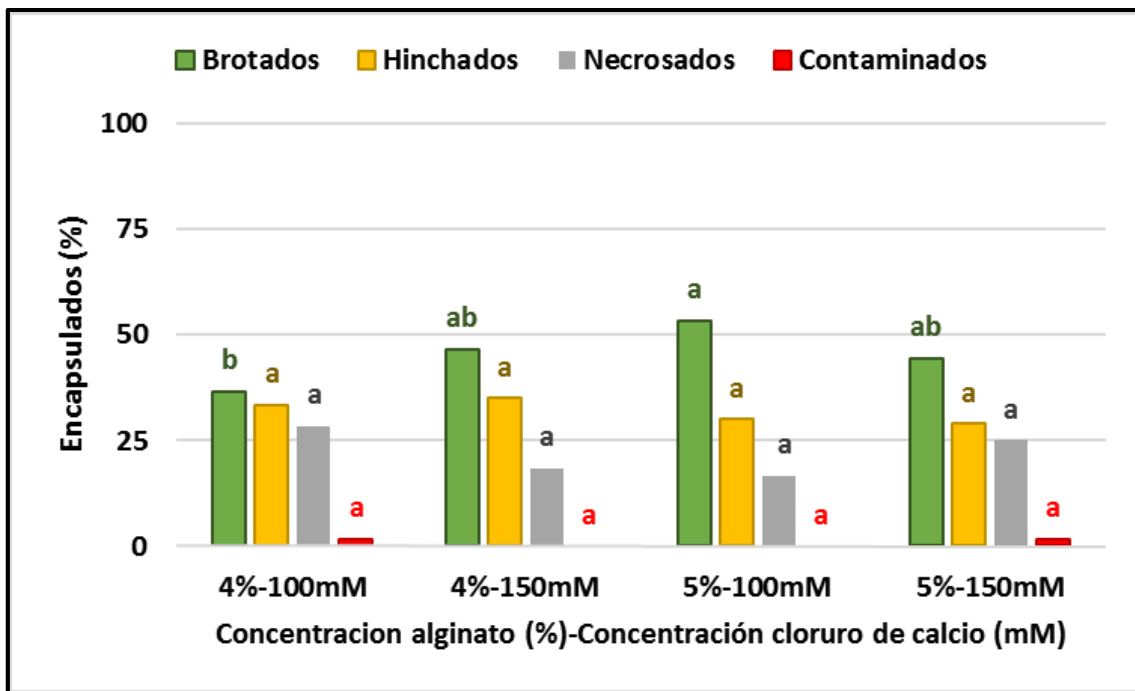


**Figura 57:** Aspecto de las cápsulas: **(a)** Cápsulas no viables (no uniformes); **(b)** Cápsulas no viables (rígidas y duras); **(c)** Cápsulas viables (uniformes y firmes).

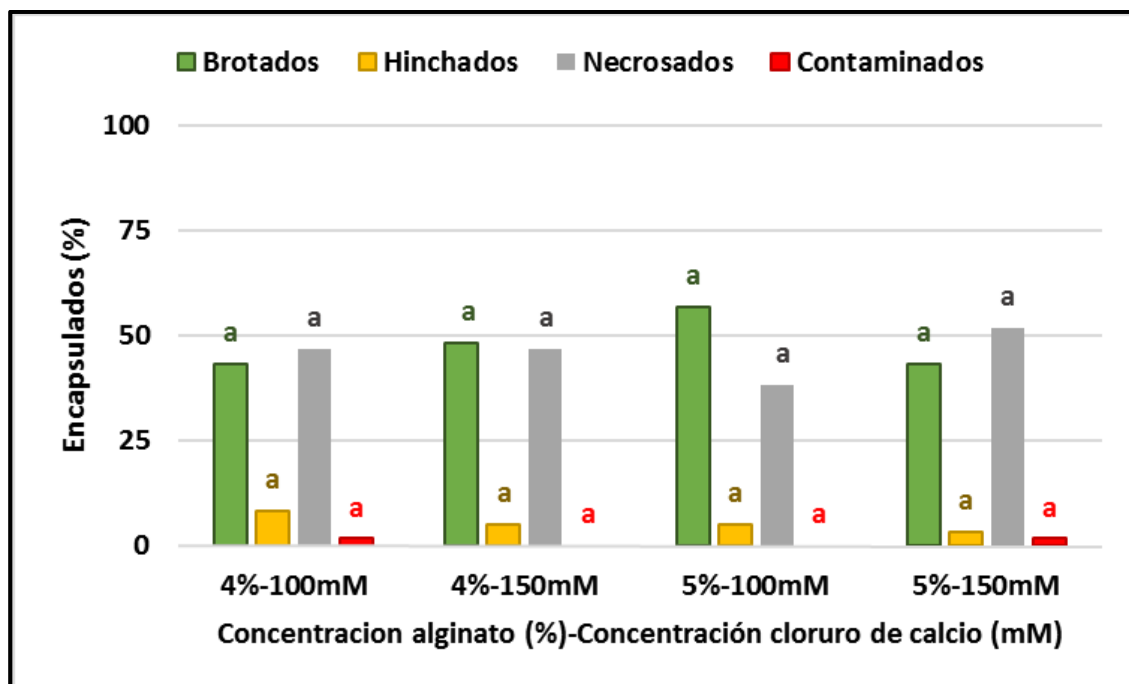
#### Experimento 2: Matriz de encapsulación, cápsula y brotación de los encapsulados

Los encapsulados, tras 4 semanas en condiciones estándares de cultivo, aparecían en distinta proporción brotados, hinchados o necrosados, dependiendo del tratamiento utilizado (**Figura 58**). Algunos encapsulados presentaron contaminación exógena por hongos, pero en porcentajes muy bajos (0.8%) (**Figura 58**), no observándose contaminación bacteriana exógena o endógena ninguna.

La brotación de los encapsulados osciló entre un 37% y un 53%, dependiendo del tratamiento (**Figura 58**). Solo se observó diferencias significativas en el tratamiento consistente en encapsular las secciones con una matriz de 5% de alginato y posterior polimerización en 100 mM de cloruro cálcico frente al tratamiento con un 4% de alginato en la matriz e idéntica polimerización (**Figura 58**). Destacar que la brotación máxima se alcanzaba a las 4 semanas. En todos los tratamientos se observó la existencia de encapsulados necrosados en un rango del 17% al 28%, sin diferencias significativas entre los tratamientos (**Figura 58**). Resultó llamativo el porcentaje relativamente alto de encapsulados hinchados, aquellos con yemas brotadas pero que no llegan a romper la cápsula, con 28% al 35%, sin diferencias significativas entre tratamientos (**Figura 58**). Sin embargo, estos encapsulados hinchados apenas brotaron tras 6 semanas en condiciones estándares de cultivo, con un 3% al 8% más de brotación según tratamiento, y la mayoría de estos encapsulados hinchados necrosaron con el paso del tiempo, con un 38%-52% de necrosis acumulada a las 6 semanas en los distintos tratamientos (**Figura 59**). Los encapsulados, una vez brotados, tenían buen aspecto y se desarrollaban correctamente tanto a 4 como a 6 semanas (**Figura 60**).



**Figura 58:** Efecto del alginato y del cloruro cálcico en la brotación y desarrollo de los encapsulados de olivo. Polimerización de 10 min. Datos tras 4 semanas de encapsulación en condiciones estándares de cultivo. En cada variable, columnas con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos de acuerdo con el test  $\chi^2$ .



**Figura 59:** Efecto del alginato y del cloruro cálcico en la brotación y desarrollo de los encapsulados de olivo. Tiempo de polimerización de 10 minutos. Datos tras 6 semanas de encapsulación en condiciones estándares de cultivo. En cada variable, columnas con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos de acuerdo con el test  $\chi^2$ .



**Figura 60:** Aspecto de los encapsulados de olivo en condiciones estándares de cultivo: **(a)** Encapsulado al inicio del ensayo; **(b)** Encapsulado brotado tras 4 semanas; **(c)** Encapsulado brotado tras 6 semanas.

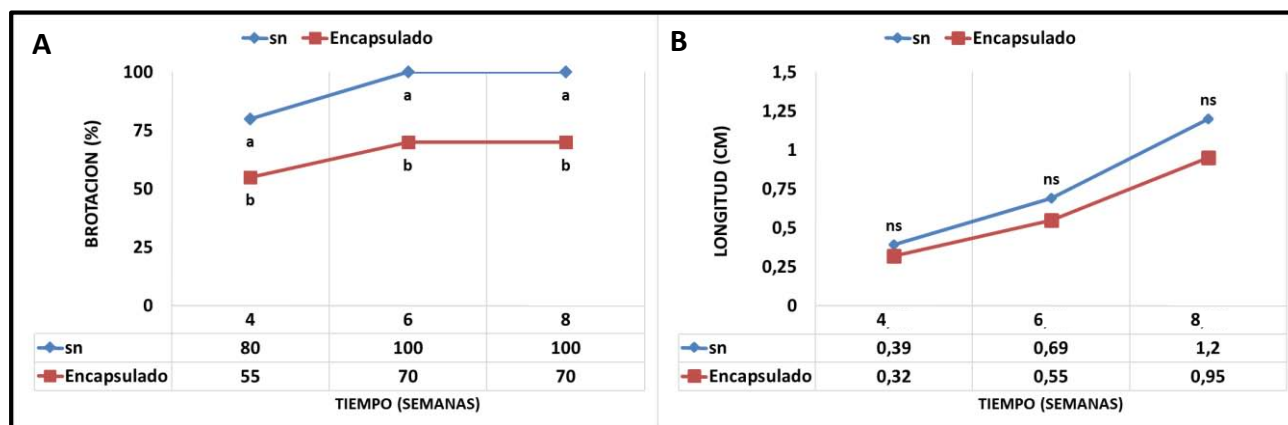
En base a los resultados obtenidos, los siguientes ensayos de encapsulación se realizaron con una matriz al 5% de alginato de sodio y una polimerización con una solución de cloruro de calcio 100 mM durante 10 minutos, que denominaremos de aquí en adelante como protocolo estándar de encapsulación.

### Experimento 3: Desarrollo de secciones nodales encapsuladas y sin encapsular

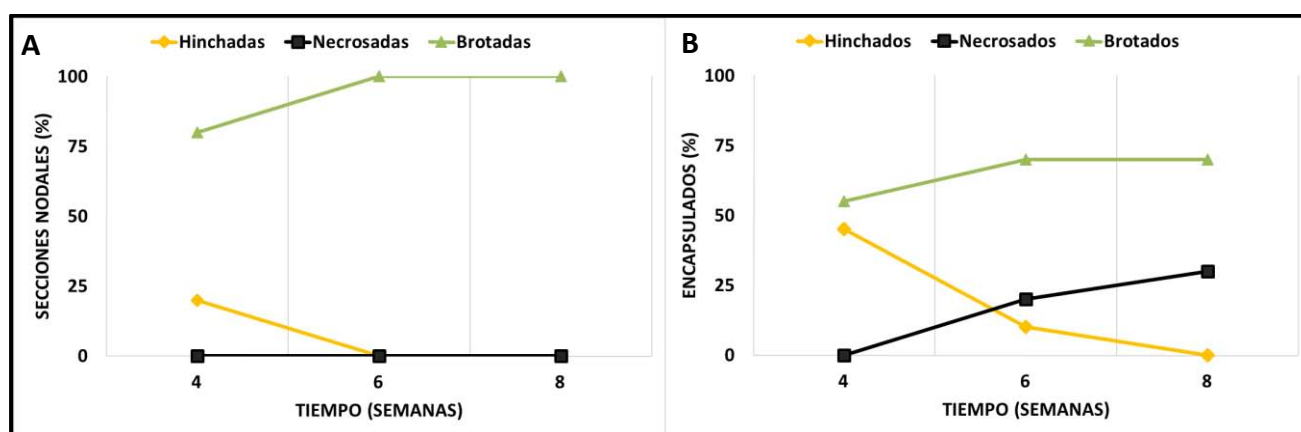
Las secciones nodales sin encapsular presentaban un 80% de brotación a las 4 semanas y un 100% de brotación a las 6 semanas, no observándose necrosis alguna. Mientras, en los encapsulados, el porcentaje de brotación fue siempre significativamente menor (55% y 70%) a las 4 y 6 semanas respectivamente (**Figura 61-A**). Además, se observaba que las secciones nodales que no brotaban y estaban hinchadas a las 4 semanas con el paso del tiempo si conseguían brotar todas (**Figura 62-A**), sin embargo, en los encapsulados sólo un reducido número de los encapsulados hinchados conseguían brotar con el tiempo (15%), los restantes necrosaban (**Figura 62-B**), así, se observó como el número de encapsulados hinchados disminuía progresivamente, casi en la misma proporción en la que aumentaban los encapsulados necrosados.

En cuanto a la longitud de los brotes formados, se pudo apreciar como a lo largo del tiempo esta iba en aumento no apreciándose diferencias significativas entre secciones nodales y encapsulados (**Figura 61-B**).





**Figura 61:** (A) Brotación y (B) longitud de los brotes en secciones nodales y encapsulados de olivo cultivados en medio RP durante 8 semanas en condiciones estándar de cultivo. Distinta letra entre tratamientos en (A) para un mismo tiempo indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con el test  $\chi^2$  y en (B) diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

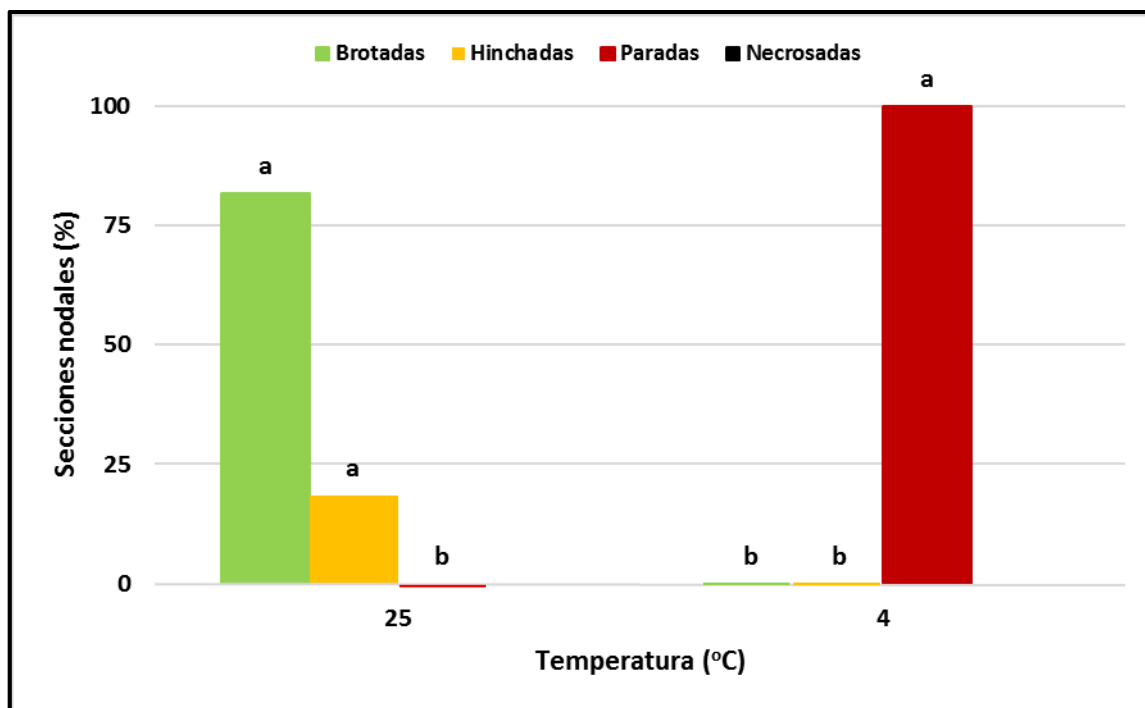


**Figura 62:** (A) Evolución de las secciones nodales y (B) evolución de los encapsulados brotados, hinchados y necrosados a lo largo de las 8 semanas de cultivo en medio RP en condiciones estándares.

## Experimento 4: Temperatura

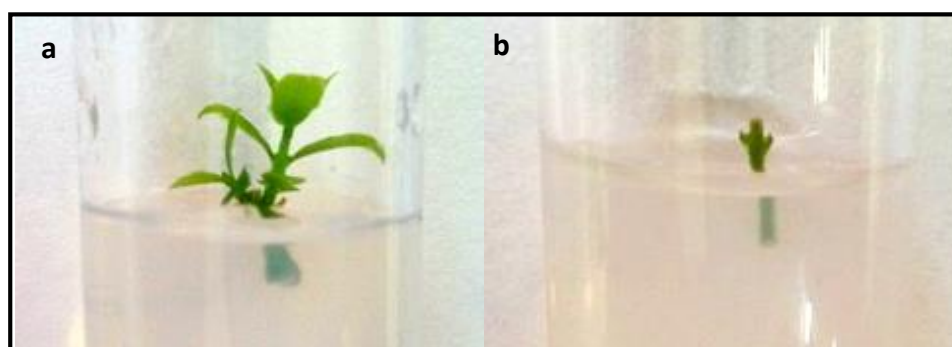
### *Experimento 4.1: Temperatura y desarrollo de las secciones nodales*

Al comparar los datos obtenidos de las secciones nodales cultivadas a 25 °C y a 4 °C, cabe destacar que mientras los explantos cultivados a 25 °C mayoritariamente brotaban (81.7%) o estaban hinchados (18.3%); los explantos cultivados a 4 °C estaban todos parados, sin ningún síntoma de crecimiento, pero tampoco deterioro (**Figura 63**).



**Figura 63:** Efecto de la temperatura sobre el desarrollo de las secciones nodales de olivo. Datos tras 4 semanas de tratamiento. Letras diferentes entre distintos tratamientos para un mismo parámetro indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) acorde con el test  $\chi^2$ . Cuando el porcentaje de alguno de los parámetros medidos fue cero las columnas correspondientes se representan gráficamente mediante una línea.

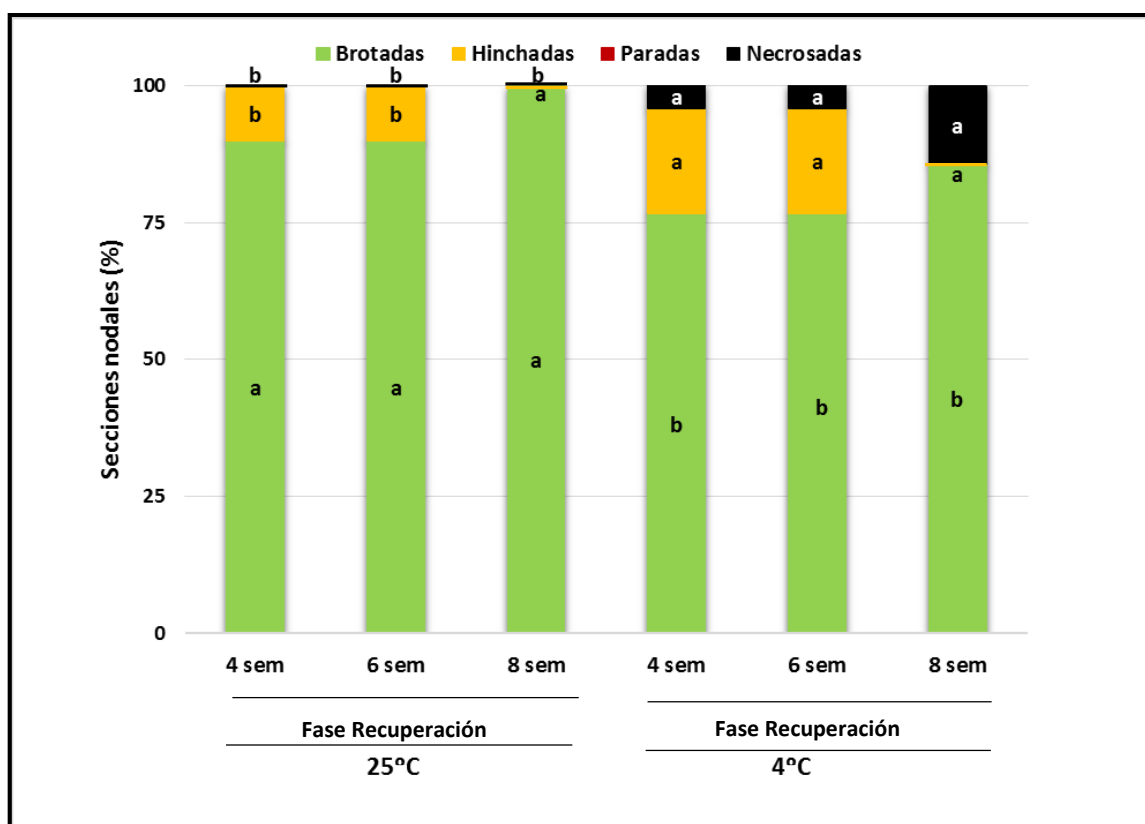
En cuanto al aspecto de los explantos, los que se mantuvieron a 4 °C mostraban el mismo aspecto tal cual fueron iniciados, mientras que los que estuvieron a 25 °C presentaban un crecimiento y desarrollo normal (**Figura 64**).



**Figura 64:** Aspecto de los explantos tras 4 semanas a (a) 25 °C y (b) 4 °C.

Una vez que los explantos que habían estado a 4 °C se pasaban a condiciones estándares de cultivo, se pudo observar que los explantos comenzaban a brotar (**Figura 65**). Así, a las 4 semanas de cultivo brotaban un 76%, existiendo un cierto número de explantos hinchados y otros que necrosaban. A las 8 semanas, los explantos pasaban de estar hinchados a brotar de forma

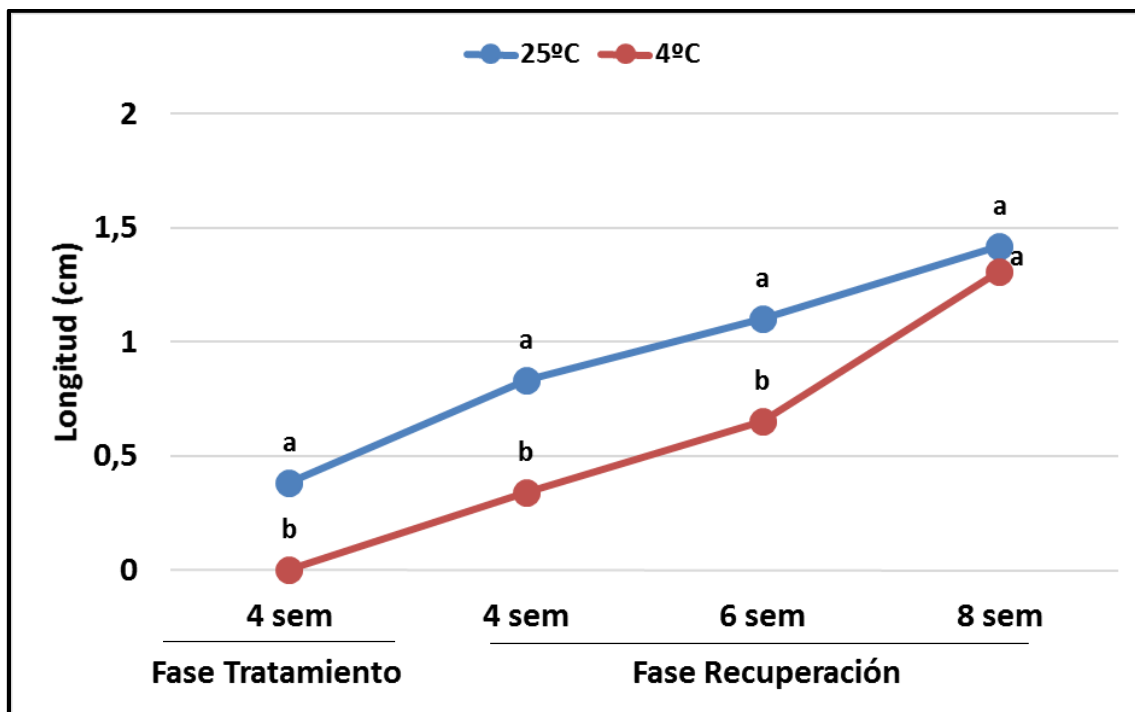
mayoritaria (85.6%), aunque este porcentaje era significativamente menor, que los que estuvieron incubado a 25 °C, los cuales a las 8 semanas ya brotaban el 100% (**Figura 65**). En cuanto a los explantos hinchados del tratamiento de 4 °C se observaba que mientras que los que estuvieron cultivados a 25 °C a medida que pasaba el tiempo, estos explantos pasaban a brotar, en el caso de los explantos tratados a 4 °C, la mitad de ellos brotaban y la otra mitad pasaban a necrosarse (**Figura 65**). Así, al finalizar el periodo de recuperación, mientras que para los explantos cultivados a 25 °C no se producía necrosis, esta era del 14.3% para los cultivados a 4 °C (**Figura 65**).



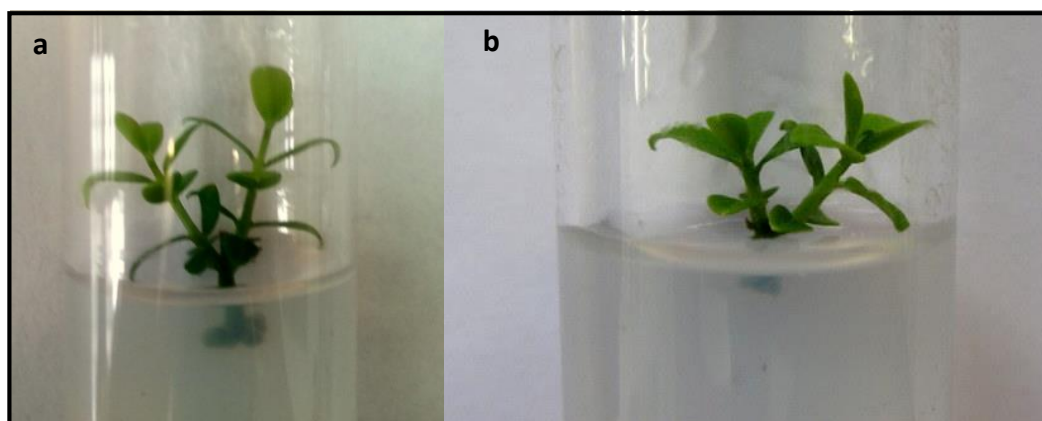
**Figura 65:** Efecto de la temperatura sobre el desarrollo de secciones nodales de olivo durante la fase de recuperación. Durante esta fase las secciones fueron mantenidas bajo condiciones estándares de cultivo. Para un mismo tiempo, distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada parámetro medido acorde al test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ). sem: semanas. Cuando el porcentaje de alguno de los parámetros medidos fue cero las columnas correspondientes se representan gráficamente mediante una línea.

Si analizamos la longitud de los brotes formados, podemos observar que tras la fase del tratamiento y durante las primeras 6 semanas de la recuperación, la longitud de los brotes cultivados a 4 °C era significativamente inferior a los cultivados a 25 °C, pero al finalizar las 8 semanas de recuperación, dicha diferencia dejó de ser significativa, aunque los brotes aún tenían

una longitud media inferior (**Figura 66**). En cuanto al aspecto de los explantos, no se apreciaban diferencias entre los tratamientos y ambos mostraban buen aspecto (**Figura 67**).



**Figura 66:** Efecto de la temperatura en la longitud de los brotes. Datos tras la fase de tratamiento (en la cual los explantos estuvieron cultivados a 25 °C y a 4 °C respectivamente) y tras la fase de recuperación, durante la cual todas las secciones estuvieron incubadas en condiciones estándares de cultivo. En cada fase y tiempo, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en la longitud de los brotes ( $p < 0.05$ ). Sem: semanas.

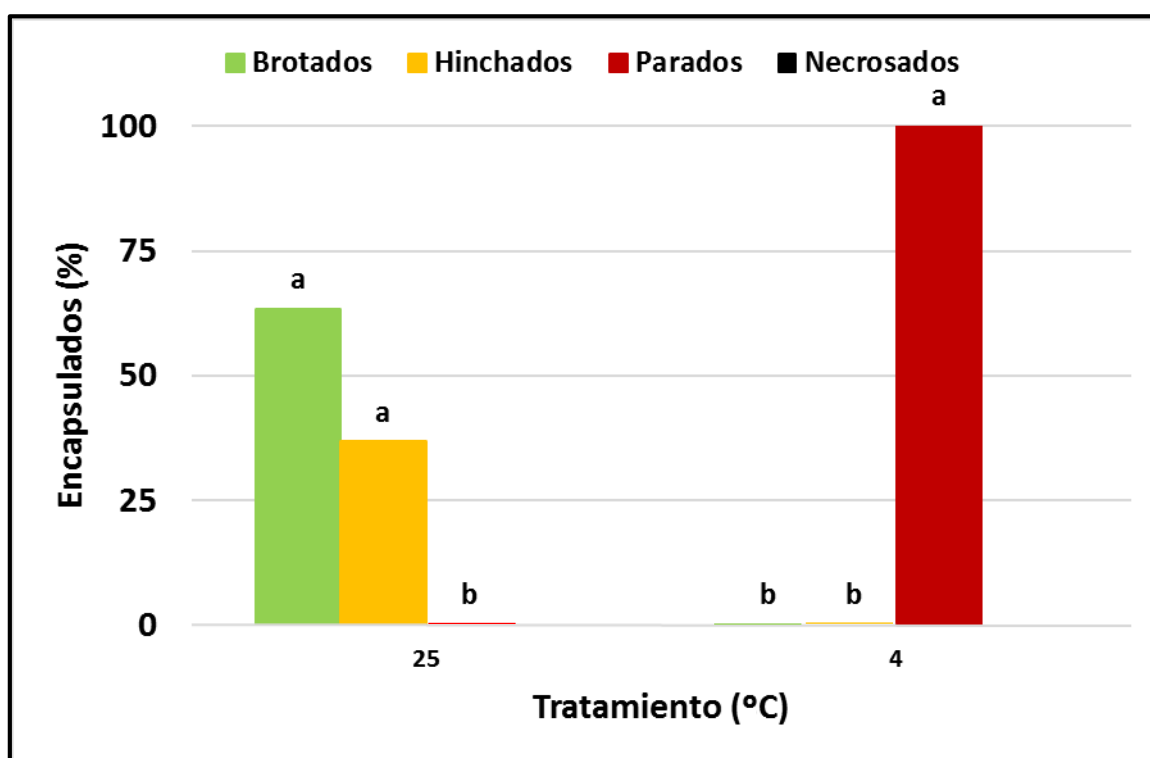


**Figura 67:** Aspecto de los explantos tras 8 semanas de recuperación: (a) Tras incubación a 25 °C y (b) a 4 °C durante 4 semanas.

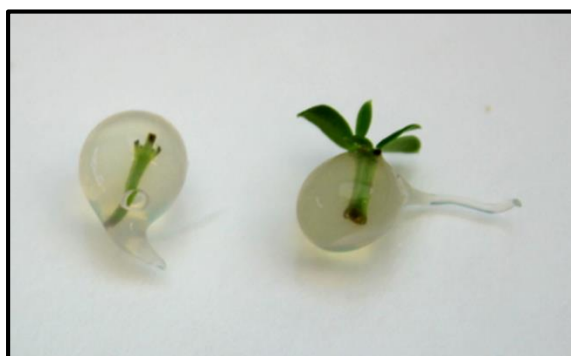
### Experimento 4.2: Temperatura, desarrollo y recuperación de los encapsulados

Una vez determinado el efecto de la temperatura sobre las secciones nodales, con este ensayo queríamos determinar si este efecto también se producía en los encapsulados.

Tras la fase de tratamiento, consistente en mantener los encapsulados durante 4 semanas a 25 °C o a 4 °C, en los encapsulados cultivados a 4 °C no se apreciaba ningún tipo de desarrollo y el 100% de ellos estaban parados. En los encapsulados cultivados a 25 °C, un 63.7% estaban brotados, y el restante 37.3% estaban hinchados (**Figura 68**). Todos los encapsulados presentaban un buen aspecto al finalizar la fase de tratamiento (**Figura 69**).



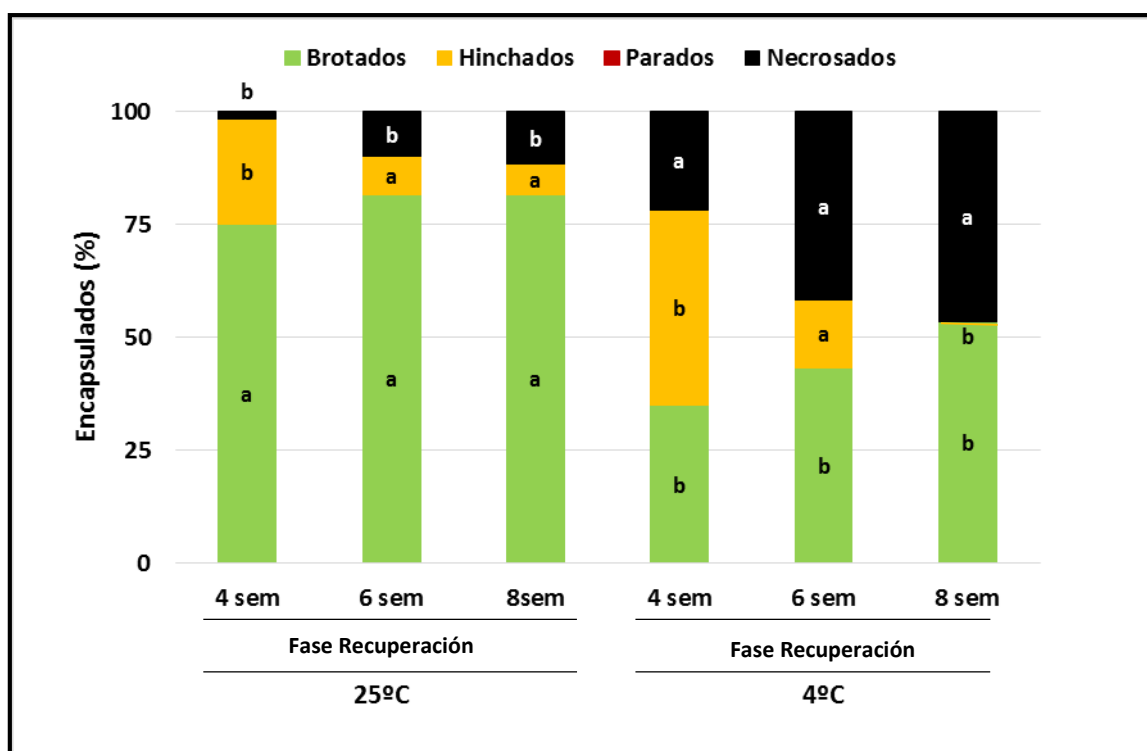
**Figura 68:** Efecto de la temperatura sobre el desarrollo de secciones nodales de olivo encapsuladas. Letras diferentes entre distintos tratamientos para un mismo parámetro indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) acorde con el test  $\chi^2$ . Cuando el porcentaje de alguno de los parámetros medidos fue cero las columnas correspondientes se representan gráficamente mediante una línea.



**Figura 69:** Aspecto de los encapsulados de olivo tras 4 semanas a 4 °C (izquierda) o a 25 °C (derecha).

En cuanto a la recuperación, se valoró tanto si se realizaba con las secciones encapsuladas como desencapsuladas.

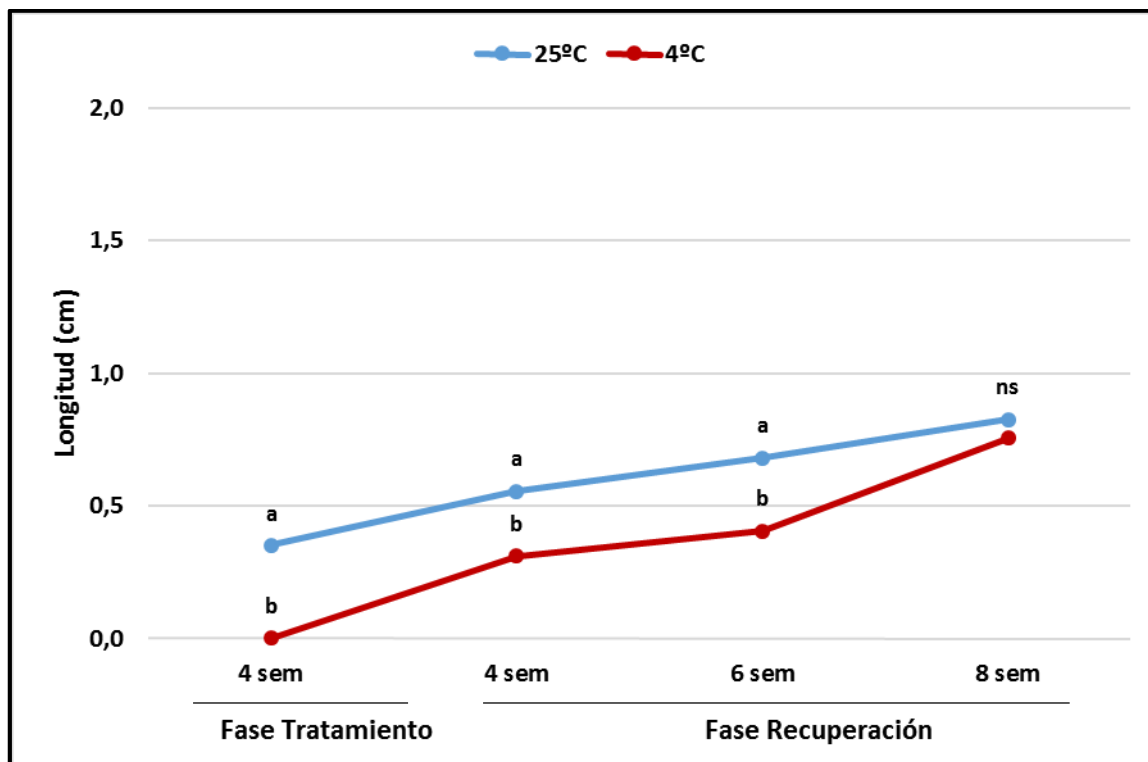
En cuanto a las secciones encapsuladas, una vez puestas en condiciones estándares de cultivo, se apreciaba que, tras 4 semanas, los encapsulados que estuvieron a 4 °C presentaban porcentajes de brotación significativamente menores (35%) a los que estuvieron a 25 °C (75%) (**Figura 70**). A las 8 semanas, la brotación de los primeros alcanzaba el 53.3% mientras que en los que estuvieron a 25 °C la brotación fue del 81.7%, esto se traduce en una pérdida de brotación de un 28.4%. Los datos de necrosis reflejaban la situación contraria y mientras que para los encapsulados cultivados a 4 °C fue del 46.7% a las 8 semanas, para los cultivados a 25 °C era del 11.7% (**Figura 70**).



**Figura 70:** Efecto de la temperatura sobre el posterior desarrollo en condiciones estándares de cultivo de secciones nodales de olivo encapsuladas en alginato. Para un mismo tiempo, distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada parámetro medido acorde al test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ). sem: semanas. Cuando el porcentaje de alguno de los parámetros medidos fue cero las columnas correspondientes se representan gráficamente mediante una línea.

En cuanto a la longitud de los brotes, aunque durante las primeras fases del ensayo mostraba diferencias significativas entre los encapsulados cultivados a 25 °C y 4 °C, a partir de la 8 semana de recuperación estas diferencias dejaron de ser significativas (**Figura 71**). En cuanto al aspecto de los encapsulados, aquellos que brotaban presentaban un aspecto bueno, y los que estaban parados,

aunque no mostraban síntomas de desarrollo, tampoco presentaban síntomas de deterioro (Figura 72)



**Figura 71:** Efecto de la temperatura sobre la longitud de los brotes de olivo. Datos tras la fase de tratamiento (en la cual los explantos estuvieron encapsulados y cultivados a 25 °C o 4 °C respectivamente) y tras la fase de recuperación (en la cual todos los explantos estuvieron encapsulados y cultivados bajo condiciones estándares). En cada fase y tiempo, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en la longitud de los brotes ( $p < 0.05$ ). sem: semanas.

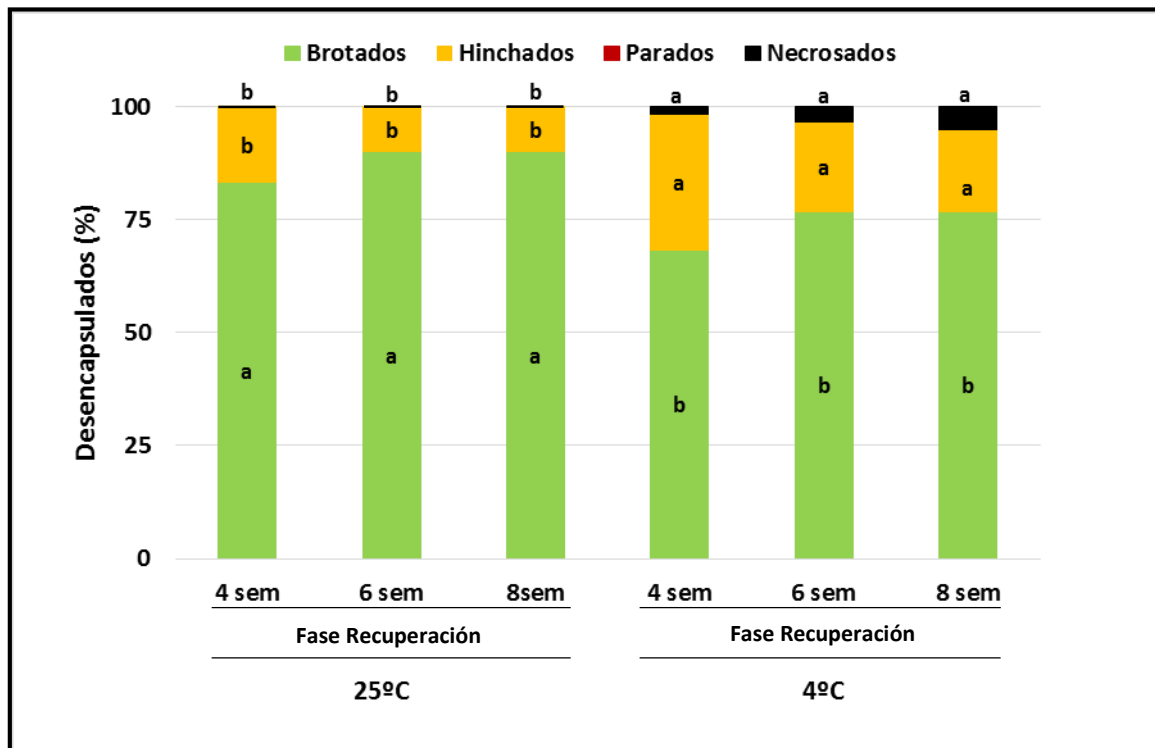


**Figura 72:** Aspecto de encapsulados de olivo tras 8 semanas de recuperación en condiciones estándares de crecimiento previamente incubados a 25 °C (izquierda) o a 4 °C (derecha) durante 4 semanas

En cuanto a la recuperación de las secciones desencapsuladas, la brotación mostraba diferencias significativas, 90% y 76.7%, para encapsulados cultivados a 25 °C y 4 °C respectivamente (**Figura 73**), pero si se aprecia una reducción del impacto de la cápsula, puesto que la pérdida de brotación entre los explantos cultivados a 25 °C y los de 4 °C es de un 13.3% (**Figura 73**), mientras que en el ensayo anterior, con los explantos recuperándose encapsulados la diferencia alcanzaba el 28.4% (**Figura 70**). Esto también se aprecia, fundamentalmente, en el porcentaje de necrosis, que para las secciones desencapsuladas que estuvieron encapsuladas y mantenidas a 25 °C pasa a ser 0%, y para las que estuvieron a 4 °C fue del 5% al finalizar el ensayo (**Figura 73**).

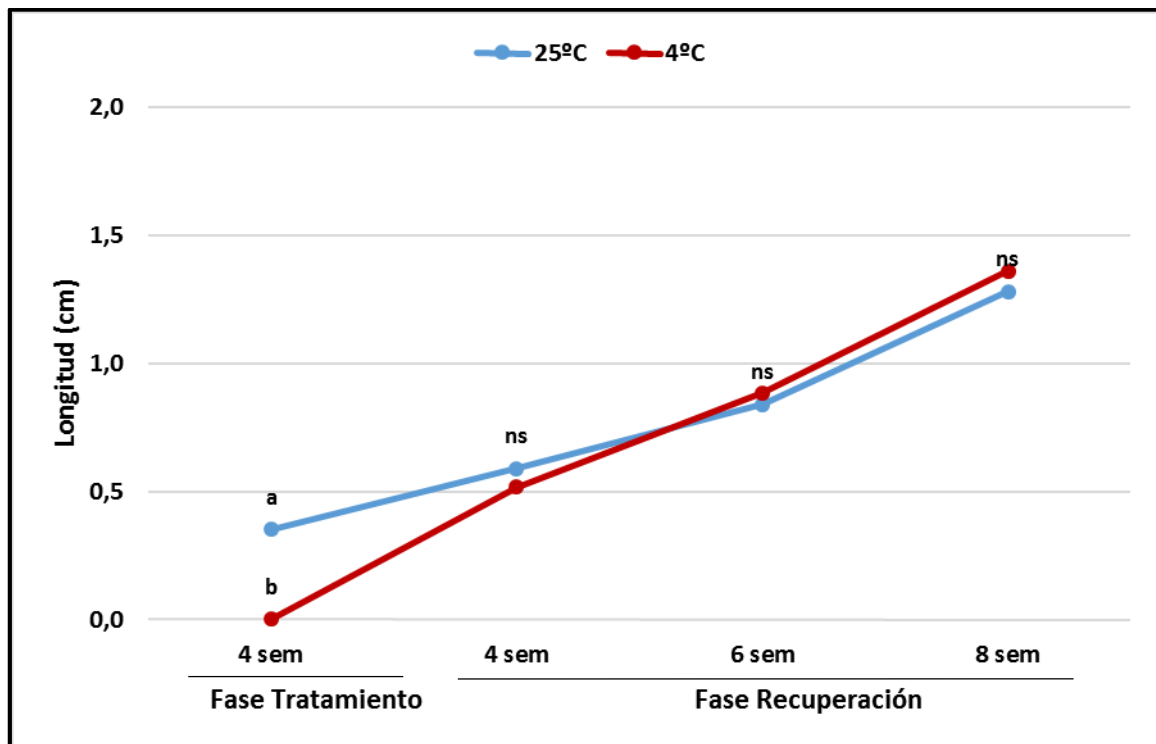
En cuanto a la longitud de los brotes formados, no se aprecian diferencias significativas entre los explantos incubados a 25 °C o a 4 °C y posteriormente desencapsulados y mantenidos en condiciones estándares de cultivo, ni a las 4 ni a las 6 u 8 semanas (**Figura 74**).

En cuanto al aspecto, tampoco se observaron diferencias entre los explantos provenientes de los distintos tratamientos, siendo el aspecto en ambos casos bueno (**Figura 75**).



**Figura 73:** Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el desarrollo de secciones nodales de olivo desencapsuladas en alginate durante la fase de recuperación bajo condiciones estándares de cultivo. Para un mismo tiempo, distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada parámetro medido acorde al test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ). Cuando el porcentaje de alguno de los parámetros medidos fue cero las columnas correspondientes se representan gráficamente mediante una línea.





**Figura 74:** Efecto de la temperatura sobre la longitud de los brotes de olivo. Datos tras la fase de tratamiento (en la cual los explantos estuvieron encapsulados y cultivados a 25 °C y 4 °C respectivamente) y tras la fase de recuperación (en la cual todos los explantos estuvieron desencapsulados y cultivados bajo condiciones estándares). En cada fase y tiempo, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en la longitud de los brotes ( $p < 0.05$ ). sem: semanas.



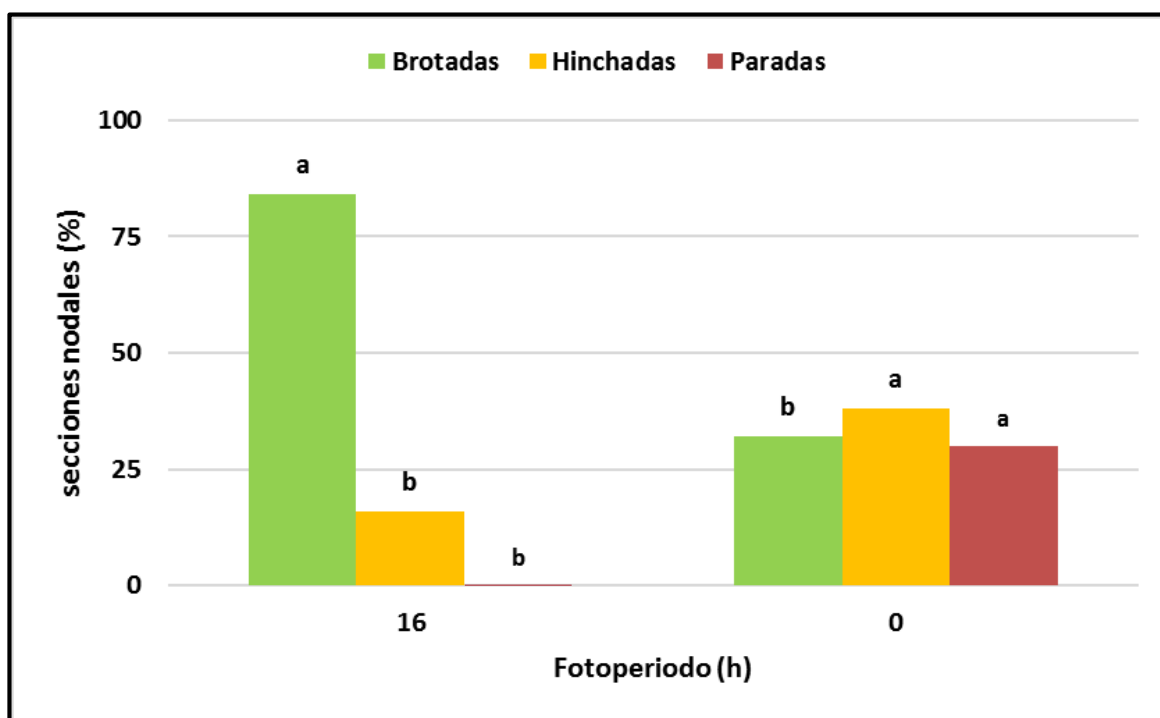
**Figura 75:** Aspecto de los explantos de olivo que estuvieron previamente incubados a 25 °C (a) y 4 °C (b) tras 8 semanas de recuperación desencapsulados.

Experimento 5: Fotoperiodo

*Experimento 5.1: Fotoperiodo y desarrollo de las secciones nodales*

Se observó que el fotoperiodo provocaba cambios en el desarrollo de los explantos. Así, con un fotoperiodo de 16 horas la brotación fue del 84%, mientras que bajaba a un 32% con fotoperiodo de 0 horas (oscuridad). Además, se observaba un mayor número de explantos hinchados en oscuridad, más del doble, pasando de un 16% con 16 horas de luz a un 38% en oscuridad. En cuanto a los explantos parados, en el tratamiento con 16 horas de luz no se observaban, pero en oscuridad alcanzaban el 30% (**Figura 76**). En ninguno de los fotoperiodos testados se observó necrosis en los explantos.

La longitud de los brotes formados también disminuía significativamente en los explantos incubados con fotoperiodo de 0 horas (**Figura 79**).



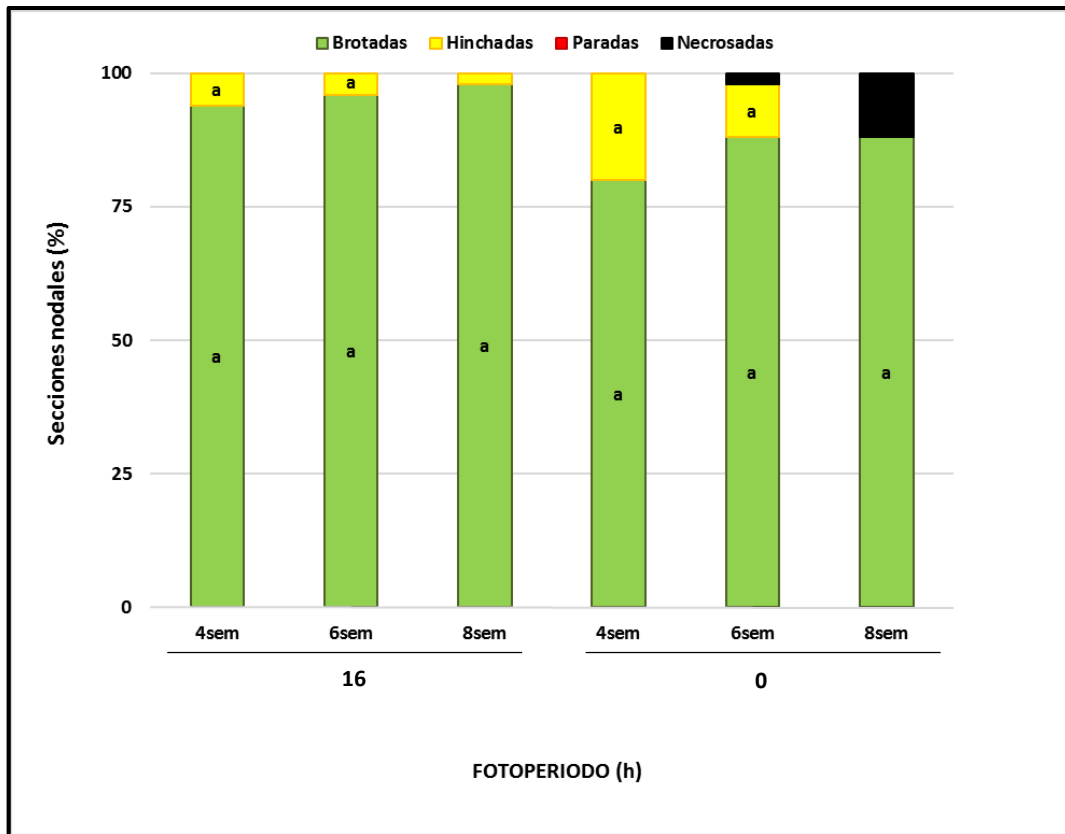
**Figura 76:** Efecto del fotoperiodo sobre el desarrollo de las secciones nodales de olivo. Datos tras 4 semanas de tratamiento. Letras diferentes entre distintos tratamientos para un mismo parámetro indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) acorde al test  $\chi^2$ . Cuando el porcentaje de alguno de los parámetros medidos fue cero las columnas correspondientes se representan gráficamente mediante una línea.

Las secciones nodales presentaron un buen aspecto y desarrollo, con la salvedad de que las secciones que brotaban en oscuridad se encontraban etioladas (**Figura 77**).

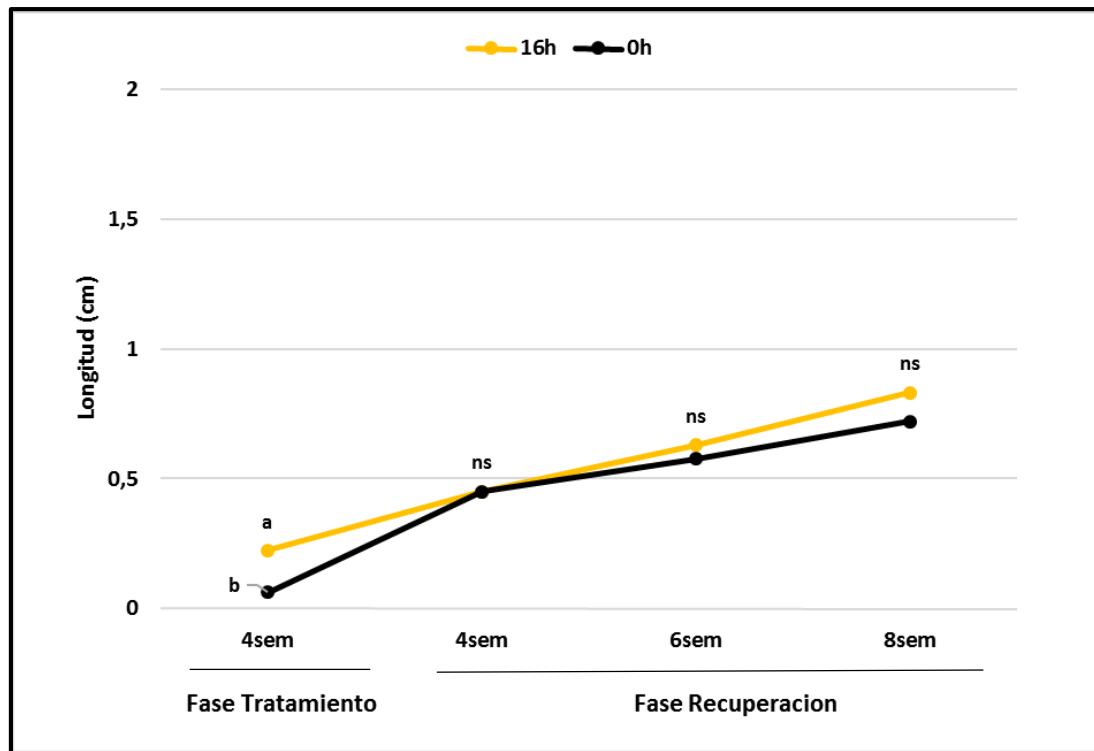
Una vez las secciones nodales, tanto los que estuvieron con fotoperiodo de 16h de luz como los que estuvieron en oscuridad, se dejaron hasta 8 semanas más en condiciones estándares de cultivo, la brotación se recuperó en aquellas que estuvieron en oscuridad, que ya no mostraban diferencias significativas entre tratamientos, 98% en 16h de luz y 88% en oscuridad (**Figura 78**). Las secciones que estuvieron en oscuridad no se recuperaron del todo, ya que parte de las secciones que habían permanecido hinchadas en oscuridad no llegaron a brotar cuando se pasaron a las condiciones estándares de cultivo, y se necrosaron. Mientras las secciones que estuvieron en 16h de luz siguieron creciendo y desarrollándose de forma correcta, observándose un bajo porcentaje de secciones hinchadas y nulo de secciones necrosadas (**Figura 78**). Si nos fijamos en la longitud de los brotes formados, podemos observar que los que estuvieron 4 semanas en oscuridad, presentaron una menor longitud durante la fase del tratamiento, pero durante la fase de recuperación, la diferencia de longitud se hizo menor, dejando de ser estadísticamente significativa (**Figura 79**). En cuanto al aspecto de los explantos, estos mostraban buen aspecto, sin encontrarse diferencias visibles a simple vista entre los distintos tratamientos (**Figura 80**).



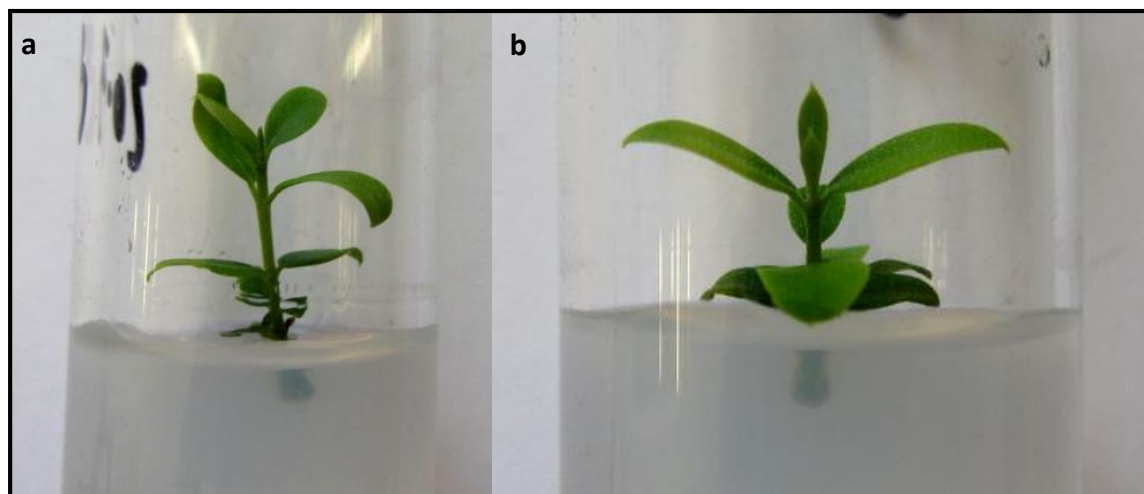
**Figura 77:** (a) Aspecto de las secciones nodales de olivo tras 4 semanas incubadas con fotoperiodo de 16 horas; (b) secciones nodales paradas tras 4 semanas incubadas con fotoperiodo de 0 horas; (c) sección nodal brotada tras 4 semanas incubada con fotoperiodo de 0 horas.



**Figura 78:** Efecto del fotoperiodo en el desarrollo de secciones nodales de olivo durante la fase de recuperación en condiciones estándares de cultivo. Para un mismo tiempo de recuperación, barras con letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con el test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).



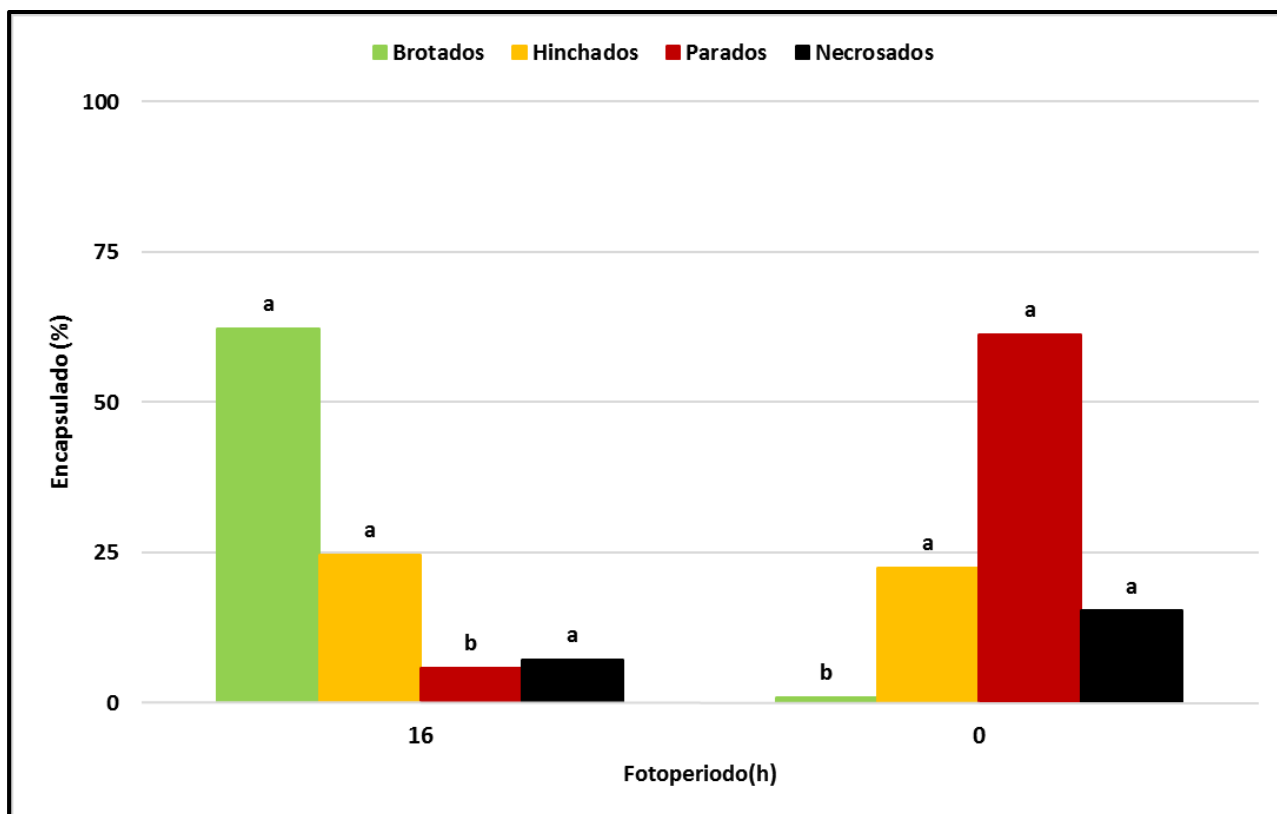
**Figura 79:** Efecto del fotoperiodo sobre la longitud de los brotes de olivo. Datos tras la fase de tratamiento y tras la fase de recuperación. Para cada fase y tiempo, valores medios con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).



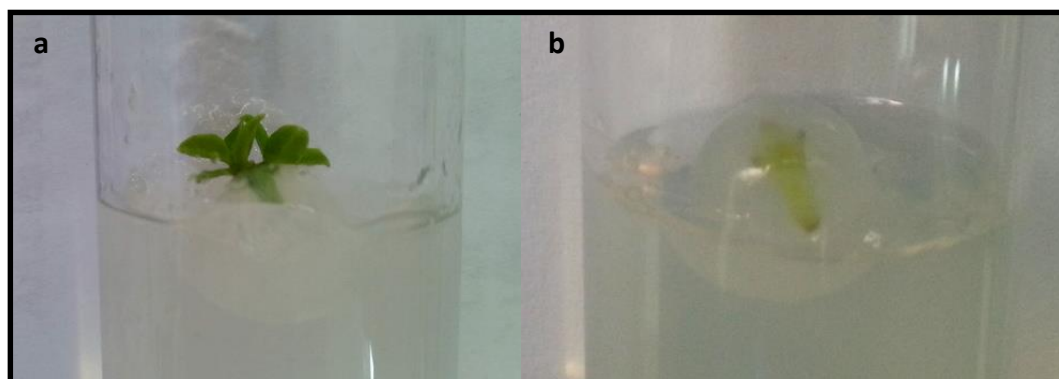
**Figura 80:** Aspecto de las secciones nodales de olivo tras 8 semanas de recuperación en condiciones estándares de cultivo: **(a)** secciones provenientes del tratamiento con fotoperiodo de 16 horas; **(b)** secciones nodales procedentes del tratamiento con fotoperiodo de 0 horas.

#### Experimento 5.2: Fotoperiodo, desarrollo y recuperación de los encapsulados

Al analizar el efecto del fotoperiodo sobre los encapsulados, lo más llamativo fue la práctica ausencia de brotación (0.85%) en los encapsulados incubados en oscuridad, respecto a los encapsulados que estuvieron con un fotoperiodo de 16 horas (62.33%). Por el contrario, la mayoría de los encapsulados incubados en oscuridad se encontraban parados a las 4 semanas de tratamiento, 61.36%, frente a un 5.83% en los encapsulados que se mantuvieron con 16 horas de luz. Para el resto de parámetros (encapsulados hinchados o necrosados), no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos (**Figura 81**). En cuanto al aspecto de los encapsulados, mientras los que se incubaron en fotoperiodo de 16 horas mostraban un buen aspecto, los que se incubaron en oscuridad mostraban cierta pérdida de color (**Figura 82**).



**Figura 81:** Efecto del fotoperiodo sobre el desarrollo de los encapsulados de olivo, tras 4 semanas de tratamiento. Para un mismo tipo de encapsulado, columnas con letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos acorde al test  $\chi^2$ .

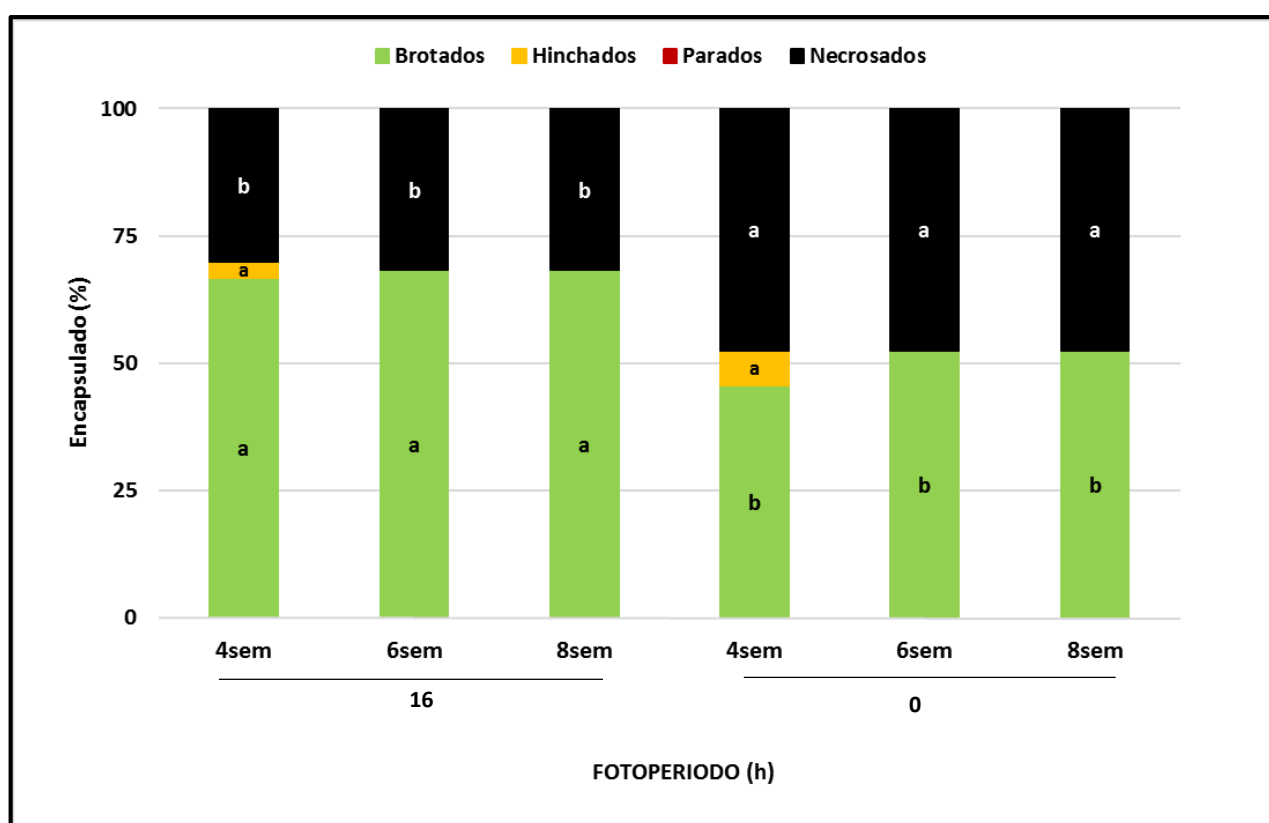


**Figura 82:** Aspecto de los encapsulados de olivo tras 4 semanas incubados con: **(a)** fotoperiodo de 16 horas; **(b)** fotoperiodo de 0 horas.

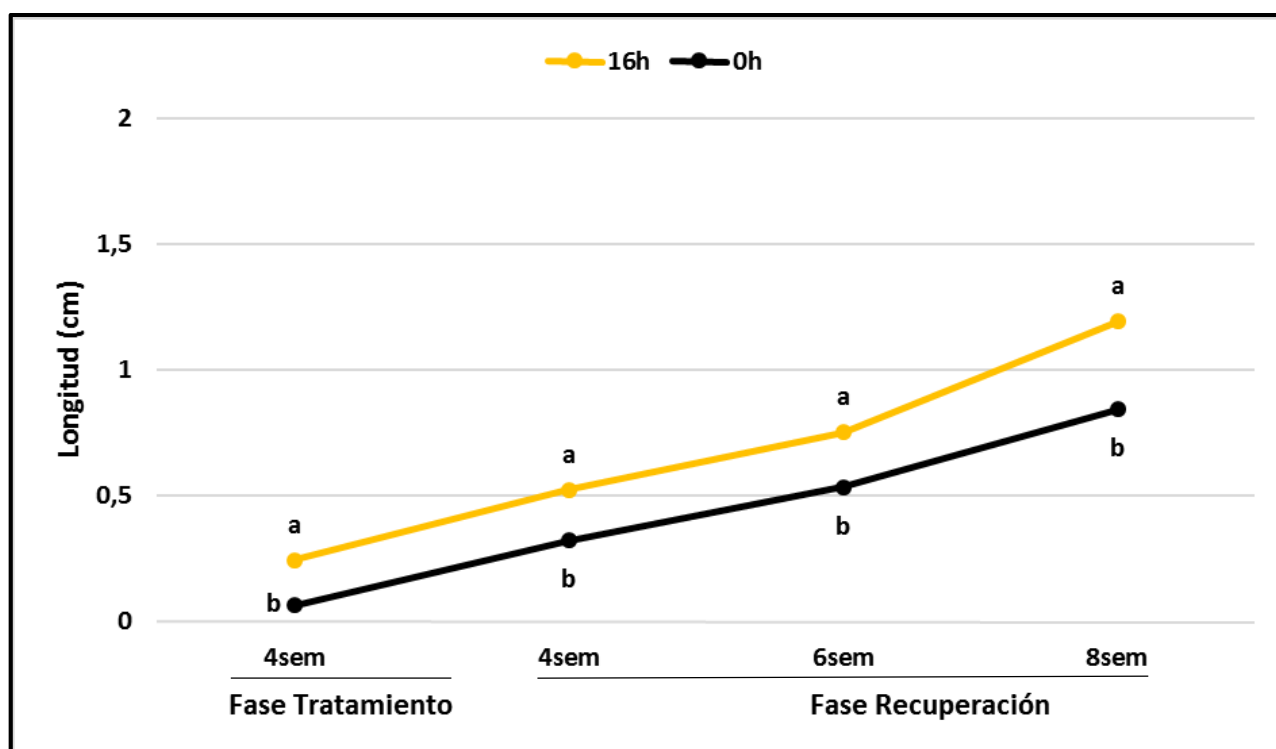
En cuanto a la fase de recuperación, se valoró dos posibilidades, una primera en la que se dejaba a las secciones nodales encapsuladas y otra en que se procedió a desencapsularlas.

En el primero de los casos, tras finalizar la fase de recuperación, se observó que la brotación en oscuridad (52.5%) era menor significativamente a la brotación en 16 horas luz (78.3%), produciéndose una disminución del 25.8% (**Figura 83**). En cuanto al resto de encapsulados, todos

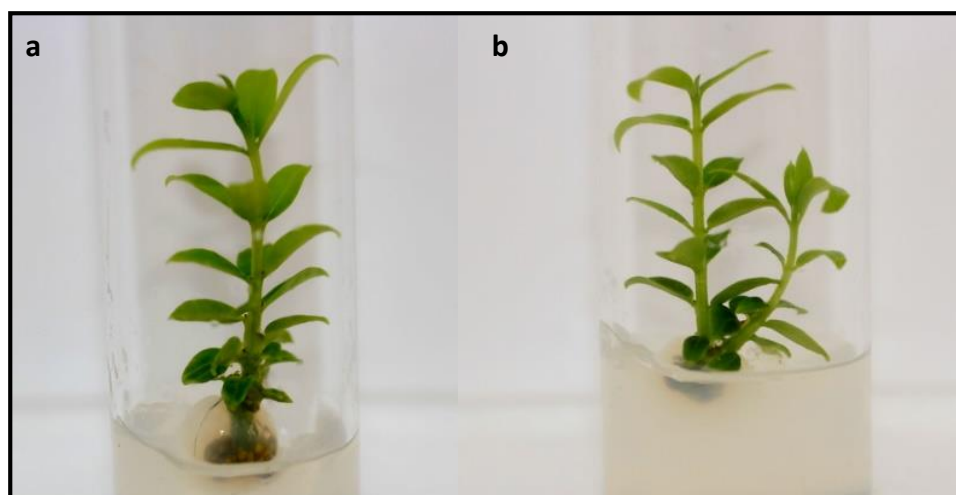
los que no brotan necrosan, por lo tanto, durante la recuperación no quedan encapsulados hinchados ni parados. Sin embargo, la necrosis fue mayor significativamente en los encapsulados que estuvieron en oscuridad (**Figura 83**). En cuanto a la longitud de los brotes, la diferencia existente es significativa entre los que estuvieron en oscuridad (0.84 cm) y los que estuvieron con fotoperiodo de 16 horas (1.19 cm) (**Figura 84**). El aspecto de los explantos fue muy bueno en los que venían del tratamiento con fotoperiodo de 16 horas, mientras que los que estuvieron con fotoperiodo de 0 horas mostraban buen crecimiento y desarrollo, pero mantenían cierto aspecto clorótico (**Figura 85**).



**Figura 83:** Efecto del fotoperiodo sobre el desarrollo de encapsulados durante las 8 semanas de la fase de recuperación, durante la cual la sn estuvieron encapsuladas y cultivadas bajo condiciones estándar de crecimiento. Para un mismo tiempo y variable distintas letras indican diferencias significativas acorde al test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).



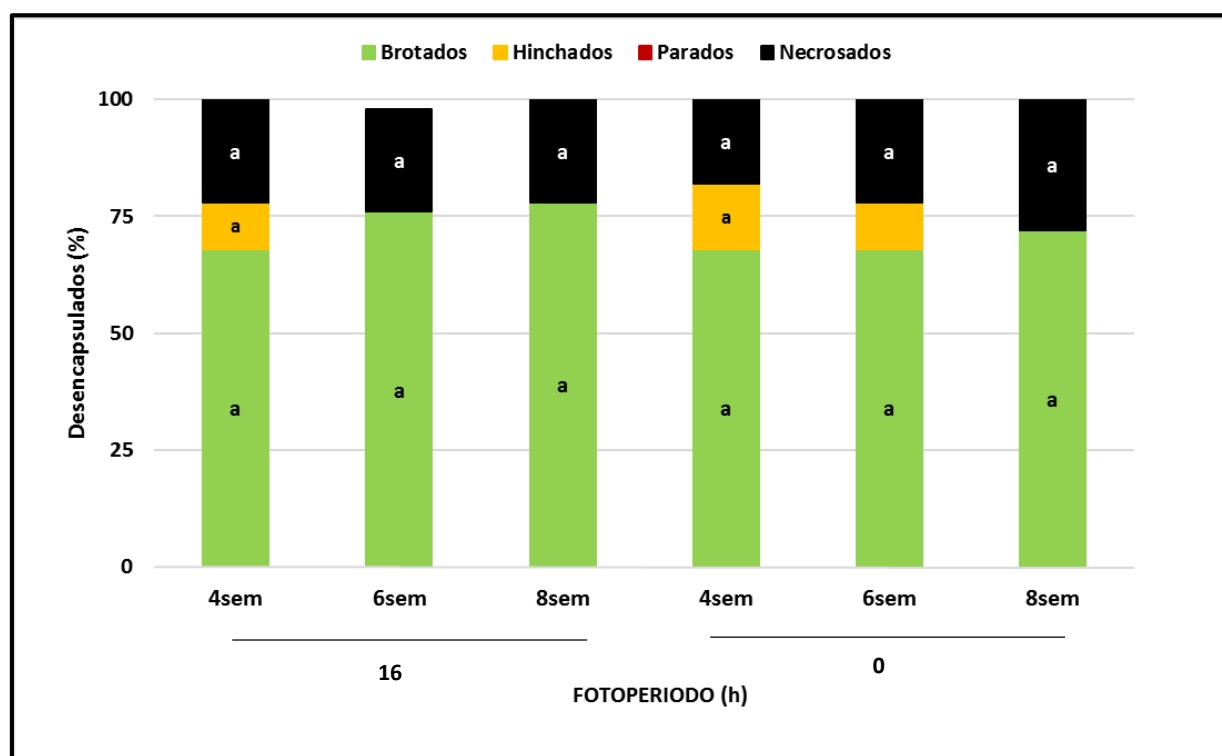
**Figura 84:** Efecto del fotoperiodo sobre la longitud de los brotes de olivo tras la fase de tratamiento (en la cual los explantos estuvieron encapsulados y cultivados a fotoperiodo 16h y 0h respectivamente) y tras la fase de recuperación (en la cual todos los explantos estuvieron encapsulados y cultivados bajo condiciones estándar). Las letras comparan los distintos tratamientos para un mismo tiempo. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 85:** Aspecto de las secciones nodales desencapsuladas y cultivadas en condiciones estándares de cultivo tras: (a) fotoperiodo de 16 horas y (b) fotoperiodo 0 horas.

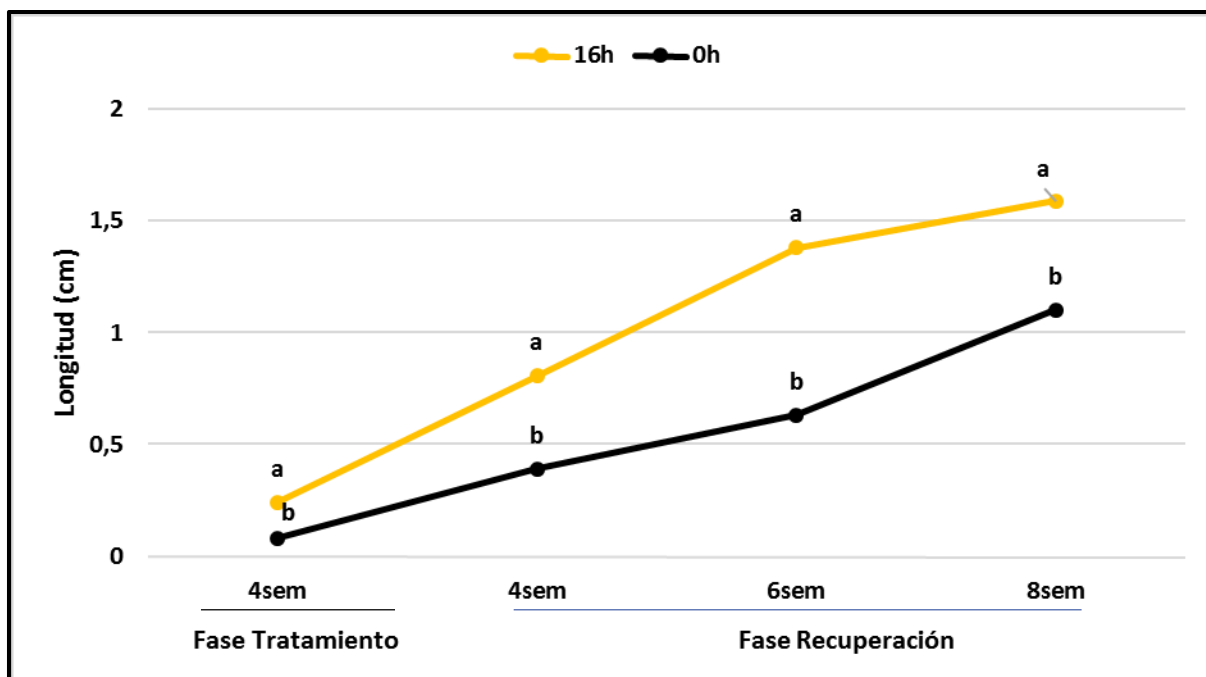


También se analizó la recuperación de los explantos cuando estos fueron desencapsulados. Pero en este caso no se apreciaron diferencias significativas entre tratamientos de fotoperiodo ni en cuanto a la brotación (78% en 16 horas luz y 72% en oscuridad) ni para el resto de parámetros medidos (**Figura 86**).

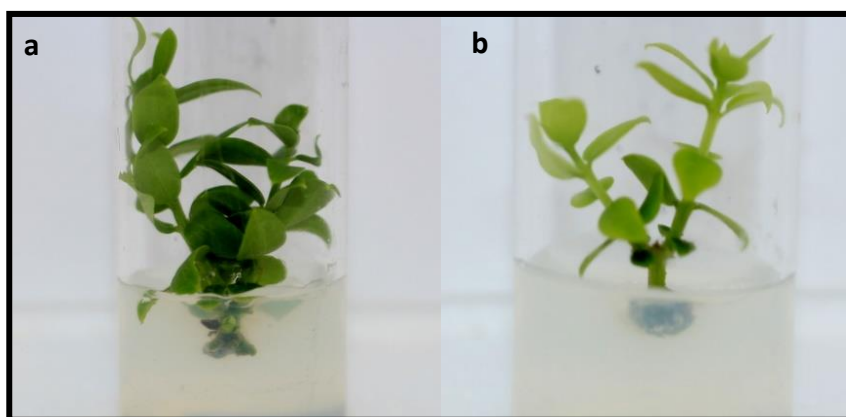


**Figura 86:** Efecto del fotoperiodo y el tiempo de cultivo sobre el desarrollo de las secciones nodales de olivo desencapsuladas durante la fase de recuperación. Durante esta fase los explantos fueron cultivados bajo condiciones estándar de crecimiento. Las letras comparan distintos tratamientos y tipos de explanto para un mismo tiempo de recuperación. Distintas letras indican diferencias significativas acorde al test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).

En cuanto a la longitud de los brotes, a pesar de que los encapsulados que se mantuvieron en oscuridad, una vez desencapsulados, mostraban un crecimiento y desarrollo totalmente normal, sí que se observaron diferencias significativas con respecto al fotoperiodo de 16 horas (**Figura 87**). Esto es debido a que, durante la fase de tratamiento, los que estuvieron con fotoperiodo de 0 horas ninguno había conseguido brotar, con lo cual durante la fase de recuperación su situación de partida era desfavorable, puesto que los explantos tratados con fotoperiodo de 16 horas ya más del 60% habían brotado antes de entrar en la fase de recuperación. En cuanto al aspecto, los encapsulados mostraban buen aspecto y crecimiento, sin embargo, aquellos encapsulados que estuvieron con fotoperiodo de 0 horas, una vez desencapsulados y puestos en condiciones estándares de crecimiento, mostraban clorosis en las hojas (**Figura 88**).

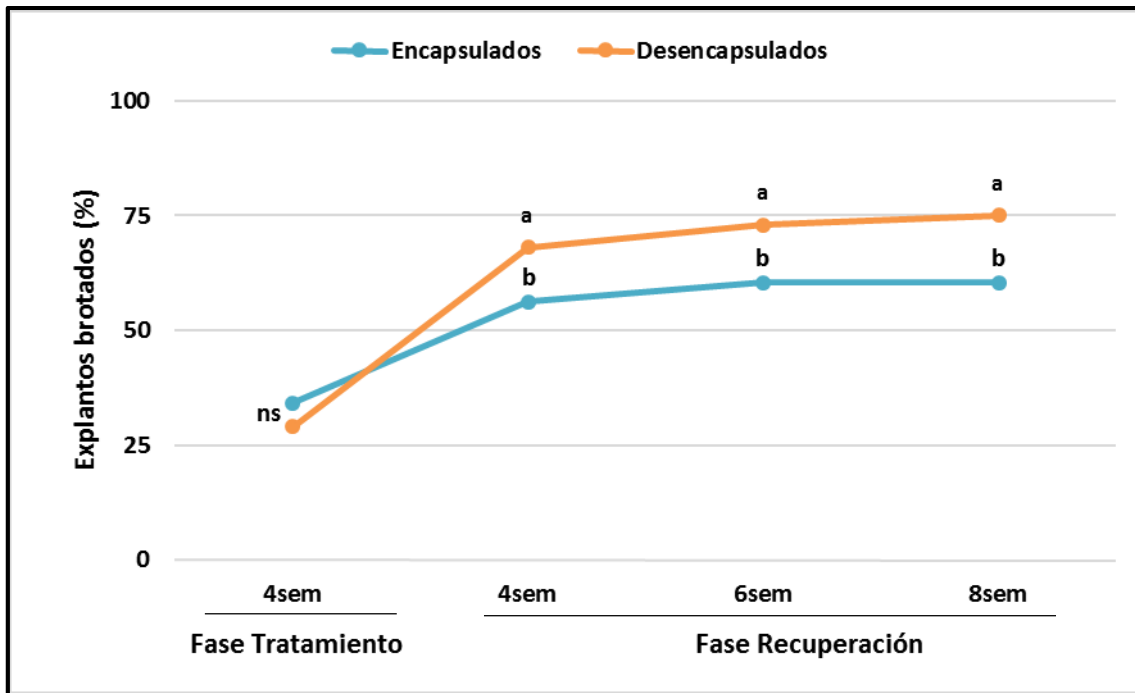


**Figura 87:** Efecto del fotoperiodo y el tiempo de cultivo sobre la longitud de los brotes de olivo formados. Datos tras la fase de tratamiento (en la cual los explantos estuvieron encapsulados y cultivados a fotoperiodo 16h y 0h respectivamente) y tras la fase de recuperación (en la cual todos los explantos estuvieron desencapsulados y cultivados bajo condiciones estándar) Las letras comparan los distintos tratamientos para un mismo tiempo. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

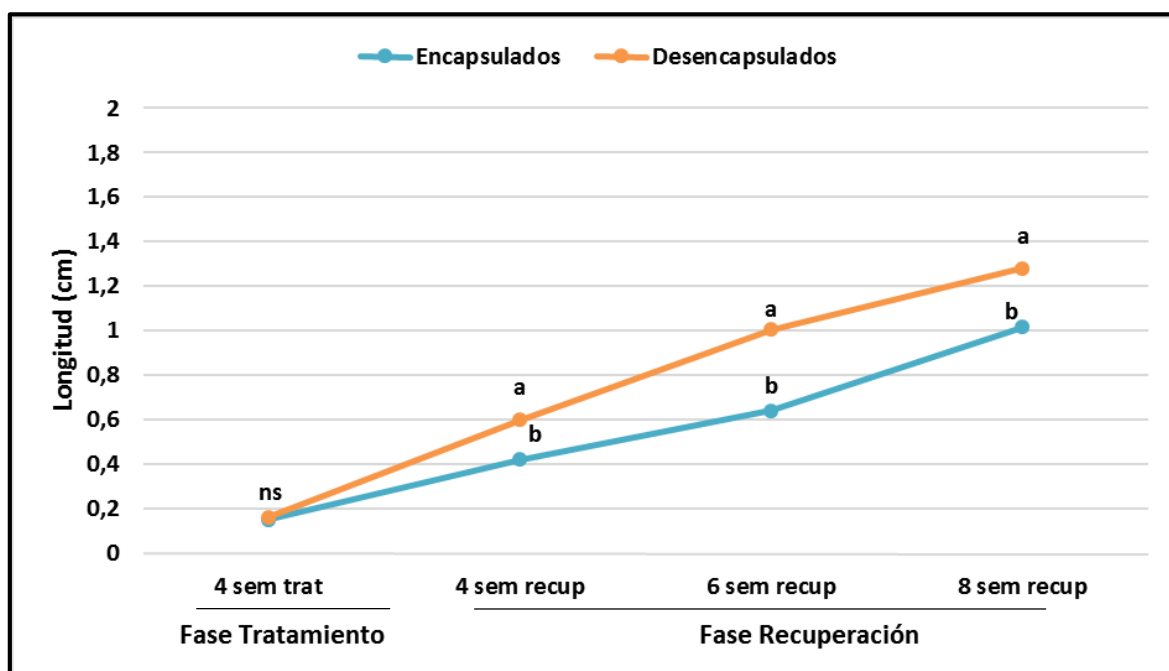


**Figura 88:** Aspecto de las secciones nodales de olivo desencapsuladas tras 8 semanas en condiciones estándares de cultivo, que habían estado encapsuladas previamente durante 4 semanas y bajo fotoperiodo de 16 horas (a) o fotoperiodo de 0 horas (b).

Si comparamos los datos obtenidos tanto de brotación (**Figura 89**) como de la longitud de los brotes (**Figura 90**) entre los explantos según el tipo de recuperación, sin tener en cuenta el fotoperiodo empleado, se observa que, cuando se desencapsulaban las secciones, los parámetros estudiados (brotación y longitud de los brotes) son significativamente mayores.



**Figura 89:** Efecto del tipo de recuperación en la brotación de los explantos de olivo tras la fase de tratamiento (en la cual los explantos estuvieron encapsulados a fotoperiodo 16h y 0h respectivamente) y tras la fase de recuperación, en la cual todos los explantos fueron cultivados bajo condiciones estándar. Las letras comparan los distintos tratamientos para un mismo tiempo. Distintas letras indican diferencias significativas acorde al test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).



**Figura 90:** Efecto del tipo de recuperación sobre la longitud de los explantos de olivo tras la fase de tratamiento (en la cual los explantos estuvieron encapsulados a fotoperiodo 16h y 0h respectivamente) y tras la fase de recuperación, en la cual todos los explantos fueron cultivados bajo condiciones estándar. Las letras comparan los distintos tratamientos para un mismo tiempo. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Experimento 6: Fotoperiodo, temperatura y tipo de recuperación en el desarrollo de los encapsulados

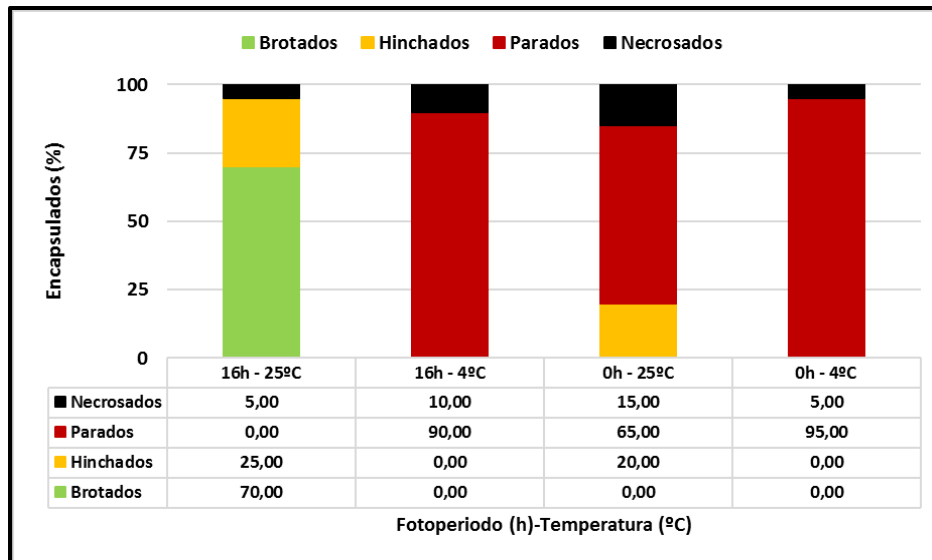
En este ensayo se testaron dos fotoperiodos (16 y 0 horas) y dos temperaturas distintas (25 °C y 4 °C) en el desarrollo de secciones nodales de olivo encapsuladas. También se valoró el comportamiento de las secciones una vez finalizado el tratamiento, tanto si seguían encapsuladas como si se desencapsulaban.

Durante la fase de tratamiento, sólo se observó brotación en el tratamiento 1 (16h 25 °C) con un 70%, siendo nulo en el resto de tratamientos. Esta brotación estuvo afectada tanto por el fotoperiodo como por la temperatura, así como por la interacción entre ambas (**Tabla 17**). En el resto de tratamientos predominó la presencia de encapsulados parados: tratamiento 2 (16h 4 °C) 100%; tratamiento 3 (0h 25 °C) 65%; tratamiento 4 (0h 4 °C) 90% (**Figura 91**), motivado por la temperatura y la interacción entre fotoperiodo y la temperatura (**Tabla 17**), de tal forma que los tratamientos sometidos a 4 °C presentan significativamente mayores porcentajes de encapsulados parados que los tratamientos sometidos a 25 °C (**Figura 92**). Mientras que el fotoperiodo no afecta al porcentaje de explantos parados (**Tabla 17**). En cuanto a la interacción entre el factor fotoperiodo y temperatura para ambos tipos de encapsulados, el tratamiento 1 (16h y 25 °C) fue el que presentó porcentajes más altos significativamente de encapsulados brotados (70%) y menor de encapsulados parados (0%) respecto al resto de tratamientos (**Figura 91 y Tabla 17**). En cuanto a los encapsulados necrosados, ronda entre el 5%-15% (**Figura 91**). En cuanto al aspecto de los encapsulados, todos mostraban buen aspecto, aunque solo los del tratamiento 1 brotaban (**Figura 93**).

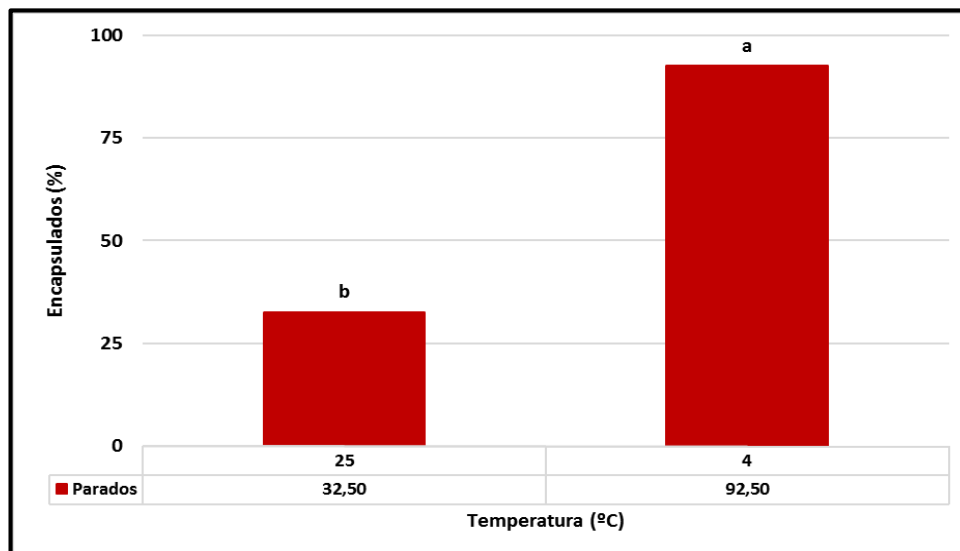
**Tabla 17:** Análisis de la varianza de máxima similitud Chi-cuadrado.

| Fuente                  | gl | Brotados<br>Chi-<br>cuadrado | Parados<br>Chi-<br>cuadrado |
|-------------------------|----|------------------------------|-----------------------------|
| Intercept               | 1  | 0,000*                       | 0,063 <sup>ns</sup>         |
| Fotoperiodo             | 1  | 0,005*                       | 0,063 <sup>ns</sup>         |
| Temperatura             | 1  | 0,005*                       | 0,000*                      |
| Fotoperiodo*Temperatura | 1  | 0,005*                       | 0,000*                      |

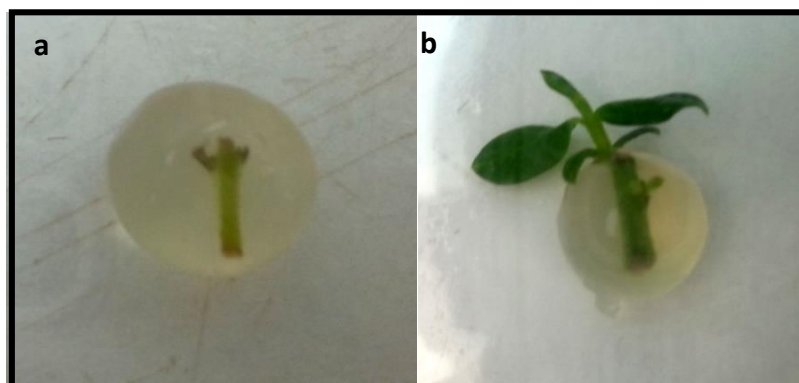
Efecto del fotoperiodo y la temperatura en la brotación de los explantos y la presencia de explantos parados, tras 4 semanas de tratamiento. <sup>ns</sup> Diferencias no significativas. \*P>0.05.



**Figura 91:** Efecto del fotoperiodo y la temperatura sobre el desarrollo de las secciones nodales de olivo encapsuladas tras 4 semanas.



**Figura 92:** Efecto de la temperatura sobre el desarrollo de los encapsulados parados. Columnas con letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo al test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).



**Figura 93:** Aspecto de los encapsulados tras 4 semanas de incubación: (a) a 4 °C y oscuridad; y (b) a 25 °C luz.

En cuanto a la fase de recuperación se valoró dos posibilidades, una primera en la que se dejaba las secciones nodales encapsuladas y otra en que se procedió a desencapsularlas.

La brotación se vio afectada por el tipo de recuperación y la interacción entre el fotoperiodo y la temperatura (**Tabla 18**).

En cuanto a la recuperación con los explantos encapsulados, los mejores resultados de brotación se obtuvieron con los tratamientos 1 y 4 con porcentajes superiores al 70% y sin diferencias significativas entre ellos (**Figura 94**). La interacción existente entre el fotoperiodo y temperatura es lo que hace que estos dos tratamientos tengan buenos porcentajes de brotación, mientras que en los tratamientos 2 y 3 los porcentajes sean significativamente inferiores (**Figura 94**). Si analizamos la longitud de los brotes formados, observamos mientras que en la fase de tratamiento los brotes de los tratamientos 2, 3 y 4 presentaban menor longitud que los del tratamiento 1, transcurridas 8 semanas de recuperación se observa que tanto el tratamiento 2 y 3 muestran longitudes similares al tratamiento 1, siendo el tratamiento 4 el único que presentó brotes significativamente menores al tratamiento 1 (**Figura 95**).

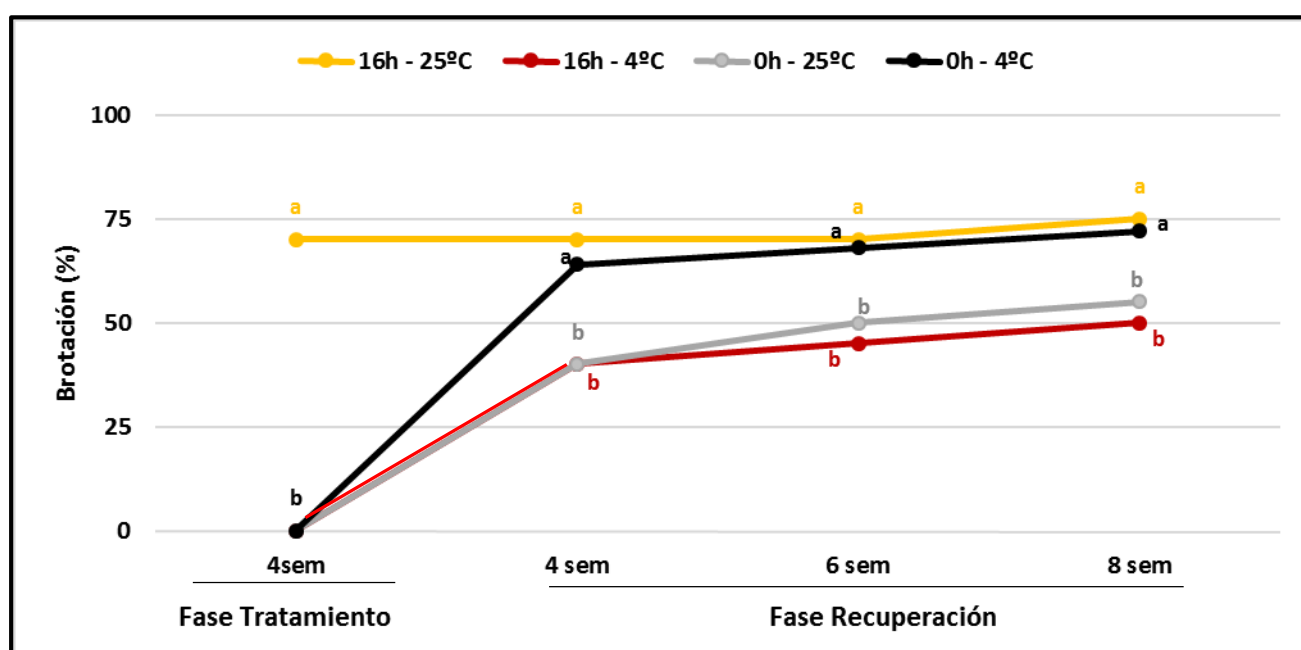
Referente a la recuperación de las secciones desencapsuladas, se observa que estas ya desde las 4 semanas muestran porcentajes elevados de brotación, quedando únicamente el tratamiento 3 con porcentajes significativamente menores al resto. A las 8 semanas de recuperación los porcentajes de brotación mantienen la tendencia, pero con valores muchos más elevados de tal forma que todos los tratamientos muestran valores superiores al 75% y el tratamiento 3 es significativamente diferente al 1 (**Figura 96**). En cuanto a la longitud de los brotes mientras que durante el tratamiento se observaban diferencias entre el tratamiento 1 y el resto, desapareciendo dichas diferencias tras 8 semanas de recuperación (**Figura 97**).

En cuanto al aspecto de los encapsulados, todos tenían buen aspecto, y sin diferencias entre los tratamientos, independientemente del tipo de recuperación (**Figura 98**).

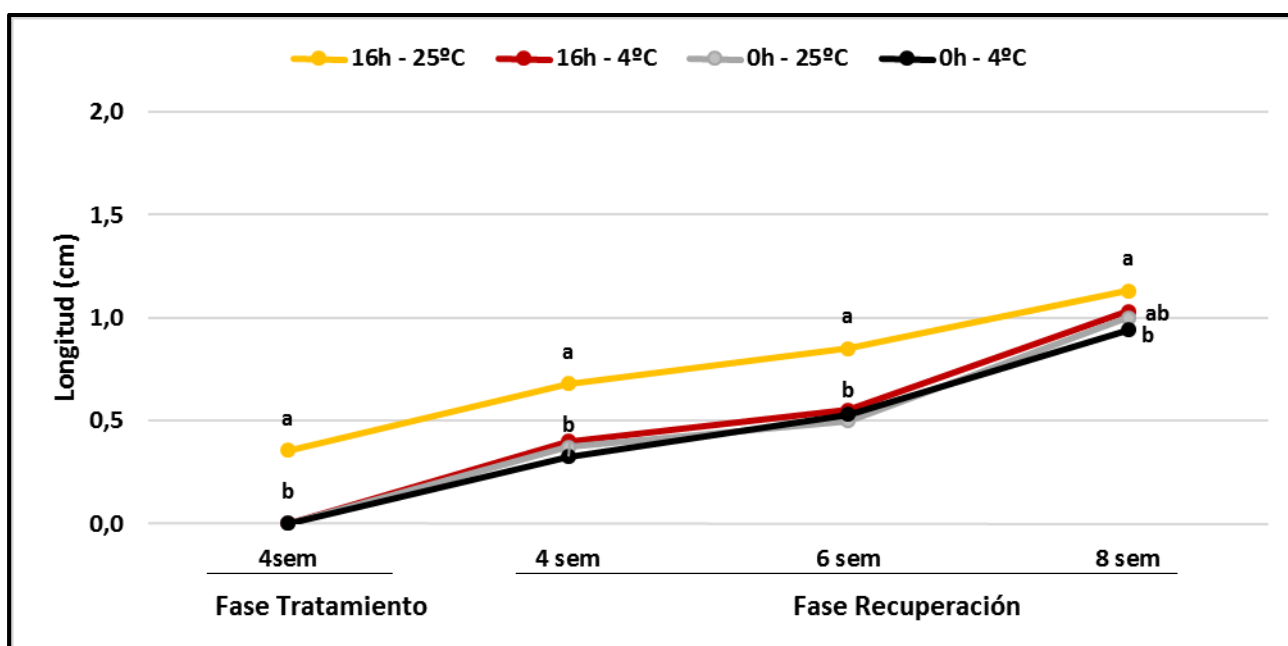
**Tabla 18:** Análisis de la varianza de máxima similitud Chi-cuadrado.

| Fuente                  | gl | Brotación Chi-cuadrado |
|-------------------------|----|------------------------|
| Intercept               | 1  | 0,000*                 |
| Fotoperiodo             | 1  | 0,636 <sup>ns</sup>    |
| Temperatura             | 1  | 0,808 <sup>ns</sup>    |
| Tipo Recuperación       | 1  | 0,000*                 |
| Fotoperiodo*Temperatura | 1  | 0.001*                 |

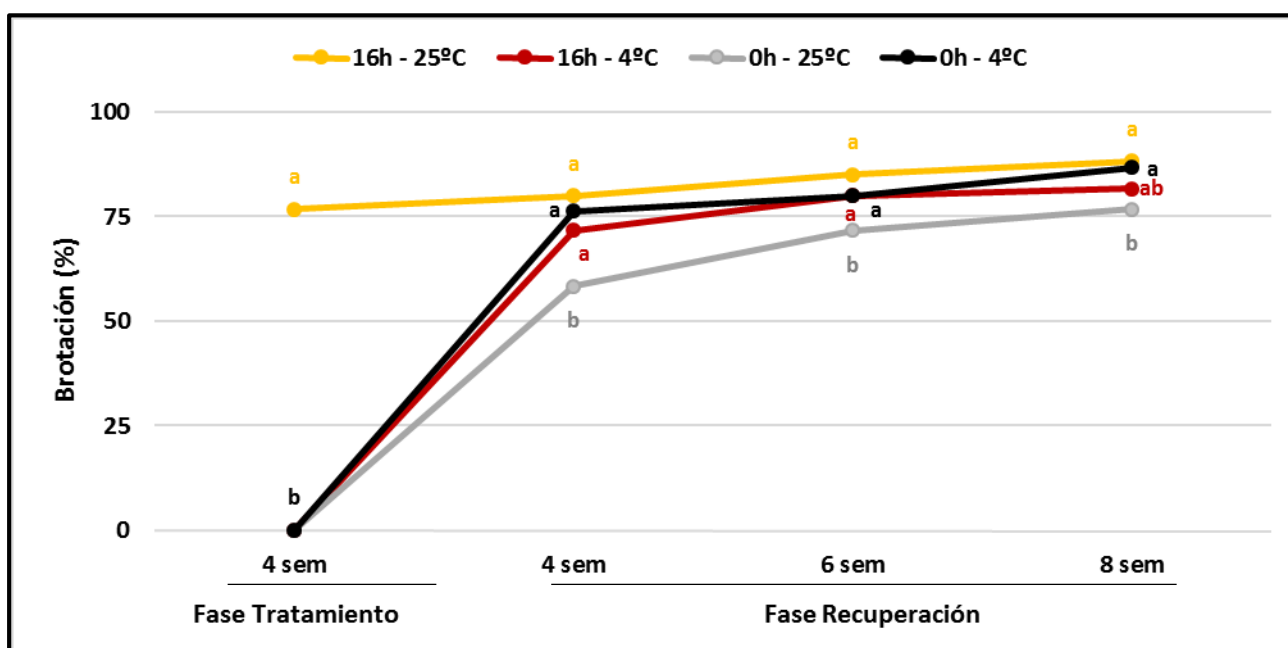
Efecto del fotoperiodo, la temperatura y el tipo de recuperación en la brotación de los explantos tras 8 semanas de recuperación. <sup>ns</sup> Diferencias no significativas. \*P>0.05.



**Figura 94:** Efecto del fotoperiodo y la temperatura sobre la brotación de las secciones de olivo encapsuladas durante la fase de tratamiento (en la cual los encapsulados están sometidos a sus respectivos tratamientos) y durante la fase de recuperación (en la cual todas las secciones permanecen encapsuladas y cultivadas bajo condiciones estándares). Valores con distinta letra para un mismo tiempo y fase indica diferencias significativas entre tratamientos acorde al test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).

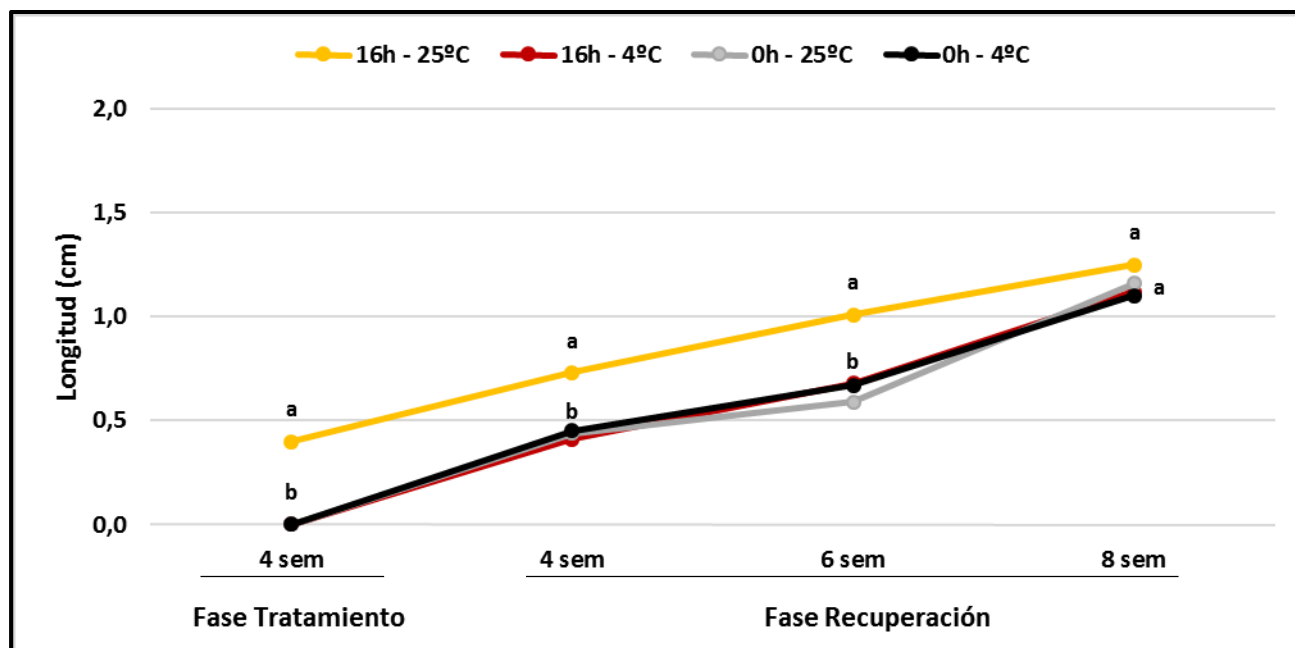


**Figura 95:** Efecto del fotoperiodo y la temperatura sobre la longitud de los brotes formados por las secciones de olivo encapsuladas durante la fase de tratamiento (en la cual los encapsulados están sometidos a sus respectivos tratamientos) y durante la fase de recuperación (en la cual todas las secciones permanecen encapsuladas y cultivadas bajo condiciones estándares). Valores con distinta letra para un mismo tiempo y fase indica diferencias significativas entre tratamientos acorde al test SNK ( $p < 0.05$ ).

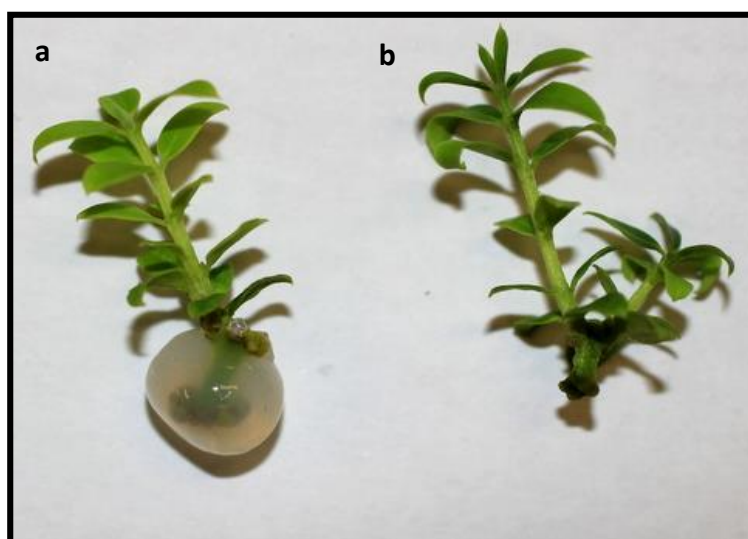


**Figura 96:** Efecto del fotoperiodo y la temperatura sobre la brotación de las secciones de olivo encapsuladas durante la fase de tratamiento (en la cual los encapsulados están sometidos a sus respectivos tratamientos) y durante la fase de recuperación (en la cual todas las secciones permanecen desencapsuladas y cultivadas bajo condiciones estándares). Valores con distinta letra para un mismo tiempo y fase indica diferencias significativas entre tratamientos acorde al test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).





**Figura 97:** Efecto del fotoperiodo y la temperatura sobre la longitud de los brotes formados por las secciones de olivo encapsuladas durante la fase de tratamiento (en la cual los encapsulados están sometidos a sus respectivos tratamientos) y durante la fase de recuperación (en la cual todas las secciones permanecen desencapsuladas y cultivadas bajo condiciones estándares). Valores con distinta letra para un mismo tiempo y fase indica diferencias significativas entre tratamientos acorde al test SNK ( $p < 0.05$ ).

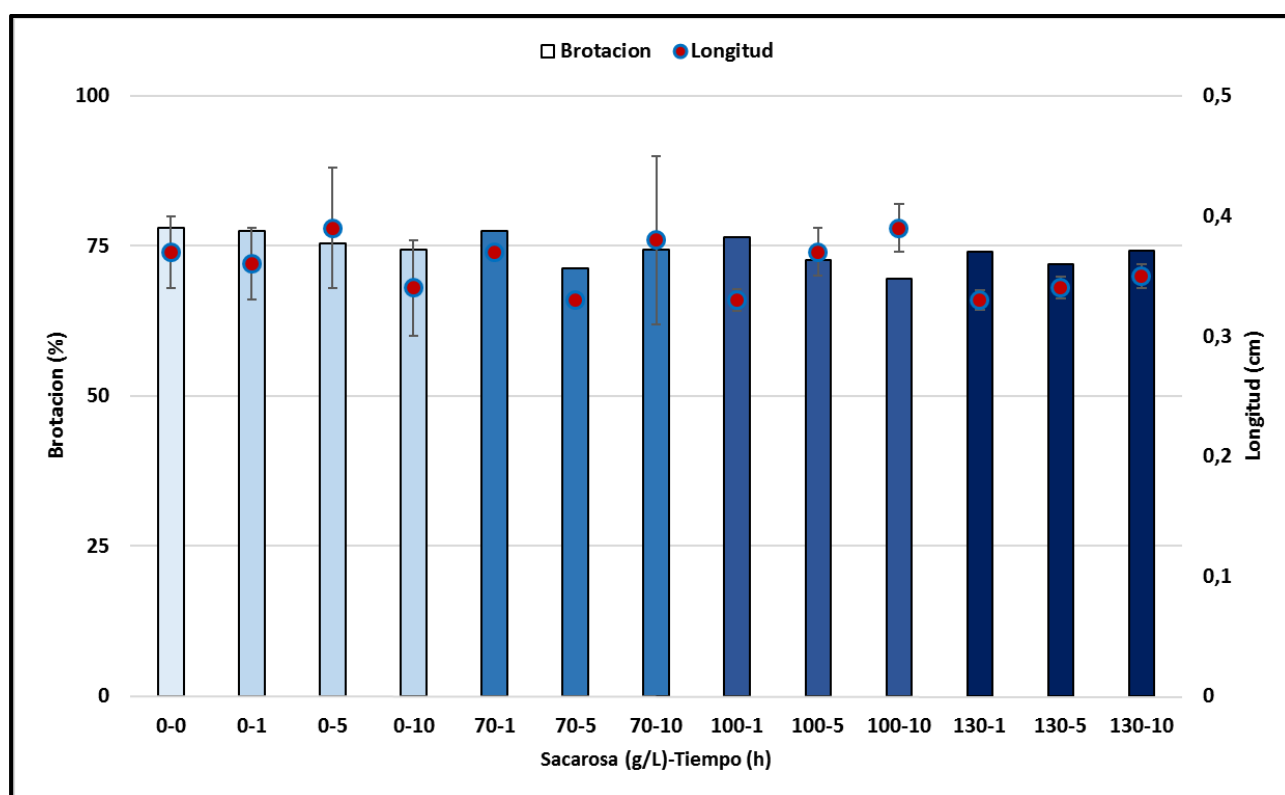


**Figura 98:** Aspecto de los explantos de olivo tras 8 semanas de recuperación en condiciones estándar de cultivo: **(a)** secciones encapsuladas; **(b)** secciones desencapsuladas. Dichos explantos estuvieron incubados a 4 °C con fotoperiodo de 16h durante la fase de tratamiento.

Experimento 7: Sacarosa

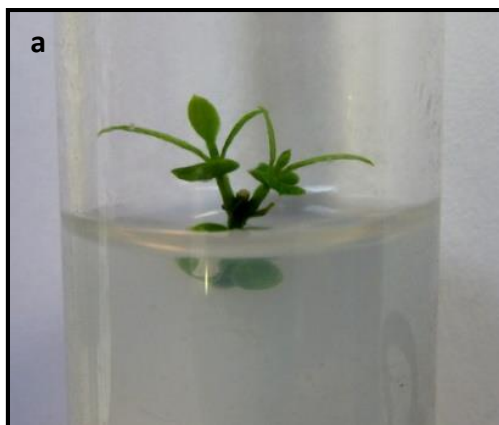
*Experimento 7.1: Sacarosa y desarrollo de las secciones nodales*

No se observaron diferencias significativas ni en función de la sacarosa, ni del tiempo de exposición, ni de la interacción entre ambos tratamientos, tanto para la brotación de las secciones nodales de olivo como para la longitud de los brotes (**Figura 99**). Los resultados mostraban unos porcentajes de brotación entorno al 70-80% para todos los casos y una longitud de los brotes con un patrón muy homogéneo que oscilaba entre los 0.3-0.4cm (**Figura 99**).



**Figura 99:** Efecto de la sacarosa y el tiempo de exposición sobre la brotación de sn de olivo y la longitud de los brotes producidos tras 4 semanas de ensayo.

En cuanto al aspecto de los explantos, estos se desarrollaban y crecían de forma adecuada, mostrando un aspecto saludable (**Figura 100**), independientemente del tipo de concentración de sacarosa empleado.



**Figura 100:** Aspecto de un explanto de olivo cultivado bajo condiciones estándares de crecimiento durante 4 semanas, previo tratamiento con: **(a)** 100 g/L de sacarosa durante 5 horas.

#### Experimento 7.2: Sacarosa y desarrollo de los encapsulados

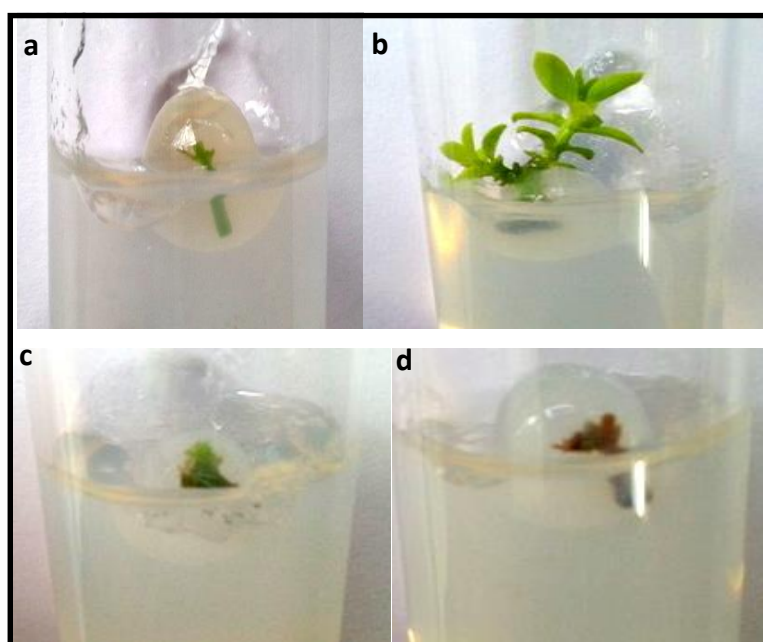
Del análisis estadístico de los datos observamos que la brotación de los encapsulados se vio afectada tanto por la concentración de sacarosa como por el tiempo de exposición de la misma (**Figura 101** y **Tabla 19**), de tal forma que aquellos encapsulados pretratados con sacarosa 130 g/L presentaban porcentajes de brotación significativamente inferiores al resto (**Figura 102**). Referente al tiempo de exposición aquellos que estuvieron con 0 horas de exposición son los que presentaban mayores porcentajes, no encontrándose diferencias significativas entre los restantes.

Al no haber diferencias de brotación entre los distintos tiempos de cultivo empleado (4-6-8 semanas), analizamos los datos fijando dicho factor, y analizamos como variaba la brotación en función de la concentración de sacarosa y del tiempo de exposición. Se observó que, en todos los casos, dentro de un mismo tiempo de cultivo existen diferencias significativas en función de la concentración de sacarosa, y no en base al tiempo de exposición (**Tabla 20**). En la **Figura 102**, en la cual se representan los datos a las 4 semanas de cultivo, se puede observar como el empleo de 130 g/L de sacarosa provocaba una disminución en la brotación de los encapsulados. Este efecto era idéntico en los otros tiempos de cultivo empleados (6 y 8 semanas).

La necrosis de los encapsulados si se vio afectada por los tres factores implicados (**Tabla 19**). Al estudiar el efecto de los distintos factores de forma individual se determinó que la concentración de sacarosa 130 g/L provocaba mayores porcentajes de necrosis que las restantes concentraciones. En cuanto al tiempo de exposición, era a 5 horas de exposición donde se daban los mayores porcentajes de necrosis. Referente al tiempo de cultivo, se observó una relación inversa entre los

encapsulados hinchados y los necrosados. Así, a medida que aumentaba el tiempo de cultivo, aumentaba el porcentaje de encapsulados necrosados, y disminuía el de encapsulados hinchados. Esto era debido a que los encapsulados que se encontraban hinchados y no conseguían romper y salir de la capsula, a medida que avanzaba el tiempo terminaban necrosándose. (**Figura 103**).

En ninguna de las variables analizadas se han encontrado interacción entre los distintos factores.

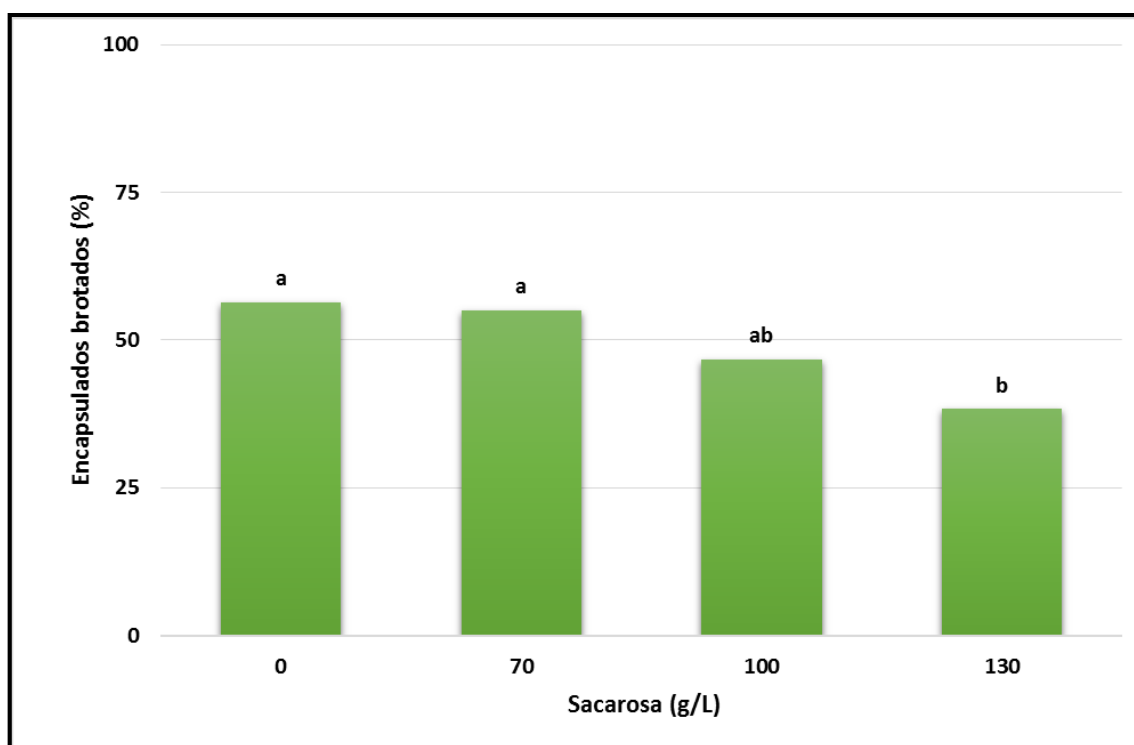


**Figura 101:** Aspecto de los encapsulados de olivo pretratados con sacarosa: **(a)** al inicio del ensayo (Sacarosa 0g/L 0h); **(b)** encapsulado brotado (Sacarosa 100 g/L 5h); **(c)** encapsulado hinchado (Sacarosa 70g/L 10h); **(d)** encapsulado necrosado (Sacarosa 130g/L 10h).

**Tabla 19:** Análisis de la varianza de máxima similitud Chi-cuadrado.

| Fuente        | gl | Brotación<br>Chi-<br>cuadrado | Hinchados<br>Chi-<br>cuadrado | Necrosis<br>Chi-<br>cuadrado |
|---------------|----|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Intercept     | 1  | 0,006*                        | 0,000*                        | 0,000*                       |
| Sacarosa      | 3  | 0,000*                        | 0,650 <sup>ns</sup>           | 0,000*                       |
| T. Cultivo    | 2  | 0,229 <sup>ns</sup>           | 0,000*                        | 0,000*                       |
| T. Exposición | 3  | 0,037*                        | 0,108 <sup>ns</sup>           | 0,004*                       |

Efecto de la concentración sacarosa, el tiempo de cultivo y el tiempo de exposición en la brotación de los encapsulados, en la formación de encapsulados hinchados y en la necrosis de los mismos. <sup>ns</sup> Diferencias no significativas. \*P>0.05.

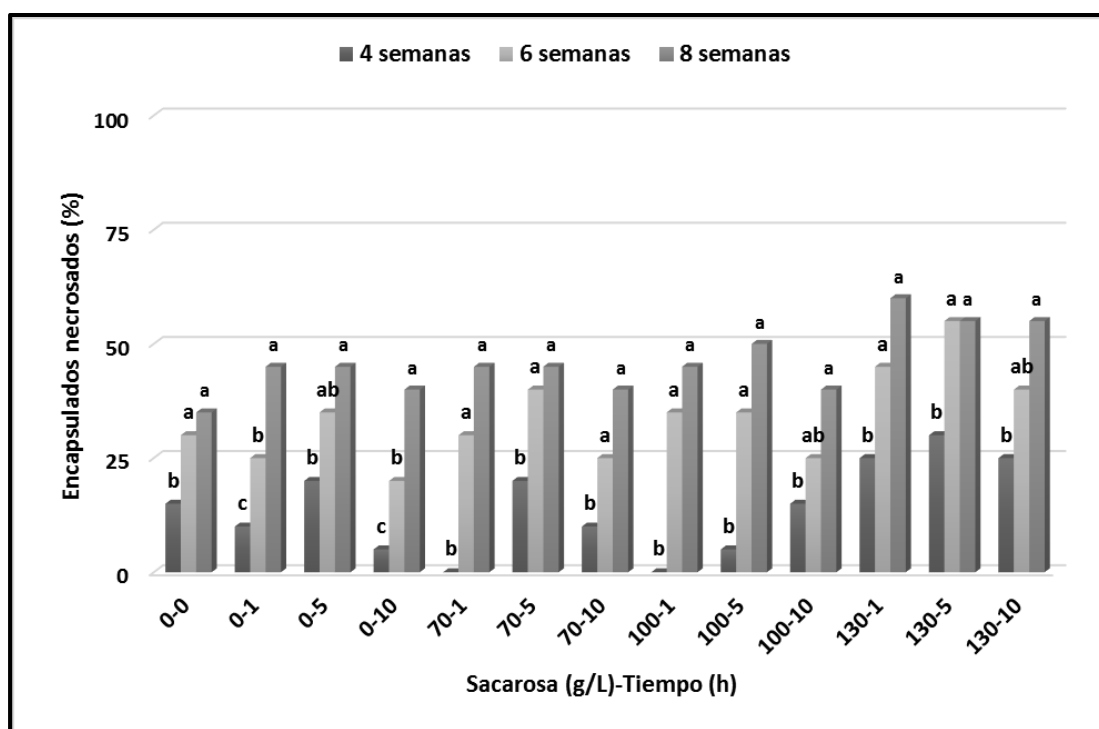


**Figura 102:** Efecto del pretratamiento con sacarosa sobre la brotación de los encapsulados de olivo. Datos a las 4 semanas de cultivo. Los datos corresponden a la media de todos los tiempos de exposición empleados (0-1-5-10 horas) para una misma concentración de sacarosa. Columnas con distintas letras indican diferencias significativas entre las distintas concentraciones de sacarosa de acuerdo con el test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 20:** Análisis de la varianza de máxima similitud Chi-cuadrado.

| Fuente        | gl | Brotación<br>8 sem<br>cultivo<br>Chi-<br>cuadrado |
|---------------|----|---|
| Intercept     | 1  | 0,029*  |
| Sacarosa      | 3  | 0,030*  |
| T. Exposición | 3  | 0,405 <sup>ns</sup>                               |

Efecto de la concentración de sacarosa y el tiempo de exposición en la brotación de los encapsulados tras 8 semanas de cultivo en medio RP. <sup>ns</sup> Diferencias no significativas. \* $P > 0.05$ .



**Figura 103:** Efecto del pretratamiento con sacarosa a distintos tiempos de exposición sobre la necrosis de los encapsulados de olivo. Para una misma concentración de sacarosa y un mismo tiempo de exposición, columnas con letras diferentes indican diferencias significativas entre los distintos tiempos de cultivo de acuerdo con test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).

#### Experimento 8: Sacarosa, baja temperatura y tipo de recuperación sobre el desarrollo de los encapsulados

Los explantos pretratados con sacarosa y posteriormente encapsulados y conservados durante 4 semanas a 4 °C no mostraron ningún tipo de desarrollo, encontrándose el 100% de ellos parados, al igual que el control (datos no mostrados).

A continuación, los encapsulados pasaron a la fase de recuperación, en la que se evaluó el desarrollo de los explantos tanto encapsulados como desencapsulados.

Tras concluir la fase de recuperación, en ambas situaciones se observó que la brotación va aumentando a lo largo del tiempo hasta alcanzar su máximo a las 8 semanas (**Figura 104 y 105**). En el análisis estadístico de los datos registrados (**Tabla 21**), se observó un efecto del tipo de recuperación sobre el valor de estos porcentajes, de tal manera que, si la recuperación se realizaba con los explantos encapsulados, los porcentajes de brotación eran significativamente menores (brotación media 53.50%) en comparación con la recuperación con los explantos desencapsulados (brotación media 91.67%) (**Figura 106**). Este hecho se corroboraba con la presencia de mayor necrosis en los explantos que permanecieron encapsulados durante la recuperación (**Figura 104 y**

105). También se observó un efecto negativo del tiempo de exposición, de tal forma que los explantos que fueron sometidos a tratamientos de sacarosa durante 10 horas presentaban peores porcentajes de brotación que el resto (Figura 107).

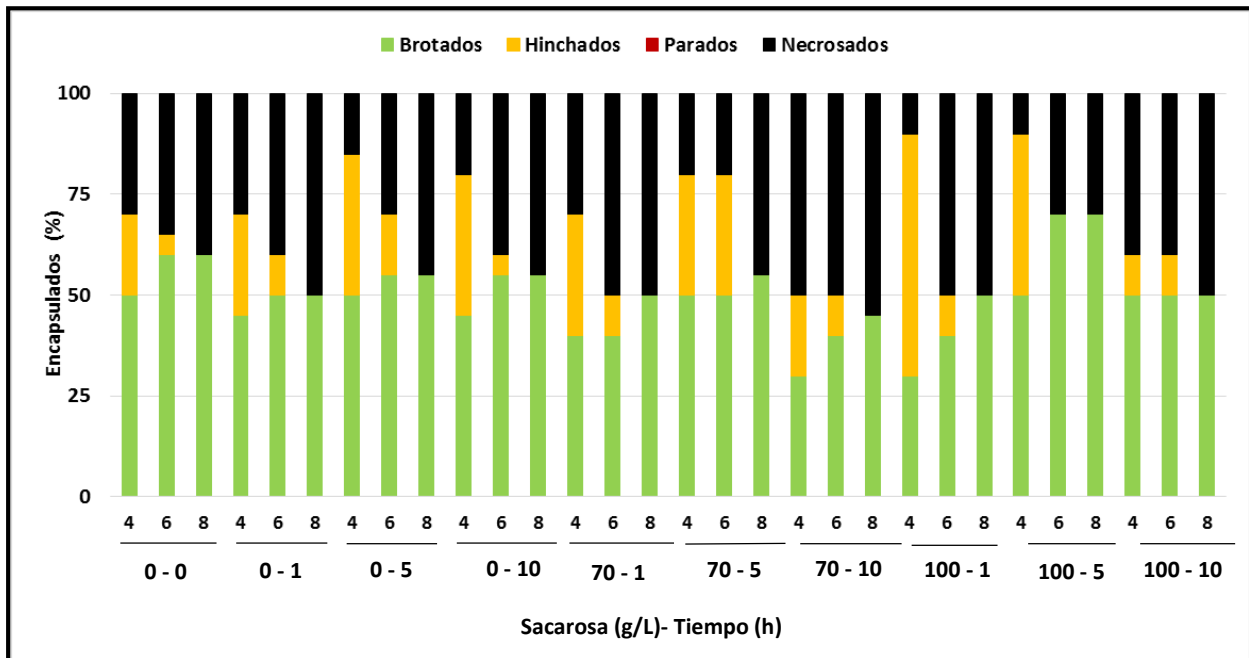


Figura 104: Efecto del pretratamiento de sacarosa y el tiempo de exposición en el desarrollo de las secciones nodales de olivo encapsuladas durante la fase de recuperación. Datos tras 4, 6 y 8 semanas de recuperación.

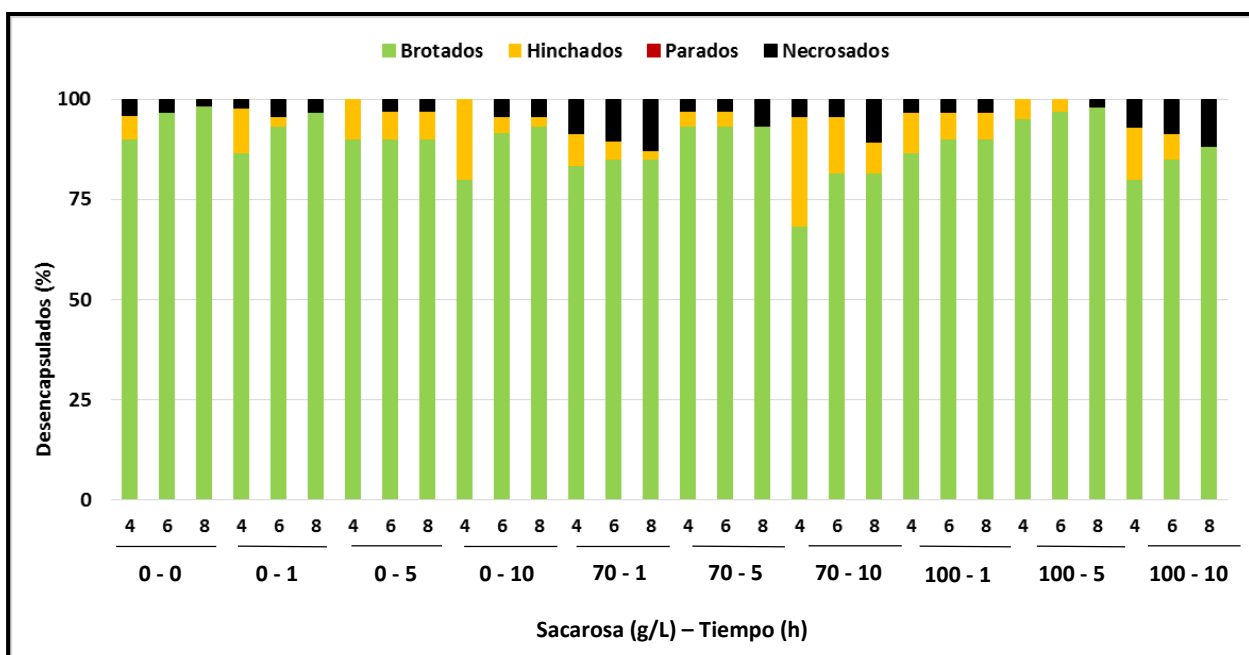


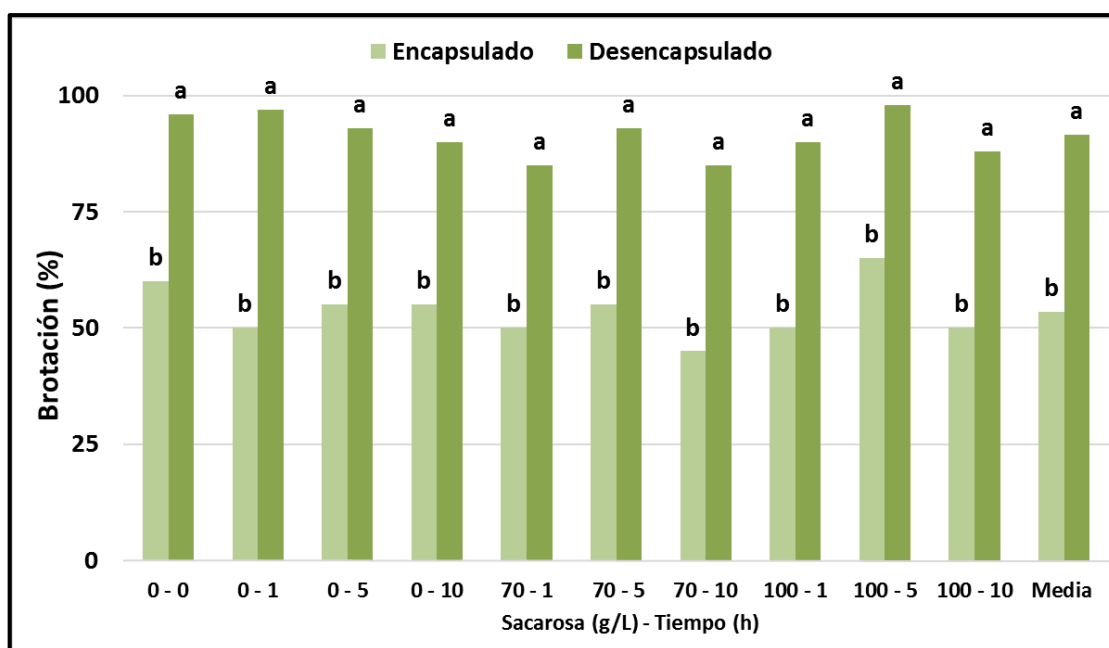
Figura 105: Efecto del pretratamiento de sacarosa y el tiempo de exposición en el desarrollo de las secciones nodales de olivo desencapsuladas durante la fase de recuperación. Datos tras 4, 6 y 8 semanas de recuperación.

**Tabla 21:** Análisis de la varianza de máxima verisimilitud Chi-cuadrado.

| Fuente               | gl | Brotación           |
|----------------------|----|---------------------|
|                      |    | Chi-cuadrado        |
| Intercept            | 1  | 0,000*              |
| Sacarosa             | 2  | 0,163 <sup>ns</sup> |
| Exposición           | 3  | 0,017*              |
| Tipo de recuperación | 1  | 0,000*              |

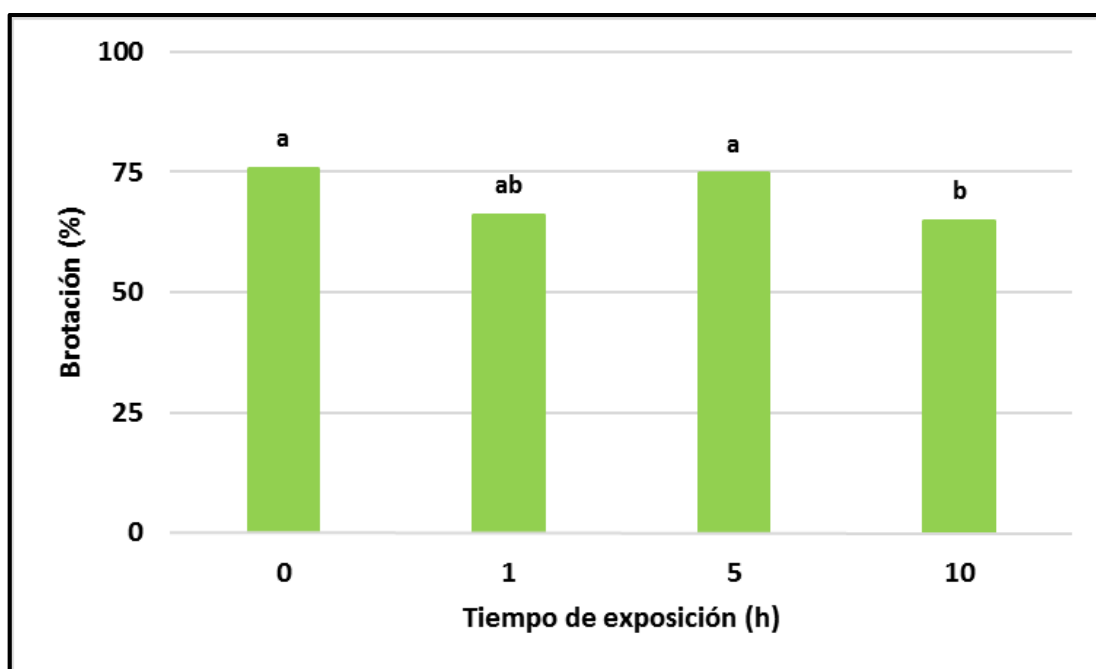
Efecto de la sacarosa, tiempo de exposición y tipo de recuperación (encapsulada o desencapsulada) en la brotación de los encapsulados de olivo tras 8 semanas de recuperación.

<sup>ns</sup> Diferencias no significativas. \*P>0.05.



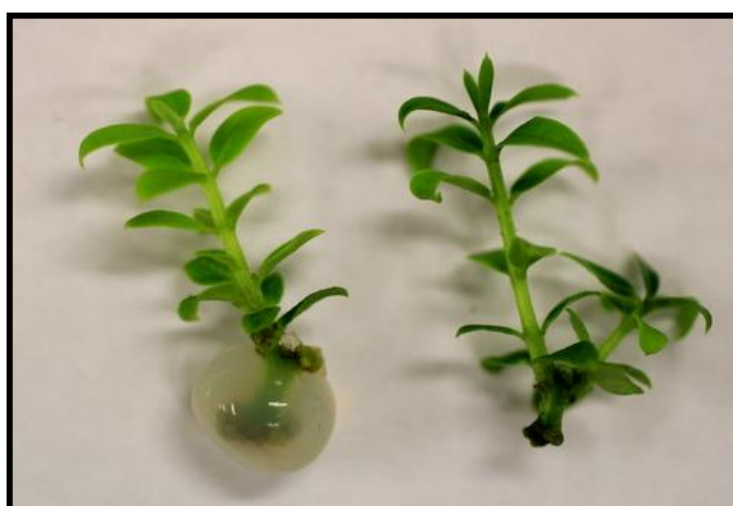
**Figura 106** Efecto del tipo de recuperación (encapsulado o desencapsulado) en la brotación de las secciones nodales de olivo previamente cultivadas en sacarosa durante distintos tiempos de exposición, tras 8 semanas de recuperación. Para cada concentración de sacarosa y tiempo de exposición, columnas con letras diferentes indican diferencias significativas según el test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).





**Figura 107:** Efecto del tiempo de exposición durante el pretratamiento con sacarosa en la brotación de los explantos de olivo tras 8 semanas en la fase de recuperación. Se representan los valores medios de los porcentajes de brotación de las secciones tanto encapsuladas como desencapsuladas. Columnas con letras diferentes indican significativas según el test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).

En cuanto al aspecto de los brotes que no necrosaban, todos mostraban un buen desarrollo y crecimiento, ningún pretratamiento con sacarosa provocaba efecto alguno en cuanto al aspecto de los mismos más allá de provocar mayor o menor brotación. En cuanto al tipo de recuperación aquellos explantos que se recuperaban encapsulados mostraban un color de hojas algo más claro (**Figura 108**).



**Figura 108:** Aspecto de los brotes de olivo previamente pretratados con 100 g/L de sacarosa durante 5 horas y e incubados a 4 °C durante 4 semanas tras 8 semanas de recuperación encapsulados (izquierda) o desencapsulados (derecha).

Por tanto, no se apreció un efecto negativo del pretratamiento con sacarosa en el desarrollo de los encapsulados, ni ninguna interacción entre los factores analizados, salvo el efecto negativo de aplicar sacarosa durante 10 horas. Por ello, para los posteriores estudios de conservación escogimos el pretratamiento de sacarosa 100 g/L y tiempo de exposición 5 horas, con porcentajes de brotación similares al control, tanto cuando la fase de recuperación se realizó con los explantos encapsulados (65% frente 60%) como desencapsulados (98% frente a 96%).

### Experimento 9: Retardantes del crecimiento

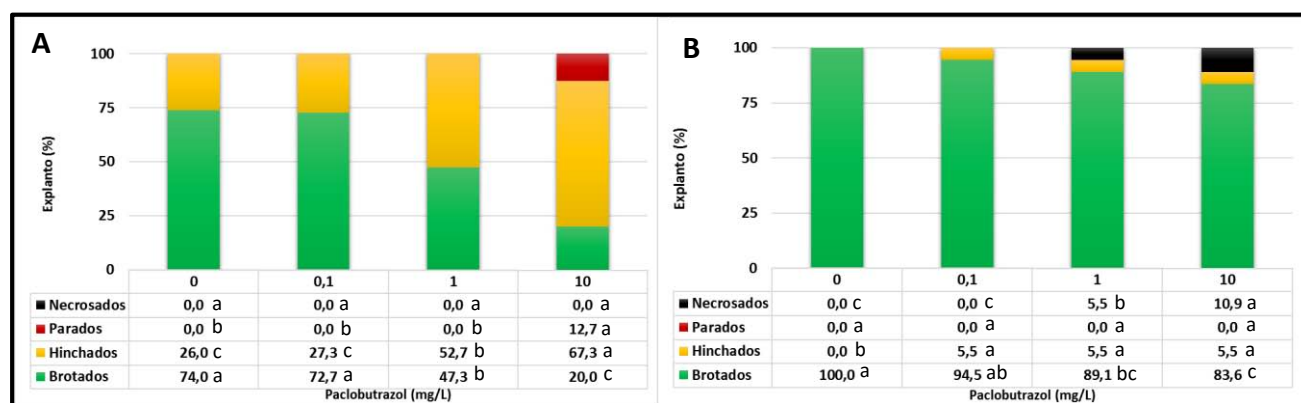
#### *Experimento 9.1: Efecto del paclobutrazol*

Los resultados obtenidos tras cultivar las secciones nodales en presencia de paclobutrazol (PBZ) mostraron una disminución significativa en la brotación de los explantos con el aumento de la concentración, salvo para la concentración de 0.1 mg/L (**Figura 109-A**), y, al mismo tiempo, un aumento del número de explantos hinchados (**Figura 109-A**). En cuanto a la presencia de explantos parados, solo se observaron cuando se cultivaban en un medio con 10 mg/L de PBZ (12.7%) (**Figura 109-A**). La necrosis durante esta fase fue nula (**Figura 109-A**). En cuanto a la distribución del número yemas brotadas por explanto, salvo para el caso de 0.1 mg/L, en la cual no existían diferencias significativas respecto al control, a medida que aumentábamos la concentración de PBZ, se producía un incremento notable del número de explantos con 0 yemas brotadas, y en aquellos explantos que conseguían brotar mayoritariamente lo hacía solo 1 yema de la sección nodal (**Figura 110-A**). En cuanto al número de hojas por yema, éste fue significativamente mayor en todas las concentraciones testadas de PBZ que en el control, salvo para la concentración de 0.1 mg/L de PBZ (**Figura 111-A**). Sin embargo, la longitud de los brotes, al igual que ocurría para la brotación, disminuía en cuanto aumentaba la concentración de PBZ por encima de 0.1 mg/L de PBZ (**Figura 111-B**).

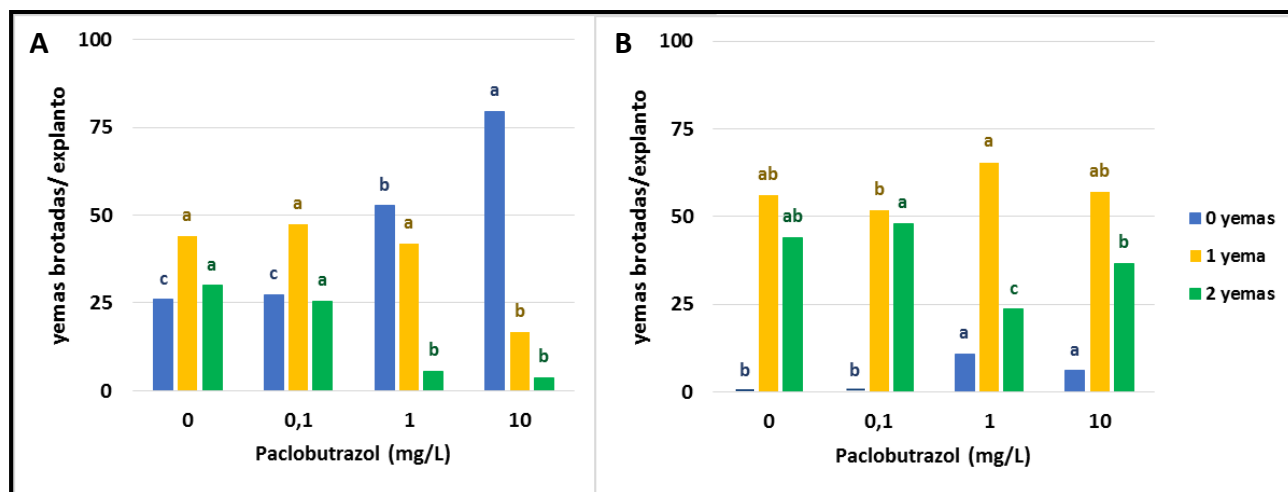
Al analizar la fase de recuperación, una vez eliminado el PBZ del medio de cultivo, observamos que se producía en todos los casos un incremento de la brotación de los explantos, independientemente del tratamiento que habían sufrido con anterioridad. Sin embargo, los que habían estado cultivados en la fase de tratamiento con 1 y 10 mg/L de PBZ, presentaron una brotación todavía significativamente inferior al control tras 4 semanas de recuperación (**Figura 109-**

**B).** Si se dejaba los cultivos en crecimiento estándar por más tiempo, todas las secciones que no necrosaban terminaban brotando (datos no mostrados). El porcentaje de explantos hinchados disminuía en todos los casos y se mantenía en un 5.5%, para todas las concentraciones de PBZ. En esta fase, la proporción de explantos parados disminuyó, pero, por el contrario, en las concentraciones 1 y 10 mg/L de PBZ, aparecieron explantos necrosados en proporción de 5.5% y 10.9% respectivamente (**Figura 109-B**). En cuanto a la distribución de las yemas brotadas por explanto, se observó un cierto equilibrio entre los explantos en los que brota solo 1 yema y los que brotan 2 yemas, para el caso del control y en aquellos que fueron tratados con 0.1 mg/L de PBZ, pero, en los explantos que provenían de 1 y 10 mg/L de PBZ mayoritariamente brotó solo 1 yema (**Figura 110-B**). En esta fase, la longitud de los brotes y el número de hojas aumentaban en todos los casos, no obstante, para aquellos que estuvieron con 10 mg/L de PBZ, la longitud de los brotes seguía siendo menor significativamente respecto al control. (**Figura 111-B**).

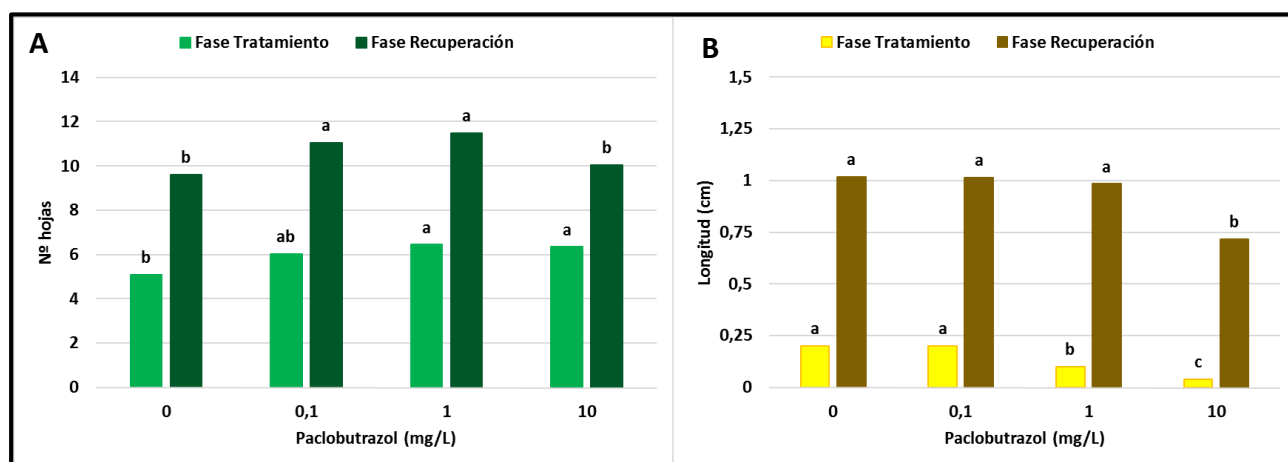
En cuanto al aspecto de los brotes, en presencia del retardante lo único destacable era la notable reducción del tamaño de las mismas (**Figura 112**), lo que provocaba que algunos explantos adquirieran una forma de roseta, sobre todo a 10 mg/L de paclobutrazol, en la que los entrenudos eran muy cortos, pero tenían un gran número de hojas. Esta sintomatología tendía a desaparecer en el momento en el que se elimina el retardante del medio, puesto que las yemas se desarrollaban y mostraban un patrón de crecimiento correcto, similar al control sin retardante.



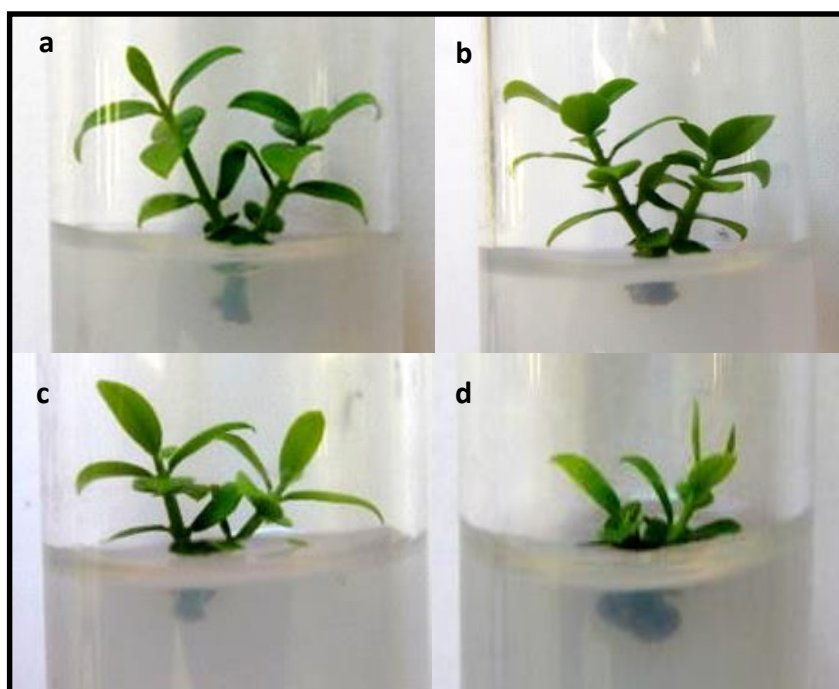
**Figura 109:** Efecto del paclobutrazol en el desarrollo de las secciones nodales de olivo: **(A)** tras 4 semanas de tratamiento y **(B)** tras 4 semanas de recuperación. En cada gráfica y para cada variable medida, valores medios con letra diferente indica diferencias significativas de acuerdo con test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).



**Figura 110:** Efecto del paclobutrazol en el número de yemas brotadas por explanto: **(A)** tras 4 semanas de tratamiento. **(B)** y tras 4 semanas de recuperación, sin retardante. En cada gráfica y para cada variable medida, columnas con letra diferente indica diferencias significativas de acuerdo con el test SNK ( $p < 0.05$ ).



**Figura 111:** Efecto del paclobutrazol: **(A)** en el número de hojas y **(B)** en la longitud de los brotes de olivo durante la fase de tratamiento con paclobutrazol y durante la de recuperación, sin la presencia del retardante. En cada gráfica y fase, columnas con distinta letra indica diferencias significativas de acuerdo con test SNK ( $p < 0.05$ ).



**Figura112:** Aspecto de los explantos tras 4 semanas de tratamiento con distintas concentraciones de paclobutrazol: **(a)** 0mg/L; **(b)** 0.1mg/L; **(c)** 1mg/L; **(d)** 10mg/L.

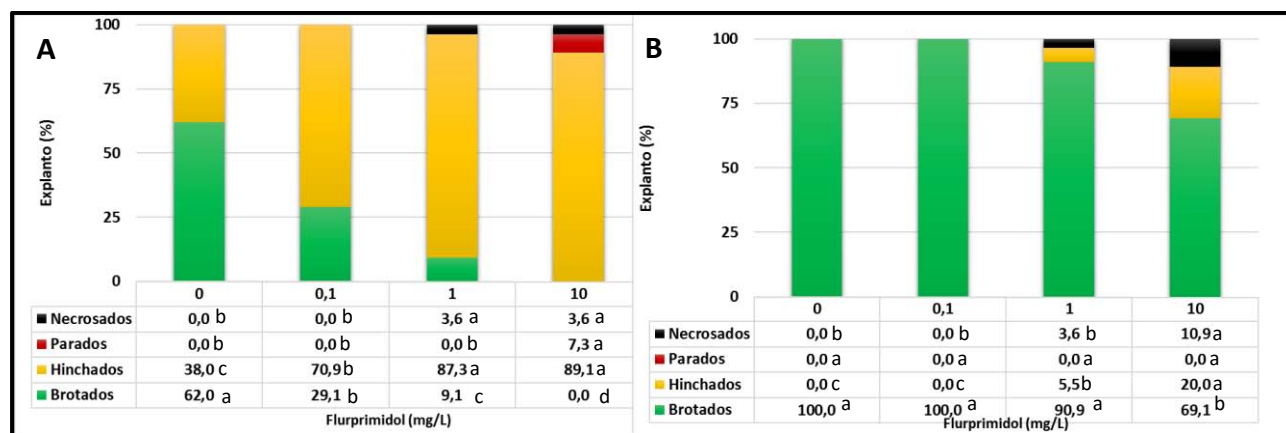
#### Experimento 9.2: Efecto del flurprimidol

Los resultados obtenidos tras cultivar los explantos en presencia de flurprimidol (FMD) mostraron una disminución brusca y significativa en la brotación de los mismos a medida que aumentaba la concentración, hasta alcanzar un valor del 0% para la concentración de 10 mg/L de FMD (**Figura 113-A**). Al igual que ocurría con el retardante PBZ, esta disminución de explantos brotados era inversa al número de explantos hinchados, los cuales aumentaban de forma significativa al aumentar la concentración de FMD (**Figura 113-A**). La presencia de explantos necrosados solo se observaba a las concentraciones de 1 y 10 mg/L, aunque en porcentajes muy bajos (3.6%); y en cuanto a los explantos parados solo estaban presentes a 10 mg/L en porcentajes del 7.3% (**Figura 113-A**). En cuanto a la distribución de yemas brotadas por explanto, se observó que a medida que aumentaba la concentración de FMD, aumentaba también el porcentaje de explantos con 0 yemas brotadas (**Figura 114-A**). El número de hojas observado en los explantos tratados con FMD no presentaba diferencias significativas respecto al control (**Figura 115-A**), sin embargo, en la longitud de los brotes se observó una disminución en cuanto aumentaba la concentración de FMD, llegando a ser nula para la concentración de 10 mg/L (**Figura 115-B**).

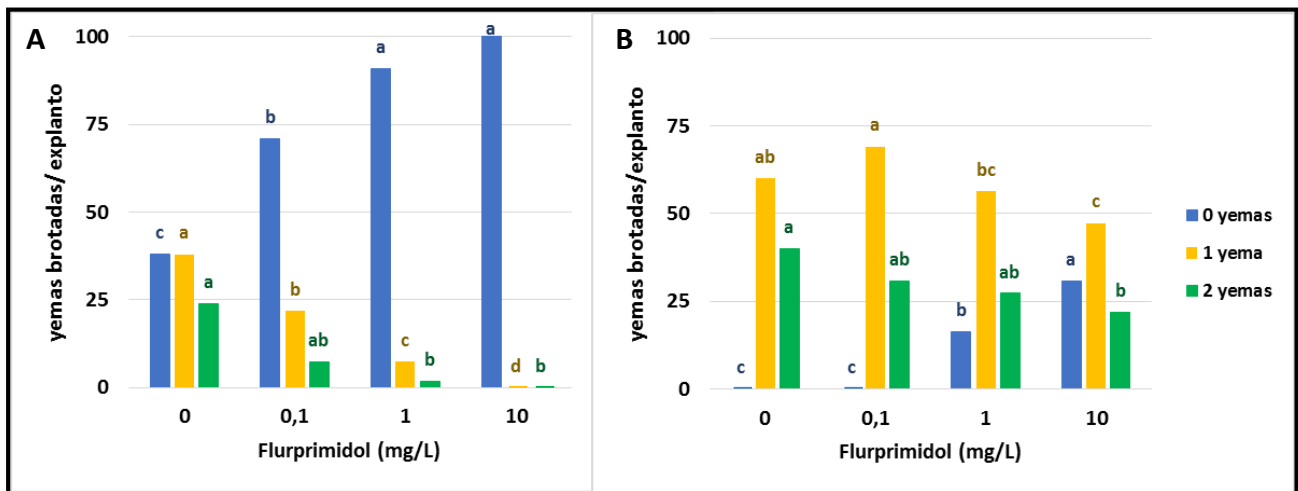
Al analizar la fase de recuperación, una vez eliminamos el FMD del medio de cultivo, se observó que la brotación de los explantos aumentaba en todas las secciones independientemente

del tratamiento previo que había recibido, siendo sólo aquellas que estuvieron previamente cultivadas con 10 mg/L de FMD significativamente inferior al control. Los explantos hinchados solo se apreciaban en los que habían sido tratados con concentraciones de 1 mg/L (5.5%) y 10 mg/L (20%), no observándose presencia de explantos parados en esta fase. Sin embargo, si aparecieron explantos necrosados, aunque en baja proporción en los que provenían del tratamiento con 1 mg/L (3.6%), pero alcanzándose un porcentaje considerable (10.9%) en los provenientes del tratamiento con 10 mg/L de FMD (**Figura 113-B**). En cuanto a la distribución del número de yemas brotadas/explanto, en todos los casos se observó que mayoritariamente los explantos brotaban con sólo 1 yema, incluso para el caso control, aunque este hecho es mucho más marcado en los explantos que habían sido tratados con FMD (**Figura 114-B**). El número de hojas aumentaba en todos los casos y no se apreciaban diferencias significativas entre los explantos control y los procedentes de los tratamientos con FMD (**Figura 115-A**). En cuanto a la longitud de los brotes, también se recuperaban de forma adecuada, aunque el tamaño de los explantos expuestos a FMD en la fase de tratamiento seguía siendo menor significativamente al de los explantos control, salvo los procedentes del tratamiento con 1 mg/L de FMD (**Figura 115-B**).

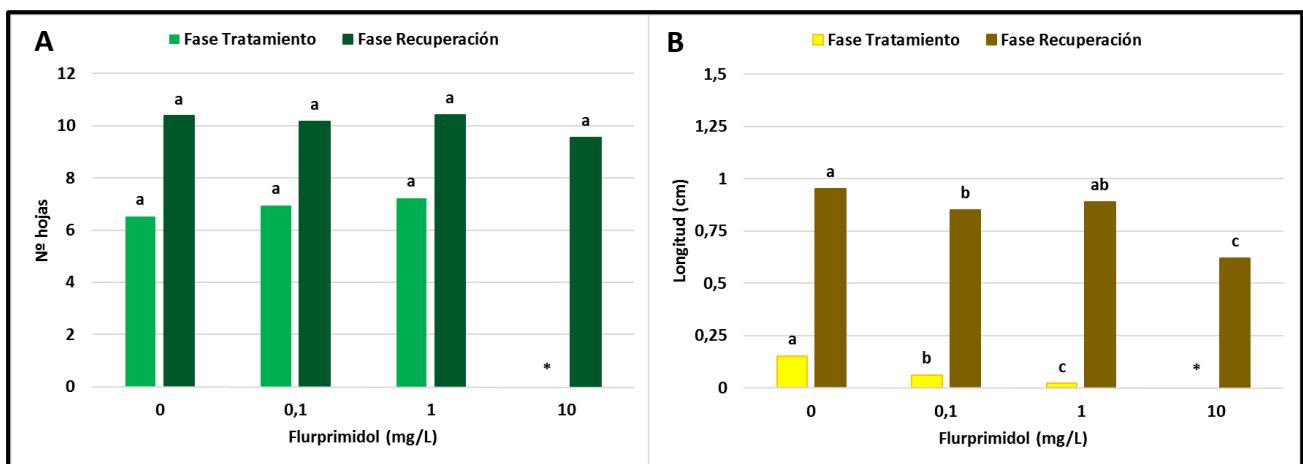
En cuanto al aspecto de las yemas, durante su cultivo con FMD, lo más destacable fue la presencia de explantos tipo roseta a concentraciones de 10 mg/L (**Figura 116-d**), las cuales además mostraban hojas de menor tamaño y de color verde más oscuro que las hojas de los brotes control. En el resto de concentraciones no se apreciaba ningún efecto anómalo visible. Una vez los explantos se cultivaban en ausencia de FMD, estos se desarrollaban y crecían con un aspecto aparentemente normal.



**Figura 113:** Efecto del flurprimidol en el desarrollo de las secciones nodales de olivo: **(A)** tras 4 semanas de tratamiento y **(B)** tras 4 semanas de recuperación, sin retardante. Valores medios con letra diferente indica diferencias significativas de acuerdo con el test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).

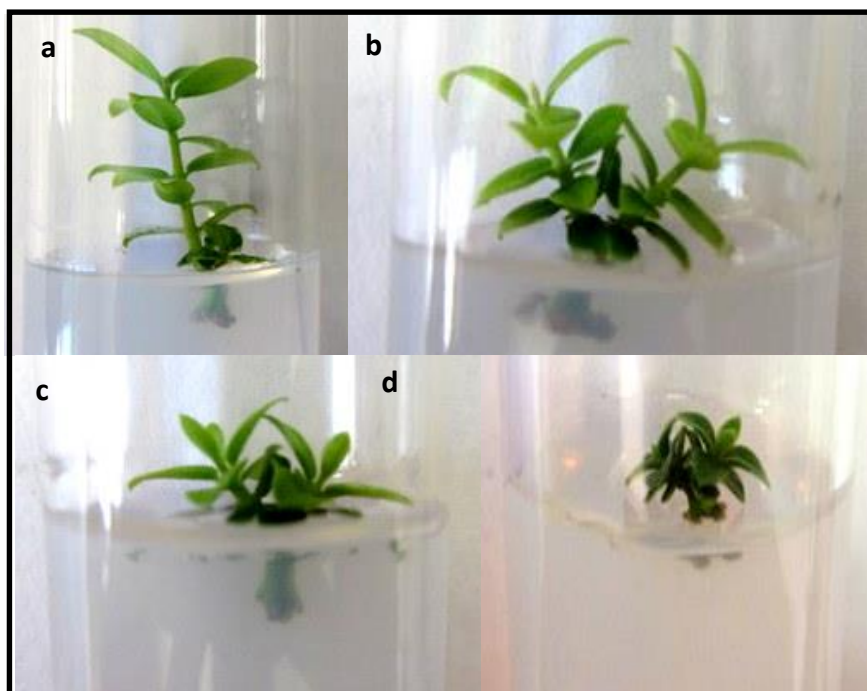


**Figura 114:** Efecto del flurprimidol en el número de yemas brotadas por explanto: **(A)** tras 4 semanas de tratamiento y **(B)** tras 4 semanas de recuperación. En cada gráfica y en cada variable medida, columnas con letras diferentes indica diferencias significativas de acuerdo con el test SNK ( $p < 0.05$ ). Cuando el porcentaje de alguno de los parámetros medidos fue cero las columnas correspondientes se representan gráficamente mediante una línea.



**Figura 115:** Efecto del flurprimidol: **(A)** en el número de hojas y **(B)** longitud de los brotes durante la fase de tratamiento con flurprimidol y durante la de recuperación, sin la presencia del retardante. En cada gráfica y fase, columnas con distinta letra indica diferencias significativas de acuerdo con el test SNK ( $p < 0.05$ ).





**Figura 116:** Aspecto de los explantos de olivo tras 4 semanas de tratamiento a distintas concentraciones de flurprimidol: **(a)** 0mg/L; **(b)** 0.1mg/L; **(c)** 1mg/L; **(d)** 10mg/L.

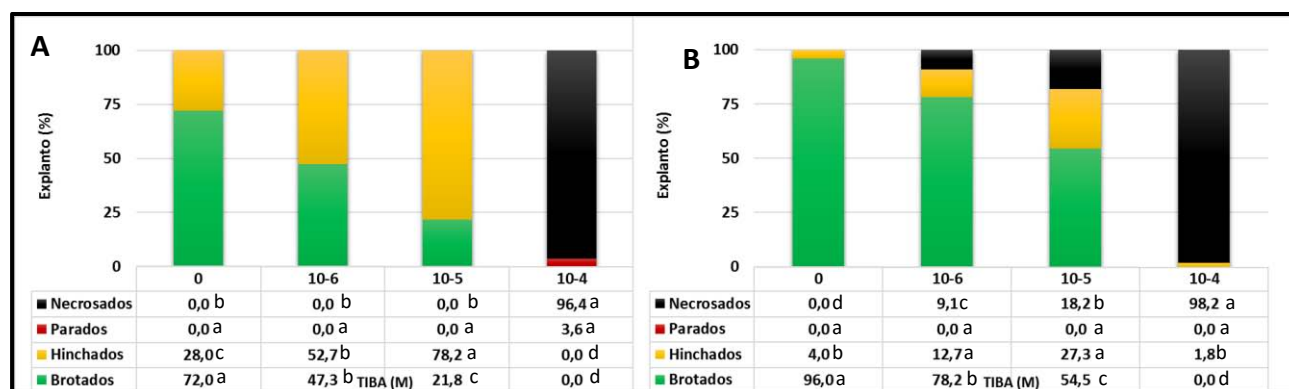
*Experimento 9.3: Efecto del ácido Triiodobenzoico (TIBA)*

Los resultados obtenidos tras cultivar los explantos en presencia de TIBA mostraron, al igual que en los casos anteriores, una disminución progresiva de la brotación de éstos a medida que aumentaba la concentración del retardante, e, igualmente, de forma paralela, un aumento en el número de explantos hinchados, con la excepción de la concentración  $10^{-4}$  M, donde prácticamente todos los explantos estaban necrosados. Por el contrario, la necrosis fue nula en el resto de concentraciones (**Figura 117-A**). El número de explantos parados también fue nulo, salvo para  $10^{-4}$  M TIBA (3.6%). En cuanto a la distribución del número de yemas brotadas por explanto, se observó un incremento notable de explantos con 0 yemas brotadas a medida que aumentaba la concentración de TIBA. Además, salvo para los explantos control, donde existía un equilibrio entre los explantos que brotan con 1 y 2 yemas, para el caso de los explantos tratados con TIBA, los explantos que brotaban lo hacían prácticamente en su totalidad con sólo 1 yema (**Figura 118-A**). En cuanto al número de hojas, no existían diferencias entre el control y los tratamientos con TIBA (**Figura 119-A**). Sin embargo, la longitud de los brotes sí que disminuía de forma significativa a medida que lo hacía la concentración de TIBA (**Figura 119-B**).

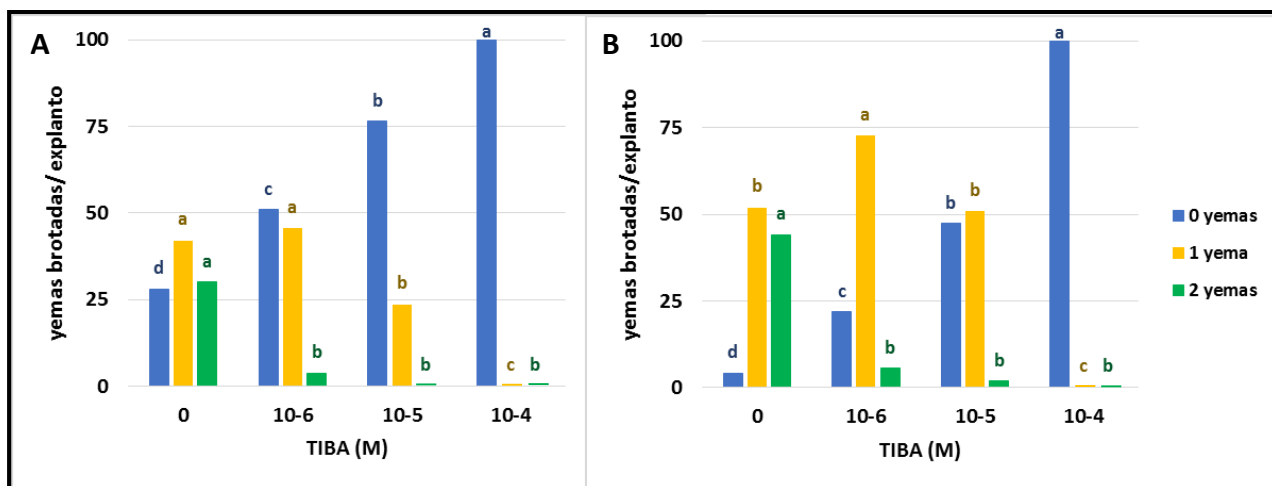


En cuanto a la recuperación de la brotación de los explantos en ausencia del retardante, ninguna de las concentraciones testadas permitía una correcta recuperación, ya que todas presentaban porcentajes de brotación significativamente menores que los obtenidos para el control (96%). Así, para las concentraciones de TIBA  $10^{-6}$ M,  $10^{-5}$ M y  $10^{-4}$ M la brotación fue del 78.2%, 54.5% y 0% respectivamente (**Figura 117-B**). Además, se observó que el porcentaje de explantos necrosados aumentaba a la par que aumentaba la concentración de TIBA (**Figura 117-B**). Este hecho se reflejó en la distribución del número de yemas brotadas por explanto, donde también, tras la recuperación, se observó un incremento significativo del número de explantos con 0 yemas brotadas a medida que aumentaba la concentración de TIBA (**Figura 118-B**). El número de hojas también disminuía con el aumento del TIBA (**Figura 119-A**) y la longitud de los brotes, que, aunque se recuperaba parcialmente en todos los casos seguía siendo significativamente menor que el control (**Figura 119-B**).

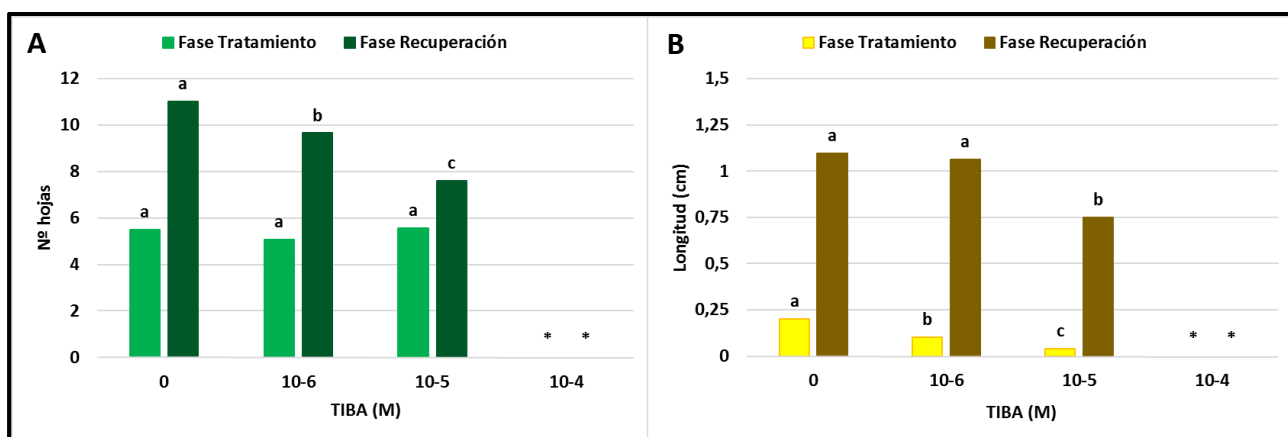
En cuanto al aspecto de las yemas, tanto en presencia como en ausencia de TIBA, no mostraron ningún tipo de anomalía más allá de un crecimiento reducido de estas respecto al control (**Figura 120**).



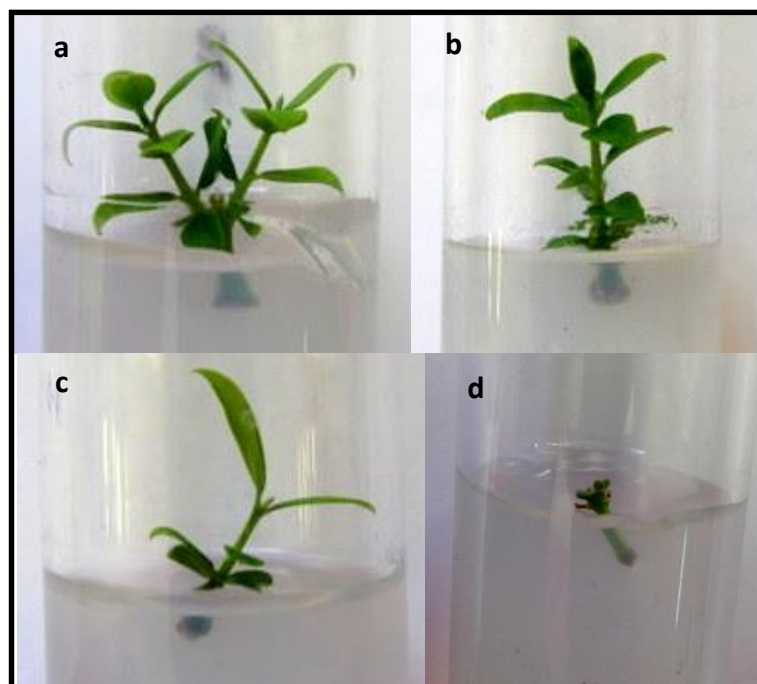
**Figura 117:** Efecto del TIBA en el desarrollo de las secciones nodales de olivo: **(A)** tras 4 semanas de tratamiento y **(B)** tras 4 semanas de recuperación. En cada fila, valores medios con letra diferente indica diferencias significativas de acuerdo con el test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).



**Figura 118:** Efecto del TIBA en la brotación de las yemas de olivo: **(A)** tras 4 semanas de tratamiento y **(B)** tras 4 semanas de recuperación. En cada gráfica y en cada variable medida, columnas con letra diferente indica diferencias significativas de acuerdo con el test SNK ( $p < 0.05$ ). Cuando el porcentaje de alguno de los parámetros medidos fue cero las columnas correspondientes se representan gráficamente mediante una línea.



**Figura 119:** Efecto del TIBA en: **(A)** el número de hojas y **(B)** longitud de los brotes durante la fase de tratamiento con TIBA y la fase de recuperación, sin retardante. En cada gráfica y en cada fase, columnas con letra diferente indica diferencias significativas de acuerdo con el test SNK ( $p < 0.05$ ). El asterisco indica que no se tuvo en cuenta en el análisis estadístico, al no disponer de ningún dato.



**Figura 120:** Aspecto de los explantos tras 4 semanas de tratamiento con distintas concentraciones de TIBA: **(a)** 0M; **(b)**  $10^{-6}$ M; **(c)**  $10^{-5}$ M; **(d)**  $10^{-4}$ M.

#### Experimento 9.4: Efecto del ácido acetil-salicílico (ASA)

Los resultados obtenidos tras cultivar los explantos en presencia de ASA mostraron que la brotación de los explantos disminuía significativamente y de forma drástica a medida que aumentaba la concentración de ASA (**Figura 121-A**). Al igual que ocurría con TIBA, se observó un elevado porcentaje de explantos necrosados a altas concentraciones, así a  $400 \mu\text{M}$  la necrosis fue del 61.8%, mientras que este valor era del 5.5% para  $100 \mu\text{M}$  y del 0% para  $25 \mu\text{M}$  ASA (**Figura 121-A**). Los explantos hinchados, por el contrario, aumentaban de forma notable y significativa conforme aumentaba la concentración del retardante, a excepción de aquellos cultivados con  $400 \mu\text{M}$  de ASA que, como se ha mencionado antes, la mayoría de los explantos estaban necrosados (**Figura 121-A**). En cuanto a los explantos parados, el porcentaje era nulo en todas las concentraciones salvo para  $100 \mu\text{M}$  donde se apreciaban valores del 10.9% (**Figura 121-A**).

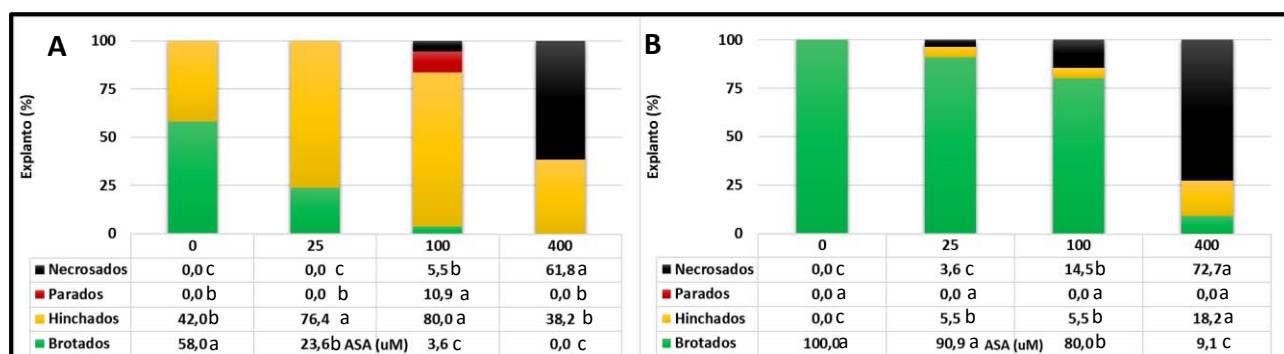
Referente a la distribución del número de yemas brotadas por explanto, lo que se apreció fue un aumento considerable de explantos con 0 yemas brotadas conforme aumentaba la concentración de ASA (**Figura 122-A**). El número de hojas no varió en las concentraciones testadas (**Figura 123-A**), pero la longitud de los brotes seguía la misma dinámica de anteriores retardantes,

con longitudes medias cada vez más bajas conforme aumentaba la concentración del retardante (**Figura 123-B**).

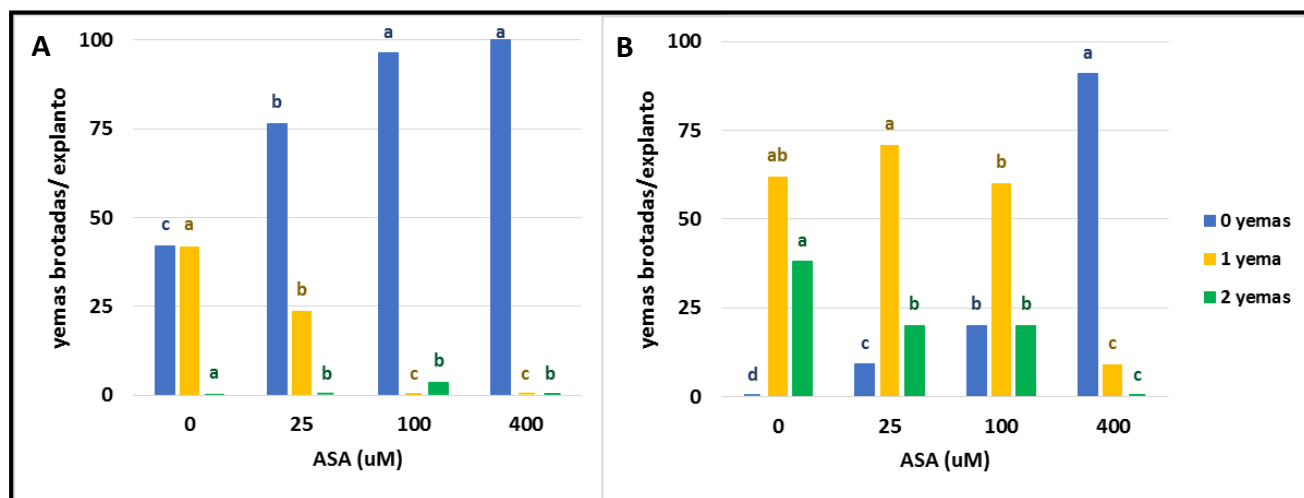
Si analizamos la recuperación de las yemas, una vez el retardante fue eliminado del medio de cultivo, se observó que salvo los que habían estado cultivados a la concentración de 400  $\mu\text{M}$ , donde el 72.7% de los explantos habían necrosado, la brotación de los explantos aumentaba a la vez que disminuía el número de explantos hinchados (**Figura 121-B**). Los explantos parados brotaron o necrosaron y, así, la necrosis aumentaba conforme aumentaba la concentración de ASA, aunque, solo a 100 y 400  $\mu\text{M}$  adquirirían valores altos (14.5% y 72.7% respectivamente) (**Figura 121-B**). En cuanto a la distribución del número de yemas brotadas/explanto, La mayoría de explantos que estuvieron previamente con ASA y que brotan lo hacen sólo con 1 yema, similarmente a lo que ocurre con los explantos control, aunque en este caso sin diferencias significativas con los explantos en los que brotan las dos yemas (**Figura 122-B**).

En cuanto al número de hojas y la longitud de los brotes, incluso tras la recuperación se observó que los valores de estos parámetros eran significativamente menores que los observados en la situación control, salvo para los que estuvieron tratados con 25  $\mu\text{M}$  ASA (**Figura 123 A y B**).

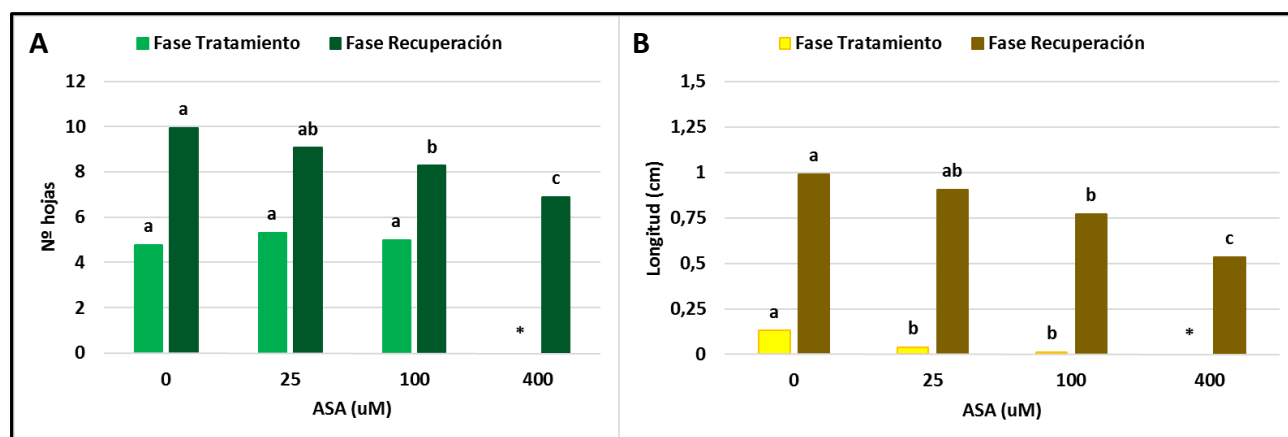
En relación al aspecto de los brotes, durante la fase de tratamiento, salvo en el tamaño de los mismos, no se apreciaban diferencias entre los distintos tratamientos y el control, sólo aquellos cultivados con 400  $\mu\text{M}$  mostraban las hojas más redondeadas de lo normal (**Figura 124-d**). Una vez los brotes pasaban a la fase de recuperación mostraban un desarrollo aparentemente normal.



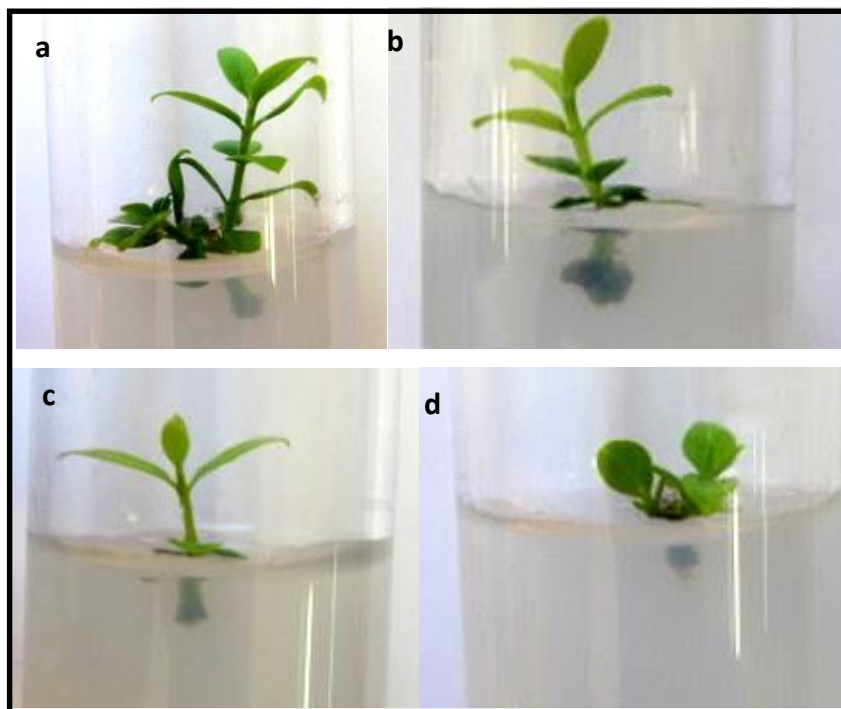
**Figura 121:** Efecto del ASA en el desarrollo de las secciones nodales de olivo: **(A)** Tras 4 semanas de tratamiento y **(B)** tras 4 semanas de recuperación. En cada gráfica y en cada fila, valores medios con letra diferente indica diferencias significativas de acuerdo con el test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).



**Figura 122:** Efecto del ASA en la brotación de las yemas de olivo: **(A)** tras 4 semanas de tratamiento y **(B)** tras 4 semanas de recuperación. En cada gráfica y en cada variable medida, columnas con letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con el test SNK ( $p < 0.05$ ). Cuando el porcentaje de alguno de los parámetros medidos fue cero las columnas correspondientes se representan gráficamente mediante una línea.



**Figura 123:** Efecto del ASA en: **(A)** el número de hojas y **(B)** la longitud de los brotes durante la fase de tratamiento con ASA y durante la fase de recuperación, sin retardante. En cada gráfica y en cada fase, columnas con letra diferente indica diferencias significativas de acuerdo con el test SNK ( $p < 0.05$ ). El asterisco indica que no se tuvo en cuenta en el análisis estadístico, al no disponer de ningún dato.



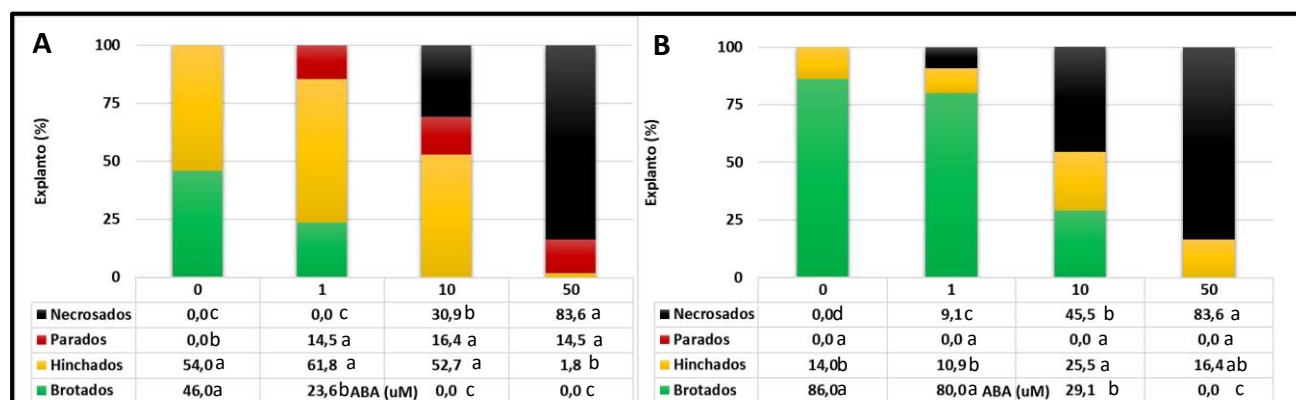
**Figura 124:** Aspecto de los explantos tras 4 semanas de tratamiento con distintas concentraciones de ASA: **(a)** 0 $\mu$ M; **(b)** 25 $\mu$ M; **(c)** 100 $\mu$ M; **(d)** 400 $\mu$ M.

Experimento 9.5: Efecto del ácido abscísico (ABA)

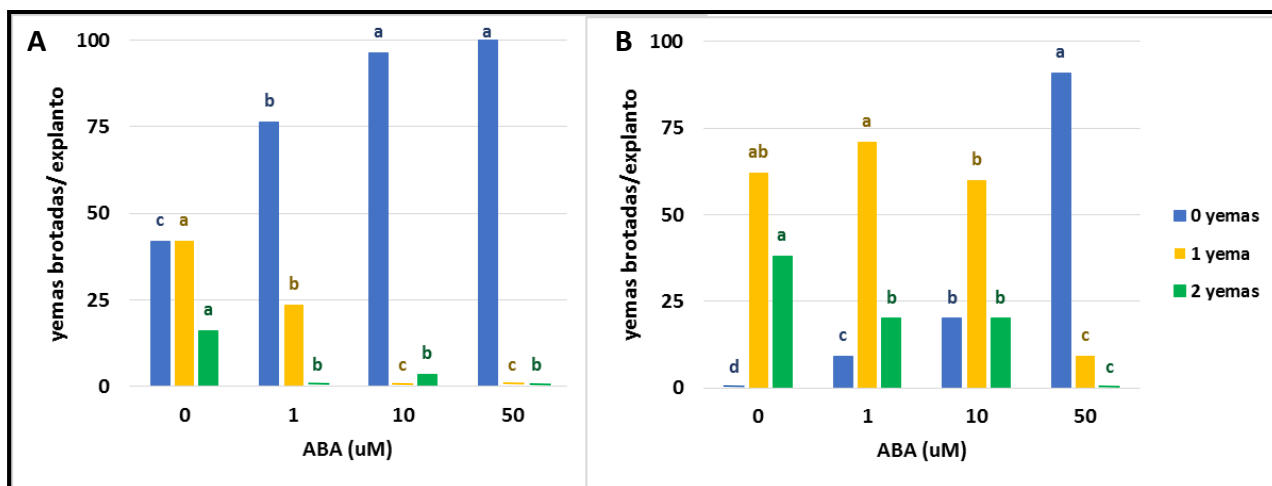
En este ensayo, se observó en presencia del retardante dos concentraciones con unos elevados porcentajes de necrosis: 10  $\mu$ M (30.9%) y 50  $\mu$ M (83.6%), además, en ambos casos el porcentaje de brotación fue del 0% (**Figura 125-A**). Para el caso de 1  $\mu$ M, observamos que la brotación disminuía notablemente y de forma significativa respecto al control (46% frente a un 23.6%). En cuanto al número de explantos hinchados no se apreciaban diferencias significativas entre el control y los pretratamientos salvo para la concentración 50  $\mu$ M (**Figura 125-A**). Caso contrario ocurría con los explantos parados, puesto que estos estaban ausentes en el control mientras que en presencia de retardante, su valor oscilaba entre el 14.5% y el 16.4% (**Figura 125-A**). El retardante también afectó a la distribución del número de yemas brotadas por explanto, de forma que a medida que aumentaba la concentración de ABA aumentó también el número de explantos con 0 yemas brotadas (**Figura 126-A**). En cuanto al número de hojas no se apreció diferencias entre la situación control y 1  $\mu$ M, pero si en lo referente a la longitud de los brotes, donde a 1  $\mu$ M ésta disminuía de forma significativa (**Figura 127 A y B**).

En cuanto a la fase de recuperación, ya en ausencia del retardante, las secciones que habían estado previamente cultivadas con 10  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  de ABA, seguían mostrando elevados porcentajes de necrosis (45,5% y 83,6% respectivamente) (**Figura 125-B**). Mientras, en la concentración 1  $\mu\text{M}$ , los valores de brotación durante dicha fase no mostraron diferencias significativas respecto al control (**Figura 125-B**). En cuanto al número de yemas brotadas por explanto, en todos los casos, incluido el control, se observó un mayor número de explantos en los que brotaban sólo 1 yema, pero las diferencias con la brotación de las dos yemas solo fueron significativas en los explantos procedentes de cultivo previo con 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  ABA (**Figura 126-B**). El número de hojas y la longitud de los brotes tras la fase de recuperación, solo mostró diferencias respecto al control en aquellos explantos previamente cultivados con 10  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  de ABA (**Figura 127 A y B**).

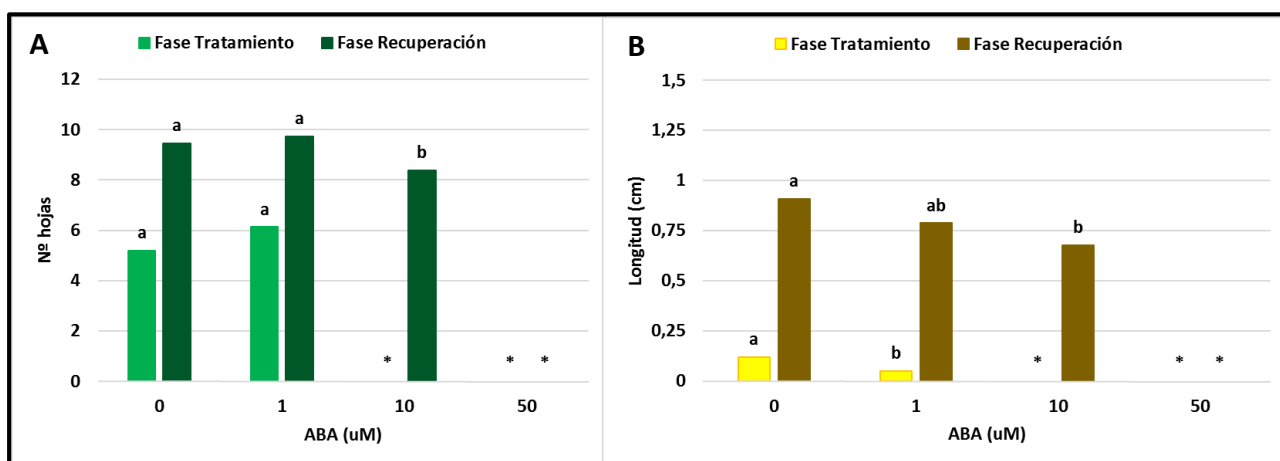
En cuanto al aspecto de las yemas, al finalizar la fase de tratamiento, aquellas que no necrosaban, mostraban buen aspecto aunque con retraso en el crecimiento y desarrollo de las mismas en presencia del retardante (**Figura 128**), pero una vez este era eliminado del medio, el desarrollo de estas yemas era completamente normal.



**Figura 125:** Efecto del ABA en el desarrollo de las secciones nodales de olivo: **(A)** tras 4 semanas de tratamiento y **(B)** tras 4 semanas de recuperación. En cada gráfica y fila, valores medios con letra diferente indica diferencias significativas de acuerdo con el test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).

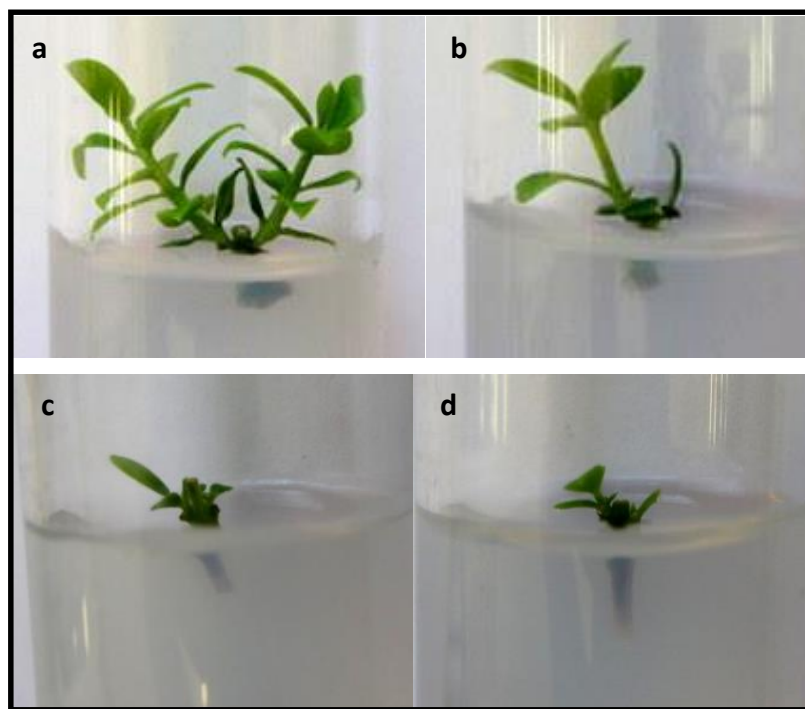


**Figura 126:** Efecto del ABA en el número de yemas brotadas por explanto: **(A)** tras 4 semanas de tratamiento y **(B)** tras 4 semanas de recuperación. En cada gráfica y para cada variable, columnas con letras distintas indica diferencias significativas de acuerdo con el test SNK ( $p < 0.05$ ). Cuando el porcentaje de alguno de los parámetros medidos fue cero las columnas correspondientes se representan gráficamente mediante una línea.



**Figura 127** Efecto del ABA: **(A)** en el número de brotes y **(B)** la longitud de los mismos durante la fase de tratamiento con ABA y durante la de recuperación, en ausencia del retardante. En cada gráfica y fase, columnas con distinta letra indica diferencias significativas de acuerdo al test SNK ( $p < 0.05$ ). El asterisco indica que no se tuvo en cuenta en el análisis estadístico, al no disponer de ningún dato.





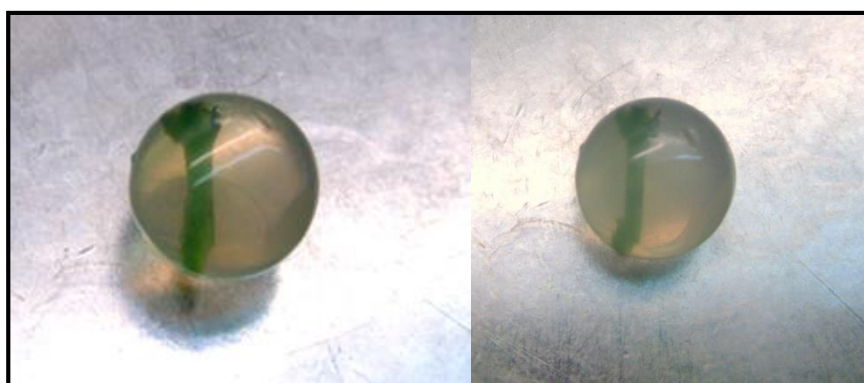
**Figura 128:** Aspecto de los explantos de olivo tras cultivarlos durante 4 semanas en medio de cultivo RP con distintas concentraciones de ABA: (a) 0 $\mu$ M; (b) 1 $\mu$ M; (c) 10 $\mu$ M; (d) 50 $\mu$ M.

Una vez completado el estudio del efecto de los distintos retardantes del crecimiento sobre las yemas de olivo, seleccionamos unos candidatos para los siguientes estudios de puesta a punto del protocolo para la conservación de material vegetal de olivo a baja temperatura. El criterio para su selección fue que en presencia de dicho retardante, el desarrollo y crecimiento de las yemas fuera visiblemente retardado o incluso anulado (baja brotación, bajo número de brotes y poca longitud de los mismos), pero una vez éste era eliminado del medio, dicho explanto mostrara un desarrollo y comportamiento lo más parecido al control.

En base a estos criterios se seleccionaron los tratamientos: 10 mg/L de paclobutrazol, 1 mg/L del flurprimidol, 25  $\mu$ M de ASA, y 1  $\mu$ M de ABA.

Experimento 10: Efecto combinado de los retardantes del crecimiento, baja temperatura, el fotoperiodo y el tipo de recuperación sobre el desarrollo de los encapsulados

Los explantos pretratados con los retardantes seleccionados fueron posteriormente encapsulados y conservados a 4 °C con un fotoperiodo de 16 o 0 horas durante 4 semanas. Comparando los datos obtenidos, no se apreció diferencias entre los tratamientos aplicados, observándose que el 100% de los encapsulados estaban parados, sin ningún tipo de desarrollo, aunque su aspecto era bueno (**Figura 129**).



**Figura 129:** Aspecto de explantos tras la fase de tratamiento (4 semanas a 4 °C).

Una vez terminada la fase de tratamiento a 4 °C, los explantos pasaron a la fase de recuperación, donde se valoró el efecto del retardante, el fotoperiodo y el tipo de recuperación en el desarrollo posterior de los mismos.

La brotación se vio afectada tanto por el retardante como por el tipo de recuperación, pero no por el fotoperiodo (**Tabla 22**), por lo que el estudio de la brotación se realizó con los valores medios obtenidos tanto por los encapsulados incubados con fotoperiodo de 16 horas como con 0 horas.

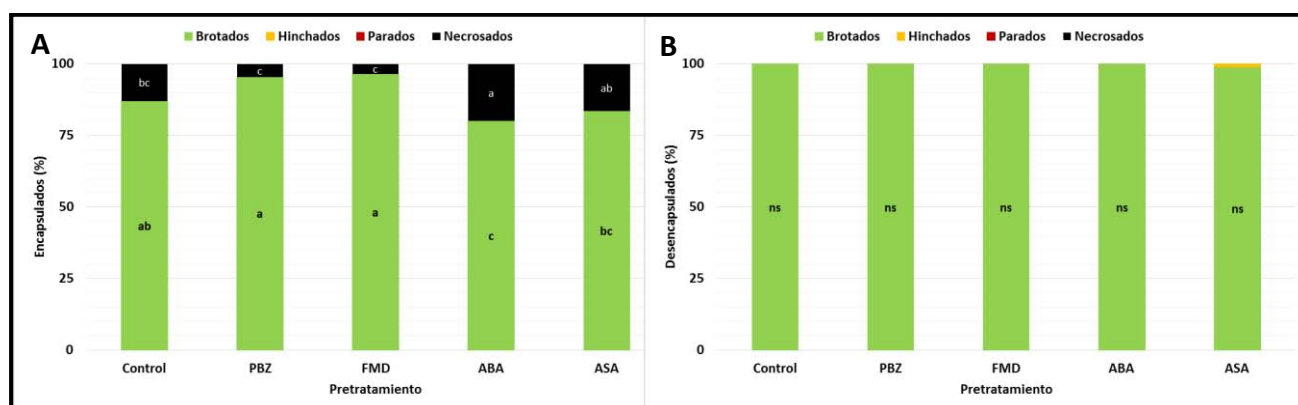
En cuanto al efecto del pretratamiento con retardantes sobre la brotación de los encapsulados, una vez puestos éstos en fase de recuperación, se observó que aquellos encapsulados que fueron pretratados con flurprimidol y paclobutrazol muestran similares porcentajes de brotación entre sí y ambos con el control, sin diferencias significativas, mientras que los tratamientos con ASA y ABA la brotación fue significativamente menor que el control (**Figura 130-A**). Cuando la recuperación se realizó desencapsulando las secciones nodales, la brotación fue

similar en todos los tratamientos, prácticamente del 100% (**Figura 130-B**) En cuanto a la necrosis, sólo se observó en las secciones que se recuperaban encapsuladas (**Figura 130-A**). Además, en los retardantes PBZ y FMD fue incluso inferior a la observada en el control, aunque de forma no significativa (**Figura 130-A**).

**Tabla 22:** Análisis de la varianza de máxima verisimilitud Chi-cuadrado.

| Fuente            | gl | Brotación           |
|-------------------|----|---------------------|
|                   |    | Chi-cuadrado        |
| Intercept         | 1  | 0,000*              |
| Retardante        | 4  | 0,000*              |
| Tipo recuperación | 1  | 0,000*              |
| Fotoperiodo       | 1  | 0,406 <sup>ns</sup> |

Efecto de los retardantes, fotoperiodo y tipo de recuperación en la brotación de secciones de olivo encapsuladas y desencapsuladas. Datos tras 8 semanas de recuperación. <sup>ns</sup> Diferencias no significativas. \*P>0.05.



**Figura 130:** Efecto de un pretratamiento con retardantes del crecimiento en la brotación de secciones nodales de olivo tras 8 semanas de recuperación (**A**) encapsulados y (**B**) desencapsulados. PBZ: Paclobutrazol; FMD: Flurprimidol; ABA: Ácido abscísico; ASA: Ácido acetilsalicílico. En cada gráfica y para una misma variable, barras con letras distintas indican diferencias significativas según el test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).

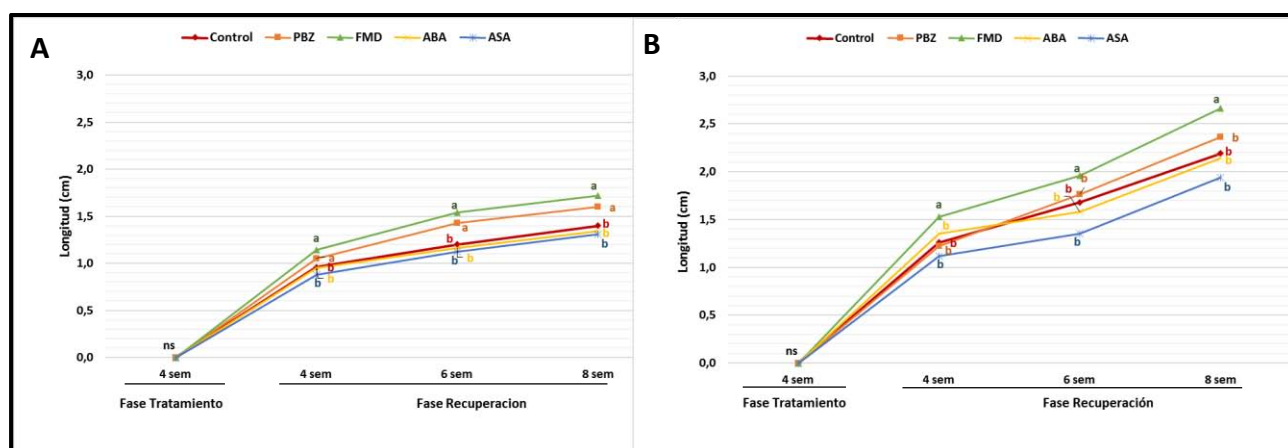
Si nos centramos en la longitud de los brotes formados tras 8 semanas de recuperación, ésta se vio afectada por todos los factores estudiados, observándose también una interacción significativa entre el retardante y tipo de recuperación, así como una interacción triple entre retardante, fotoperiodo y tipo de recuperación (**Tabla 23**).

Puesto que, tanto el fotoperiodo como el tipo de recuperación, afectaba a la longitud de los brotes, se estudiaron los datos por separado en función de dichos factores. En el caso del fotoperiodo de 16 horas, se observó que, cuando las secciones permanecían encapsuladas durante la recuperación, los pretratamientos con PBZ y con FMD, producían ambos, tras 8 semanas, brotes significativamente de mayor longitud que el control, mientras que si se desencapsulaban, únicamente los explantos que habían sido pretratados con FMD mostraban una mayor longitud que los brotes control. Igualmente, cuando la recuperación se realizaba desencapsulando las secciones nodales, las longitudes de los brotes tras 8 semanas de recuperación fueron siempre superiores a los brotes procedentes de secciones encapsuladas en todos los tratamientos ensayados (**Figura 131**). Así, la longitud promedio de los brotes de todos los pretratamientos tras 8 semanas de recuperación con los explantos encapsulados, fue de 1.47 cm frente a los 2.26 cm en caso de que la recuperación se realizara con los explantos desencapsulados.

**Tabla 23:** Análisis de la varianza (ANOVA).

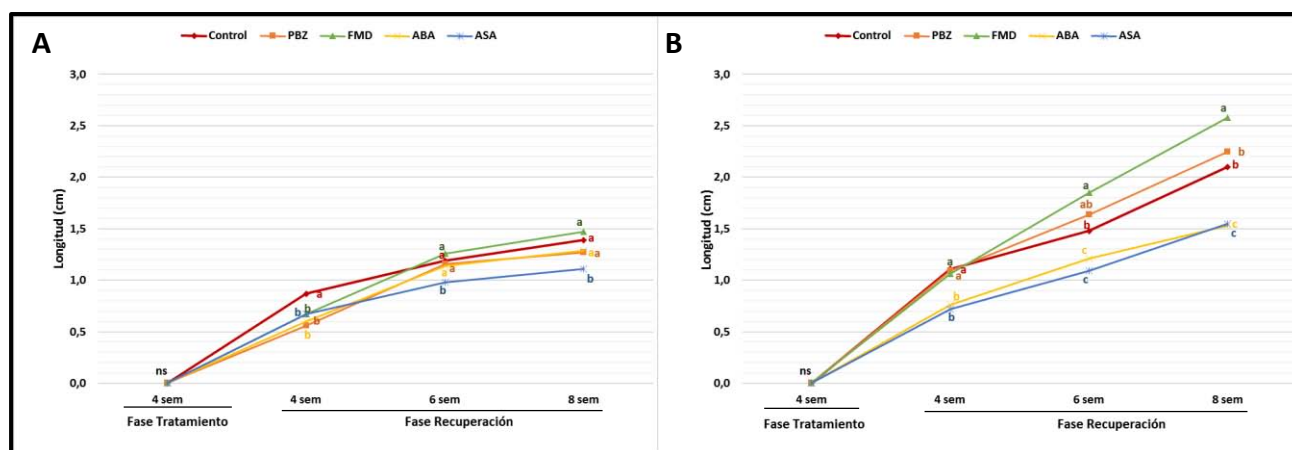
| Fuente                                   | gl | Longitud |
|--|----|----------|
| Intercept                                | 1  | 0,000*   |
| Retardante                               | 4  | 0,000*   |
| Fotoperiodo                              | 1  | 0,000*   |
| Tipo recuperación                        | 1  | 0,000*   |
| Retardante*Tipo recuperación             | 4  | 0,000*   |
| Retardante*Fotoperiodo*Tipo recuperación | 4  | 0,006*   |

Efecto del pretratamiento con retardantes, el fotoperiodo y el tipo de recuperación en la longitud de los brotes de olivo tras 8 semanas de recuperación. <sup>ns</sup> Diferencias no significativas. \*P<0.05.



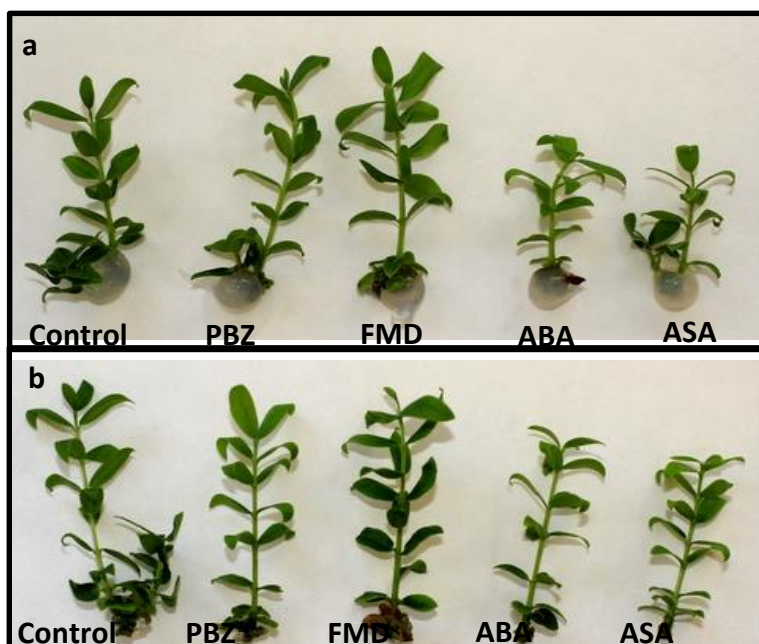
**Figura 131:** Efecto del pretratamiento con retardantes de crecimiento sobre la longitud de los brotes formados durante la fase de tratamiento (en la cual los explantos estaban encapsulados e incubados a 4 °C con 16 h de fotoperiodo) y durante la fase de recuperación (en la cual los explantos estaban: **(A)** encapsulados o **(B)** desencapsulados, en condiciones estándar de crecimiento). Para una misma fase y un mismo tiempo, valores medios con distinta letra indica diferencias significativas de acuerdo con el test SNK ( $p < 0.05$ ). PBZ: Paclobutrazol; FMD: Flurprimidol; ABA: Ácido abscísico; ASA: Ácido acetilsalicílico.

Cuando el fotoperiodo fue de 0 horas, se observó que el pretratamiento con FMD producía brotes significativamente de mayor longitud que el control y que el resto de tratamientos, pero esto sucedía sólo cuando la recuperación se realizaba desencapsulando las secciones nodales (**Figura 132-B**). Cuando las secciones estaban encapsuladas, ningún retardante mostraba diferencias respecto al control, salvo el ASA que presentaba longitudes significativamente inferiores (**Figura 132-A**). En el caso del tipo de recuperación, cuando esta se realizaba desencapsulando las secciones nodales, se observó que las longitudes de los brotes fueron siempre superiores (**Figura 132**). Así, la longitud promedio de los brotes de todos los pretratamientos tras 8 semanas de recuperación cuando las secciones nodales permanecían encapsuladas fue de 1.31 cm frente a los 2.00 cm en caso de que estuvieran desencapsuladas durante la fase de recuperación.



**Figura 132:** Efecto del pretratamiento con retardantes de crecimiento sobre la longitud de los brotes formados durante la fase de tratamiento (en la cual los explantos estaban encapsulados e incubados a 4 °C con 0 h de fotoperiodo) y durante la fase de recuperación (en la cual los explantos estaban: **(A)** encapsulados o **(B)** desencapsulados, en condiciones estándar de crecimiento). Para una misma fase y un mismo tiempo, valores medios con distinta letra indica diferencias significativas de acuerdo con el test SNK ( $p < 0.05$ ). PBZ: Paclobutrazol; FMD: Flurprimidol; ABA: Ácido abcísico; ASA: Ácido acetilsalicílico).

Referente al aspecto general de los brotes, no se detectó ningún tipo de alteración visualmente apreciable debida al empleo de los retardantes de crecimiento, y, una vez concluida la fase de recuperación, todos los explantos mostraban un buen desarrollo y crecimiento (**Figura 133**).



**Figura 133:** Aspecto de los explantos de olivo tras 8 semanas de recuperación cultivados en condiciones estándar de crecimiento tanto: **(a)** encapsulados como **(b)** desencapsulados. PBZ: Paclobutrazol; FMD: Flurprimidol; ABA: Ácido abscísico; ASA: Ácido acetilsalicílico.

Con estos experimentos se buscaba ir definiendo que parámetros podrían afectar al material de olivo en una conservación en frío a medio plazo, para maximizar la supervivencia y desarrollo del material. De los pretratamientos aplicados, el flurprimidol a 1 mg/L podría tener un efecto positivo en la conservación, ya que su presencia en el medio como pretratamiento reduce el crecimiento y desarrollo de los explantos, pero una vez es eliminado del medio permite un alto porcentaje de brotación y supervivencia de los encapsulados y unos brotes con longitudes, incluso, significativamente mayores que el control tras la fase de conservación a 4 °C y posterior recuperación.

Por su parte, tanto el fotoperiodo como el tipo de recuperación parecen afectar a brotación y/o longitud de los brotes, por lo que en los experimentos a largo plazo se seguirán ensayando, para valorar si tuvieran un efecto más significativo a más largo plazo.

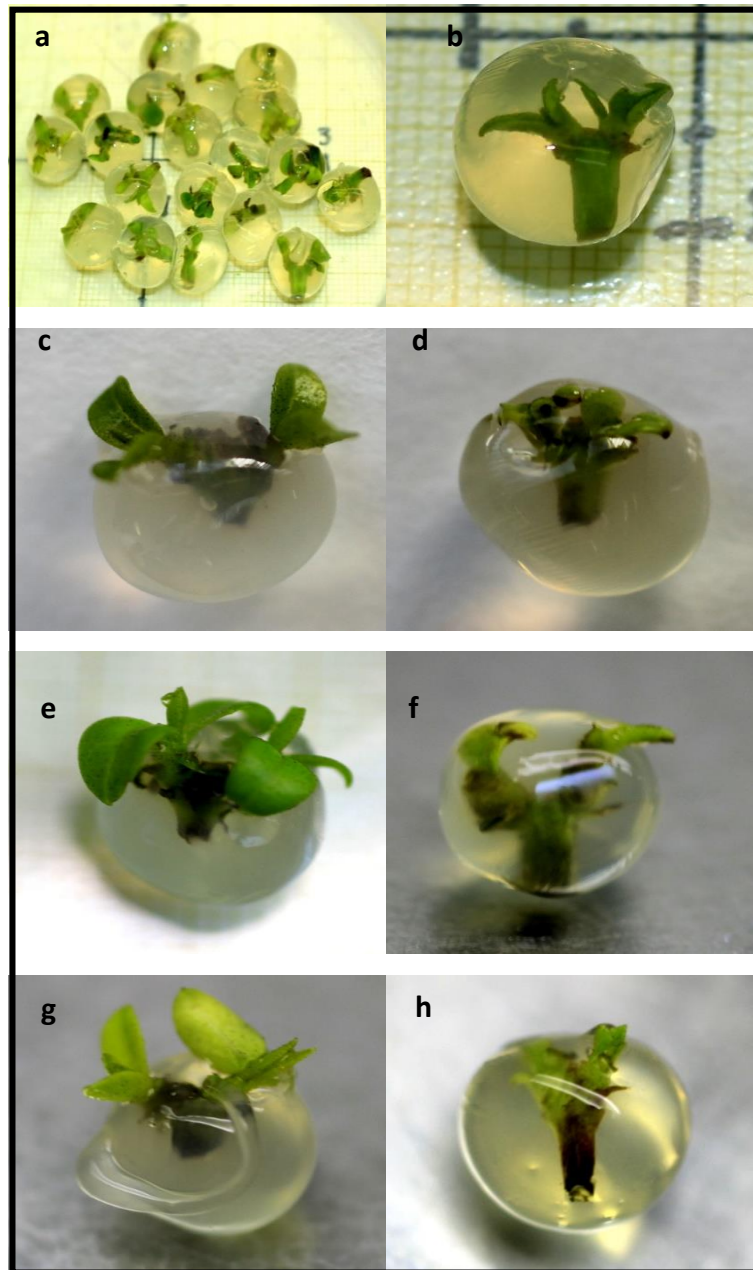
### III.3.3. Conservación a medio plazo de secciones nodales de olivo mediante encapsulación a baja temperatura

Con este ensayo se pretendía poner a punto un protocolo de conservación de secciones nodales de olivo en alginato a baja temperatura (4 °C) basándonos en los resultados obtenidos de brotación y longitudes de los brotes en los ensayos anteriores, testándose el efecto de un pretratamiento con sacarosa (100 g/L durante 5 horas), otro con flurprimidol (1 mg/L), el fotoperiodo, los tiempos de conservación en frío (4 °C) durante 3, 6, 9 y 12 meses y el tipo de recuperación, resultando 8 tratamientos diferentes.

Tras el periodo de conservación, el aspecto de los encapsulados variaba en función del fotoperiodo y de la duración de la conservación. A los 3 meses de conservación, los encapsulados mostraban muy buen aspecto y color, y no se apreciaba diferencia de aspecto entre los conservados en uno u otro fotoperiodo (**Figura 134-a y b y Tabla 24**). A los 6 meses de conservación, ya se empieza a observar diferencias, así, los encapsulados conservados con fotoperiodo de 16 horas de luz, mostraban un buen aspecto, en general, aunque con cierta necrosis en el tallo de las secciones encapsuladas (20%), aunque esto no parecía interferir en su desarrollo, y ya tras la conservación el 40% de los encapsulados mostraban brotación (**Tabla 24**), incluso cuando presentaban cierta necrosis en el tallo (**Figura 134-c**). Mientras, los encapsulados conservados con fotoperiodo de 0 horas, ninguno mostraba brotación, y se observó un 5% de necrosis en las secciones, y las restantes se mantenían hinchadas (95%) (**Tabla 24 y Figura 134-d**). A los 9 meses de conservación, todos mostraban un buen aspecto general, aunque los conservados con fotoperiodo de 16 horas, tenían mejor aspecto y mayor desarrollo, así, un 40% de los encapsulados brotaban, y el restante 60% estaban hinchados (**Tabla 24 y Figura 134-e**). Por contra, aunque los encapsulados conservados con 0 horas de luz, también presentaban buen aspecto general, solo un 10%, consiguen brotar, y los restantes 90% permanecen hinchados (**Tabla 24**). Patrón similar se observó para los encapsulados conservados durante 12 meses, así, aquellos conservados con fotoperiodo de 16 horas, presentaban mejor aspecto y estaban brotados el 70% de los encapsulados, mientras que los encapsulados conservados con fotoperiodo de 0 horas el porcentaje de brotación fue del 35% (**Tabla 24**). Destacar que, tras los 12 meses de conservación, se observó necrosis en los encapsulados, tanto con fotoperiodo de 16 h como de 0 h (15% y 10% respectivamente). En cuanto a su aspecto, las secciones encapsuladas mostraban necrosis en el tallo, en ambos fotoperiodos, pero en mayor medida a 0 h,



donde el 100% de las secciones la presentaban, mientras que, en las secciones conservadas con 16 h, esta era del 60% (**Figura 134-g y h**).



**Figura 134:** Aspecto de los encapsulados tras el periodo de conservación: **(a)** 3 meses con fotoperiodo de 16 horas; **(b)** 3 meses con fotoperiodo de 0 horas; **(c)** 6 meses con fotoperiodo de 16 horas; **(d)** 6 meses con fotoperiodo de 0 horas; **(e)** 9 meses con fotoperiodo de 16 horas; **(f)** 9 meses con fotoperiodo de 0 horas; **(g)** 12 meses con fotoperiodo de 16 horas; **(h)** 12 meses con fotoperiodo de 0 horas.



**Tabla 24:** Efecto del periodo de conservación y el fotoperiodo en la brotación y desarrollo de las secciones nodales encapsuladas de olivo.

| Periodo de conservación (4 °C) | Fotoperiodo (h) | Brotación (%) | Hinchadas (%) | Necrosis (%) |
|--------------------------------|-----------------|---------------|---------------|--------------|
| <b>3 meses</b>                 | 16              | 0             | 100           | 0            |
|                                | 0               | 0             | 100           | 0            |
| <b>6 meses</b>                 | 16              | 40            | 55            | 5            |
|                                | 0               | 0             | 95            | 5            |
| <b>9 meses</b>                 | 16              | 40            | 60            | 0            |
|                                | 0               | 10            | 90            | 0            |
| <b>12 meses</b>                | 16              | 40            | 45            | 15           |
|                                | 0               | 15            | 75            | 10           |

En cuanto a la recuperación de los explantos, tras el análisis estadístico de los datos (**Tabla 25**) podemos constatar que el pretratamiento con flurprimidol, el pretratamiento con sacarosa y el tipo de recuperación tienen un efecto sobre la recuperación y brotación de los encapsulados a los 3, 6 y 9 meses, mientras que a los 12 meses solo el flurprimidol y la sacarosa muestran un efecto significativo de los encapsulados en casi todos los tiempos de conservación analizados (**Figura 135**).

El pretratamiento con sacarosa afecta de forma negativa a la conservación de los encapsulados, de tal forma que aquellos explantos pretratados con sacarosa una vez concluida la conservación y valorada la recuperación presentan peores porcentajes de supervivencia y brotación que los que no estuvieron pretratados (**Figura 135**).

Por su parte, el pretratamiento con flurprimidol provoca una mejora general en la supervivencia de los encapsulados. Este efecto positivo se da en todos los casos, tanto en explantos pretratados o no con sacarosa y en todos los tiempos de conservación ensayados (**Figura 135**).

Ni el fotoperiodo no afecta a la conservación y recuperación de los explantos a ninguna de los tiempos de conservación ensayados mientras que el tipo de recuperación afecta a la recuperación de los explantos conservados de 3 a 9 meses, pero no a los conservados durante 12 meses (**Tabla 25**).

También se ha observado en todos los casos una interacción flurprimidol-sacarosa (**Tabla 25**). Así, los explantos pretratados con flurprimidol pero sin pretratamiento de sacarosa son los que presentan significativamente mayores porcentajes de supervivencia (**Figura 135**).

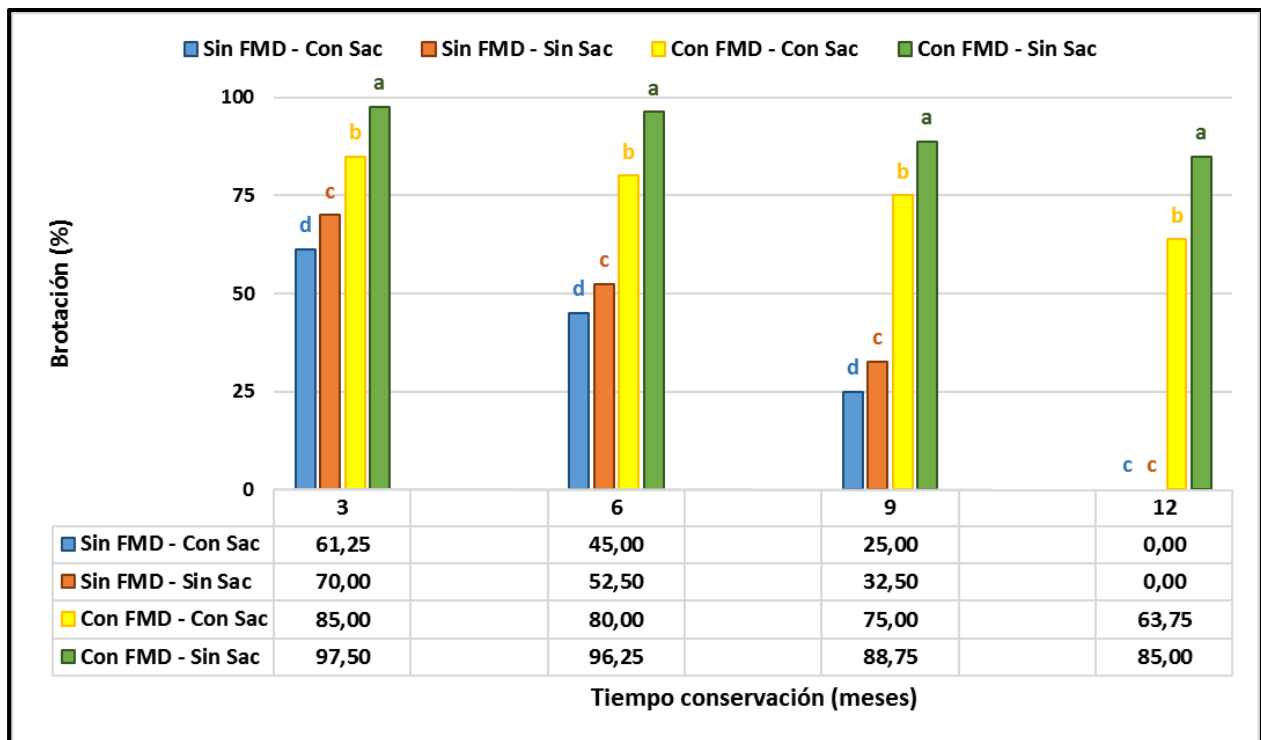
Además, se ha observado también una interacción entre el flurprimidol y el fotoperiodo (**Tabla 25**), pero sólo para los tiempos de 6 y 9 meses de conservación, en los cuales los explantos no pretratados con flurprimidol e incubados bajo fotoperiodo de 16 horas de luz presentan porcentajes de supervivencia significativamente menores (**Tabla 25**). El resto de interacción entre los distintos factores no fue significativa.

**Tabla 25:** Análisis de la varianza de máxima verisimilitud Chi-Cuadrado.

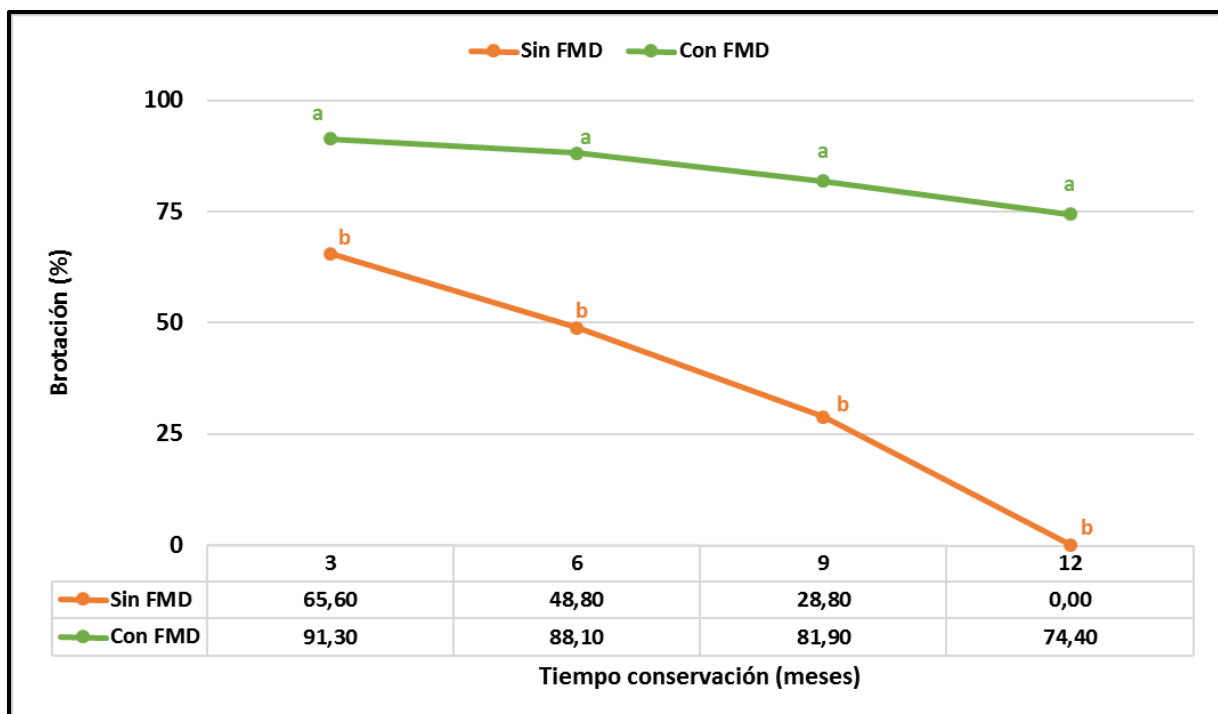
| Fuente                          | gl | Supervivencia       |                     |                     |                     |
|---------------------------------|----|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                                 |    | 3 meses             | 6 meses             | 9 meses             | 12 meses            |
| <b>Intercept</b>                | 1  | 0,000*              | 0,000*              | 0,001*              | 0,000*              |
| <b>Flurprimidol</b>             | 1  | 0,000*              | 0,000*              | 0,000*              | 0,000*              |
| <b>Sacarosa</b>                 | 1  | 0,000*              | 0,000*              | 0,000*              | 0,005*              |
| <b>Fotoperiodo</b>              | 1  | 0,056 <sup>ns</sup> | 0,063 <sup>ns</sup> | 0,059 <sup>ns</sup> | 0,073 <sup>ns</sup> |
| <b>Tipo Recuperación</b>        | 1  | 0,001*              | 0,007*              | 0,000*              | 0,437 <sup>ns</sup> |
| <b>Flurprimidol*Sacarosa</b>    | 1  | 0,045*              | 0,009*              | 0,000*              | 0,005*              |
| <b>Flurprimidol*Fotoperiodo</b> | 1  | 0,089 <sup>ns</sup> | 0,001*              | 0,004*              | 0,083 <sup>ns</sup> |

Efecto del pretratamiento con flurprimidol y con sacarosa, el fotoperiodo durante el periodo de conservación y el tipo de recuperación tras 3, 6, 9 y 12 meses de conservación a 4 °C en la supervivencia de los encapsulados de olivo tras 8 semanas de recuperación. Datos de 1 repetición. <sup>ns</sup> Diferencias no significativas. \*P<0.05

Por tanto, en un análisis general de los datos, podemos decir que el pretratamiento con flurprimidol es el factor que mayor efecto tiene en la supervivencia de los explantos independientemente de la combinación de otros factores (**Figura 136**). Así, a los explantos a los que se les aplica un pretratamiento de flurprimidol tendrían una brotación que oscila entre el 91% a los 3 meses y un 74 a los 12 meses (**Figura 136**).



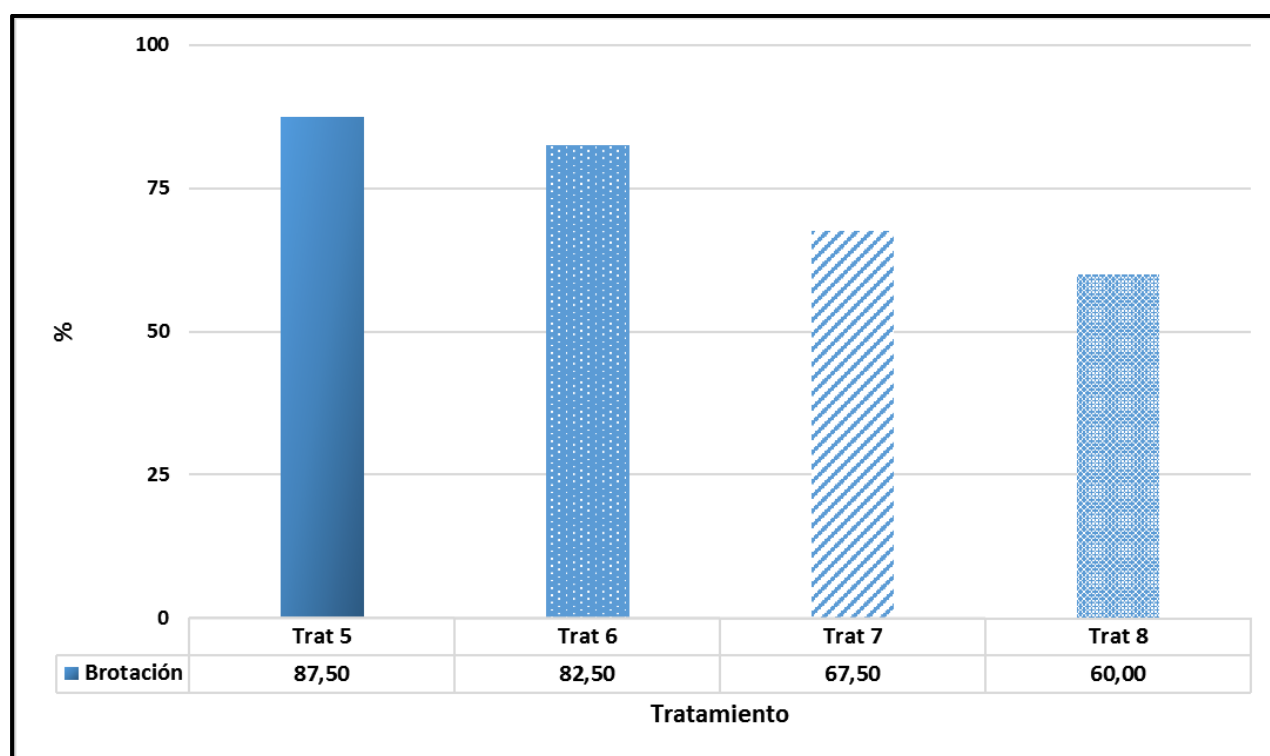
**Figura 135:** Efecto del pretratamiento con flurprimidol (1 mg/L) y/o sacarosa (100 g/L) en la brotación de los encapsulados de olivo tras su conservación durante 3, 6, 9 y 12 meses a 4 °C y 8 semanas de recuperación. Datos de una repetición. En cada tiempo de conservación, columnas con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con el test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).



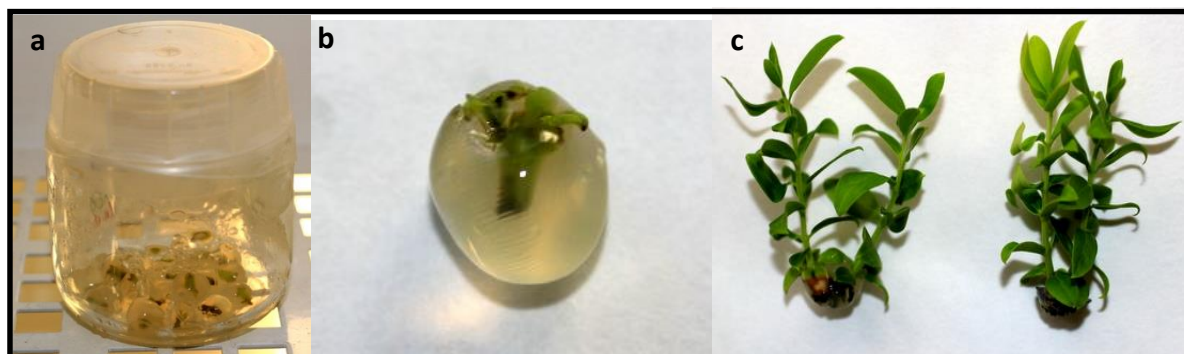
**Figura 136:** Efecto del pretratamiento con flurprimidol (1 mg/L) en la supervivencia de los explantos conservados a 4 °C durante 3, 6, 9 y 12 meses. Datos tras 8 semanas de recuperación. Datos de una repetición. En cada tiempo de conservación, valores con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con el test  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).

Si analizamos los resultados de los 8 tratamientos ensayados de forma individual a los 12 meses, pudimos constatar como en los tratamientos 1 a 4, que no contemplaban el pretratamiento con flurprimidol, no se pudo recuperar ningún material, siendo la supervivencia de las secciones nodales y encapsulados nula, mientras que, en los tratamientos 5 a 8, que llevaban un pretratamiento con flurprimidol, se pudo recuperar material en todos ellos, siendo los mejores tratamientos los 5 y 6, con un 87.5% y un 82.5% de brotación respectivamente y sin diferencias significativas entre ellos (**Figura 137**). La longitud media de los brotes de estos tratamientos fueron de 2.7 cm, sin diferencias significativas entre ellos.

Además, en relación al aspecto de los explantos, tras la fase de recuperación presentaron un crecimiento y desarrollo normal, sin ningún tipo de rastro debido al efecto del pretratamiento con el retardante, ni debido a la encapsulación o posterior conservación a baja temperatura (**Figura 138**).



**Figura 137:** Porcentaje de brotación media de los explantos (encapsulados y desencapsulados) tras 8 semanas de recuperación. Trat 5: Flurprimidol-Sin Sacarosa-16h; Trat 6: Flurprimidol-Sin Sacarosa-0h; Trat 7: Flurprimidol-Con Sacarosa-16h; Trat 8: Flurprimidol-Con Sacarosa-0h. Datos de una repetición.



**Figura 138:** Aspecto de los explantos durante el proceso de conservación: **(a)** Imagen de los encapsulados almacenados en frascos estériles a 4 °C; **(b)** Encapsulado tras 12 meses de conservación; **(c)** Aspecto de los explantos pretratados con flurprimidol y conservados durante 12 meses a 4 °C tras 8 semanas de recuperación: (izquierda) encapsulado y (derecha) desencapsulado.

Todos estos datos nos hacen indicar que el pretratamiento con flurprimidol mejora notablemente la conservación de los encapsulados a baja temperatura, y que las mejores condiciones para futuros ensayos de conservación sería aplicar a los explantos únicamente un pretratamiento con flurprimidol (sin pretratamiento con sacarosa), y posteriormente proceder a su encapsulación bajo el protocolo establecido y a su conservación a 4°C, independientemente del fotoperiodo, pues este a la vista de los resultados parece no afectar, una vez los encapsulados están pretratados con FMD.



## III.4. DISCUSIÓN

### III.4.1. Frigoconservación

En el presente estudio, hemos comprobado la utilidad del protocolo de frigoconservación que se puso a punto para la variedad Arbequina (Imbroda *et al.*, 2014), para la conservación de 8 variedades de olivo. Aunque con una gran heterogeneidad en la respuesta de las mismas, se han podido conservar las 8 variedades estudiadas hasta los 12 meses, con valores medios del porcentaje de supervivencia tras la fase de recuperación entre el 5% y el 67%. En todos los casos muy por debajo de los resultados obtenidos con la variedad 'Arbequina', donde se alcanzó el 82% de supervivencia (Imbroda *et al.*, 2014). Esto parece indicar un fuerte efecto del genotipo en la respuesta de las plantas al frío, este efecto del genotipo también se ha descrito en la conservación de colecciones *in vitro* de patata (Sarkar *et al.*, 2001; Arrigoni-Blank *et al.*, 2014). Un aspecto a tener en cuenta son las diferencias entre los genotipos, respecto a la capacidad de adaptación a las condiciones de conservación *in vitro*. Rao (2004), señala que el rango de temperatura óptimo para la conservación del material *in vitro* varía según la especie, aunque las tolerantes al frío se conservan a temperaturas entre 0 °C-5 °C, mientras que las especies tropicales se conservarían a 15 °C-20 °C. Esto es aplicable a variedades con distinta sensibilidad al frío.

En el caso del olivo, Barranco *et al.* (2005a), catalogan las variedades según su comportamiento y adaptación al frío en campo como tolerantes o sensibles. Respecto a las variedades que hemos estudiado, 'Blanqueta-11', 'Castellana', 'Cornicabra', 'Hojiblanca' y 'Lechín de Granada', serían variedades tolerantes o con gran capacidad de adaptación al mismo; mientras que las variedades 'Sevillenca', 'Verdial de Vélez Málaga' y 'Villalonga' aparecen reflejadas como sensibles. Si comparamos el comportamiento de dichas variedades en la naturaleza con su comportamiento *in vitro*, podemos concretar que aquellas variedades definidas como sensibles en la naturaleza, *in vitro* mantienen ese comportamiento y presentan porcentajes de supervivencia inferiores al 25% tras 12 meses de conservación, este es el caso de 'Sevillenca' (8.6%), 'Verdial de Vélez Málaga' (25%) y 'Villalonga' (11.4%). Por el contrario, en aquellas variedades definidas como tolerantes, sólo 'Castellana' (68.6%), 'Hojiblanca' (38.6%) y 'Lechín de Granada' (34.3%) se pueden considerar con buena adaptación al frío a la conservación *in vitro*. Mientras que 'Blanqueta-11' y 'Cornicabra' consideradas variedades tolerantes al frío en la naturaleza, *in vitro* se comportan como variedades sensibles con un 5.0% y 14.3% de supervivencia respectivamente. Por tanto, no se

observa relación entre la tolerancia al frío en campo de una especie e *in vitro*. Una posible explicación es que el árbol en campo sufre un descenso de las temperaturas gradualmente, lo que posibilita que se pueda aclimatar (Byun *et al.*, 2014), mientras que en la frigoconservación se pasa directamente de 25 a 8 grados, por lo que el daño al someterlo a bajas temperaturas es mayor. Por este motivo, Hazarika (2003), señala que, en general, las plantas micropropagadas necesitan de periodo de aclimatación gradual para que estas puedan adaptar sus características anatómicas y fisiológicas al nuevo ambiente al que serán sometidas.

Otros tratamientos pueden ser utilizados de forma complementaria o alternativa a la bajada gradual de temperatura, vg, carbohidratos, fotoperiodo o adición al medio de reguladores/inhibidores de crecimiento, entre otros.

En olivo, Gulen *et al.* (2009) y Cansev *et al.* (2009) han puesto de manifiesto que las diferencias en cuanto a adaptación de las variedades de olivo en el campo a condiciones de estrés, particularmente a frío, son un reflejo de las diferencias en cuanto a la capacidad de estas para la acumulación de carbohidratos bajo dichas condiciones. Así, en cultivares tolerantes al frío, los niveles de carbohidratos solubles eran mayores que en cultivares sensibles. En este sentido, Bartolozzi *et al.* (2001), comprobaron en la variedad 'Moraiolo', que una aclimatación de explantos mediante el empleo de sacarosa (6%) durante 14 días antes de su conservación a 4 °C, mejoraba la tolerancia de los mismos a las bajas temperaturas. Por otro lado, la adición de sacarosa al medio de conservación en frío también ha dado buenos resultados mejorando la supervivencia de los brotes especies como la patata (Arrigoni-Blank *et al.* (2014). Esto podría indicar que aumentando la concentración de sacarosa en el medio de frigoconservación, en estas especies más sensibles, se podría alcanzar una mayor supervivencia de los brotes conservados.

Por otro lado, se ha sugerido que inhibidores o retardantes del crecimiento como paclobutrazol, flurprimidol, uniconazol, ancimidol, etc. tienen un importante papel en diversos procesos de la micropropagación, ya que parecen evitar los daños que producen diversos estreses en la planta (Hazarika *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 1991). También, se ha comprobado el efecto positivo de estos compuestos en la conservación *in vitro* (Sarkar *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2015).

En cuanto al fotoperiodo, nosotros nos basamos en el protocolo descrito por Imbroda *et al.* (2014), los cuales comprobaron que, para la variedad 'Arbequina', era más efectiva la conservación del material con fotoperiodo de 16 horas, pues en oscuridad observaron mayores tasas de necrosis.



Resultados similares obtuvieron Oka y Niino (1997) en la conservación de brotes de peral, donde comprobaron que un fotoperiodo de 8h era más favorable para la conservación que la oscuridad. Sin embargo, estos resultados se contraponen a los obtenidos por Lambardi *et al.* (2002) en olivo, en los que los mejores resultados se obtenían en oscuridad.

Por otro lado, otra idea que se desprende de nuestros datos es que, a pesar de que se consiguió conservar material de todas las variedades hasta los 12 meses para todas las variedades, la duración de la conservación influye de manera clara en los porcentajes de supervivencia y recuperación del material. De tal forma que, o el aumento del tiempo de conservación de 6 a 12 meses disminuía los porcentajes de la supervivencia de los explantos, en todas las variedades y sólo la variedad 'Castellana', con un 74.3%, superó el 50% de supervivencia. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores que observaron un descenso pronunciado de la supervivencia de los explantos al aumentar el tiempo de conservación (Arrigoni-Blank *et al.*, 2014; Capuana y Di Lonardo, 2003; Lambardi *et al.*, 2002; Pérez-Tornero *et al.*, 1999). Si la situación de estrés se mantiene durante un tiempo excesivo, la capacidad de resistencia de la planta se agota y ralentiza o detiene sus funciones vitales, entrando en la fase de agotamiento, que culmina con la muerte de la planta. Pero cuando el estrés desaparece, las funciones fisiológicas de la planta pueden regenerarse y alcanzar un nuevo estado fisiológico óptimo (Tadeo y Gómez-Cadenas, 2008).

En cuanto al desarrollo de los brotes tras la conservación, no se observaron diferencias en la longitud de los mismos tras 6 y 12 meses. Esto se debe a que, una vez es eliminado el estrés, las plantas que sobreviven entrarían en la fase de regeneración, recuperando su metabolismo normal. Resultados similares obtuvieron Trifunovic *et al.* (2007), que no observaron diferencias en los ratios de crecimiento y multiplicación en explantos de *Chrysanthemum* que fueron conservados a 4°C durante 2, 4 y 6 meses y posteriormente cultivados a 23°C.

En definitiva, el método utilizado podría ser utilizado para introducir in vitro las restantes variedades de olivo del BGMO, no obstante, en aquellas más sensibles al frío como 'Sevillena' o 'Verdial de Vélez Málaga' habría que estudiar otras opciones como un periodo de aclimatación previa con sacarosa, reguladores y/o retardantes del crecimiento, que se han empleado con éxito en la conservación de otras especies. Y, finalmente, sería conveniente estudiar el efecto de otros fotoperiodos, incluida la oscuridad, visto que incluso en otras variedades de olivo han dado resultados positivos.

### III.4.2. Encapsulación

#### Puesta a punto

En la preparación de las cápsulas y los encapsulados, los mejores resultados se obtuvieron con un 5% de alginato y solidificación durante 10 min en 100mM de  $\text{CaCl}_2$ , pues fue el tratamiento donde mejores resultados de desarrollo de las secciones nodales se obtuvo. El porcentaje de alginato empleado en nuestro ensayo es relativamente alto en comparación con los empleados por otros autores. Así, Micheli *et al.*, 2007b e Ikhtlaq *et al.*, 2010, en estudios con olivo emplearon concentraciones del 2.5%, lo cual estaría más en consonancia con lo recogido en la bibliografía, donde mayoritariamente predomina el empleo del alginato a una concentración entorno al 3% (Watt *et al.*, 2000; Chand y Singh, 2004; Lisek y Orlikowska, 2004; Naik y Chand, 2006; Singh *et al.*, 2006; Rai *et al.*, 2008a; Ahmad y Anis, 2010; Verma *et al.*, 2010; Cheruvathur *et al.*, 2013; Bukhari *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2015; Saha *et al.*, 2015). Sin embargo, en otras especies es común el empleo de concentraciones más alta, en torno al 4%, como es el caso de *Morus* (Pattnaik y Chand, 2000) *Cedrela fissilis* (Nunes *et al.*, 2003), Roble (Tsvetkov y Hausman, 2005) y *Populus* (Tsvetkov *et al.*, 2006); del 5% en *Musa* (Ganapati *et al.*, 2001), *Cannabis sativa* (Lata *et al.*, 2009) o del 6% en *Valeriana Wallichii* (Mathur *et al.*, 1989). Puesto que el alginato de sodio que se utiliza es un producto que se extrae de algas marinas pardas y tiene una composición variable, esta diferencia entre laboratorios puede deberse a diferencias en la pureza y composición del alginato utilizado, ya que nosotros mismos hemos observado diferencias de viscosidad entre lotes del mismo producto.

A la hora de establecer la concentración de la cápsula, hay que establecer un equilibrio entre aquella concentración que permita establecer una cápsula con una firmeza y consistencia adecuada y que, a la vez, permita la correcta germinación de los explantos, y en nuestro caso, el equilibrio se alcanzó usando una matriz de alginato al 5% y solidificación con una solución de cloruro de calcio 100mM durante 10 minutos.

Haque y Ghosh (2014), estudiaron el efecto de la concentración de alginato, y pusieron de manifiesto que lo que realmente afecta al desarrollo y viabilidad de los explantos, es la consistencia y presión mecánica que ejerce la propia cápsula sobre el explanto. En su estudio, a pesar de que los mejores porcentajes de germinación se obtenían con una matriz con un 1% de alginato (93.3%) frente al 86.5% de germinación que se obtenía cuando la matriz llevaba un 2.5%, decidieron incluir en el protocolo la concentración de 2.5% porque las cápsulas formadas con 1% de alginato no

presentaban la consistencia necesaria y dificultaba su manejo. Y por el contrario, las cápsulas formadas con matriz al 4% mostraban un menor porcentaje de germinación (57.8%), debido, según ellos, al endurecimiento de la cápsula, que impedía la correcta germinación de los explantos. Igualmente, Singh *et al.* (2006b), observaron que mientras los explantos no encapsulados brotaban el 100%, para el caso de los encapsulados la brotación observada fue del 87% achacando dicha pérdida, al retraso en la brotación debido al endurecimiento de la cápsula. Resultados similares obtuvieron Singh *et al.* (2006c) y Dhir y Shekhawat (2013), los cuales observaron que el empleo de concentraciones de alginato entorno al 4-5%, inhibía la conversión de los explantos en plantas, debido a la presión mecánica que ejerce la propia cápsula.

Sin embargo, en un estudio sobre encapsulación de secciones nodales de albaricoquero y neem (*Azadirachta indica*) con cápsulas con un 3% de alginato, donde se ensayaron distintos tiempos de polimerización, se observó que conforme aumentaba dicho tiempo la resistencia a la presión y a la penetración de las cápsulas era mayor de forma significativa, sin embargo, ningún tiempo afectó posteriormente a la brotación de los propágulos encapsulados en ellas (Padilla *et al.*, 2007).

Referente al efecto en sí de la encapsulación sobre el desarrollo de los explantos, se pudo observar que se producía una disminución de un 30% en la brotación. Esta disminución básicamente respondería al deterioro que sufren las secciones en el interior de las capsuladas, debido a que no consiguen emerger de la misma y continuar su desarrollo normal, a pesar de que sí que consiguen cierto desarrollo en el interior de la cápsula. Pero una vez la yema consigue emerger y salir de la capsula, esta se desarrolla de forma normal, sin diferencias respecto a una sección sin encapsular. Una posible explicación a dicho fenómeno, podría ser la limitación de oxígeno e intercambio gaseoso que sufren los explantos cuando estos permanecen encapsulados (Goosen, 1999), de tal forma que, si transcurre mucho tiempo desde que estos se encapsulan hasta que consiguen emerger y así romper la barrera física que limita dicho intercambio gaseoso, las yemas empiezan a deteriorarse y a sufrir necrosis. Resultados similares observaron Singh y Chand (2009), los cuales achacaron la pérdida de viabilidad de las secciones encapsuladas por la disminución de la respiración de los tejidos de las secciones debido a la matriz de alginato. Otro factor a tener en cuenta es la falta de disponibilidad de nutrientes, debido a la difusión limitada de los mismos, por lo que sugieren suplementar la matriz de encapsulación mediante la adición de reguladores del crecimiento como BA y GA<sub>3</sub> para el uso de los encapsulados durante la conservación a baja

temperatura (Pattnaik *et al.*, 1995). Gardi *et al.* (1999), trabajando con variedades de *Olea*, sugirieron que las diferencias obtenidas en la viabilidad de los explantos encapsulados eran debida a que cada variedad responde de forma distinta a la falta de nutrientes de la matriz de encapsulación, debido a que el medio empleado no es el óptimo para el crecimiento y desarrollo de dicha variedad. Sin embargo, en la bibliografía el medio MS es el más utilizado en la matriz de encapsulación, que normalmente no contiene reguladores de crecimiento, pero puede ser que en determinadas especies y/o variedades haya que optimizar el medio nutritivo de la matriz para obtener mejores resultados. No obstante, la limitación de oxígeno e intercambio gaseoso podría explicar mejor nuestros resultados de pérdida de viabilidad y necrosis, ya que hemos observado que una vez la yema consigue romper la capsula sigue un crecimiento y desarrollo normal, aun cuando la base del explanto está dentro de la cápsula.

#### Efecto temperatura

El crecimiento y desarrollo de las plantas resulta de procesos de división y expansión celular que están fuertemente influenciados por la temperatura, de tal forma que a baja temperatura se prolonga la duración del ciclo celular y como consecuencia disminuye el ratio de crecimiento de la planta (Xia *et al.*, 2009). Giménez-Abián *et al.*, (2004) observaron que en meristemas de *Allium cepa*, la duración del ciclo celular pasa de 17.6 h a 69 horas cuando se disminuye la temperatura de 25 °C a 10 °C. Por su parte, Veselova *et al.*, (2005) observaron que a baja temperatura se produce una disminución del contenido de citoquinina (fitohormona responsable de procesos de división celular) porque se estimula la actividad citoquinina-oxidasa.

En nuestros resultados, se pudo comprobar la importancia de la temperatura en el desarrollo y crecimiento de las secciones nodales de olivo de la variedad 'Arbequina'. Así, las secciones cultivadas a 4 °C no mostraban ningún tipo de desarrollo, observándose un cese completo de la actividad del meristemo, mientras que las que lo hacían a 25 °C presentaban una brotación del 100%. Una vez las secciones incubadas a baja temperatura volvían a cultivarse en condiciones estándar, recuperaban su desarrollo, lo que indicaba que no había daño celular en los meristemas.

En el caso de los encapsulados conservados a 4 °C, ocurría algo similar, no mostraban síntomas de crecimiento, pero una vez eliminado el frío, recuperaban el crecimiento. Aunque hay que mencionar que, si la recuperación se realizaba encapsulada, las diferencias entre los explantos

cultivados a 4 °C y 25 °C si eran más evidentes (55% frente a 82% respectivamente) que, si la recuperación se realizaba desencapsulada, donde las diferencias eran mínimas (76% frente a 90%). Una explicación, radica en que el someter a los explantos a un cultivo a 4 °C, su metabolismo está totalmente parado, al pasarlo a condiciones estándar y verse sometido a la presión de la matriz, limita su desarrollo y provoca más pérdida de material que aquellos que son conservados a 25 °C, pues estos durante su conservación ya están desarrollándose bajo condiciones óptimas, lo que le permite presentar un vigor que hace romper la cápsula, minimizando las pérdidas de material.

Es importante destacar que, en los procesos de conservación *in vitro*, la temperatura de almacenamiento puede afectar a la conservación del material de diversas especies, o incluso en diferentes genotipos dentro de la misma especie, y que pequeños cambios en esta temperatura de conservación puede provocar cambios sustanciales. Capuana y De Lonardo (2013), ensayaron temperaturas de conservación de 8 °C y 4 °C en castaño, y observaron que mientras a 4 °C los porcentajes de supervivencia eran de 8% tras 24 meses y del 0% a los 48 meses, al emplear los 8 °C la supervivencia pasaba a ser del 82% a los 48 meses. Resultados similares obtuvieron Haque y Gosh (2014), los cuales testaron temperaturas de 4 °C, 15 °C y 24 °C durante hasta 6 meses en la conservación *in vitro* de *Drimiopsis kirkii*, y observaron que mientras a 4 °C la viabilidad de los explantos era del 0% a los 3 meses, cuando se incubaban a 15 °C la viabilidad era del 64.4% incluso tras 4 meses de conservación, mientras que a 24 °C esta era del 33%. Sin embargo, Micheli *et al.* (2007), testaron el efecto de distintas temperaturas (4 ° y 18 °C) en la conservación de la variedad de olivo 'Moraiolo' durante 1 mes y no observaron diferencias entre los tratamientos y en ambos casos consiguió una brotación del 100%, aunque, previo a la conservación, el material fue sometido a un pretratamiento con GA<sub>3</sub>, para inducir la brotación.

En general, la mayoría de los trabajos recogidos en la bibliografía, trabajan con una temperatura de conservación de 4 °C (Cheruvathur *et al.*, 2013; Bukhari *et al.*, 2014; Cordeiro *et al.*, 2014; Perveen y Anis, 2014; Ahmed *et al.*, 2015; Saha *et al.*, 2015).

#### Efecto del fotoperiodo

La luz afecta al crecimiento y desarrollo de las plantas básicamente de tres maneras (Casal, 2008), actúa como fuente de energía para la fotosíntesis, como fuente de calor y como fuente de información para los procesos de fotomorfogénesis. Pero el número de horas diarias de luz que

recibe una planta (fotoperiodo) también es igualmente importante. En cultivo *in vitro*, se intenta mantener a las plantas en sus condiciones óptimas de crecimiento, por eso se emplea el fotoperiodo de 16h de luz/ 8 h de oscuridad. Pero en procesos de conservación, el crecimiento no es deseable, pues se busca precisamente el efecto contrario. Por lo cual, en nuestro estudio, hemos ensayado el fotoperiodo estándar frente a la oscuridad (0 h de luz), para estudiar el efecto de las horas de luz durante la conservación *in vitro* del material. Los resultados obtenidos trabajando con secciones nodales de olivo corroboran la importancia del fotoperiodo en el crecimiento de las yemas, de tal forma que se observó una disminución en la brotación de los explantos del 52% cuando se mantenían en oscuridad (84% de brotación con fotoperiodo de 16h frente al 32% del fotoperiodo de 0h). Sin embargo, hemos constatado que la falta de luz no detiene completamente el crecimiento de las yemas, como sí ocurrió con la baja temperatura. Resulta, no obstante, un tratamiento interesante a tener en cuenta a la hora de conservar *in vitro* el material, ya que una vez los explantos vuelven a cultivarse bajo fotoperiodo de 16h, observamos que éstos recuperan la brotación con normalidad (98% 16h frente al 88% 0h). Esta idea, está en concordancia con los resultados obtenidos por Lambardi *et al.* (2002), los cuales obtuvieron mejores resultados con el empleo de oscuridad en la conservación a baja temperatura de 2 variedades italianas de olivo ('Frantoio' y 'Leccino'). Sin embargo, se contraponen a los obtenidos por Imbroda *et al.* (2014), donde para la variedad 'Arbequina' los mejores resultados se obtenían con el empleo del fotoperiodo de 16 h. Oka y Niino (1997), Reed (2002), Renau-Morata *et al.* (2006) también obtuvieron mejores resultados con el empleo del fotoperiodo en lugar de oscuridad.

Cuando estudiamos el efecto del fotoperiodo en los encapsulados, obtuvimos resultados similares (62.3% brotación con fotoperiodo de 16h frente 0.8% con 0h), y, de nuevo, una vez pasan los encapsulados mantenidos en oscuridad a la fase de recuperación, ya no se aprecian diferencias significativas entre los que estuvieron en oscuridad y los que estuvieron conservados con fotoperiodo estándar. En la bibliografía consultada, la mayoría de los trabajos usan fotoperiodo (Micheli *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2010; Bukhari *et al.*, 2014; Perveen y Anis, 2014; Cordeiro *et al.*, 2014, Saha *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2015), y pocos son los trabajos que emplean oscuridad durante la conservación del material (West *et al.*, 2006; Preece y West, 2009; Ruzic *et al.*, 2011).

En general, los valores obtenidos con los encapsulados son inferiores a los obtenidos en las secciones nodales sin encapsular. Estas diferencias serían debido al efecto de la cápsula, como ya

se ha mencionado anteriormente, que provoca una disminución en la brotación y supervivencia de los mismos.

#### Fotoperiodo y temperatura

Nuestros resultados ponen de manifiesto que, en la conservación de las secciones nodales de olivo encapsuladas, existe una interacción entre la temperatura y el fotoperiodo consistente en que aquellos encapsulados que están cultivados a 25 °C tienden a desarrollarse, aunque sólo aquellos que están cultivados con fotoperiodo de 16 horas muestran un desarrollo correcto, mientras que los cultivados en oscuridad (0 horas luz), no consiguen brotar, mostrando solo una parte de ellos síntomas de desarrollo, con un 20% de encapsulados hinchados. Sin embargo, los encapsulados cultivados a 4 °C no muestran ningún tipo de crecimiento, pues la baja temperatura lo inhiben, independientemente del fotoperiodo utilizado, lo que resulta interesante a la hora de conservar el material, ya que permitiría conservarlo en oscuridad, con el ahorro de costes en electricidad y en infraestructuras que ello supondría, ya que con contar con un refrigerador que se pueda graduar a 4 °C sería suficiente.

A la hora de recuperar el material conservado, cuando éste permaneció encapsulado, también nos encontramos con la sorpresa de que los encapsulados que estuvieron a 4 °C y en oscuridad fueron, junto con los que estuvieron en condiciones estándares de crecimiento, los que mejores resultados de brotación y recuperación mostraron, con un 72% de brotación, frente al 75% del tratamiento estándar, mientras que el tratamiento de 4 °C y 16 h luz se quedó en un 50%. Una posible explicación, es que, durante la fase de conservación, la falta de luz produciría en los encapsulados conservados a 4 °C cambios metabólicos que junto al frío producirían, de algún modo, una cierta “dormancia” de las yemas, que explicarían los bajos porcentajes de encapsulados necrosados en este tratamiento, así como la menor longitud de los brotes, en relación al tratamiento de conservación a 4 °C y 16 h de luz, durante la recuperación posterior en condiciones estándares de crecimiento.

Con la recuperación con las secciones desencapsuladas, ocurre algo similar, solo que únicamente aquellos encapsulados cultivados a 25 °C y 0 horas, son los que presentan valores ligeramente inferiores al resto.

En cuanto a la bibliografía consultada referente al efecto del fotoperiodo y la conservación de material de olivo *in vitro*, no parece concluyente. Así, Imbroda *et al.*, (2014) estudiaron el efecto de distintas temperaturas (8 °C y 4 °C) distintas concentraciones de hormonas y distintos fotoperiodos, en la conservación de brotes de olivo de la variedad 'Arbequina', material adulto, y de material juvenil procedente de semillas. Obtuvo porcentajes de supervivencia del 100% para material adulto, y del 92% para material juvenil, descartando un efecto en cuanto a la concentración de hormonas testadas (1x/0.5x/0x de AIB). El protocolo desarrollado con el cual se obtuvieron dichos porcentajes fue de 8 °C y fotoperiodo de 16h luz, obteniendo mayores porcentajes de necrosis con el empleo de temperaturas más bajas (4 °C) y oscuridad. Sin embargo, estos resultados se contraponen a los obtenidos por Lambardi *et al.*, (2002) los cuales realizaron trabajos de frigoconservación con dos variedades de olivo italianas 'Leccino' y 'Frantoio', con los cuales consiguieron porcentajes de supervivencia tras 12 meses de conservación a 4 °C y oscuridad del 66% y 40% respectivamente. Estos porcentajes caían drásticamente al 0% si la conservación se hacía con un fotoperiodo de 8h de luz. Resultados similares obtuvieron estos autores en otras especies leñosas (Lambardi y De Carlo, 2002 citado por Lambardi *et al.*, 2002). En este trabajo, queda también patente el efecto del genotipo en la frigoconservación del material ('Leccino' 66% frente a 'Frantoio' 40%). En otras especies que han sido frigoconservadas o encapsuladas también se observa disparidad de resultados en cuanto a temperatura y fotoperiodo, así, Reed (2002) en trabajos de frigoconservación de fresa a 4 °C, en los que testó distintos fotoperiodos (12h de luz y oscuridad) y pudo comprobar que la presencia del fotoperiodo mejoraba la condición de los cultivos, respecto a cultivarlos en oscuridad. Por su parte, West *et al.* (2006) con *Hibiscus*, no encontraron diferencias entre los fotoperiodos empleados (16 h de luz y oscuridad) cuando los explantos se conservaban a 5 °C, sin embargo, cuando la conservación se realizaba a 25 °C, los encapsulados con fotoperiodo mostraban mejor aspecto y desarrollo. Preece y West (2009) en *Hibiscus* y Ruzic *et al.* (2011) en rapsberry, por su parte, conservaron el material a 5 °C en oscuridad obteniendo buenos resultados.

### Efecto de la sacarosa

Originalmente se pensó que los azúcares únicamente tenían un efecto osmótico fuera de la célula, sin embargo, se ha mostrado que entran en ésta y tienen un papel en la estabilización de proteínas y membranas (Reed, 1996). Actualmente, se ha comprobado que el efecto de este tipo de tratamientos parecen darse a diferentes niveles: un efecto directo, induciendo una reducción del



contenido hídrico debido a efectos osmóticos, con lo cual se reduce el contenido de humedad de los explantos; un efecto protector, estabilizando proteínas y membranas celulares; y un efecto a nivel fisiológico, induciendo distintos tipos de cambios, que vienen provocados por el aumento de la absorción de sacarosa, o la acumulación de azúcares durante la aclimatación, que hace aumentar la concentración de solutos internos (González-Arno y Engelmann, 2006).

Las plantas poseen una serie de osmolitos para estabilizar las membranas celulares y mantener la conformidad de las proteínas. Entre esos osmolitos se incluyen los carbohidratos, a los cuales se les atribuye propiedades crioprotectoras. Se han propuesto diversas hipótesis del mecanismo de acción de los azúcares y su relación al estrés por frío: aumento de presión osmótica, protección de macromoléculas y compartimentos celulares específicos, evita formación de cristales de hielo por deshidratación, interacción con fosfolípidos de membranas para su estabilización e inducción de dormancia (Suzuki *et al.*, 1997; Danyluk *et al.*, 1998; Bartolozzi *et al.*, 2001; Jacobsen *et al.*, 2005; Choi y Jeong, 2012).

En relación a esto, Bekheet (2011), indica que la adición de agentes osmóticos como los carbohidratos, al medio de cultivo, resulta muy útil para la conservación del material bajo crecimiento mínimo, porque provoca la reducción de las actividades metabólicas de la planta, sin afectar a su viabilidad y, por lo tanto, incrementa el tiempo de conservación de tejidos *in vitro* en muchas especies. Son muchos los autores que han mejorado los resultados en la conservación del material mediante la adición de carbohidratos al medio de cultivo (Sarkar y Naik, 1998; Bartolozzi *et al.*, 2001; Akdemir *et al.*, 2010; Marino *et al.*, 2010; Sá *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2011; Cordeiro *et al.*, 2014). Sin embargo, también se han referido en la bibliografía, a efectos negativos de su empleo, como hipermetilación de ADN (Harding, 1994), o flacidez y anormalidades en los cultivos con el empleo de altas concentraciones de los mismos (López Delgado *et al.*, 1998; Sarkar y Naik, 1998; Bartolozzi *et al.*, 2001; Renau-Morata *et al.*, 2006).

Cordeiro *et al.* (2014), observaron que, además del efecto beneficioso del empleo de carbohidratos durante la conservación del material, la aplicación de un pretratamiento adicional de sacarosa (0.4M) antes de la conservación mejoraba notablemente la supervivencia de los explantos (93.3% con pretratamiento frente a 70% sin pretratamiento).

Es por ello que estudiamos si un pretratamiento con sacarosa daría una ventaja a los explantos a la hora de conservarlos en frío a medio plazo, permitiéndole una mayor supervivencia. El efecto

de la sacarosa fue diferente en función de si el explanto estaba encapsulado o no. En secciones nodales sin encapsular, ninguna de las concentraciones de sacarosa ni tiempos de exposición ensayados afectaron al posterior desarrollo de las yemas. Los resultados obtenidos en explantos encapsulados muestran, sin embargo, diferencias en supervivencia y viabilidad en función de la concentración y la duración del pretratamiento de sacarosa. Este hecho, es recogido por otros autores, en los cuales se observa efecto negativo del empleo de altas concentraciones de sacarosa, por la aparición de estrés osmótico (López-Delgado *et al.*, 1998; Bartolozzi *et al.*, 2001; Morata *et al.*, 2006; Cordeiro *et al.*, 2014). En nuestro caso, la concentración crítica, a la cual decaía la viabilidad de los encapsulados es a 130 g/L, pues es aquella en la que se produce una reducción en la brotación de los encapsulados y una mayor necrosis de los mismos. Y, por consiguiente, usamos como concentración final para posteriores estudios, la inmediatamente anterior testada (100 g/L) la cual se corresponde con la que mostraba mejores resultados de viabilidad de los encapsulados.

El efecto perjudicial de altas concentraciones de sacarosa sobre los encapsulados, puede deberse a un efecto conjunto de la sacarosa con el efecto de la matriz de alginato, ya que diversos estudios han demostrado que la concentración endógena de carbohidratos juega un papel importante en la morfogénesis de muchas plantas leñosas (Kromer y Gamian, 2000; Li y Leung, 2000) y esto puede estar influenciado por el suministro exógeno de fuentes de carbono (Neto y Otoni, 2003), de tal forma que una excesiva concentración de sacarosa produciría un desequilibrio osmótico que afectaría negativamente a otros procesos metabólicos de la célula que unido a la limitación física que representa la matriz afectaría a los encapsulados en su brotación. Cuando se combinó distintas concentraciones de sacarosa (0-70-100g/L) y tiempos de exposición (0-1-5-10h) con la conservación de los encapsulados a 4 °C durante 4 semanas, no se observó ningún efecto negativo de la sacarosa en la brotación y desarrollo de los explantos, pero sí del tiempo de exposición, de forma que 10 horas producía una disminución en la brotación de los encapsulados. Por tanto, estas concentraciones con tiempos de exposición menores de 10 horas podrían ser utilizadas para la conservación a medio plazo de las secciones nodales de olivo encapsuladas. Se sabe que los hidratos de carbono tienen propiedades crioprotectores y se estudian a menudo debido a su acumulación a baja temperatura. Sin embargo, no hay siempre una relación directa entre la acumulación de carbohidratos y la resistencia a la congelación (Stuiver *et al.*, 1995). Además, en procesos de conservación a baja temperatura, tanto la concentración empleada como la duración del tratamiento viene determinado por el efecto tóxico que estos componentes

producen en los explantos encapsulados. Generalmente, la óptima concentración que se selecciona es justamente la anterior a la que provoca una caída en la supervivencia de los explantos (González-Arnao y Engelmann, 2006). Diversos trabajos encontrados en la bibliografía utilizan la sacarosa para la frigoconservación *in vitro* de material vegetal, brotes o yemas, a baja temperatura con buenos resultados (Nunes *et al.*, 2003; Lynch *et al.*, 2007; Akdemir *et al.*, 2010; Cordeiro *et al.*, 2014), aunque todos ellos incluyen la sacarosa en el medio de cultivo en concentración normalmente del 3%. Por su parte, Bartolozzi *et al.* (2001), utilizaron distintas concentraciones de sacarosa (3, 6 y 9%) en el medio de cultivo, y obtuvieron los mejores resultados con el empleo de sacarosa al 6%.

#### Efecto de los retardantes del crecimiento

En la conservación *in vitro* mediante crecimiento mínimo, es fundamental la utilización de bajas temperaturas, con el fin de ralentizar los procesos metabólicos. Sin embargo, a veces, las condiciones de baja temperatura por si solas, no son suficientes para conseguir tal propósito y es necesario modificar otros factores como la composición del medio de cultivo (minerales, azúcar, hormonas, etc.), el fotoperiodo o tratamientos para preparar el material a las bajas temperaturas. En este sentido, el empleo de retardantes de crecimiento ha sido una herramienta muy útil para conseguir retrasar o inhibir el crecimiento de los explantos y que estos pudieran conservarse a baja temperatura sin que sufrieran daños (Fletcher y Gilley, 2000; Lin *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2007; Baninasab, 2009; Sharma *et al.*, 2011; Baninasab y Ghobadi, 2010; Zhou *et al.*, 2012; Hajihashemi y Ehsanpour, 2013; Padilla *et al.*, 2015). Destacar que, en la bibliografía consultada respecto a la conservación *in vitro* mediante encapsulación, no se menciona el empleo de retardantes de crecimiento, pero si se recoge la utilidad del empleo de reguladores del crecimiento como AIB, ANA, BA y Tidiazurón (Bukhari *et al.*, 2014; Perveen y Anis, 2014; Hu *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2015; Saha *et al.*, 2015). Además, en todos los casos, dichos regulador del crecimiento se adicionan a la matriz de encapsulación. En nuestro caso, el empleo de los retardantes de crecimiento fue como pretratamiento.

Los triazoles (PBZ y FMP) son compuestos que actúan inhibiendo la biosíntesis de giberelinas, que son las responsables de regular el crecimiento y desarrollo vegetal, provocando, así, una reducción en el crecimiento de los brotes (Singh, 2001; Williams *et al.*, 2003; Bai *et al.*, 2004; Kozak, 2006). Esto se pudo comprobar en nuestros resultados, y a medida que se aumentaba la concentración de estos compuestos, mayor era la reducción en el desarrollo de los explantos. El



efecto principal de estos compuestos es impedir la elongación de los entrenudos, lo que se desprende de la observación del número de hojas por explanto, en las cuales no hay diferencias significativas entre los tratamientos, y la longitud de los explantos, donde cuanto mayor es la concentración aplicada, menor es la longitud de los mismos. Similares resultados obtuvieron Singh (2001), Williams *et al.* (2003), Bai *et al.* (2004), Kozak (2006) y Padilla *et al.* (2015). Además, los brotes se veían vigorosos y con un intenso color verde en sus hojas, debido probablemente a la relación entre los triazoles y la acumulación de clorofila causado por la reducción de la elongación celular (Fletcher y Gilley, 2000), como también se ha observado en otros trabajos de *in vitro* (Yiu *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2015). También hemos observado una diferente sensibilidad del olivo a estos compuestos, ya que, mientras el PBZ, a la concentración de 10 mg/L (34  $\mu$ M) provocaba una alta inhibición en el desarrollo de los explantos, pero en su ausencia estos se recuperaban perfectamente, no se observa el mismo efecto en el caso del FMP, donde la mayor de las concentraciones ensayadas, 10 mg/L (32  $\mu$ M) también presentaba un mayor efecto inhibitorio que concentraciones menores ensayadas, pero la recuperación del material no era del todo satisfactoria una vez se eliminaba del medio. Este efecto diferencial también se ha descrito en albaricoquero y neem (Padilla *et al.*, 2015) y en calabaza (Singh *et al.*, 2015).

En cuanto al TIBA, de las concentraciones testadas, la más alta de ellas ( $10^{-4}$  M) resultó ser letal, y provocó la necrosis de prácticamente la totalidad de los explantos. Mismo resultado obtuvo Jarret (1997) en batata, en la que el empleo de  $10^{-4}$ M resultó ser letal para los cultivos y también Padilla *et al.* (2015) en albaricoquero. De las restantes concentraciones, si se observó un efecto inhibitorio progresivo conforme aumentaba la concentración del retardante. El TIBA actúa interfiriendo en el transporte polar de las auxinas, al competir directamente con el ácido indolacético (IAA), inhibiendo así el crecimiento de las plantas (Lomax *et al.*, 1995; Jarret, 1997; Dhaliwal *et al.*, 2004). El transporte polar de auxinas está implicado en numerosos procesos de desarrollo muy importantes para la planta como el crecimiento, la dominancia apical y la rizogénesis (Marks *et al.*, 2002). Además, el transporte de auxinas es importante porque ésta interactúa con otros reguladores de crecimiento como las citoquininas en la regeneración de órganos y tejidos (Dhaliwal *et al.*, 2004). Sin embargo, ninguna de las concentraciones testadas, resultaron útiles para posteriores estudios, pues, durante la fase de recuperación, se observaba cierto efecto tóxico residual, y los porcentajes de brotación eran significativamente menores que los obtenidos en los brotes control, sin retardante. Además, se observó, una necrosis del material de entre el 10 y el

18%. Resultados similares obtuvieron Singh et al. (2015) donde ninguna de las concentraciones de TIBA testadas ( $10^{-3}$  a  $10^{-8}$ M) mejoraban los resultados obtenidos sin el empleo del retardante. Además, diversos estudios han demostrado efectos negativos en el desarrollo de la planta tras ser sometidas a tratamientos con TIBA (Roussy et al., 1996; Jarret et al., 1997; Sing et al., 2014; Padilla et al., 2015), por lo que parece muy importante determinar la concentración más adecuada para cada explanto de forma precisa antes de su uso.

En lo que respecta al ASA, también se alcanzó una concentración letal ( $400 \mu\text{M}$ ) en la cual se produce la práctica totalidad de necrosis del material, y otra concentración ( $100 \mu\text{M}$ ) en la que en presencia del retardante el efecto inhibitorio del desarrollo de los explantos era muy evidente, pero que en su ausencia la recuperación no era efectiva, y mostraba una necrosis del 14.5%. Siendo,  $25 \mu\text{M}$  la concentración escogida para los ensayos de conservación por cumplir con los requisitos establecidos. El papel del ácido salicílico en procesos de aclimatación al frío ha sido ampliamente estudiado por la activación de enzimas antioxidativas, como la acumulación de hidrogeno peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa, etc., que contrarrestan los daños oxidativos asociado a las bajas temperaturas (Yang et al., 2004; Horváth et al., 2007; Gunes et al., 2007; Jing-Hua et al., 2008; Eraslan et al., 2008). El efecto del SA depende de numerosos factores, incluido la especie, la etapa de desarrollo del material, el modo de aplicación y la concentración (Vanacker et al., 2001; Horváth et al., 2007). Jing-Hua et al. (2008), observaron que, en melón, al emplear concentraciones de SA de  $1 \text{ mmol/L}$  mejoraba la capacidad de las plantas a tolerar bajas temperaturas, y, sin embargo, al aumentar la concentración a  $2$  y  $3 \text{ mmol/L}$ , esta capacidad se reducía y provoca efectos negativos.

Li et al., (2011), trabajando con material *in vivo*, comprobaron el efecto protector del SA en la conservación del material, pues las plantas pretratadas con SA mostraban menos daños en la clorofila y aparato fotosintético, los niveles de ROS también eran mucho más bajos que en la situación control, y similares a los observados en plantas que han sufrido proceso de aclimatación, con lo cual, se demostró la implicación del ASA en los mecanismos de tolerancia a situaciones de baja temperatura. Resultados similares obtuvieron Jing-Hua et al. (2008) en trabajos con melón también *in vivo*.

Por su parte, López-Delgado et al., (1998a), estudió el efecto del ASA en la conservación *in vitro* de plantas de patatas y obtuvo buenos resultados con el empleo de  $100 \mu\text{M}$  de ASA, permitiéndole conservar los brotes *in vitro* durante 12 meses.

En cuanto al ABA, de las concentraciones testadas, las dos más altas (10 y 50  $\mu\text{M}$ ) provocan altos índices de necrosis del material, mostrándose, por tanto, tóxicas. Bello-Bello *et al.*, (2014), trabajando con brotes de caña de azúcar de 2 cm, también observaron que a medida que aumentaban la concentración de ABA, disminuía el porcentaje de supervivencia, de tal forma que con 11.35  $\mu\text{M}$  (3 mg/L) de ABA la supervivencia de los explantos era de un 53% frente al 100% en la situación control. Sin embargo, Keatmetha *et al.* (2006), mostraron que con 3.8  $\mu\text{M}$  de ABA aplicados a brotes de *in vitro* de 1 cm, se redujo el crecimiento de *Garcinia mangostana*, sin afectar la supervivencia y el número de brotes por explanto. El que explantos de menor tamaño, respondan mejor a altas concentraciones de ABA, que explantos de mayor tamaño, nos estaría indicando una sensibilidad diferencial al ABA para cada especie. Farhoudi y Saeedipour (2011), observaron incluso diferencias entre distintas variedades de colza, así, al aplicar ABA (15  $\mu\text{M}$ ), en la variedad 'Okamer' obtuvieron resultados positivos, y solo a 30  $\mu\text{M}$  se observaron efectos negativos y una reducción de, crecimiento, mientras, en la variedad 'Fornex', ya a 15  $\mu\text{M}$ , mostró toxicidad y efectos negativos en el crecimiento. Para el caso del olivo, los resultados obtenidos muestran que la sensibilidad respecto al ABA, sería similar a la observada en otras especies como caña de azúcar (Bello-Bello *et al.*, 2014) y *Garcinia mangostana* (Keatmetha *et al.*, 2006), sin embargo, sería mucho más sensible que en especies como colza (Farhoudi y Saeedipour, 2011), patata (Gopal *et al.*, 2005) y yuca (Barrueto y Carvalho, 2008). El ABA se ha relacionado clásicamente con la senescencia, pero este efecto se relaciona más en la actualidad con el etileno, si bien parece ser que el ABA promueve la producción de etileno estimulando los niveles de ACC sintasa (Riov *et al.*, 1990).

Por su parte, la concentración de 1  $\mu\text{M}$  sí que provoca un notable efecto inhibitorio en el desarrollo de las secciones nodales de olivo sin llegar a ser tóxica, ya que una vez se eliminaba el ABA del medio el crecimiento se recuperaba. Este efecto inhibitorio en las yemas también se ha observado en otras especies. Así, Gopal *et al.* (2005), comprobaron que el crecimiento *in vitro* de secciones nodales de patata se redujo al añadir 8  $\mu\text{M}$  (2 mg/L) de ABA. Barrueto y Carvalho (2008), observaron que la aplicación de 19 y 30  $\mu\text{M}$  (5 y 8 mg/L) de ABA en secciones nodales de yuca, reducía el número y la longitud de los brotes, lo que sugería que estas concentraciones podrían ser adecuadas para la inducción *in vitro* de la dormancia de brotes de esta especie. Keatmetha *et al.* (2006), mostraron que 3.8  $\mu\text{M}$  (1 mg/L) de ABA aplicados a brotes de 1 cm, redujo el crecimiento de *Garcinia mangostana*, sin afectar la supervivencia y el número de brotes por explanto *in vitro*. Se ha sugerido que el nivel de ABA en la yema regula su estado de dormancia natural de forma que cuando

el nivel de ABA aumenta se produce un cese de la proliferación celular y del crecimiento del brote y cuando disminuye se rompe la dormancia de las yemas (Koussa *et al.*, 1994; Or *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004; Destefano-Beltrán *et al.*, 2006), observándose un retraso en la salida de dormancia cuando se aplica ABA de forma exógena (Dutcher y Powell, 1972; Lionakis y Schwabe, 1984; Mielke y Dennis, 1978). En este efecto sobre el ciclo natural de dormancia de los meristemas de las yemas parece ser que están implicada las distintas rutas metabólicas de síntesis y catálisis del ABA (Zheng *et al.*, 2015) y es, quizás, por ello, que en algunos estudios se ha concluido que la aplicación exógena de ABA no sea una estrategia práctica para mantener la dormancia y con ello alargar la vida útil por ejemplo de tubérculos de patata (Suttle *et al.*, 2012).

Aparte de este efecto en la dormancia de las yemas, el ABA también se ha asociado con una inhibición del crecimiento de la planta durante condiciones de estrés abiótico, como el estrés hídrico y el estrés por bajas o altas temperaturas (Umezawa *et al.*, 2010). Así, se ha descrito un incremento en los niveles de ABA en los órganos de las plantas, tanto vegetativos como reproductivos, al someter a las plantas a baja temperatura y su implicación en la expresión de genes relacionados con la aclimatación al frío (Xiong *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2009; Baron *et al.*, 2012).

#### Conservación a medio plazo de secciones de olivo encapsuladas en alginato de sodio.

A la vista de los resultados obtenidos, y aunque sean resultados de una sola repetición, se ha conseguido conservar secciones nodales de olivo de la variedad 'Arbequina' mediante la técnica de la encapsulación en alginato de sodio y conservación en frío durante al menos un año, manteniendo unos porcentajes de supervivencia y recuperación posterior en torno al 88%.

El efecto beneficioso del pretratamiento con flurprimidol durante el proceso de conservación parece ser el factor clave, pues en todos los tratamientos testados y en todos los tiempos de conservación empleados, el pretratamiento con flurprimidol provocaba que el material, tras el posterior proceso de conservación y recuperación, mostrara mejores porcentajes de supervivencia y desarrollo, hasta tal punto, que el material control (sin pretratamiento de flurprimidol), tras 12 meses de conservación a 4 °C, está totalmente necrosado, mientras que en presencia de flurprimidol el material en término medio sobrevive un 74.4% y en el mejor de los tratamientos llegara hasta una supervivencia media del 88%. Los triazoles, como el flurprimidol, son considerados agentes protectores de las plantas frente al estrés abiótico (Fletcher y Gilley, 2000) En relación al estrés por



frío, los triazoles actuarían reduciendo los daños oxidativos derivados, bien al aumentar los niveles de proteínas antioxidantes o por la reducción de la actividad de las enzimas oxidativas (Fletcher y Gilley, 2000; Lin *et al.*, 2006; Baninasab, 2009). Jaleel *et al.*, (2007) señalan las plantas tratadas con estos tipos de compuestos (triazoles) *in vivo* presentan ventajas adaptativas a ciertas condiciones desfavorables como la tolerancia a temperaturas extremas, sequía, salinidad y ataque por patógenos. Resultados similares obtuvieron otros autores, donde se observó el efecto protector del empleo de flurprimidol en plantas tratadas con frío (Krug *et al.*, 2006; Nzokou y Nikiema, 2008; Berruti *et al.*, 2013).

En cuanto a su uso en conservación *in vitro*, puede ser una alternativa nueva y eficaz para la conservación *in vitro* de germoplasma de olivo, como se ha observado en calabaza (Singh *et al.*, 2015).

La sacarosa, como pretratamiento, tuvo un efecto negativo en la conservación de las secciones de olivo encapsuladas y mantenidas a 4 °C, así, aquellos explantos pretratados con sacarosa presentaron una menor supervivencia y recuperación posterior. Resultados similares se han observado en otros estudios recogidos en la bibliografía, donde el empleo de agentes ósmóticos en procesos de conservación, ha provocado efectos negativos, como una reducción de la tasa de crecimiento. Así, Balch *et al.*, (2012) observó como el empleo de manitol y sacarosa en la conservación a baja temperatura de *Agave*, provocaba que estos mostraran un retraso en las tasas de crecimiento respecto al material que no había sido sometido a dichos tratamientos, aunque el material no mostraba síntomas de daños o alteraciones, cosa que si ocurría en trabajos con patata (Gopal, 2002), donde el empleo de agentes osmóticos como el manitol y la sacarosa provocaban cierta mortalidad de los tejidos durante el proceso de conservación y su desarrollo posterior. Sin embargo, en otros estudios, el empleo de sacarosa y otros agentes osmóticos presentan efectos beneficiosos durante el proceso de conservación (Lambardi *et al.*, 2006; Roncasaglia *et al.*, 2009; Benelli *et al.*, 2011). Ozudogru *et al.*, (2010), concluyó que, al combinar varios factores, los cuales todos afectan al proceso de conservación, es necesario optimizar dichos factores para cada especie y variedad en busca de la optimización del procedimiento de conservación *in vitro*. En base a esta idea, una posible explicación a porque el uso de sacarosa en combinación con el pretratamiento de flurprimidol no ha dado resultado puede deberse a que, diversos estudios han demostrado que el empleo de triazoles, provocan una reducción en el crecimiento de la planta (Singh, 2001; Williams *et al.*, 2003; Bai *et al.*, 2004), y por consiguiente se incrementa el almacenamiento interno de



carbohidratos (Sharma *et al.*, 2011; Martínez-Trinidad *et al.*, 2013). Y, por otro lado, los triazoles, incrementan la producción de clorofila y con ello también la producción de carbohidratos (Zheng *et al.*, 2012). Esto junto a la aplicación exógena de sacarosa, llevaría a la planta a un desajuste en el balance de carbohidratos que provocaría efectos perjudiciales en la misma, como, por ejemplo, una excesiva deshidratación de las yemas. Y, por lo tanto, a la vista de los resultados obtenidos con el pretratamiento de sacarosa, concluimos que este agente, en las condiciones testadas, no es adecuado para la conservación del material de olivo a medio plazo.

En cuanto al fotoperiodo, los resultados obtenidos parecen indicar que no influye en la conservación del material a 12 meses, y por tanto se puede emplear indistintamente un fotoperiodo u otro, en futuros ensayos de conservación. Este hecho es significativo a la hora de utilizar este protocolo para la conservación del banco de germoplasma de olivo o incluso a nivel comercial, por el ahorro de energía e infraestructuras que supone, ya que significa que con disponer de un refrigerador que se pueda graduar a 4 °C sería suficiente para conservar gran cantidad de material. Una posible explicación podría ser a pesar de que la luz es vital para el crecimiento y desarrollo de las plantas, pues actúa como fuente de energía, cuando éstas son conservadas a baja temperatura y ralentizarse su ciclo celular y por tanto su ratio de crecimiento va a niveles mínimos, no se necesita tanta energía, con lo cual, es posible la conservación del material en oscuridad, sin que se afecte la viabilidad del mismo. Además, la matriz de alginato, crea una capa nutritiva que alimenta directamente a las yemas (Micheli *et al.*, 2007a). Por ello, en la mayoría de las plantas leñosas, los procesos de conservación se realizan en oscuridad (Bekheert *et al.*, 2002), aunque en muchos otros casos se ha visto que es necesario un fotoperiodo, como, por ejemplo, en eucalipto (Watt *et al.*, 2000) o en castaño (Lambardi *et al.*, 2001; Capuana y Lonardo, 2013). En cuanto al olivo, los resultados recogidos en la bibliografía son dispares, autores como Micheli *et al.*, (2007b) e Imbroda *et al.*, (2014), obtuvieron mejores resultados empleando fotoperiodo de 16 horas, mientras que Lambardi *et al.*, (2002) y Lambardi y De Carlo, (2002) obtuvieron mejores resultados en oscuridad.

En cuanto al tipo de recuperación del material, manteniendo las secciones nodales encapsuladas o desencapsulándolas, se ha observado que no tiene ninguna influencia en la posterior supervivencia y desarrollo del material siempre que el material está pretratado con flurprimidol, lo cual muestra una vez más el efecto beneficioso del empleo de este retardante. Una posibilidad es que al pretratar el material con flurprimidol, las yemas entren en un estado de dormancia, que provoca que soporte mejor las bajas temperaturas, con lo cual, las yemas sufren

menos daño y por tanto una vez se recultiva el material en condiciones óptimas, su metabolismo se activaría por el paso de 4 °C a 25 °C y su desarrollo sería más vigoroso, lo que les permitiría romper la barrera física que crea la matriz de alginato.

Las técnicas de conservación *in vitro* mediante crecimiento limitado, suponen todas ellas una serie de condiciones de estrés, añadidas a las que ya, de por sí, implica el cultivo *in vitro*. Por ello, otro aspecto a tener en cuenta es el de la estabilidad genética del material. Dado que existe una clara relación entre el estrés y diferencias causadas de variación somaclonal (cambios en patrones de metilación, actividad de elementos móviles, alteraciones cromosómicas, etc.) (Gernand *et al.*, 2007; Bairu *et al.*, 2010; Neelakandan y Wang, 2012), la aplicación de técnicas de conservación *in vitro* puede conducir, si no se controla adecuadamente, a la pérdida, por variación somaclonal, de los genotipos que se pretende conservar. En nuestro caso, estamos realizando estudios para valorar la estabilidad del material, con el protocolo puesto a punto. Pero en diversas especies, como caña de azúcar (González-Arno, 2006); manzano (Hao *et al.*, 2002); batata (Ahuja *et al.*, 2002; Sonail-Dixit *et al.*, 2005); kiwi y uva (Zhai *et al.*, 2003); o espárrago (Carmona-Martín, 2014), sometidas a protocolos de encapsulación, en los que se ha estudiado la estabilidad genética del material conservado una vez recuperado, no se han apreciado diferencias morfológicas, agronómicas, cromosómicas, bioquímicas y/o moleculares.

Los resultados obtenidos aportan gran cantidad de información sobre el comportamiento de las secciones nodales de olivo y como los distintos factores estudiados le afectan a su crecimiento y desarrollo y a su respuesta al estrés por enfriamiento que puede ser aplicada a otros métodos de conservación *in vitro* como la frigoconservación y la crioconservación. Aunque es necesario realizar más experimentos de conservación a largo plazo para confirmar los resultados obtenidos, éstos, además de proporcionarnos un protocolo de encapsulación de secciones nodales de olivo para su almacenamiento, conservación y distribución, nos abren otras posibilidades a realizar en un futuro. Así, en un primer lugar, sería interesante ver si permite conservar las secciones por más de 1 año. También sería interesante aplicar este protocolo al resto de variedades introducidas *in vitro* y comprobar su eficacia. Por otro lado, los resultados obtenidos nos hacen pensar que el uso del flurprimidol también nos podría ayudar a mejorar el protocolo de frigoconservación, bien como pretratamiento o simplemente añadiendo este retardante en el medio de conservación. Finalmente, las secciones nodales pretratadas con flurprimidol y encapsuladas podrían sufrir una fase de deshidratación y ser introducidas en nitrógeno líquido para su conservación a largo plazo mediante

crioconservación. Todos estos métodos de conservación *in vitro* son complementarios y consideramos que sería de gran interés para el BGMO disponer de ellos para mantenerlo y salvaguardarlo. En este trabajo hemos tratado de poner las bases de la conservación *in vitro* del BMGO, CAP-UCO-IFAPA.

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



# CONCLUSIONES



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## CONCLUSIONES

A partir de este trabajo se han extraído las siguientes conclusiones:

1. El genotipo es un factor determinante en la micropropagación de olivo, especie que muestra respuestas muy heterogéneas en todas las fases de la micropropagación, en función de la variedad.
2. A pesar de que la respuesta a la micropropagación es altamente dependiente del genotipo, el 55% de las variedades estudiadas han podido ser micropropagadas siguiendo el protocolo de Vidoy-Mercado (2004), por lo que la conservación *in vitro* del BGMO es un objetivo abordable.
3. Los resultados obtenidos permiten recomendar el enraizamiento *ex vitro* como primera opción para cualquier protocolo de micropropagación de olivo.
4. Los resultados obtenidos en el enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* no son extrapolables ni entre sí, ni con los existentes sobre estaquillado leñoso. No existiendo, en general, un comportamiento varietal independiente del método de enraizamiento utilizado.
5. El protocolo de frigoconservación desarrollado para la variedad 'Arbequina' es aplicable a otras variedades, aunque con resultados dispares, lo que indica un efecto del genotipo también en el comportamiento de las variedades a la conservación a baja temperatura.
6. Es posible conservar *in vitro* secciones nodales de olivo mediante encapsulación-refrigeración a 4 °C, durante al menos un año, con porcentaje de supervivencia de hasta el 88%.
7. La conservación en frío (4 °C) daña los meristemas de forma proporcional al tiempo de almacenamiento. Este daño podría ser eliminado mediante el pretratamiento de las secciones nodales con flurprimidol

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





# ANEXO



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## ANEXO

### Protocolo de extracción de ADN

1. Pesar aproximadamente 100mg de hojas sin nervaduras y ponerlas en los Eppendorf, todo ello en nitrógeno líquido. Triturar hasta hacerlo polvo.
2. Añadir 600µl de Tampón de extracción (para preparar el tampón de extracción añadimos 15ml de CTAB + 75µl de 2-mercaptoetanol en la campana de extracción).
3. Homogeneizar la mezcla.
4. Incubar en el baño a 65 °C durante ½ hora en agitación.
5. Añadir 600µl de SEVAG (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1), mezclar hasta obtener una mezcla homogénea.
6. Centrifugar a 11,000 r.p.m. durante 10 minutos a T<sup>a</sup> ambiente.
7. Recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo. Verter nuevamente SEVAG 1 volumen (la misma cantidad que sobrenadante se haya recuperado) y mezclar nuevamente para homogeneizar la muestra.
8. Centrifugar a 11,000 r.p.m. durante 10 minutos a T<sup>a</sup> ambiente.
9. Transferir el sobrenadante en tubo limpio, esta vez con muchísimo cuidado de no arrastrar nada para evitar contaminación. Añadir lentamente Isopropanol del congelador y mezclar suavemente (se añaden 2/3 del volumen de sobrenadante recuperado). Invertir los tubos para mezclar completamente el contenido.
10. Centrifugar a 14,000 r.p.m. durante 15 minutos a T<sup>a</sup> ambiente. Eliminar el sobrenadante.
11. Añadir 200µl de etanol frío al 70% a cada tubo y centrifugar a 14,000 r.p.m. durante 5 minutos.
12. Vaciar el etanol rápidamente y dejar secar con el eppendorf abierto hasta que desaparezca el olor (aproximadamente durante 10-15 minutos).
13. Resuspender el pellet en 100µL de agua miliq estéril (o tampón MTE o TE). Lo dejamos en hielo durante unos 5-10 minutos (para conseguir que resuspenda todo el pellet de forma correcta).
14. Tratamiento con RNAsa añadir 1µl de RNAsa (Stock 10ng/µl). Dejándola actuar 20 minutos en la estufa a 37 °C.
15. Añadir 300µl de agua y 400µl de fenol: cloroformo: isoamílico (24:24:1). Mezclar homogéneamente, pero de forma suave para no romper el DNA.
16. Centrifugar a 13,000 r.p.m. durante 10 minutos a T<sup>a</sup> ambiente.
17. Recuperar el sobrenadante y precipitar mediante adición de 1/10 volumen (una décima parte del sobrenadante recuperado) de Acetato sódico 3M (AcNa 3M) + 2 volúmenes del total, (suma del sobrenadante + AcNa añadido) de Etanol 100%. Incubar entre 30 minutos y 1 hora a -20 °C.
18. Centrifugar a 13,000 r.p.m. durante 15 minutos a T<sup>a</sup> ambiente. Eliminamos el sobrenadante.
19. Lavar el pellet, añadir 200µl de etanol frío al 70% a cada tubo y centrifugar a 13,000 r.p.m. durante 5 minutos.
20. Vaciar el etanol rápidamente y dejar secar con el eppendorf abierto hasta que desaparezca el olor (aproximadamente durante 10- 15 minutos).
21. Resuspender el pellet en 100µl de MTE o TE.
22. Cuantificar el DNA en el espectrofotómetro y hacer un gel de calidad.

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



# BIBLIOGRAFÍA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## BIBLIOGRAFÍA

### A

- AAO (2013).** Agencia para el Aceite de Oliva. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente. Gobierno de España. <http://www.aao.es>
- Abe, T. y T. Sasahara (1982).** "Genetical control of callus formation in rice." Plant Tissue Culture. proceedings, 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture held at Tokyo and Lake Yamanake, Japan, July 11-16, 1982
- 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., S. Lavee, J. Liñan y A. Troncoso (1997).** "*In vitro* germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes." Scientia Horticulturae **69**(3-4): 207-215.
- Acevedo-Couthinho, L. (1956).** "Subsidio para o estudio cardiológico de *Olea europaea* L." Gen. Iber., **8**: 3-44.
- Adir, N., H. Zer, S. Shochat y I. Ohad (2003).** "Photoinhibition—a historical perspective." Photosynthesis Research **76**: 343-370.
- Agarwal, M., N. Shrivastava y H. Padh (2008).** "Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences." Plant Cell Reports **27**(4): 617-631.
- Ahloowalia, B. (1986).** "Limitations to the use of somaclonal variation in crop improvement." Somaclonal variations and crop improvement **20**: 14-27.
- Ahmad, N. y M. Anis (2010).** "Direct plant regeneration from encapsulated nodal segments of *Vitex negundo*." Biologia Plantarum **54**(4): 748-752.
- Ahmad, T., N. A. Abbasi, I. A. Hafiz y A. Ali (2007).** "Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation of peach rootstock GF-677." Pakistan Journal of Botany **39**(4): 1269-1275.
- Ahmed, E., T. Hayashi y S. Yazawa (2004).** "Auxins increase the occurrence of leaf-colour variants in *Caladium* regenerated from leaf explants." Scientia Horticulturae **100**: 153-159.
- Ahmed, M. R., M. Anis y H. A. Al-Etta (2015).** "Encapsulation technology for short-term storage and germplasm exchange of *Vitex trifolia* L." Rediconti Lincei-Scienze Fisiche e Naturali **26**(2): 133-139.
- Ahuja, S., B. Mandal, S. Dixit y P. Srivastava (2002).** "Molecular, phenotypic and biosynthetic stability in *Dioscorea floribunda* plants derived from cryopreserved shoot tips." Plant Science **163**: 971-977.
- Akdemir, H., E. Kaya y Y. Ozden (2010).** "*In vitro* proliferation and minimum growth storage of *Fraser photinia*: Influences of different medium, sugar combinations and culture vessels." Scientia Horticulturae **126**(2): 268-275.
- Alba, V., V. Bisignano, E. Alba, A. Stradis y G. B. Polignano (2011).** "Effects of cryopreservation on germinability of olive (*Olea europaea* L.) pollen." Genetic Resources and Crop Evolution **58**(7): 977-982.
- Ali, A., T. Ahmad, N. A. Abbasi y I. A. Hafiz (2009b).** "Effect of different concentrations of auxins on *in vitro* rooting of olive cultivar 'Moraiolo'." Pakistan Journal of Botany **41**(3): 1223-1231.
- Ali, A., T. Ahmad, N. A. Abbasi y I. A. Hafiz (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.

- Ali, N. y H. Afrasiab (2014).** "Effect of TIBA and other plant growth regulators on callogenic response from different explants of safflower (*Carthamus tinctorius*)." *International Journal of Agriculture and Biology* **16**(6): 1112-1116.
- Anastassopoulos, E. y M. Keil (1996).** "Assessment of natural and induced genetic variation in *Alstroemeria* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers." *Euphytica* **90**(2): 235-244.
- Andres, H., B. Fernández y R. Rodríguez (2002).** "Phytohormone contents in *Corylus avellana* and their relationship to age and other developmental processes." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **70**: 173-180.
- Ara, H., U. Jaiswal y V. Jaiswal (2000).** "Synthetic seed: prospects and limitations." *Current Science* **78**: 1438-1444.
- Araújo, L., A. Prabhu, M. Filippi y L. J. Chaves (2001).** "RAPD analysis of blast resistant somaclones from upland rice cultivar IAC 47 for genetic divergence." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **67**: 165-172.
- Arnold, S. (2008).** "Somatic embryogenesis." *Plant Propagation by Tissue Culture* **1**: 335-354.
- Arrigoni-Blank Mde, F., F. F. Tavares, A. F. Blank, M. C. dos Santos, T. S. Menezes y A. D. de Santana (2014).** "In vitro conservation of sweet potato genotypes." *The Scientific World Journal*, Volume 2014, Article ID 208506, 7 pages.
- Arrillaga, I., T. Marzo y J. Segura (1991).** "Micropropagation of juvenile and adult *Sorbus domestica* L." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **27**(3): 341-348.
- Ashraf, M., N. A. Akram, R. N. Arteca y M. R. Foolad (2010).** "The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance." *Critical Reviews in Plant Sciences* **29**(3): 162-190.
- Atienza, S. G., R. Rosa, M. C. Domínguez-García, A. Martín, A. Kilian y A. Belaj (2013).** "Use of DArT markers as a means of better management of the diversity of olive cultivars." *Food Research International* **54**(2): 2045-2053.
- Atienza, S. G., R. Rosa, L. León, A. Martín y A. Belaj (2014).** "Identification of QTL for agronomic traits of importance for olive breeding." *Molecular Breeding* **34**(2): 725-737.
- Azzarello, E., S. Mugnai, C. Pandolfi, E. Masi, E. Marone y S. Mancuso (2009).** "Comparing image (fractal analysis) and electrochemical (impedance spectroscopy and electrolyte leakage) techniques for the assessment of the freezing tolerance in olive." *Trees* **23**: 159-167.

## B

- Bahrami, M. K., A. M. Azar y M. R. Dadpour (2009).** "Influence of thidiazuron in direct shoot regeneration from segments of *in vitro* leaves, and axillary and apical buds of olive (*Olea europaea*)." *Acta Horticulturae* **884**: 383-390.
- Bai, S., W. Chaney y Y. Qi (2004).** "Response of cambial and shoot growth in trees treated with paclobutrazol." *Journal of Arboriculture* **30**(3): 137-145.
- Bairu, M., C. Fennell y J. Staden (2006).** "The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig')." *Scientia Horticulturae* **108** (4): 347-351.
- Bairu, M., W. Stirk y J. Staden (2009).** "Factors contributing to *in vitro* shoot-tip necrosis and their physiological interactions." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **98**: 239-248.
- Bairu, M. W., A. O. Aremu y J. Staden (2011).** "Somaclonal variation in plants: causes and detection methods." *Plant Growth Regulation* **63**(2): 147-173.
- Balch, E. P., M. J. Araiza y M. E. Pérez-Reyes (2012).** "In vitro conservation of *Agave* spp. germplasm under slow growth conditions." *Revista Fitotecnia Mexicana* **35**(4): 279-287.



- Baldoni, L. y A. Belaj (2009).** "Olive." En: Oil Crops, J. Vollmann and I. Rajcan, (eds) Springer, New York. pp 397-421.
- Baldoni, L., N. G. Cultrera, R. Mariotti, C. Ricciolini, S. Arcioni, G. G. Vendramin, A. Buonamici, A. Porceddu, V. Sarri, M. A. Ojeda, I. Trujillo, L. Rallo, A. Belaj, E. Perri, A. Salimonti, I. Muzzalupo, A. Casagrande, A. Casagr, O. Lain, R. Messina y R. Testolin (2009).** "A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping." *Molecular Breeding* **24**(3): 213-231.
- Ballester, A., M. C. Sánchez, A. M. Vieitez y M. V. José (1990).** "Development of rejuvenation method for *in vitro* establishment, multiplication and rooting of mature trees." En: Plant Aging: Basic and Applied Approaches, R. Rodríguez, R. Sánchez-Tamés y D.J. Durzan (eds) Springer, US. pp 43-49.
- Baninasab, B. (2009).** "Amelioration of chilling stress by paclobutrazol in watermelon seedlings." *Scientia Horticulturae* **121**(2): 144-148.
- Baninasab, B. y C. Ghobadi (2010).** "Influence of paclobutrazol and application methods on high-temperature stress injury in cucumber seedlings." *Journal of Plant Growth Regulation* **30**(2): 213-219.
- Barceló-Muñoz, A. (1995).** "Micropropagación de aguacate (*Persea americana* Mill.). Aspectos histológicos del proceso de vitrificación." Tesis Doctoral, Universidad de Málaga (España).
- Barceló-Muñoz, A., C. L. Encina, E. Simón-Pérez y F. Pliego-Alfaro (1999).** "Micropropagation of adult avocado." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **58**(1): 11-17.
- Baron, K. N., D. F. Schroeder y C. Stasolla (2012).** "Transcriptional response of abscisic acid (ABA) metabolism and transport to cold and heat stress applied at the reproductive stage of development in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Science* **188**: 48-59.
- Barranco, D. (2008).** "Variedades y Patrones." En: El Cultivo del Olivo, D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (eds). 6ª Edición Coed. Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. pp 63-91.
- Barranco, D. y L. Rallo (1983).** "Origen y difusión de los cultivares de olivo en Andalucía." *ITEA* **2**: 57-69.
- Barranco, D. y L. Rallo (1984).** "Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía." Ministerio de Agricultura y Junta de Andalucía.
- Barranco, D. y L. Rallo (2000).** "Olive cultivars in Spain." *Horticultural Technology* **10**(1): 107-110.
- Barranco, D., N. Ruiz y M. G. Campo (2005b).** "Frost tolerance of eight olive cultivars." *Hortscience* **40**(3): 558-560.
- Barranco, D., C. Toro y L. Rallo (1998).** "Periods of ripening of olive cultivars in Cordoba [Spain]." *Investigacion Agraria. Produccion y Proteccion Vegetales* (España).
- Barranco, D., I. Trujillo y L. Rallo (2005a).** "Elaiografía Hispánica." En: Variedades de olivo en España, L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C. Del Río, A. Marín, J. Tous y I. Trujillo, (eds). Mundi Prensa, Madrid. pp 47-76.
- Barrueto, C. L. P. y L. L. Carvalho (2008).** "Importancia del ácido abscísico (ABA) en la conservación *in vitro* de la Yuca (*Manihot esculenta* Crantz)." *Chilean Journal of Agricultural Research* **68**(3): 304-308.
- Bartolini, G., A. R. Leva y A. Benelli (1990).** "Advances in *in vitro* culture of the olive: propagation of cv. Maurino." *Acta Horticulturae* **286**: 41-44.
- Bartolozzi, F., M. Mencuccini y G. Fontanazza (2001).** "Enhancement of frost tolerance in olive shoots by cold acclimation and sucrose increase in the culture medium." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **67**: 299-302.
- Bauer, H. y U. Bauer (1980).** "Photosynthesis in leaves of the juvenile and adult phase of ivy (*Hedera helix*)." *Physiologia Plantarum* **49**: 366-372.

- Baurens, F., J. Nicolleau y T. Legavre (2004).** "Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated *in vitro* with reference to leaf morphology as a phase change marker." *Tree* **24**: 401-407.
- Becerril, J. M., M. J. Niclós, J. M. Becerril, M. P. Vega, F. N. Viñals y M. J. Niclós (2010).** "Los recursos fitogenéticos en la mejora genética vegetal." En: *Mejora Genética y Recursos Fitogenéticos: Nuevos Avances en la Conservación y Utilización de los Recursos Fitogenéticos*, J.M. Carrillo, M.J. Díez, M. Pérez de la Vega y F. Nuez (eds). Centro de Publicaciones Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. pp 9-49.
- Bednarek, P., R. Orłowska, R. Koebner y J. Zimny (2007).** "Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.)." *BioMed Central Plant Biology* **7**: 10-18.
- Bekheet, S., H. Taha y M. Saker (2002).** "*In vitro* long-term storage of date palm." *Biologia Plantarum* **45**: 121-124.
- Bekheet, S. (2011).** "*In vitro* conservation of Date palm germplasm." En: *Date Palm Biotechnology*, S.A. Bekheet (eds). Springer, Netherlands. pp 337-360.
- Belaj, A., J. M. Caballero, D. Barranco, L. Rallo y I. Trujillo (2003a).** "Genetic characterization and identification of new accessions from Syria in an olive germplasm bank by means of RAPD markers." *Euphytica* **134**(3): 261-268.
- Belaj, A., M. C. Dominguez-García, S. G. Atienza, N. M. Urdíroz, R. Rosa, Z. Satovic, A. Martín, A. Kilian, I. Trujillo, V. Valpuesta y C. Río (2012).** "Developing a core collection of olive (*Olea europaea* L.) based on molecular markers (DARs, SSRs, SNPs) and agronomic traits." *Tree Genetics & Genomes* **8**: 365-378.
- Belaj, A., J. Hidalgo, G. Beltrán, J. Cano, A. Jiménez, I. Padilla, A. Barceló, L. León y R. Rosa (2013).** "La colección mundial de variedades de olivo de Córdoba y su utilidad para el olivar andaluz." *Vida Rural*: **358**: 54-58.
- Belaj, A., L. Rallo, I. Trujillo y Z. Satovic (2004a).** "Efficiency of RAPD markers for varietal identification in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections." *Acta Horticulturae* **663**: 643-646.
- Belaj, A., Z. Satovic, H. Ismaili, D. Panajoti, L. Rallo y I. Trujillo (2003b).** "RAPD genetic diversity of Albanian olive germplasm and its relationships with other Mediterranean countries." *Euphytica* **130**(3): 387-395.
- Belaj, A., Z. Satovic, L. Rallo y I. Trujillo (2002).** "Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA." *Theoretical and Applied Genetics* **105**(4): 638-644.
- Belaj, A., Z. Satovic, L. Rallo y I. Trujillo (2004b).** "Optimal use of RAPD markers for identifying varieties in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections." *Journal of the American Society for Horticultural Science* **129**(2): 266-270.
- Belaj, A. y I. Trujillo (2005).** "Identificación de variedades de olivo por marcadores moleculares." En: *Variedades de olivo en España*, L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C. Del Río, A. Marín, J. Tous y I. Trujillo, (eds). Mundi Prensa, Madrid. pp 431-450.
- Belaj, A., I. Trujillo, D. Barranco y L. Rallo (2004c).** "Characterization and identification of spanish olive germplasm by means of RAPD markers." *Hortscience* **39**(2): 346-350.
- Belaj, A., I. Trujillo, R. Rosa, P. Rallo y M. J. Giménez (2001).** "Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank." *Journal of the American Society of Horticultural Science* **126**(1): 64-71.
- Bello-Bello, J., W. Poot-Poot, L. Iglesias-Andreu, H. Caamal-Velázquez, M. Díaz-Sánchez y M. Díaz-Sánchez (2014).** "Comparison of effect of osmoregulators and growth inhibitors on *in vitro* conservation of sugarcane." *Agrociencia* **48**: 439-446.

- Benelli, C., A. Carlo, M. Lambardi y P. T. Lynch (2001).** "Vitrification of shoot-tips, nodal segments and embryogenic tissue of olive (*Olea europaea* L.) for germoplasm conservation." *Acta Horticulturae* **560**: 137-140.
- Benelli, C., E. A. Ozudogru y M. Lambardi (2011).** "*In vitro* conservation of ornamental plants by slow growth storage." *Acta Horticulturae* **961**: 89-93.
- Bennici, A., M. Anzidei y G. Vendramin (2004).** "Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis." *Plant Science* **166**: 221-227.
- Berruti, A., V. Scariot, R. Borriello, V. Bianciotto, M. T. Della Beffa, A. Christiaens, M. C. Van Labeke y E. De Keyser (1990).** "Rationalization of *Camellia japonica* L. pot cultivation: a multidisciplinary approach " *Acta Horticulturae* **990**: 159-166.
- Besnard, G., P. Baradat y A. Bervillé (2001).** "Genetic relationships in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars." *Theoretical and Applied Genetics* **102**: 251-258.
- Besnard, G. y A. Bervillé (2000).** "Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms." *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **323**(2): 173-181.
- Besnard, G., R. R. Casas, P. Christin y P. Vargas (2009).** "Phylogenetics of *Olea* (*Oleaceae*) based on plastid and nuclear ribosomal DNA sequences: Tertiary climatic shifts and lineage differentiation times." *Annals of Botany* **104**(1): 143-160.
- Besnard, G., C. García-Verdugo, R. Rubio de Casas, U. A. Treier, N. Galland y P. Vargas (2008).** "Polyploidy in the olive complex (*Olea europaea*): evidence from flow cytometry and nuclear microsatellite analyses." *Annals of Botany* **101**: 25-30.
- Bhojwani, S. S. y P. K. Dantu (2013b).** "Conservation of phytodiversity." En: *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*, S:S. Bhojwani y P. K. Dantu (eds). Springer, India. pp 287-298.
- Bhojwani, S. S. y P. K. Dantu (2013a).** "Micropropagation." En: *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*, S:S. Bhojwani y P. K. Dantu (eds). Springer, India. pp 245-274.
- Bhojwani, S. S. y M. K. Razdan (1996).** "Plant Tissue Culture: theory and practice" *Biol Plant* **39**: 542.
- Binet, M. N., M. C. Lemoine, C. Martin, C. Chambon y S. Gianinazzi (2007).** "Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) and application of mycorrhiza to improve plantlet establishment." *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **43**(5): 473-478.
- Bonga, J. (1982).** "Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity, and rejuvenation." En: *Tissue culture in forestry*, J. M. Bonga y D.J. Durzan (eds). The Hague, Netherlands. pp 387-412.
- Bornet, B. y M. Branchard (2001).** "Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting." *Plant Molecular Biology Reporter* **19**(3): 209-215.
- Boskou, D. (2006).** "Characteristics of the olive tree and olive fruit." *Olive oil chemistry and technology* 13-19
- Botía, J. M., A. Ortuño, M. Acosta, F. Sabater y J. Sánchez-Bravo (1992).** "Influence of 2, 3, 5-triiodobenzoic acid on the transport and metabolism of IAA in lupin hypocotyls." *Journal of Plant Growth Regulation* **11**: 135-141.
- Botstein, D., R. White, M. Skolnick, R. W. Davis y R. W. Davis (1980).** "Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms." *American journal of human genetics* **32**(3): 314-331.

- Bouman, H. y G. Klerk (2001).** "Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays." *Theoretical and Applied Genetics* **102**(1): 111-117.
- Bouza, L. (1997).** "Micropropagation of *Prunus tenella* (dwarf russian almond)." *Biotechnology in Agriculture and Forestry* **40**: 276-288.
- Bracci, T., A. Minnocci y L. Sebastiani (2012).** "Preliminary studies on *in vitro* culture establishment of four typical olive cultivars from Tuscany and Liguria (Italy)." *Acta Horticulturae* **949**: 53-60
- Bradaï, F. (2009).** "Estabilidad genética en plántulas de olivo, obtenidas via embriogénesis somática." Tesina Máster Mejora Genética Vegetal. Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza.
- Braun, A. (1959).** A demonstration of the recovery of the crown-gall tumor cell with the use of complex tumors of single-cell origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **45**(7): 932-938.
- Breviglieri, N. y E. Battaglia (1954).** "Ricerche Cariologiche in *Olea europaea* L." *Caryologia* **6**(2-3): 271-283.
- Brhadda, N., A. Abousalim, D. E. Loudiyi y Benali (2003).** "Effet du milieu de culture sur le microbouturage de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine Marocaine." *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* **7**(3-4): 177-182.
- Briccoli-Bati, C., A. Fodale, R. Mulé y T. Trombino (1999).** "Trials to increase *in vitro* rooting ok *Olea europaea* L. cuttings." *Acta Horticulturae* **474**: 91-94.
- Briccoli-Bati, C., G. Godino, D. Monardo y V. Nuzzo (2006).** "Influence of propagation techniques on growth and yield of olive trees cultivars 'Carole' and 'Nocellara Etnea'" *Scientia Horticulturae* **109**(2): 173-182.
- Briccoli-Bati, C., G. Godino y V. Nuzzo (2002).** "Preliminary agronomic evaluation of two cultivars of olive trees obtained from micropropagation methods." *Acta Horticulturae* **586**: 867-870.
- Brink, R. A. (1962).** "Phase change in higher plants and somatic cell heredity". *Quarterly Review of Biology*, 1-22.
- Brito, G., A. Costa, C. Coelho y C. V. Santos (2009).** "Large-scale acclimatization of *Olea maderensis* micropropagated plants: morphological and physiological survey." *Trees* **23**: 1019-1031.
- Brito, G., T. Lopes, J. Loureiro, E. Rodriguez y C. Santos (2010).** "Assessment of genetic stability of two micropropagated wild olive species using flow cytometry and microsatellite markers." *Trees* **24**(4): 723-732.
- Browicz, K. y J. Zielinski (1990).** "Chorology of trees and shrubs in South-West Asia and adjacent regions." *Polish Scientific*
- Buiatti, M., S. Baroncelli y A. Bennici (1974).** "Genetics of growth and differentiation of *Brassica oleracea* var. Botrytis." *Journal of Plant Breeding* **73**(1-4): 298-302.
- Bukhari, N. A. W., I. Siddique, K. Perveen, I. Siddiqui y M. S. Alwahibi (2014).** "Synthetic seed production and physio-biochemical studies in *Cassia angustifolia* vahl a medical plant." *Acta Biologica Hungarica* **65**(3): 355-367.
- Burritt, D. J. (2008).** "Efficient cryopreservation of adventitious shoots of *Begonia x erythrophylla* using encapsulation-dehydration requires pretreatment with both ABA and proline." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **95**(2): 209-215.
- Byun, Y. J., M. Y. Koo, H. J. Joo, Y. M. Ha-Lee, D. H. Lee y D. H. Lee (2014).** "Comparative analysis of gene expression under cold acclimation, deacclimation and reacclimation in *Arabidopsis*." *Physiologia Plantarum* **152**: 256-274.

## C

- Caballero, J. M. (1981).** "Multiplicación del olivo por estaquillado semileñoso bajo nebulización." Comunicaciones del INIA. Serie Producción Vegetal **31**.
- Caballero, J. M. y C. Río (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 C. Río (2005).** "Bancos de Germoplasma." En: Variedades de olivo en España, L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C. Del Río, A. Marín, J. Tous y I. Trujillo, (eds). Mundi Prensa, Madrid. pp 237-246.
- Caballero, J. M. y C. Río (2008).** "Métodos de multiplicación." En El Cultivo del Olivo, D. Barranco, R.Fernández-Escobar y L. Rallo (eds). Coed. Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. pp 95-123.
- Caballero, J. M., C. Río, C. Navarro, M. García-Fernández, J. Morales, M. Hermoso, L. A. Olmo, F. López, F. Cera y G. Ruiz (2005).** "Ensayo comparativo de variedades." En: Variedades de olivo en España, L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C. Del Río, A. Marín, J. Tous y I. Trujillo, (eds). Mundi Prensa, Madrid. pp 385-394.
- Calamar, A. y G. J. De Klerk (2002).** "Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **70**(2): 207-212.
- Cancado, G. M., T. A. Setotaw y J. L. Ferreira (2013).** "Applications of biotechnology in olive." African Journal of Biotechnology **12**(8): 767-779.
- Candolle, A. (1883).** "Origine des plantes cultivées." Germer-Baillière.
- Cansev, A., H. Gulen y A. Eris (2009).** "Cold-hardiness of olive (*Olea europaea* L.) cultivars in cold-acclimated and non-acclimated stages: seasonal alteration of antioxidative enzymes and dehydrin-like proteins." The Journal of Agricultural Science **147**(01): 51-61.
- Canto, A. M. M. E., F. V. D. Souza, M. A. C. Costa, A. D. S. Souza, C. A. D. S. Ledo y J. R. S. Cabral (2004).** "In vitro conservation of pineapple germplasm treated with paclobutrazol." Pesquisa Agropecuária Brasileira **39**(7): 717-720.
- Cañas, L., L. Carramolino y M. Vicente (1987).** "Vegetative propagation of the olive tree from *in vitro* cultured embryos." Plant Science **50**(1): 85-90.
- Cañas, L. A., J. Avila, M. Vicente y A. Benbadis (1992).** "Micropropagation of Olive (*Olea europaea* L.)." Biotechnology in Agriculture and Forestry **18**: 493-505.
- Cañas, L. A. y A. Benbadis (1988).** "In vitro plant regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (*Olea europaea* L)." Plant Science **54**: 65-74.
- Capelo, A. M., S. Silva, G. Brito y C. Santos (2010).** "Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **103**(2): 237-242.
- Capuana, M. y S. Lonardo (2013).** "In vitro conservation of chestnut (*Castanea sativa*) by slow growth." In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant **49**(5): 605-610.
- Capuano, G., E. Piccioni y A. Standardi (1998).** "Effect of different treatments on the conversion of M.26 apple rootstock synthetic seeds obtained from encapsulated apical and axillary micropropagated buds." Journal of Horticultural Science **73**: 299-305.
- Carmona-Martín, E., J. J. Regalado, I. M. Padilla y N. Westendorp (2014).** "A new and efficient micropropagation method and its breeding applications in *Asparagus* genera." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **119**(3): 479-488.
- Carter, E.M. (1997).** "Olive micropropagation (*Olea europaea* L)". Plant Propagation. 49 p INIA/CL (Chile).



- Casal, (2008).** "Fotomorgogénesis: La luz como factor regulador del crecimiento." En: Fundamentos de Fisiología Vegetal, J. Azcón y M. Bieto (eds). McGraw-Hill/Interamericana, Barcelona. pp: 467-482.
- Cerezo, S. (2012).** "Regeneración y Transformación Genética de Olivo (*Olea europaea* L.)." Tesis Doctoral, Universidad de Málaga (España).
- Cheruvathur, M. K., N. Najeeb y T. D. Thomas (2013).** "In vitro propagation and conservation of Indian sarsaparilla, *Hemidesmus indicus* LR Br. through somatic embryogenesis and synthetic seed production." *Acta physiologiae plantarum* **35**(3): 771-779.
- Churchill, G. C., M. J. Reaney y L. V. Gusta (1994).** "Molecular modeling of the (S)-ABA binding site of the receptor involved in the induction of freezing tolerance: a hypothetical receptor model." *Journal of Plant Growth Regulation* **13**(4): 173-181.
- Cicerale, S., X. A. Conlan, A. J. Sinclair y R. S. Keast (2009).** "Chemistry and health of olive oil phenolics." *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **49**: 218-236.
- Cid, L. B. y L. Carvalho (2008).** "Importancia del Ácido Abscísico (ABA) en la Conservación *In Vitro* de la Yuca (*Manihot esculenta* Crantz)." *Chilean journal of agricultural* **68**: 304-308.
- Ciferri, R. (1942).** "Recent progress in botanical studies of the cultivated olive." *Convegno di Studi Olivicoli*: 15-52.
- Cimanto, A. y P. Fiorino (1980).** "Stato attuale delle conoscenze sulla moltiplicazione dell'olivo con la técnica della nebulizzazione." *L'Informatore Agrario* **36**(3): 12227-12238.
- Cipriani, G., A. Belaj, L. Baldoni, Z. Satovic, R. Testolin, L. Rallo y I. Trujillo (2002).** "Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA." *Theoretical and Applied Genetics* **105**(4): 638-644.
- Civantos, L. (2008).** "La olivicultura en el mundo y en España." En: *El Cultivo del Olivo*, D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (eds). Coed. Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. pp 17-36.
- Clark, J. R. (1983).** "Age-related changes in trees." *Journal of Arboriculture* **9**: 201-205.
- Clavero-Ramírez, I. (1994).** "Acortamiento del periodo juvenil en olivo (*Olea europaea* L.)." Tesis Doctoral, Universidad de Málaga (España).
- Clavero-Ramírez, I. y F. Pliego-Alfaro (1993).** "Efecto del fotoperiodo en el crecimiento y desarrollo de plántulas de olivo." *Acta Horticulturae* **10**(2): 893-897.
- Clemens, J., R. Henriod, D. Bailey y P. Jameson (1999).** "Vegetative phase change in *Metrosideros*: shoot and root restriction." *Plant Growth Regulation* **28**: 207-214.
- COI (2015).** Consejo Oleícola Internacional <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>
- Conde, C., P. Silva, A. Agasse, R. Lemoine, S. Delrot, R. M. Tavares, R. M. Tavares y H. Gerós (2007).** "Utilization and transport of mannitol in *Olea europaea* and implications for salt stress tolerance." *Plant and Cell Physiology* **48**: 42-53.
- Cooper, C., T. Crowther, B. Smith, S. Isaac y S. A. Collin (2006).** "Assessment of the response of carrot somaclones to *Pythium violae*, causal agent of cavity spot." *Plant* **55**: 427-432.
- Cordeiro, S. Z., N. K. Simas, A. B. Henriques y A. Sato (2014).** "In vitro conservation of *Mandevilla moricandiana* (*Apocynaceae*): short-term storage and encapsulation-dehydration of nodal segments." *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **50**(3): 326-336.
- Couselo, J. C., P. Varela y M. Rey (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.
- Cown, B. H. y R. Amos (1979).** "Initial trials with commercial micropropagation of brich selections." *Proceedings International Plant Propagators Society* **29**: 387-393.

- Cown, B. H. y G. Lloyd (1979).** "Woody Plant Medium (Wpm) - A Mineral Nutrient Formulation for Microculture Of Woody Plant-Species." *Hortscience* **16**(3): 453.
- Cozza, R., D. Turco, C. Briccoli-Bati y M. B. Bitonti (1997).** "Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **51**(3): 215-223.
- Crisosto, C. y E. G. Sutter (1985).** "Improving "Manzanillo" olive seed germination." *Hortscience* **20**(1): 100-102.
- Cubero, J. I., S. Nadal y M. T. Moreno (2006).** "Recursos Fitogenéticos." Editorial Agrícola Española SA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Cummings, D. P., C. E. Green y D. D. Stuthman (1976).** "Callus Induction and Plant Regeneration in Oats." *Crop science* **16**(4): 465-470.
- Custódio, L., M. A. Martins-Loução y A. Romano (2004).** "Influence of sugars on *in vitro* rooting and acclimatization of carob tree." *Biologia Plantarum* **48**(3): 469-472.
- Chari, A., A. Chelly-Chaabouni, M. Maalej y N. Drira (2002).** "Meski olive variety propagated by tissue culture." *Acta Horticulturae* **586**: 871-874.
- Chari, A., A. Trigui y Drira (1999).** "Micropropagation of tunisian cultivars olive trees: preliminary results." *Acta Horticulturae* **474**: 79-81.
- Chari, 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.
- Chandel, K. P. S., y Pandey, R. (1991).** "Plant genetic resources conservation: recent approaches".
- Chalupa, V. (1987).** "Temperature." *Cell and Tissue Culture in Forestry* **1**: 142-151.
- Chen, J. T. y W. C. Chang (2004).** "TIBA affects the induction of direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium*." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **79**: 315-320.
- Chen, H. H., P. H. Li y M. L. Brenner (1983).** "Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation." *Plant Physiology* **71**(2): 362-365.
- Cheng, F. S., S. K. Brown y N. F. Weeden (1997).** "A DNA extraction protocol from various tissues in woody species." *Hortscience* **32**(5): 921-922.
- Chevalier, A. (1948).** "L'origine de l'olivier cultivé et ses variations." *Revue internationale de Botanique appliquée et d'agriculture tropicale* **48**: 1-25.
- Chiancone, B., G. Patricolo y Germanà (2008).** "*In vitro* establishment and culture of two sicilian cultivars of *Olea europaea* L." *Acta Horticulturae* **949**: 35-38.
- Chuang, S., C. Chen, J. Chen, W. Chou and J. Sung (2009).** "Detection of somaclonal variation in micro-propagated *Echinacea purpurea* using AFLP marker." *Scientia Horticulturae* **120**: 121-126.

## D

- Damasco, O., M. Smith, I. Godwin, S. W. Adkins, S. W. Adkins, R. M. Smillie, R. M. Smillie, S. E. Hetherington y S. E. Hetherington (1997).** "Micropropagated dwarf off-type Cavendish bananas (*Musa* spp, AAA) show improved tolerance to suboptimal temperatures." *Australian Journal of Agricultural Research* **48**: 377-384.
- Danso, K. y B. Ford-Lloyd (2003).** "Encapsulation of nodal cuttings and shoot tips for storage and exchange of cassava germplasm." *Plant Cell Reports* **21**(8): 718-725.
- Danyluk, J., A. Perron, M. Houde, A. Limin, B. Fowler, N. Benhamou y F. Sarhan (1998).** "Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat." *The Plant Cell* **10**(4): 623-638.
- Das, S.C., T. S. Barman y R. Singh (1990).** "Plant regeneration and establishment in the nursery." *Tea New* **79**: 24-27.

- Davies, F. T. (1983).** "Influence of juvenility and maturity in propagation." Proceedings of International Plant Propagator's Society **33**: 559-565.
- Debergh, P. y L. Maene (1981).** "A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture." Scientia Horticulturae **14**: 335-345.
- Debergh, P. C. y P. E. Read (1991).** "Micropropagation." En: Micropropagation, P.C. Debergh y P.E. Read (eds). Springer, Netherlands. pp 1-13.
- De Klerk, G. J., W. V. Krieken y J. C. Jong (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., A. Angiolillo, C. Guerrero, M. Pellegrini, L. Rallo, G. Besnard, A. Bervillé, A. Martin y L. Baldoni (2003).** "A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers." Theoretical and Applied Genetics **106**: 1273-1282.
- Del Rio, C. (1988).** "Influencia de los hidratos de carbono y de la presencia del fruto en el enraizamiento de olivo por estaquillado semileñoso." Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba (España).
- Denaxa, N. K., S. N. Vemmos y P. A. Roussos (2012).** "The role of endogenous carbohydrates and seasonal variation in rooting ability of cuttings of an easy and a hard to root olive cultivars (*Olea europaea* L.)." Scientia Horticulturae **143**: 19-28.
- Dennis, E., R. Brettell y W. Peacock (1987).** "A tissue culture induced Adh1 null mutant of maize results from a single base change." Molecular and General Genetics **210**: 181-183.
- Destefano-Beltrán, L., D. Knauber, L. Huckle y J. C. Suttle (2006).** "Chemically forced dormancy termination mimics natural dormancy progression in potato tuber meristem by reducing ABA content and modifying expression of genes involved in regulating ABA synthesis and metabolism." Journal of Experimental Botany **57**: 2879-2886.
- Devarumath, R., R. Doule y P. Kwar (2007).** "Field performance and RAPD analysis to evaluate genetic fidelity of tissue culture raised plants vis-à-vis conventional setts derived plants of sugarcane." Sugar tech **9**(1): 17-22.
- Devarumath, R. M., S. Nandy, V. Rani, S. Marimuthu, N. Muraleedharan y S. Raina (2002).** "RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camelia sinensis* (China type) and *C. assamica* spp. *assamica* (Assam-India type)." Plant Cell Reports **21**(2): 166-173.
- Dhaliwal, H. S., E. C. Yeung y T. A. Thorpe (2004).** "TIBA inhibition of *in vitro* organogenesis in excised tobacco leaf explants." *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **40**(2): 235-238.
- Dhir, R. y G. S. Shekhawat (2013).** "Production, storability and morphogenic response of alginate encapsulated axillary meristems and genetic fidelity evaluation of *in vitro* regenerated *Ceropegia bulbosa*: A pharmaceutically important threatened plant species." Industrial Crops and Products **47**: 139-144.
- Diamond, J. (2002).** "Evolution, consequences and future of plant and animal domestication." Nature **418**: 700-707.
- Dimassi y D. Dimassi (1994).** "*In vitro* propagation of cv. 'Kalamon' olives (*Olea europaea sativa* L.)." Advances in Horticultural Science **8**: 185-189.
- Dimassi, K. (1999).** "Micropropagation studies of the cv. 'Kalamon' olives (*Olea europaea sativa* L.)." Acta Horticulturae **474**: 83-86.
- Donini, L. P., M. W. Schuch, M. Ribeiro, J. A. Souza y G. C. Soares (2008a).** "*In vitro* establishment of olive tree cultivar 'Arbequina' for micropropagation starting." Ciencia Rural **38**(6): 1-5.
- Donini, L. P., M. W. Schuch, M. Ribeiro, J. A. Souza y G. C. Soares (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* **9**(2): 229-233.

**Dorado, G., R. Rosa, P. Rallo y A. Martín (2005)**. "Marcadores Moleculares." En: Variedades de olivo en España, L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C. Del Río, A. Marín, J. Tous y I. Trujillo, (eds). Mundi Prensa, Madrid. pp 423-430.

**Drew, R. A. (1991)**. "*In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **26**(1): 23-27.

**Driver, J. A. y G. R. L. Suttle (1987)**. "Nursery handling of propagules." En: Cell and Tissue Culture in Forestry, J.A. Druver y G.R.L. Suttle (eds). Springer, Netherlands. pp 320-335.

**Driver, J. A. y A. H. Kuniyuki (1984)**. "*In vitro* propagation of paradox walnut rootstock." *Hortscience* **19**(4): 507-509.

**Dutcher, R. D. y L. E. Powell (1972)**. "Culture of apple shoots from buds *in vitro*." *Journal of the American Society for Horticultural Science* **97**: 511-514.

## E

**Ecker, R., A. Barzilay y L. Afigin (1992)**. "Growth and flowering responses of *Matthiola incana* LR BR. to paclobutrazol." *Hortscience* **27**(12): 1330.

**Eraslan, F., A. Inal, D. Pilbeam y A. Gunes (2008)**. "Interactive effects of salicylic acid and silicon on oxidative damage and antioxidant activity in spinach (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador) grown under boron toxicity and salinity." *Plant Growth Regulation* **55**: 207-219.

**Eris, A., H. Gulen, E. Barut y A. Cansev (2007)**. "Annual patterns of total soluble sugars and proteins related to cold-hardiness in olive (*Olea europaea* L.)." *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **82**: 597-604.

**Escrich, E., R. Moral y M. Solanas (2011)**. "Olive oil, an essential component of the mediterranean diet, and breast cancer." *Public Health Nutrition* **14**(12A): 2323-2332.

**Espinasse, A. y C. Lay (1989)**. "Shoot regeneration of callus derived from globular to torpedo embryos from 59 sunflower genotypes." *Crop science* **29**(1): 201-205.

**Esquinas-Alcázar, J. T. (1993)**. "La diversidad genética como material básico para el desarrollo agrícola." En: La Agricultura del siglo XXI, J.I. Cubero y M.T. Moreno (eds). Mundi Prensa, Madrid. pp 79-102.

## F

**Fabbri, A., G. Bartolini, M. Lambardi y S. Kailis (2004)**. "Olive Propagation Manual." Ed. Landlinks Press, Australia.

**FAOSTAT (2015)**. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>

**Farahani, F., M. Peyvandi y M. Hosseini-Mazinani (2008)**. "Effect sucrose and manitol on *in vitro* regeneration of Iranian olive cv 'Rowghani'." *Acta Horticulturae* **791**: 203-208.

**Farahani, F., S. Razeghi, M. Peyvandi, S. Attai y M. H. Maninani (2011a)**. "Micrografting and micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) Iranian cultivar: Zard." *African Journal of Plant Science* **5**(11): 671-675.

**Farahani, F., R. Yari y M. Sheidai (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., R. Yari y M. Sheidai (2011c)**. "Somaclonal variation in Dezful cultivar of olive (*Olea europaea* subsp. *europaea*)." *Geneconserve* **40**: 216-233.

**Farhodi, R. y S. Saedipour (2011)**. "Effect of exogenous abscisic acid on antioxidant activity and salt tolerance in rapeseed (*Brassica napus*) cultivars." *Research on Crops* **12**(1): 122-130.

**Favre, J. M. y B. Juncker (1987)**. "*In vitro* growth of buds taken from seedlings and adult plant material in *Quercus robur* L." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **8**(1): 49-60.

- Feher, A., T. P. Pasternak y D. Dudits (2003).** "Transition of somatic plant cells to an embryogenic state." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **74**(3): 201-228.
- Fico, G., A. Bilia, I. Morelli y F. Tomè (2000).** "Flavonoid distribution in *Pyracantha coccinea* plants at different growth phases." *Biochemical Systematics and Ecology* **28**: 673-678.
- Fishel, D. W., J. J. Zaczek y J. E. Preece (2003).** "Positional influence on rooting of shoots forced from the main bole of swanp white oak and northern red oak." *Canadian Journal of Forest Research* **33**(4): 705-711.
- Fletcher, R. A. y A. Gilley (2000).** "Triazoles as plant growth regulators and stress protectants." *Horticultural Reviews* **24**: 55-138.
- Fortanier, E. J. y H. Jonkers (1976).** "Juvenility and maturity of plants influenced by their ontogenetical and physiological ageing." *Acta Horticulturae* **56**: 37-44.
- Fortes, G. R. y J. E. Pereira (2001).** "*In vitro* storage of potato under acetyl salicylic acid and two carbohydrate sources." *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **36**(10): 1261-1264.
- Fraga, M., R. Rodríguez y M. Cañal (2002).** "Genomic DNA methylation–demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*." *Tree Physiology* **22**: 813-816.
- Francllet, A. (1983).** "Rajeunissement, culture *in vitro* et pratique sylvicole." En: *Clonal Forestry: Its impact on tree improvement and our future forest*. 19<sup>th</sup> Meeting of the Canadian Tree Improvement Association, pp: 96-134.
- Francllet, A. (1991).** "Biotechnology in "rejuvenation": hope for the micropropagation of difficult woody plants." *Acta Horticulturae* **289**: 273-282.
- Francllet, A., M. Boulay, F. Bekkaoui, Y. Fouret, B. Verschoore-Martouzet y N. Walker (1987).** "Rejuvenation." En: *Cell and Tissue Culture in Forestry*, J.M. Bonga y D.J. Durzan (eds). Springer, Netherlands. pp 232-248.
- Fuentes, S., M. Calheiros, J. Manetti-Filho, L. G. Vieira y L. G. Vieira (2000).** "The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **60**: 5-13.
- Fujita, M., Y. Fujita, Y. Noutoshi, F. Takahashi, Y. Narusaka, K. Yamaguchi-Shinozaki y K. Shinozaki (2006).** "Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks." *Current Opinion in Plant Biology* **9**(4): 436-442.
- Fujiwara, K., T. Kozai y I. Watanabe (1988).** "Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoots and/or plantlets at rooting and acclimatization stages." *Acta Horticulturae* **230**: 153-158.
- Fukuoka, H., M. Kawata y F. Takaiwa (1994).** "Molecular changes of organelle DNA sequences in rice through dedifferentiation, long-term culture, or the morphogenesis process." *Plant Molecular Biology* **26**: 899-907.

## G

- Galiba, G., G. Kocsy, R. Kaur-Shawney, J. Sutka y A. W. Galston (1993).** "Chromosomal localization of osmotic and salt stress-induced differential alterations in polyamine content in wheat." *Plant Science* **92**(2): 203-2011.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller y K. Ojima (1968).** "Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells." *Experimental Cell Research* **50**(1): 151-158.
- Gao, D., V. Vallejo, B. He, Y. Gai y L. Sun (2009).** "Detection of DNA changes in somaclonal mutants of rice using SSR markers and transposon display." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **98**(2): 187-196.
- García, J. L., N. Avidan, A. Troncoso, R. Sarmiento y S. Lavee (2000).** "Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues." *Scientia Horticulturae* **85**: 537-540.

- García-Férriz, L. y M.I. Huesca (2005).** "Del laboratorio *in vitro* al vivero". Horticultura Intenacional 1: 58-61
- García-Férriz, L., R. Ghorbel, M. Ybarra, A. Belaj y I. Trujillo (2002).** "Micropropagation from adult olive trees." Acta Horticulturae **586**: 879-882.
- García-Férriz, L., R. Ghorbel, M. Ibarra, A. Belaj y I. Trujillo (2003).** "Cultivo *in vitro* y comportamiento en campo de olivo adulto." Horticultura: Material Vegetal **172**: 64-66.
- García-Férriz, L., R. Ghorbel, M. Ibarra, A. Marí, A. Belaj y I. Trujillo (2001).** "Micropropagación de olivo a partir de material adulto." Fruticultura Profesional **120**: 73-75.
- García, J. L., R. Sarmiento y A. Troncoso (2002).** "Some biochemical differences between juvenile and young olive plant material." Acta Horticulturae **586**: 537-540.
- Gardi, T., E. Piccioni y A. Standardi (1999).** "Effect of bead nutrient composition on regrowth of stored vitro-derived encapsulated microcuttings of different woody species." Journal of Microencapsulation **16**(1): 13-25.
- Gaspar, T. (1991).** "Vitrification in micropropagation." Biotechnology in Agriculture and Forestry **17**: 116-126.
- George, E. F. (2008).** "Plant Tissue Culture Procedure - Blanckgroud." En: Plant Propagation by Tissue Culture, E.F. George, A.H. Michael y G.J. De Klerk (eds). Springer, Netherlands. pp 1-28.
- George, E. F. y W. Davies (2008).** "Effects of the Physical Environment." En: Plant Propagation by Tissue Culture E.F. George, A.H. Michael y G.J. De Klerk (eds). Springer, Netherlands. pp 423-464.
- George, E. F. y P. C. Debergh (2008).** "Micropropagation: Uses and Methods." En: Plant Propagation by Tissue Culture, E.F. George, A.H. Michael y G.J. De Klerk (eds). Springer, Netherlands. pp 29-64.
- Gernand, D., H. Golczyk, T. Rutten, T. Ilnicki, A. Houben y A. J. Joachimiak (2007).** "Tissue culture triggers chromosome alterations, amplification, and transposition of repeat sequences in *Allium fistulosum*." Planta **213**: 1-10.
- Gil, B., E. Pastoriza, A. Ballester y C. Sánchez (2003).** "Isolation and chatacterization of a cDNA from *Quercus robur* differentially expressed in juvenile-like and mature shoots." Tree Physiology **23**: 633-640.
- Giles, K. L., y Friesen, K. R. D. (1994).** "Micropropagation". En: Biotechnological Applications of Plant Culture, B. Raton (eds). CRC Press, Florida, USA. PP: 111-128.
- Giménez-Abián, M. I., A. E. Rozalén, J. A. Carballo, L. M. Botella, J. Pincheira, J. F. López-Sáez y C. de la Torre (2004).** "HSP90 and checkpoint-dependent lengthening of the G2 phase observed in plant cells under hypoxia and cold." Protoplasma **223**(2-4): 191-196.
- Giménez, C., E. García, N. Enrech y I. Blanca (2001).** "Somaclonal variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant CIEN BTA-03." *In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant **37**: 217-222.
- González-Arno, M. T. y F. Engelmann (2006).** "Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique." CryoLetters **27**(3): 155-168.
- Goosen, M. F. A. (1999).** "Physico-chemical and mass transfer considerations in microencapsulation." Annals of New York Accademy of Scieince **875**(1): 84-104.
- Gopal, J., A. Chamail y D. Sarkar (2002).** "Slow-growth *in vitro* conservation of potato germplasm at normal propagation temperature." Potato research **45**: 203-213.
- Gopal, J., A. Chamail y D. Sarkar (2005).** "Use of microtubers for slow-growth *in vitro* conservation of potato germplasm." Plant Genetic **141**: 56-60.
- Gostimsky, S., Z. Kokaeva y F. Konovalov (2005).** "Studying plant genome variation using molecular markers." Russian Journal of Genetics **41**: 378-388.

- Grant, N. J. y N. Hammatt (1999).** "Increased root and shoot production during micropropagation of cherry and apple rootstocks: effect of subculture frequency." *Tree Physiology* **19**: 899-903.
- Grattapaglia, D., M. A. Machado, A. C. Torres, L. S. Caldas y J. A. Buso (1998).** "Micropropagação." *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas* **1**: 183-260.
- Green, C. E. y R. L. Phillips (1975).** "Plant Regeneration from Tissue Cultures of Maize." *Crop Science* **15**(3): 417-421.
- Green, P. S. y G. E. Wickens (1989).** "The *Olea europaea* complex." En: *Plant Taxonomy, Phytogeography and Related Subjects*, K. Tan (eds) University Press, Edinburgh. pp 287-299.
- Greenwood, M. S. (1987).** "Rejuvenation of forest trees." *Plant Growth Regulation* **6**: 1-12.
- Grigoriadou, K., E. P. Eleftheriou y M. Vasilakakis (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., M. Vasilakakis y E. P. Eleftheriou (2002).** "*In vitro* propagation of the Greek olive cultivar 'Chondrolia Chalkidikis'." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **71**: 47-54.
- Grigoriadou, K., M. Vasilakakis y E. P. Eleftheriou (2003).** "Rooting and acclimatization of *in vitro* propagated olive tree microshoots (*Olea europaea* sativa L.) cv. Chondrolia chalkidikis." *Acta Horticulturae* **616**: 193-197.
- Grout, B. (1995).** "Introduction to the *in vitro* preservation of plant cells, tissues and organs." En: *Genetic preservation of plant cells in vitro*, W.W. Grout (eds) Springer, Berlin Heidelberg. pp 1-20.
- Grout, B. W. W. y M. J. Aston (1977).** "Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration." *Horticultural Research (UK)*.
- Guan, H. y G. J. De Klerk (2000).** "Stem segments of apple microcuttings take up auxin predominantly via the cut surface and not via the epidermal surface." *Scientia Horticulturae* **86**(1): 23-32.
- Gulen, H., A. Cansev y A. Eris (2009).** "Cold hardiness of olive (*Olea europaea* L.) cultivars in cold-acclimated and non-acclimated stages: seasonal alteration of soluble sugars and phospholipids." *The Journal of Agricultural Science* **147**: 459-467.
- Gunes, A., A. Inal, M. Alpaslan, F. Eraslan, E. G. Bagci y N. Cicek (2007).** "Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity." *Journal of Plant Growth Regulation* **164**: 728-736.
- Guo, W., Y. Li, L. Gong, F. Li, Y. Dong y B. Liu (2006).** "Efficient micropropagation of *Robinia ambigua* var. *idahoensis* (Idaho Locust) and detection of genomic variation by ISSR markers." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **84**(3): 343-351.
- Gusta, L. V., R. Trischuk y C. J. Weiser (2005).** "Plant Cold Acclimation: The Role of Abscisic Acid." *Journal of Plant Growth Regulation* **24**(4): 308-318.
- Gyves, E. M., F. R. Mira, F. Ruiy y E. Rugini (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**(2): 233-238.
- ## H
- 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*, J.M. Bonga y D.J. Durzan (eds). Springer, Netherlands. pp 216-227.

- Hackett, W. P. y J. R. Murray (1993).** "Maturation and rejuvenation in woody species." En: Micropropagation of Woody Plants, M.R. Ahuja (eds). Springer, Netherlands. pp 93-105.
- Haffner, V., F. Enjalric, L. Lardet y M. P. Carron (1991).** "Maturation of woody plants: a review of metabolic and genomic aspects." *Annales Science Forestry* **48**: 615-630.
- Hajhashemi, S. y A. A. Ehsanpour (2013).** "Influence of exogenously applied paclobutrazol on some physiological traits and growth of *Stevia rebaudiana* under *in vitro* drought stress." *Biologia* **68**(3): 414-420.
- Hao, Y. y X. Deng (2002).** "Occurrence of chromosomal variations and plant regeneration from long-term-cultured citrus callus." *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **38**: 472-476.
- Haq, I. U., M. C. Dominguez-García, I. A. Hafiz y N. A. Abbasi (2009).** "Influence of micro cutting sizes and IBA Concentrations on *in vitro* rooting of olive cv.'Dolce Agogia'." *Pakistan Journal of Botany* **41**(3): 1213-1222.
- Haque, S. M. y B. Ghosh (2014).** "Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed Production—a Biotechnological Approach for True-to-Type Propagation and *In Vitro* Conservation of an Ornamental Bulbaceous Plant *Drimiopsis kirkii* Baker." *Appl Biochem Biotechnol* **172**: 4013-4024.
- Harding, K. (1994).** "The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **37**(1): 31-38.
- Harlan, J. (1975).** "Crops and Man." American society of agronomy.
- Harten, A. (1998).** Mutation breeding: theory and practical applications.
- Hartmann, H. T., D. E. Kester, Davies, F. T. y R. L. Geneve (2011).** Hartmann and Kester's Plant Propagation, Principles and Practices.
- Hartmann, W. (1984).** *Erwerbsobstbau* **26**: 135-140
- Hashempour, A., M. Ghasemnezhad, R. F. Ghazvini y M. M. Sohani (2014).** "Olive (*Olea europaea* L.) freezing tolerance related to antioxidant enzymes activity during cold acclimation and non acclimation." *Acta Physiologiae Plantarum* **36**(12): 3231-3241.
- Hashmi, G., R. Huettel, R. Meyer, L. Krusberg y F. Hammerschlag (1997).** "RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach." *Plant Cell Reports* **16**(9): 624-627.
- Hatano, K., K. Kamura, Y. Soyama y I. Nishioka (1988).** "Clonal multiplication of *Aconitum carmichaeli* by tip culture and alkaloid contents of clonally propagated plant." *Planta Med.* **54**: 152-155.
- Hautea, D., G. Molina, C. Balatero, N. B. Coronado, E. B. Pérez y M. T. Alvarez (2004).** "Analysis of induced mutants of Philippine bananas with molecular markers." En: Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations, S.M. Jain y R. Swennen (eds). Science Publishers Inc. pp 45-57.
- Hazarika, B. N. (2003).** "Acclimatization of tissue-cultured plants." *Current Science* **85**(12): 1704-1712.
- Hazarika, B., V. A. Parthasarathy y V. Nagaraju (2001).** "Influence of *in vitro* preconditioning of Citrus microshoots with paclobutrazol on *ex vitro* survival." *Acta Botanica Croatica* **60**: 25-29.
- He, Y. y Z. J. Zhu (2008).** "Exogenous salicylic acid alleviates NaCl toxicity and increases antioxidative enzyme activity in *Lycopersicon esculentum*." *Biologia Plantarum* **52**(4): 792-795.
- Henry, R. J. (1998).** "Molecular and biochemical characterization of somaclonal variation." En *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*, S.M. Jain, D.S. Brar y B.S. Ahoowalia (eds). Springer, Netherlands. pp 485-499.
- Hernández, P., G. Dorado, A. Cabrera, Laurie, J. W. Snape, J. W. Snape y A. Martín (2002).** "Rapid verification of wheat *Hordeum* introgressions by direct staining of SCAR, STS, and SSR amplicons." *Genome* **45**: 198-203.



- Hilding, A. y T. Welander (1976).** "Effects of some factors on propagation of *Begonia hiemalis in vitro*." Swed. J. Agr. Res. **6**: 191-199.
- Hornero, J., I. Martinez, C. Celestino, F. Gallego, V. Torres y M. Toribio (2001).** "Early checking of genetic stability of cork oak somatic embryos by AFLP analysis." International Journal of Plant Sciences **162**(4): 827-833.
- Horváth, E., M. Pál, G. Szalai, E. Páldi y T. Janda (2007).** "Exogenous 4-hydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of short-term drought and freezing stress on wheat plants." Biologia Plantarum **51**(3): 480-487.
- Howard, B. E., O. P. Jones y J. Vasek (1989).** "Long-term improvement in the rooting of plum cuttings following apparent rejuvenation." Journal of Horticultural Science **64**(2): 147-156.
- Hsu, Y. T. y C. H. Kao (2005).** "Abscisic acid accumulation and cadmium tolerance in rice seedlings." Plant Physiology **124**(1): 71-80.
- Huang, R. H., J. H. Liu, Y. M. Lu y R. X. Xia (2008).** "Effect of salicylic acid on the antioxidant system in the pulp of 'Cara cara' navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) at different storage temperatures." Postharvest Biology and Technology **47**(2): 168-175.
- Hu, C. Y. y P. J. Wang (1983).** "Meristem, shoot tip, and bud cultures." En Plant Cell Culture. Macmillian ( pag 177-227). Publishers Company, New York.
- Hu, G. H., N. Dong, Y. Zhou, W. W. Ye y S. X. Yu (2015).** "*In vitro* regeneration protocol for synthetic seed production in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.)." Plant Cell Tissue and Organ Culture **123**(3): 673-679.
- Husen, A. y M. Pal (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 M. Pal (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.
- I**
- Ibanez, M. R. y J. B. Amo-Marco (1998).** "Promotion by phloroglucinol of micropropagation of *Minuartia valentina*, an endangered and endemic Spanish plant." Plant Growth Regulation **26**: 49-56.
- Ikhlaq, M., I. A. Hafiz, M. Micheli, T. Ahmad, N. A. Abbasi y A. Standardi (2010).** "*In vitro* storage of synthetic seeds: Effect of different storage conditions and intervals on their conversion ability." African Journal of Biotechnology **9**(35): 5712-5721.
- Ikhlaq, M., I. A. Hafiz, M. Micheli, T. Ahmad, N. A. Abbasi y A. Standardi (2013).** "*In vitro* storage of synthetic seeds: Effect of different storage conditions and intervals on their conversion ability." African Journal of Biotechnology **9**(35): 5712-5721.
- Imbroda, I., B. Cabello, J. Gallego, R. Linacero, I. M. Padilla y A. Barceló (2014).** "Frigoconservación *in vitro* de olivo (cultivar 'Arbequina')." Acta Horticulturae **69**: 139-140.
- Iñiguez, A., S. Paz y S. J. Illa (2001).** "Variedades de olivo cultivadas en la Comunidad Valenciana." Conselleria d'Agricultura, Peixa i Alimentació. Generalitat Valenciana.
- Israeli, Y., E. Lahav y O. Reuveni (1995).** "*In vitro* culture of bananas." En: Bananas and Plantains, A.M. aremouu (eds). Springer, Netherlands. pp 147-178.
- Israeli, Y., O. Reuveni y E. Lahav (1991).** "Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques." Scientia Horticulturae **41**: 71-88.
- Izhar, S. y J. Power (1977).** "Genetical studies with *Petunia* leaf protoplasts I. Genetic variation to specific growth hormones and possible genetic control on stages of protoplast development in culture" Plant Science Letters **8**(4): 375-383.

## J

- Jacobsen, S. E., C. Monteros, J. L. Christiansen, L. A. Bravo, L. J. Corcuera y A. Mujica (2005).** "Plant responses of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to frost at various phonological stages." *European Journal of Agronomy* **22**: 131-139.
- Jain, S. M. (2001).** "Tissue culture-derived variation in crop improvement." *Euphytica* **118**(2): 153-166.
- Jaleel, C., P. Manivannan, B. Sankar y A. Kishorekumar (2007).** "Responses of antioxidant defense system of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. to paclobutrazol treatment under salinity." *Acta Physiologiae* **29**: 205-209.
- Jaligot, E., T. Beulé y A. Rival (2002).** "Methylation-sensitive RFLPs: characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism." *Theoretical and Applied Genetics* **104**(8): 1263-1269.
- James, A., S. Peraza-Echeverria, V. Herrera-Valencia, O. Martinez, S. M. Jain y R. Swennen (2004).** "Application of the amplified fragment length polymorphism (AFLP) and the methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) techniques for the detection of DNA polymorphisms and changes in DNA methylation in micropropagated bananas." En: *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*, S.M. Jain y R. Swennen (eds). Scienccis Publishers Inc. pp 287-305.
- Jarret, R. L. (1997).** "Effects of chemical growth retardants on growth and development of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) *in vitro*." *Journal of Plant Growth Regulation* **16**: 227-231.
- Jelaska, S. y B. Jelencic (1980).** "Plantlet regeneration from shoot tip culture of *Pelargonium zonale* hybrid." *Acta Botanica Croatica* **39**: 59-63.
- Jiang, C., A. Mithani, X. Gan, E. Belfield, J. Klingler, J. K. Zhu, J. Ragoussis, R. Mott y N. P. Hardberd (2011).** "Regenerant *Arabidopsis* lineages display a distinct genome-wide spectrum of mutations conferring variant phenotypes." *Current Biology* **21**: 1385-1390.
- Jin, S., R. Mushke, H. Zhu, L. Tu, Z. Lin y Y. Zhang (2008).** "Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers." *Plant Cell Reports* **27**: 1303-1316.
- Jing-Hua, Y., G. Yuan, L. Yan-Man, Q. Xiao-Hua y Z. Ming-Fang (2008).** "Salicylic acid-induced enhancement of cold tolerance through activation of antioxidative capacity in watermelon." *Scientia Horticulturae* **118**(3): 200-205.
- Joyce, S. M., A. C. Cassells y S. M. Jain (2003).** "Stress and aberrant phenotypes *in vitro* culture." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **74**(2): 103-121.

## K

- Kadota, M., K. Imizu y T. Hirano (2001).** "Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear." *Scientia Horticulturae* **89**: 207-215.
- Kadota, M. y Y. Niimi (2003).** "Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **72**: 261-265.
- Kaeppeler, S., H. Kaeppeler y Y. Rhee (2000).** "Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants." *Plant Molecular Biology* **43**: 179-188.
- Kaeppeler, S. y R. Phillips (1993).** "DNA methylation and tissue culture-induced variation in plants." *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **29**: 125-130.

- Kalberer, S., M. Wisniewski y R. Arora (2006).** "Deacclimation and reacclimation of cold-hardy plants: current understanding and emerging concepts." *Plant Science* **171**: 3-16.
- Kang, G., G. Li, G. Liu, W. Xu, X. Peng, C. Wang, Y. J. Zhu y T. C. Guo (2013).** "Exogenous salicylic acid enhances wheat drought tolerance by influence on the expression of genes related to ascorbate-glutathione cycle." *Biologia Plantarum* **57**(4): 718-724.
- Karp, A. (1994).** "Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures." En: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, I. Vasil y T. Thorpe (eds). Springer, Netherlands. pp 139-152.
- Karp, A. (1995).** "Somaclonal variation as a tool for crop improvement." *Euphytica* **85**: 295-302.
- Kataeva, N. V. y R. G. Butenko (1987).** "Clonal micropropagation of apple trees." *Acta Horticulturae* **212**: 585-588.
- Kaviani, B. y S. Zakizadeh (2013).** "Effect of Photoperiod, auxin and cytokinin on the multiplication rate and growth of amatyllis (*Hippeastrum Johnsonii*) bulbs *in vitro*." *Propagation of Ornamental Plants* **13**(2): 78-85.
- Kawiak, A. y E. Łojkowska (2004).** "Application of RAPD in the determination of genetic fidelity in micropropagated *Drosera* plantlets." *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **40**: 592-595.
- Keatmetha, W., P. Suksa-Ard, M. Mekanawakul y S. Te-Chato (2006).** "*In vitro* germoplasm conservation of *Garcinia mangostana* L. and *Lansium domesticum* Corr." *Walailak Journal of Scienza Technology* **3**: 33-50.
- Khadari, B., A. Z. Aabidine, C. Grout, I. B. Sadok, A. Doligez, N. Moutier, S. Santoni y E. Costes (2010).** "A genetic linkage map of olive based on amplified fragment length polymorphism, intersimple sequence repeat and simple sequence repeat markers." *Journal of the American Society for Horticultural Science* **135**(6): 548-555.
- Khan, M. R., H. Rashid y A. Quraishi (2002).** "*In vitro* shoot development from juvenile cuttings of field-grown olive (*Olea europaea* L.) cv. Leccino." *OnLine Journal of Biological* **2**(7): 438-440.
- Khlestkina, E., M. Röder y A. Börner (2010).** "Mapping genes controlling anthocyanin pigmentation on the glume and pericarp in tetraploid wheat (*Triticum durum* L.)." *Euphytica* **171**(1): 65-69.
- Kiani, M., Z. Zamani y A. Ebadi (2006).** "*In vitro* germination of three olive cultivars." *Acta Horticulturae* **725**: 333-336.
- Kibbler, H., M. Johnston y R. Williams (2004).** "Adventitious root formation in cuttings of *Backhousia citriodora* F. Muell: 1. Plant genotype, juvenility and characteristics of cuttings." *Scientia Horticulturae* **1**: 133-143.
- Klerk, G. J. (2002).** "Rooting of microcuttings: Theory and practice." *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **38**(5): 415-422.
- Ko, C. J. (1986).** "The effect of temperature on *in vitro* bulblet formation of *Hyacinthus orientalis* L." Tesis Doctoral, Universidad de Minnesota (EEUU).
- Konieczny, R., J. Kępczyński, M. Pilarska, D. Cembrowska, D. Menzel, D. Menzel y J. Šamaj (2009).** "Cytokinin and Ethylene Affect Auxin Transport-Dependent Rhizogenesis in Hypocotyls of Common Ice Plant (*Mesembryanthemum crystallinum* L.)." *Journal of Plant Growth Regulation* **28**(4): 331-340.
- Kooi, L. T., C. L. Keng y C. T. Hoe (1999).** "*In vitro* rooting of sentang shoots (*Azadirachta excelsa* L.) and acclimatization of the plantlets." *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **35**(5): 396-400.
- Kosová, K., I. Práčil, P. Vítámvás, P. Dobrev, V. Motyka, K. Flokova, O. Novak, V. Turetkova, J. Rolcik, B. Pesek, A. Travnickova, a. Gaudinova, G. Galiba, T. Janda, E. Vlasakova, P. Prasilova y R. Vankova (2012).** "Complex phytohormone responses during the cold acclimation of two



wheat cultivars differing in cold tolerance, winter Samanta and spring Sandra." *Journal of Plant Physiology* **169**(6): 567-576.

- Koussa, T., M. Broquedis y J. Bouard (1994)**. "Changes of abscisic acid level during the development of grapevine latent buds, particularly in the phase of dormancy break." *Vitis* **33**: 63-67.
- Kováčik, J., J. Grúz, M. Bačkor, M. Strnad y M. Repčák (2009)**. "Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants." *Plant Cell Reports* **28**: 135-143.
- Kovalchuk, I., Y. Lyudvikova, M. Volgina y B. M. Reed (2009)**. "Medium, container and genotype all influence *in vitro* cold storage of apple germplasm." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **96**(2): 127-136.
- Kovalchuk, I., Z. Zhumagulova, T. Turdiev y B. M. Reed (2014)**. "Growth medium alterations improve *in vitro* cold storage of pear germplasm." *CryoLetters* **35**(3): 197-203.
- Kozak, D. (2006)**. "The influence of growth retardants and BA on the growth and development of *Tibouchina urvilleana* Cogn. *in vitro*." *Acta Horticulturae* **1-2**(725): 435-438.
- Kozomara, B., B. Vinterhalter, L. Radojevic y D. Vinterhalter (2008)**. "*In vitro* propagation of *Chimonanthus praecos* (L.), a winter flowering ornamental shrub." *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **44**(2): 142-147.
- Kucharska, D., T. Orlikowska, A. Stepowska y B. Diky (2012)**. "The influence of TIBA on Adventitious shoot induction of Rose Cultivars " *Propagation of Ornamental Plants* **12**(2): 109-116.
- Kromer, K. y A. Gamian (2000)**. "Analysis of soluble carbohydrates, proteins and lipids in shoots of M 7 apple rootstock cultured *in vitro* during regeneration of adventitious roots." *Journal of Plant Physiology* **156**: 775-782.
- Krug, B. A., B. E. Whipker y I. McCall (2006)**. "Hyacinth height bulb soaks of control using preplant flurprimidol " *Hort Technology* **16**(2): 370-375.

## L

- Lagarda, A., G. Martín y D. E. Kester (1983)**. "Influence of environment, seed tissue and seed maturity on 'Manzanillo' olive germination." *Hortscience* **18**: 868-869.
- Lambardi, M., C. Benelli, A. Carlo, A. Fabbri y S. Grassi (2002)**. "Medium and long-term *in vitro* conservation of olive germoplasm (*Olea europaea* L.)." *Acta Horticulturae* **586**: 109-112.
- Lambardi, M., C. Benelli, A. Carlo, A. Previati, A. Carlo, F. Re y M. Giannini (2006)**. "Biotechnologies for the preservation of selected red chicory (*Cichorium intybus* L.) lines." *Acta Horticulturae* **725**: 311-318.
- Lambardi, M., C. Benelli, G. Paoli y A. Battistini (2001)**. "Biotechnologie per la conservazione del Castagno." *Proc. Convegno Nazionale Castagno 2001*: 86-91.
- Larkin, P. J. y W. R. Scowcroft (1981)**. "Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement." *Theoretical and Applied Genetics* **60**(4): 197-214.
- Lavee, S., N. Avidan, A. Haskal y A. Ogrodovich (1996)**. "Acortamiento del periodo juvenil en los plantones de olivo obtenidos de semillas. Un instrumento de revalorización de la mejora genética." *Olivae: revista oficial del Consejo Oleícola Internacional*, **60**: 33-41.
- Leal, F., J. Loureiro, E. Rodriguez, M. Pais y C. Santos (2006)**. "Nuclear DNA content of *Vitis vinifera* cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from anther culture." *Plant Cell Reports* **25**: 978-985.
- Lee, M. y R. Phillips (1988)**. "The chromosomal basis of somaclonal variation." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**: 413-437.
- Leljак-Levanić, D., N. Bauer, S. Mihaljević y S. Jelaska (2004)**. "Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L." *Plant Cell Reports* **23**: 120-127.

- León, L., R. Rosa, D. Barranco y L. Rallo (2003). "Ten years of olive breeding in Córdoba (Spain)." *Acta Horticulturae* **663**: 747-750.
- Leva, A. (2011). "Innovative protocol for 'ex vitro rooting' on olive micropropagation." *Central European Journal of Biology* **6**(3): 352-358.
- Leva, A. R. (2009). "Morphological protocol 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. R., R. Muleo y R. Petruccelli (2003). "Reproductive, vegetative and agronomic behaviour of the micropropagated olive cv. 'Maurino'." *Acta Horticulturae* **616**: 309-312.
- Leva, A. R., R. Petruccelli y G. Bartolini (1994). "Mannitol in *in vitro* culture of *Olea europaea* L. (cv. 'Maurino')." *Acta Horticulturae* **356**: 43-46.
- Leva, A. R., R. Petruccelli, G. Montagni y R. Muleo (2002). "Field performance of micropropagated olive plants (cv. 'Maurino'): morphological and molecular features." *Acta Horticulturae* **586**: 891-894.
- Leva, A. R. y R. Petruccelli (2012). "Monitoring of cultivars identity in micropropagated olive plants using RAPD and ISSR markers." *Biologia Plantarum* **56**(2): 373-376.
- Levitt, J. (1980). "Responses of plants to environmental stresses". En *Water, radiation, salt, and other stresses Vol (2)*. Accademics Press Inc.
- Leyva-Perez, M. d., A. Valverde-Corredor, R. Valderrama, J. Jimenez-Ruiz, A. Munoz-Merida, O. Trelles, J. B. Barroso, J. Mercado-Blanco y F. Luque (2014). "Early and delayed long-term transcriptional changes and short-term transient responses during cold acclimation in olive leaves." *DNA Research*: 1-11.
- Li, C., O. Junttila, P. Henio y E. T. Palva (2004). "Low temperature sensing in silver birch (*Betula pendula* Roth) ecotypes." *Plant Science* **167**: 165-171.
- Li, M. y D. Leung (2000). "Starch accumulation is associated with adventitious root formation in hypocotyl cuttings of *Pinus radiata*." *Journal of Plant Growth Regulation* **19**: 423-428.
- Li, R., H. Zhang, X. Zhou, Y. Guan, F. Yao y G. Song (2010). "Genetic diversity in Chinese sorghum landraces revealed by chloroplast simple sequence repeats." *Genetic resources and crop evolution* **57**(1): 1-15.
- Li, Y. Y., C. Liu, T. C. Li, C. Y. Wang, Y. H. Xiao, L. Zhang, D. D. Jin, Y. Zhao, Y. H. Xiao, Z. Wang, L. Zhang, J. Cao, D. D. Jin y L. Hao (2011). "Regulatory role of exogenous salicylic acid in the response of *Zoysia japonica* plants to freezing temperatures: a comparison with cold-acclimatisation." *Journal of Horticultural Science* **86**(3): 277-283.
- Lin, K. H., F. H. Pai, S. Y. Hwang y H. F. Lo (2006). "Pre-treating paclobutrazol enhanced chilling tolerance of sweetpotato." *Plant Growth Regulation* **49**(2-3): 2489-2262.
- Lin, S., Z. Zhang, W. Liu, Y. Lin, Q. Zhang, B. Q. Zhu y B. Q. Zhu (2005). "Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in freezing-induced freezing resistance of *Populus suaveolens*." *Journal of Plant Physiology* **35**: 34-40.
- Linacero, R., E. Alves y A. Vázquez (2000). "Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye." *Theoretical and Applied Genetics* **100**: 506-511.
- Lionakis, S. M. y W. W. Schwabe (1984). "Bud dormancy in the kiwi fruit, *Actinidia chinensis* Planch." *Annals of Botany* **54**: 467-484.
- Lisek, A. y T. Orlikowska (2004). "*In vitro* storage of strawberry and raspberry in calcium-alginate beads at 4 C." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **78**(2): 167-172.
- Lomax, T. L., G. K. Muday y P. H. Rubery (1995). "Auxin transport." En: *Plant Hormones*, P. Davies (eds). Springer, Netherlands. pp 509-530.

- Long, S., S. Humphries y P. G. Falkowsky (1994).** "Photoinhibition of photosynthesis in nature." Annual Review of Plant **45**: 633-662.
- Lopes, T., A. Capelo, G. Brito, J. Loureiro y C. Santos (2009).** "Genetic variability analyses of the somatic embryogenesis induction process in *Olea* spp. using nuclear microsatellites." Trees **23**(1): 29-36.
- López-Delgado, H., J. F. Dat, C. H. Foyer y I. M. Scott (1998b).** "Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>." Journal of Experimental Botany **49**(321): 713-720.
- López-Delgado, H. y M. Jimenez-Casas (1998a).** "Storage of potato microplants *in vitro* in the presence of acetylsalicylic acid." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **54**(3): 145-152.
- López-Miranda, J., F. Pérez-Jiménez, E. Ros, R. Caterina, L. Badimón, M. I. Covas, E. Escrich, R. Moral, M. Solanas y C. Pelucchi (2010).** "Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report." Nutrition Metabolism Cardiovascular Diseases **20**: 284-294.
- López, C. R., A. Wetten y M. J. Wilkinson (2010).** "Progressive erosion of genetic and epigenetic variation in callus-derived cocoa (*Theobroma cacao*) plants." New Phytology **186**: 856-868.
- LoSchiavo, F., L. Pitto, G. Giuliano, G. Torti, V. Nuti-Ronchi, D. Marazziti, R. Vergara, S. Orselli y M. Terzi (1989).** "DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs." Theoretical and Applied **77**: 325-331.
- Loumou, A. y C. Giourga (2003).** "Olive groves: 'The life and identity of the Mediterranean'." Agriculture and Human Values **20**(1): 87-95.
- Loureiro, J., A. Capelo, G. Brito, E. Rodriguez, S. Silva, G. Pinto y C. Santos (2007).** "Micropropagation of *Juniperus phoenicea* from adult plant explants and analysis of ploidy stability using flow cytometry." Biologia Plantarum **51**(1): 7-14.
- Loureiro, J., E. Rodríguez, A. Costa y C. Santos (2006).** "Nuclear DNA content estimations in wild olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaeae* var. *sylvestris* Brot.) and Portuguese cultivars of *O. europaea* using flow cytometry." Genetic Resources and Crop Evolution **54**: 21-25.
- Lucchesini, M. y C. Vitagliano (2002).** "*In vitro* micro-environment to improve growth of olive plantlets during rooting fase." Acta Horticulturae **586**: 895-898.
- Ludwig-Müller, J. (2003).** "Peroxidase isoenzymes as markers for the rooting ability of easy-to-root and difficult-to-root *Grevillea* species and cultivars of *Protea obtusifolia* (*Proteaceae*)." *In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant **39**(4): 377-383.
- Ludwig-Müller, J. y J. D. Cohen (2002).** "Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*." Physiologia Plantarum **115**(2): 320-329.
- Lynch, P., A. Siddika, A. Mehra, A. Fabbri, C. Benelli y M. Lambardi (2007).** "The challenge of successful cryopreservation of olive (*Olea europaea* L.) shoot tips." Advance in Horticultural Science **4**: 211-214.
- 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.
- Llácer, G. y M. L. Badenes (2010).** "La conservación de plantas de multiplicación vegetativa." En: Mejora Genética y Recursos Fitogenéticos: Nuevos Avances en la Conservación y Utilización de los Recursos Fitogenéticos, J.M. Carrillo, M.J. Díez, M. Pérez de la Vega y F. Nuez (eds). Centro de Publicaciones Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. pp 175-210).
- Lloyd, G. y B. McCown (1980).** "Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture." Combined Proceedings **30**: 421-427.

## M

- Machakova, I., E. Zazimalova y E. F. George (2008).** "Plant growth regulators I: Introduction; Auxins, their analogues and inhibitors." *Plant Propagation by Tissue Culture* **1**: 175-204.
- MAGRAMA (2015).** <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/aceite-oliva-y-aceituna-mesa/>
- Mandal, A., A. Maiti, B. Chowdhury y R. Elanchezhian (2001).** "Isoenzyme markers in varietal identification of banana." *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **37**(5): 599-604.
- Margara, J. (1982).** "Bases de la multiplicación vegetativa, los meristemos y la organogénesis".
- Marino, G., P. Negri, A. Cellini y A. Masia (2010).** "Effect of carbohydrates on *in vitro* low-temperature storage of shoot cultures of apricot." *Scientia Horticulturae* **126**(4): 434-440.
- Marino, G., G. Bertazza, E. Magnanini y A. D. Altan (1993).** "Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **34**: 235-244.
- Marks, T. R., Y. Y. Ford, R. W. F. Cameron, C. Goodwin, P. E. Myers y H. L. Judd (2002).** "A role for polar auxin transport in rhizogenesis." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **70**: 189-198
- Martin, K., S. Pachathundik, C. Zhang, A. Slater y J. Madassery (2006).** "RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. grande naine and its propagation via shoot tip culture." *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **42**: 188-192.
- Martínez-Trinidad, T., F. O. Plascencia-Escalante y V. M. Cetina-Alcalá (2013).** "Growth and Vitality of *Populus alba* L. with Topping and Treated with Paclobutrazol." *Revista Chapingo Serie Horticultura* **19**(3): 381-388.
- Martínez, D., R. Arroyo-García y M. A. Revilla (1999).** "Cryopreservation of *in vitro* growth shoot-tips of *Olea europaea* L. var. Arbequina." *CryoLetters* **20**: 29-36.
- Martínez, D., M. A. Revilla, A. Espina y J. R. García (2000).** "Differential scanning calorimetry applied to the storage at ultra low temperatures of olive and hop *in vitro* grown shoot-tips." *Thermochimica Acta* **349**: 147-151.
- Martínez, T., N. Vidal, A. Ballester y A. Vieitez (2012).** "Improved organogenic capacity of shoot cultures from mature pedunculate oak trees through somatic embryogenesis as rejuvenation technique." *Trees* **26**: 321-330.
- Martins LM, Pereira MAS, França SC y B. BW (2011).** "Micropropagação e conservação de *Macrosiphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg. em banco de germoplasma *in vitro*." *Ciencia Rural* **41**: 454-458.
- Mascarenehas, A. F., P. K. Gupta, V. M. Kulkarni, U. Mehta, V. M. Kulkarni, U. Iyer, V. M. Kulkarni, S. S. Khuspe, V. Jagannathen, S. S. Khuspe y V. Jagannathen (1988).** Genetic Manipulation of Woody Plants
- Materán, M. E., M. Fernández, M. E. Materán, S. Valenzuela, K. Sáez, P. Seeman, M. Sánchez-Olate y D. Ríos (2009).** "Abscisic acid and 3-indoleacetic acid levels during the reinvigoration process of *Pinus radiata* D. Don adult material." *Plant Growth Regulation* **59**: 171-177.
- Mathur, J., S. P.A., N. Lal y A. K. Mathur (1989).** "Propagation of *Valeriana wallichii* Dc. using encapsulated apical and axial shoot buds." *Plant Science* **60**: 111-116.
- Mazri, M. A., I. Belkoura, F. Pliego-Alfaro y M. Belkoura (2013).** "Embryogenic competence of calli and embryo regeneration from various explants of Dahbia cv, a Moroccan olive tree (*Olea europaea* L.)." *Scientia Horticulturae* **159**: 88-95.
- Mazzuca, S., M. M. Bitonti, M. C. Ruffini, R. Cozza y A. M. Innocenti (1995).** "Nuclear changes and cytochemical aspects in olive shoot meristem following the transitions to adult phase." *Cytobios* **83**: 105-115.



- McClintock, B. (1984).** "The significance of responses of the genome to challenge." *Science* **226**: 792-801.
- McCown, B., y Amos, R. (1979).** "Initial trials with commercial micropropagation of birch selections [*Betula platyphylla azechuanica*]". Combined Proceedings-International Plant Propagators' Society (USA).
- McGowran, E., G. C. Douglas y M. Parkinson (1998).** "Morphological and physiological markers of juvenility and maturity in shoot cultures of oak (*Quercus robur* and *Quercus petraea*).". *Tree Physiology* **18**: 251-257.
- Meddad-Hamza, A., A. Beddiar, A. Gollote, M. C. Lemoine, C. Kuszala y S. Gianinazzi (2010).** "Arbuscular mycorrhizal fungi improve the growth of olive trees and their resistance to transplantation stress." *African Journal of Biotechnology* **9**(8): 1159-1167.
- Mehta, Y. y D. Angra (2000).** "Somaclonal variation for disease resistance in wheat and production of dihaploids through wheat x maize hybrids." *Genetics and Molecular Biology* **23**: 617-622.
- 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 E. Rugini (1993).** "*In vitro* shoot regeneration from olive cultivar tissues." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **32**: 283-288.
- Mendoza-de Gyves, E. Mira, F.R., Ruiú, 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.
- Micheli, M., T. Gardi, M. Meoni, F. Prospero, G. Scerna y G. Sisani (2007a).** "Nuove tecniche di coltura *in vitro* per la salvaguardia delle risorse vegetali autoctone." *Proceeding 102nd meeting bot soc*: 234.
- Micheli, M., I. A. Hafiz y A. Standardi (2007b).** "Encapsulation of *in vitro* derived explants of olive (*Olea europaea* L. cv. Moraiolo)." *Scientia Horticulturae* **113**(3): 286-292.
- Micheli, M. y A. Standardi (2005).** "Encapsulation of *in vitro*-derived explants of olive (cv. Moraiolo). I. Effects of pretreatments, their size and the coating." *Current Top Biotechnology* **2**: 81-86.
- Mielke, E. A. y F. G. Dennis (1978).** "Hormonal control of flower bud dormancy in sour cherry (*Prunus cerasus* L.). III. Effects of leaves, defoliation and temperature on levels of abscisic acid in flower primordia." *Journal of the American Society for Horticultural Science* **103**: 446-449.
- Miguel, C. y L. Marum (2011).** "An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond." *Journal of Experimental Botany* **62**(11): 3713-3725.
- Ministerio de Agricultura (1972).** "El Olivar Español."
- Minelli, S., F. Maggini, M. T. Gelati, A. Angiolillo y P. G. Cionini (2000).** "The chromosome complement of *Olea europaea* L.: characterization by differential staining of the chromatin and in-situ hybridization of highly repeated DNA sequences." *Chrom Research* **8**: 615-619.
- Mohanty, S., M. Panda, E. Subudhi y S. Nayak (2008).** "Plant regeneration from callus culture of *Curcuma aromatica* and *in vitro* detection of somaclonal variation through cytophotometric analysis." *Biologia Plantarum* **52**: 783-786.
- Mohmand, A. y M. Nabors (1990).** "Somaclonal variant plants of wheat derived from mature embryo explants of three genotypes." *Plant Cell Reports* **8**: 558-560.
- Monreal, A. R. (2010).** "Valor económico que aportan los recursos fitogenéticos a los cultivos." En: *Mejora Genética y Recursos Fitogenéticos: Nuevos Avances en la Conservación y Utilización de los Recursos Fitogenéticos*, J.M. Carrillo, M.J. Díez, M. Pérez de la Vega y F. Nuez (eds). Centro de Publicaciones Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. pp 143-171.
- Montaño, Y. A., Á. V. Monter y G. A. Ostoa (2009).** "*In vitro* rooting kinetics of grapevine rootstocks in response to sugar source and concentration." *Revista Fitotecnia Mexicana* **32**(2): 111-117.

- Monteuuis, O. (1987).** "In vitro meristem culture of juvenile and mature *Sequoiadendron giganteum*." *Tree Physiology* **3**(3): 265-272.
- Monteuuis, O. y M. C. Bon (2000).** "Influence of auxins and darkness on *in vitro* rooting of micropropagated shoots from mature and juvenile *Acacia mangium*." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **63**(3): 173-177.
- Moreno-Alías, I., H. F. Rapoport, L. León y R. Rosa (2010b).** "Olive seedling firts-flowering position and management." *Scientia Horticulturae* **124**: 74-77.
- Moreno-Alías, I., H. F. Rapoport, R. López, L. León y R. Rosa (2010a).** "Optimizing Early Flowering and Pre-selection for Short Juvenile Period in Olive Seedlings." *Hortscience* **45**(4): 519-522.
- Moussa, H. y S. El-Gamal (2010).** "Effect of salicylic acid pretreatment on cadmium toxicity in wheat." *Biologia Plantarum* **54**(2): 315-320.
- Mronginski, L. A. y W. Roca (1991).** "Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones." Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia, 127.
- Murashige, T. (1974).** "Plant propagation through tissue cultures." *Annual Review of Plant Physiology* **25**: 135-166.
- Murashige, T. (1978).** "The impact of tissue culture in agriculture." *Frontiers of plant tissue culture* **15**: 26.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962).** "Arevised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures." *Physiologia Plantarum* **15**(3): 473-497.
- Muzzalupo, I., F. Stefanizzi y E. Perri (2009).** "Evaluation of Olives Cultivated in Southern Italy by Simple Sequence Repeat Markers." *Hortscience* **44**(3): 582-588.

## N

- Naik, D., V. Vartak y S. Bhargava (2003).** "Provenance -and subculture- dependent variation during micropropagation of *Gmelina arborea*." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **73**(2): 189-195.
- Naik, S. K. y P. K. Chand (2006).** "Nutrient-alginate encapsulation of *in vitro* nodal segments of pomegranate (*Punica granatum* L.) for germplasm distribution and exchange." *Scientia Horticulturae* **108**(3): 247-252.
- Nas, M. N., P. E. Read, M. N. Nas, V. Miller, P. E. Read, P. A. Rutter y P. A. Rutter (2002).** "In vitro rejuvenation of woody species is temporary." *Acta Horticulturae* **625**: 211-215.
- Navarro, A., M. J. Sánchez-Blanco, S. Bañon y M. J. Sánchez-Blanco (2007).** "Influence of paclobutrazol on water consumption and plant performance of *Arbutus unedo* seedlings." *Scientia Horticulturae* **111**: 133-139.
- Neelakandan, A. K. y K. Wang (2012).** "Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications." *Plant Cell Reports* **31**(4): 597-620.
- Neto, V. P. y W. Otoni (2003).** "Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter?" *Scientia Horticulturae* **97**: 193-202.
- Neumann, K. H., A. Kumar y J. Imani (2009).** "Plant Cell and Tissue Culture-a Tool in Biotechnology." Springer, Netherlands.
- Nisi, R., D. Bergué, C. Benelli, T. Canino, M. Lambardi y A. Fabbri (2006).** "PROC 2nd Int Seminar OLIVEBIOTEQ **1**: 449-452.
- Nolan, K. E., R y J. Rose (2010).** "Plant Regeneration -Somatic embryogenesis." En: *Plant Cell Culture Essentials Methods*, M.R. Davey y P. Anthony (eds). John Wiley & Song, Chichester, UK. pp 39-59.
- Norton, M. E. y C. R. Norton (1986).** "Change in shoot proliferation with repeated *in vitro* subculture of shoots of woody species of *Rosaceae*." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **5**(3): 187-197.

- Nunes, E. D. C., E. E. Benson, A. C. Oltramari, P. S. Araujo, J. R. Moser y A. M. Viana (2003).** "In vitro conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (*Meliaceae*), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest." *Biodiversity & Conservation* **12**(4): 837-848.
- Nzokou, P. y P. Nikiema (2008).** "The influence of three plant growth regulators on susceptibility to cold injury following warm winter spells in Fraser fir [*Abies fraseri* (Pursh) Poir] and Colorado blue spruce (*Picea pungens*)." *Hortscience* **43**(3): 742-746.

## O

- Offord, C. A., C. L. Campbell y M. G. Mullins (1992).** "Micropropagation of *Telopea speciosissima* R. Br. (*Proteaceae*). 1. Explant establishment and proliferation." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **29**(3): 215-221
- Oka, S. y T. Niino (1997).** "Long term storage of pear (*Pyrus* spp.) shoot cultures in vitro by minimal growth method." *Japan Agricultural Research Quarterly* **31**: 1-8.
- Oliveira, A. F., M. Pasqual, J. C. Nagib, M. A. Regina y R. R. Carmen (2003).** "Influence of the number of nodes on semi-woody cuttings of olive tree (*Olea europaea* L.) on the rooting in misty room." *Ciencia e Agrotecnologia* **27**(2): 332-338.
- Olson, M., L. Hood, C. Cantor y D. Botstein (1989).** "A common language for physical mapping of the human genome." *Science* **245**: 1434-1435.
- Oono, K. (1985).** "Putative homozygous mutations in regenerated plants of rice." *Molecular and General Genetics* **198**: 377-384.
- Or, E., E. Belausov, I. Popilevsky y Y. B. Tal (2000).** "Changes in endogenous ABA level in relation to the dormancy cycle in grapevines grown in a hot climate." *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **75**: 190-194.
- Orbović, V., M. Čalović, Z. Vilorija, B. Nielsen, F. Gmitter, W. Castle y J. Grosser (2008).** "Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry." *Euphytica* **161**: 329-335.
- Ortega-Nieto, J. M. (1955).** "Las variedades de Olivo cultivadas en España." INIA.
- Ortega-Nieto, J. M. (1963).** "Las variedades de Olivo cultivadas en España." Dirección General de Agricultura. Ministerio de Agricultura.
- Ortega-García, F. y J. Peragón (2009).** "The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europaea* L. cv. Picual)." *Journal of the Science of Food* **89**: 1565-1573.
- Otero, M. L. y D. M. Docampo (1998).** "Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Arbequina from juvenile cuttings." *Phyton Revista Internacional de Botánica Experimental* **63**: 133-140.
- Ozkaya, M. T., S. M. Lionakis y Vasilakakis (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.
- Ozudogru, E., A. Previati y M. Lambardi (2010).** "In vitro conservation and cryopreservation of ornamental plants." En: *Protocols for in vitro propagation of Ornamental Plants*, S.M. Jain y S.J. Ochatt (eds). Humana Press. pp 303-324.

## P

- Padilla, I. M. G. (1997).** "Micropropagación del Chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) cv. Fino de Jete". Tesis Doctoral, Universidad de Málaga (España).
- Padilla, I. M. G., L. Burgos y A. Piqueras (2007).** "Encapsulación de secciones nodales de albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) y neem (*Azadirachta indica* A. Juss)." Libro de resúmenes. VII reunión de la Sociedad Española de Cultivo In Vitro de Tejidos Vegetales. Alcalá de Henares, Madrid.: 104.

- Padilla, I.M.G., I. Vidoy y C. Encina (2009a).** "Influence of indole-butyric acid and electro-pulse on *in vitro* rooting and development of olive (*Olea europaea* L.) microshoots." *Plant Cell Reports* **28**: 1411-1420.
- Padilla, I. M.G. y C. L. Encina (2005).** "Changes in root morphology accompanying mycorrhizal alleviation of phosphorus deficiency in micropropagated *Annona cherimola* Mill. plants." *Scientia Horticulturae* **106**(3): 360-369.
- Padilla, I. M. G., N. Fernández García, E. Olmos, L. Burgos y A. Piqueras (2015).** "Effects of growth retardants on sprouting and development of apricot (*Prunus armeniaca* L.) and neem (*Azarchta indica* A. Juss.) nodal buds." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1-13
- Padilla, I. M. G., G. Barba-Espín, J. A. Hernández, L. Burgos y A. Piqueras (2009b).** "Conservación de secciones nodales de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) mediante encapsulación-refrigeración: Efecto del ácido acetil-salicílico." Libro de resúmenes. VIII Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *In vitro* de Tejidos Vegetales. Murcia-España: 36.
- Palliotti, A. y G. Bongi (1996).** "Freezing injury in the olive leaf and effects of mefluidide treatment." *Journal of Horticultural Science* **71**(1): 57-63.
- Panis, B. (2015).** "Cryopreservation of plant species: from protocol development to crop cryobanking." XI Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales: 27.
- Paran, I. y R. Michelmore (1993).** "Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce." *Theoretical and Applied Genetics* **85**: 985-993.
- Patac, L., P. Cadahia y E. Campo (1954).** "Tratado de Olivicultura." Sindicato Nacional del Olivo.
- Pattnaik, S. y P. K. Chand (2000).** "Morphogenic response of the alginate-encapsulated axillary buds from *in vitro* shoot cultures of six mulberries." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **60**(3): 177-185.
- Pattnaik, S., Y. Sahoo y P. Chand (1995).** "Efficient plant retrieval from alginate-encapsulated vegetative buds of mature mulberry trees." *Scientia Horticulturae* **61**: 227-239.
- Pearce, R. S. (2001).** "Plant freezing and damage." *Annals of Botany* **87**(4): 417-424.
- Peixe, A., A. Raposo, R. Lourenço, H. Cardoso y E. Macedo (2007).** "Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation." *Scientia Horticulturae* **113**(1): 1-7.
- Pelucchi, C., C. Bosetti, E. Negri, L. Lipworth y C. L. Vecchia (2011).** "Olive Oil and Cancer Risk: an Update of Epidemiological Findings through 2010." *Current Pharmaceutical Design* **17**(8): 805-812.
- Peña-Ramírez, Y., J. Juárez-Gómez, L. Gómez-López, J. Jerónimo-Pérez, I. García-Sheseña, J. A. González-Rodríguez y M. L. Robert (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 trees species." *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **46**(2): 149-160.
- Pérez-Barranco, G., J. A. Mercado, F. Pliego-Alfaro y C. Sánchez-Romero (2007).** "Genetic transformation of olive somatic embryos through biolistic. ." *Acta Horticulturae* **738**: 473-477.
- Pérez de la Vega (2010).** "La domesticación de las plantas cultivadas y la base genética de los cultivos" En: *Mejora Genética y Recursos Fitogenéticos: Nuevos Avances en la Conservación y Utilización de los Recursos Fitogenéticos*, J.M. Carrillo, M.J. Díez, M. Pérez de la Vega y F. Nuez (eds). Centro de Publicaciones Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. pp: 51-100.
- Pérez-Francés, J. F., R. V. Ramallo y J. A. Rodríguez-Pérez (2001).** "Micropropagation of *Leucospermum* 'Sunrise' (*Proteaceae*)." *Acta Horticulturae* **545**: 161-169.





- Pérez-Tornero, O., F. Ortín-Párraga, J. Egea y L. Burgos (1999).** "Medium-term storage of Apricot shoot tips *in vitro* by minimal growth method." *HortScience* **34**(7): 1277-1278.
- Perveen, S. y M. Anis (2014).** "Encapsulation of internode regenerated adventitious shoot buds of Indian Siris in alginate beads for temporary storage and twofold clonal plant production." *Acta Physiologiae Plantarum* **36**(8): 2067-2077.
- Peschke, V. M., V. M. Peschke y R. L. Phillips (1992).** "Genetic implications of somaclonal variation in plant." *Advances in Genetic* **30**: 41-75.
- Petolino, J. F., J. L. Roberts y P. Jayakumar (2003).** "Plant cell culture: a critical tool for agricultural biotechnology." En: *Industrial Cell Culture: Mammalian, Microbial and Plant Cells*, V. Vinci y S. Parekh (eds). Humana Press. pp 243-258.
- Peyvandi, M., F. Farahani, M. Hosseini-Mazinani, Z. Noormohamadi, S. Attai y A. Asgharzade (2015).** "*Pseudomonas fluorescens* and its ability to promote root formation of olive microshoots." *International Journal of Plant Production* **4**(1): 63-66.
- Peyvandi, M., F. Farahani, Z. Noormohamadi, O. Baninashemi, M. Hosseini-Mazinani y S. Ataee (2009a).** "Mass production of *Olea europaea* L. (cv Rowghani) through micropropagation." *General and Applied Plant Physiology* **35**(1-2): 35-43.
- Peyvandi, M., Z. Noormohamadi, O. Baninashemi, F. Farahani, A. Majd, M. Hosseini-Mazinani y M. Sheidai (2009b).** "Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Olea europaea* L. (cv Dexful)." *Asian Journal of Plant Sciences* **8**(2): 146-152.
- Piatczak, E., M. Wielanekb y H. Wysokiskaa (2005).** "Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centraurium erythraea* Rafn." *Plant Science* **168**(2): 431-437.
- Pierik, R. L. (1987).** "*In vitro* culture of higher plants as a tool in the propagation of Horticultural crops". *International Symposium on Propagation of Ornamental Plants* **226**: 25-40.
- Pierik, R. L. (1990a).** "El cultivo *in vitro* de las plantas superiores." Mundi-Prensa, Madrid.
- Pierik, R.L. (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 Aartrij (eds). Kluwer Academic, Dordrech, Netherlands. pp: 91-101.
- Piola, F., R. Rohr y P. Heizmann (1999).** "Rapid detection of genetic variation within and among *in vitro* propagated cedar (*Cedrus libani* Loudon) clones." *Plant Science* **414**(2): 159-163.
- Piperpoint, W. S. (1994).** "Salicylic Acid and its derivates in plants medicines, metabolites and messenger molecules." *Advances in Botanical Research* **20**: 163-235.
- Pliego-Alfaro, F. y A. Barceló-Muñoz (2001).** Morfogénesis *in vitro*.
- Pliego-Alfaro, F. y T. Murashige (1987).** "Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*." *Hortscience* **22**(6): 1321-1324.
- Polymerou-Kamilakis, A. (2006).** "The culture of olive tree (Mediterranean Word)." *Olive Oil: Chemistry and Technology* **2**: 1-12.
- Pontikis, C. A. y S. S. Xiroychakis (1985).** "Juvenility as a factor in propagating carob (*Ceratonia siliqua* L.)." *The Plant Propagator* **31**(4): 5-6.
- Popescu, A. N., V. S. Isac, M. S. Coman y V. S. Isac (1997).** "Somaclonal variation in plants regenerated by organogenesis from callus cultures of strawberry (*Fragaria x ananassa*)." *Acta Horticulturae* **439**: 89-96.
- Pospíšilová, J., I. Tichá, P. Kadleček, D. Haisel, J. Pospíšilová y Š. Plzáková (1999).** "Acclimatization of Micropropagated Plants to *ex vitro* conditions." *Biologia Plantarum* **42**(4): 481-497.
- Predieri, S. (2001).** "Mutation induction and tissue culture in improving fruits." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **64**: 185-210.

- Preece, J. (2008).** "Stock Plant Physiological Factor Affecting Growth and Morphogenesis." En: Plant Propagation by Tissue Culture, E.F. George, A.H. Michael y G.J. De Klerk (eds). Springer, Netherlands. pp 403-422.
- Preece, J. y T. West (2009).** "Microshoot encapsulation for cold storage, acclimatization, and clean up from arthropod infestations." *Acta Horticulturae* **812**: 83-90.
- Preece, J. E. (1987).** "Treatment of the stock plant with plant growth regulators to improve propagation success." *Hortscience* **22**: 754-759.
- Preece, J. E. y P. E. Read (2003).** "Novel Methods in Micropropagation." *Acta Horticulturae* **616**: 71-76.
- Preece, J. E. y E. G. Sutter (1991).** "Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field." En: Micropropagation, P.C. Debergh y R.H. Zimmerman (eds). Springer, Netherlands. pp 71-93.
- Priego, J. M. (1924).** "Las variedades de olivo en la región agronómica de Andalucía Oriental." *Bol. De Agric. Técnica y Economía*.
- Priego, J. M. (1930).** "Las variedades de olivo en la Región de Aragón y Rioja." Ministerio de Fomento.
- Priego, J. M. (1931).** "Las variedades de olivo en la Región Agronómica Central." Ministerio de Fomento.
- Priego, J. M. (1932).** "Olivicultura." Salvat Editores. S.A.
- Priego, J. M. (1933).** "L'etude des variétés d'olivier en Espagne." *Actes de XI Congrès International d'Oliviculture*. **7**: 55-58.
- Priego, J. M. (1935).** "Las variedades de olivo generalizadas en España." Instituto de Investigaciones Agronómicas.
- Puddephat, I. J., H. T. Robinson, B. M. Smith y J. Lynn (1999).** "Influence of stock plant pretreatment on gynogenic embryo induction from flower buds of onion." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **57**(2): 145-148.

## Q

- Quoirin, M. y P. H. Lepoivre (1977).** "Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp." *Acta Horticulturae* **78**: 437-442.

## R

- Rache-Cardenal, L., E. Rojas-Pinzón y J. Pacheco-Maldonado (2008).** "Revigorización y clonación de yemas adultas de árboles de olivo: establecimiento *in vitro* de microinjertos." *Bioagro* **20**(1): 57-65.
- Rahman, M., M. Amin, F. Ishiguri, S. Yokota, R. S. Sultana, R. S. Sultana, Y. Takashima, K. Iizuka y N. Yoshizawa (2009).** "*In vitro* plantlet regeneration of "dwarf" Indian olive (*Elaeocarpus robustus* Roxb.): a fruit plant of Bangladesh." *Plant Biotechnology* **3**: 259-266.
- Rahman, M. y O. Rajora (2001).** "Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*)." *Plant Cell Reports* **20**(6): 531-536.
- Rai, M., N. Shekhawat, Harish, A. Gupta, M. Phulwaria, K. Ram y U. Jaiswal (2011).** "The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **106**: 179-190.
- Rai, M. K., P. Asthana, S. K. Singh, V. S. Jaiswal y U. Jaiswal (2009).** "The encapsulation technology in fruit plants—a review." *Biotechnology* **27**(6): 671-679.
- Rai, M. K., V. S. Jaiswal y U. Jaiswal (2008a).** "Encapsulation of shoot tips of guava (*Psidium guajava* L.) for short-term storage and germplasm exchange." *Scientia Horticulturae* **118**(1): 33-38.

- Rai, M. K., V. S. Jaiswal y U. Jaiswal (2008b).** "Effect of ABA and sucrose on germination of encapsulated somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.)." *Scientia Horticulturae* **117**(3): 302-305.
- Rallo, L. (2005).** "Variedades de Olivo en España: Una aproximación Cronológica." En: *Variedades de olivo en España*, L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C. Del Río, A. Marín, J. Tous y I. Trujillo, (eds). Mundi Prensa, Madrid. pp 17-43.
- Rallo, L., D. Barranco, R. Rosa y L. León (2008).** "'Chiquitita' Olive." *Hortscience* **43**(2): 529-531.
- Rallo, P., G. Dorado y A. Martín (2000).** "Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.)." *Theoretical and Applied Genetics* **101**: 984-989.
- Rallo, P., A. Martín y G. Dorado (2005).** "Identificación de variedades de olivo por marcadores moleculares." En: *Variedades de olivo en España*, L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C. Del Río, A. Marín, J. Tous y I. Trujillo, (eds). Mundi Prensa, Madrid. pp 431-450.
- Rallo, P., I. Tenzer, C. Gessler, L. Baldoni, G. Dorado y A. Martín (2003).** "Transferability of olive microsatellite loci across the genus *Olea*." *Theoretical and Applied Genetics* **107**(5): 940-946.
- Rama, P. y C. A. Pontikis (1990).** "*In vitro* propagation of olive (*Olea europaea* sativa L.) 'Kalamon'." *Journal of Horticultural Science* **65**(3): 347-353.
- Ramzan-Kan, M., Rashind, 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., A. Parida y S. Raina (2001).** "Chromosome number dependent genome size and RAPD fingerprinting diagnostics for genetic integrity of enhanced axillary branching-derived plants of ten forest tree species." *Acta Horticulturae* **560**: 531-534.
- Rani, V. y S. Raina (1998).** "Genetic analysis of enhanced-axillary-branching-derived *Eucalyptus tereticornis* Smith and *E. camaldulensis* Dehn. plants." *Plant Cell Reports* **17**(3): 236-242.
- Rani, V. y S. Raina (2000).** "Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal." *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **36**: 319-330.
- Rao, N. K. (2004).** "Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology." *African Journal of Biotechnology* **3**(2): 136-145.
- Rapoport, H. F. (2008).** "Botánica y morfología." En: *El Cultivo del Olivo*, D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (eds). Coed. Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. pp 37-62.
- Rasheed, S., T. Fatima, K. Bashir, Husnain y S. Riazuddin (2003).** "Agronomical and physiochemical characterization of somatic variants in *Indica Basmati* rice." *Pakistan Journal of Botany* **6**(9): 844-848.
- Ray, T., I. Dutta, P. Saha, S y S. Roy (2006).** "Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers" *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **85**(1): 11-21.
- Preece, J. E., y Read, P. E. (2003).** "Novel methods in micropropagation".
- Read, P. E. y Y. Qiguang (1985).** "Novel plant growth regulator delivery systems for *in vitro* culture of horticultural plants." *Acta Horticulturae* **212**.
- Reboredo-Rodríguez, P., C. González-Barreiro, B. Cancho-Grande y J. Simal-Gándara (2014).** "Quality of extra virgin olive oils produced in an emerging olive growing area in north-western Spain." *Food Chemistry* **164**(0): 418-426.
- Reed, B. M. (1996).** "Pretreatment strategies for cryopreservation of plant tissues." En: *In vitro Conservation of Plant Genetic Resources*, B.M. Reed (eds). Springer, Netherlands. pp 1-14.
- Reed, B. M. (2002).** "Photoperiod improves long-term survival of *in vitro*-stored strawberry plantlets." *HortScience* **37**(5): 811-814.

- Renau-Morata, B., I. Arrillaga y J. Segura (2006).** "In vitro storage of cedar shoot cultures under minimal growth conditions." *Plant Cell Reports* **25**(7): 636-642.
- Reuveni, O. y Y. Israeli (1990).** "Measures to reduce somaclonal variation in *in vitro* propagated bananas." *Acta Horticulturae* **275**: 307-313.
- Revilla, M. A., J. Pacheco, A. Casares y R. Rodríguez (1996).** "In vitro reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea* L) through micrografting." *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **32**(4): 257-261.
- Rey, M., C. Díaz-Sala y R. Rodríguez (1998).** "Free polyamine content in leaves and buds of hazelnut (*Corylus avellana* L. cv. Negret) trees subjected to repeated severe pruning." *Scientia Horticulturae* **76**: 115-121.
- Río, C. y J. M. Caballero (2005).** "Aptitud al enraizamiento." En: *Varietades de olivo en España*, L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C. Del Río, A. Marín, J. Tous y I. Trujillo, (eds). Mundi Prensa, Madrid. pp 277-280.
- Riov, J., E. Dagan, R. Goren y S. F. Yang (1990).** "Characterization of abscisic acid-induced ethylene production in citrus leaf and tomato fruit tissues " *Plant Physiology* **92**(1): 48-53.
- Rodrigues, P. H., P. H. Rodrigues, P. H. Rodrigues, A. Tullmann-Neto, P. Cassieri-Neto, B. M. Mendes, B. M. Mendes y B. M. Mendes (1998).** "Influence of the number of subcultures on somaclonal variation in micropropagated of Nanico (*Musa* spp. AAA group)." *Acta Horticulturae* **490**: 469-473.
- Romano, A., C. Noronha y M. A. Martins-Loucao (1995).** "Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **40**(2): 159-167.
- Roncasaglia, R., C. Benelli, A. Carlo, G. Dradi y E. A. Ozudogru (2009).** "Factors affecting slow growth storage of fruit species." *Italus Hortus* **16**(2): 234-238.
- Roselli, G., G. Benelli y D. Morelli (1989).** "Relationship between stomatal density and winter hardiness in olive (*Olea europaea* L.)." *Journal of Horticultural Science* **64**: 199-203.
- Roselli, G., N. L. Porta y D. Morelli (1992).** "Valutazioni del germoplasma di olivo per la tolleranza a stress da freddo." *Anti Convegno Germoplasma Frutticolo* **9**: 107-112.
- Roselli, G. y G. Venora (1990).** "Relationship between stomatal size and winter hardiness in the olive." *Acta Horticulturae* **286**: 89-92.
- Rostami, A. A. y A. R. Shahsavari (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 C. A. Pontikis (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 C. A. Pontikis (2002).** "In vitro propagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Koroneiki." *Plant Growth Regulation* **37**: 295-304.
- Roussy, I., F. Dubois, R. S. Sangwan y B. S. Sangwan-Norreel (1996).** "In planta 2, 3, 5 triodobenzoic acid treatment promotes high frequency and routine *in vitro* regeneration of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants." *Plant Cell Reports* **16**: 142-146.
- Roy, B. y A. Mandal (2005).** "Anther culture response in indica rice and variations in major agronomic characters among the androclones of a scented cultivar, Karnal local." *African Journal of Biotechnology* **145**: 221-227.
- Royo, J. y R. Itoiz (2004).** "Evaluation of the discriminance capacity of RAPD, isoenzymes and morphologic markers in apple (*Malus x domestica* Borkh.) and the congruence among classification." *Genetic Resources and Crop Evolution* **51**(2): 153-160.
- 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**(2): 123-134.



- Rugini, E. (1992).** "Involvement of polyamides in auxin and agrobacterium rhizogenes - induced rooting of fruit trees *in vitro*." Journal of the American Society for Horticultural Science **117**(3): 532-536.
- Rugini, E. (1995).** "Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.)." Somatic Embryogenesis in Woody Plants **44-46**: 171-189.
- Rugini, E. y L. Baldoni (2005).** "*Olea europaea* Olive." Biotechnology of Fruit and Nut Crops.: 404-428.
- Rugini, E. y G. Caricato (1995).** "Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) "Canino" and "Moraiolo". Plant Cell Reports **14**: 257-260.
- Rugini, E. y E. Fedeli (1990).** "Olive (*Olea europaea* L.) as an oilseed crop." Legumes and Oilseed Crops I.
- Rugini, E. y G. Fontanazza (1981).** "*In vitro* propagation of 'Dolce Agogia' olive." Hortscience **16**(4): 492-493.
- Rugini, E., A. Jacobini y A. Bazzoffia (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 G. Pannelli (1993).** "Olive (*Olea europaea* L.) biotechnology for short term genetic improvement." Agro-Food-Industry Hi-Tech **4**: 3-5.
- Rugini, E., G. Pannelli, M. Ceccarelli y M. Muganu (1996).** "Isolation of triploid and tetraploid olive (*Olea europaea* L.) plants from mixoploid cv. Frantoio and Leccino mutants by *in vivo* and *in vitro* selection." Plant Breed **115**: 23-27.
- Rustaei, M., S. Nazeri, M. Ghadimzadeh y S. Hemmaty (2009).** "Effect of phloroglucinol, medium type and some component on *in vitro* proliferation of dwarf rootstock of apple (*Mallus domestica*)." International Journal of Agriculture and Biology **11**(2): 193-196.
- Ruzic, D. J., T. Vujovic y R. Cerovic (2011).** "*In Vitro* Propagation of Blackberry and Raspberry after Cold Storage of Encapsulated Shoot Tips " International Symposium on Cryopreservation in Horticultural **908**: 275-282.

## S

- Sá AJ, Lédo AS y L. Cas (2011).** "Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil." Ciencia Rural **41**: 57-62.
- Sadok, I., J. Celton, L. Essalouh y A. Aabidine (2013).** "QTL mapping of flowering and fruiting traits in olive." PlosOne **9**: 1
- Saha, S., C. Sengupta y P. Ghosh (2015).** "Encapsulationm short-term storage, conservation and molecular analysis to assess genetic stability in alginate-encapsulated microshoots of *Ocimum kilimandscharicum* Guerke." Plant Cell Tissue and Organ Culture **120**(2): 519-530.
- Sahijram, L., J. Soneji y K. Bollamma (2003).** "Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.)." *In vitro* Cellular & Developmental Biology - Plant **39**: 551-556.
- Saiprasad, G. (2001).** "Artificial seeds and their applications." Resonance **6**(5): 39-47.
- Sánchez-Romero, C., R. Swennen y B. Panis (2009).** "Cryopreservation of olive embryogenic cultures." CryoLetters **30**(5): 359-372.
- Sanchez-Teyer, L., F. Quiroz-Figueroa, V. Loyola-Vargas y D. Infante (2003).** "Culture-induced variation in plants of *Coffea arabica* cv. Caturra rojo, regenerated by direct and indirect somatic embryogenesis." Molecular Biotechnology **23**(2): 107-115.
- Sánchez, M. C. y A. M. Vieitez (1991).** "*In vitro* morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut." Tree Physiology **8**: 59-70.
- Sandoval, J., F. Kerbellec, F. Cote y P. Doumas (1995).** "Distribution of endogenous gibberellins in dwarf and giant off-types banana (*Musa* AAA, cv. 'Grand nain') plants from *in vitro* propagation." Plant Growth Regulation **17**(3): 219-224.

- Santos, C. V., G. Brito, G. Pinto y H. M. Fonseca (2003). "In vitro plantlet regeneration of *Olea europaea* ssp. *maderensis*." *Scientia Horticulturae* **97**: 83-87.
- Sarkar, D. y P. Naik (1998). "Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*." *Euphytica* **102**(2): 275-280.
- Sarkar, D. y P. S. Naik (2000). "Phloroglucinol enhances growth and rate of axillary shoot proliferation in potato shoot tip cultures *in vitro*." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **60**: 139-149.
- Sauerbrey, E., K. Grossmann y J. Jung (1987). "Influence of growthretardants on the internode elongation and ethylene production of sunflower plants." *Plant Physiology* **70**(1): 8-12.
- Schellenbaum, P., V. Mohler, G. Wenzel y B. Walter (2008). "Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (*Vitis vinifera* L.)." *BioMed Central Plant Biology* **8**: 78.
- Seifi, E., Y. Teymoor, M. Alizadeh y H. Fereydooni (2014). "Olive mycorrhization: Influences of genotype, mycorrhiza, and growing periods." *Scientia Horticulturae* **180**: 214-219.
- Selby, C., R. Lee y B. Harvey (1990). "Partial "Rejuvenation" of 20-Year-Old Sitka Spruce by Lower Crown Pruning." En: *Plant Aging*, R. Rodríguez, R. S. Tamés y D. J. Durzan (eds). Springer, US. pp 373-375.
- Seyhan, S. y E. Özzambak (1994). "Shoot multiplication of some olive (*Olea europaea* L.) cultivars." *Acta Horticulturae* **356**: 35-38.
- Sghir, S., P. Chatelet, N. Ouazzini, F. Dosba y I. Belkoura (2005). "Micropropagation of eight Moroccan and French Olive Cultivars." *Hortscience* **40**(1): 193-196.
- Shah, S., S. Wainwright y M. Merret (2003). "Regeneration and somaclonal variation in *Medicago sativa* and *Medicago media*." *Pakistan Journal of Botany* **6**(9): 816-820.
- Shakirova, F. M., A. R. Sakhabutdinova, M. V. Bezrukova, R. A. Fatkhutdinova y D. R. Fatkhutdinova (2003). "Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity." *Plant Science* **164**(3): 317-322.
- Shannon, J. C. y J. W. Batey (1973). "Inbred and hybrid effects on establishment of *in vitro* cultures of *Zea Mays* L. endosperm." *Crop Science* **13**(4): 491-493.
- Sharma, D. K., A. K. Dubey, M. Srivastav, A. K. Singh, R. K. Sairam, R. N. Pandey, A. Dahuja y C. Kaur (2011). "Effect of putrescine and paclobutrazol on growth, physiochemical parameters, and nutrient acquisition of salt-sensitive citrus rootstock karna khatta (*Citrus karna* Raf.) under NaCl stress." *Journal of Plant Growth Regulation* **30**(3): 301-311.
- Sharma, M., A. Sood, P. K. Nagar, O. Prakash y P. S. Ahuja (1999). "Direct rooting and hardening of tea microshoots in the field." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **58**(2): 111-118.
- Sharma, S., G. Bryan, M. Winfield y S. Millam (2007). "Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment" *Planta* **226**(6): 1449-1458.
- Shepherd, K. y J. Santos (1996). "Mitotic instability in banana varieties. I-Plants from callus and shoot tip cultures." *Fruits* **51**: 5-11.
- Shibli, R. A. y K. H. Al-Juboory (2000). "Cryopreservation of "Nabali" olive (*Olea europaea* L.) somatic embryos by encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification." *CryoLetters* **21**: 357-366.
- Shiota, H. y H. Kamada (2008). "Optical isomers of abscisic acid in carrot somatic embryos have the same effect on induction of dormancy and desiccation tolerance." *Plant Biotechnology* **25**(5): 457-463
- Simmonds, J. A. y S. D. Nelson (1989). "Improved micropropagation of *Begonia* × *hiemalis* by maintaining donor plants in long-day conditions." *Hortscience* **24**(5): 831-832.

- Simon, P. W. y S. J. Peloquin (1977).** "The influence of paternal species on the origin of callus in anther culture of *Solanum hybrids*." Theoretical and Applied Genetics **50**(1): 53-56.
- Singh, A. K. y S. Chand (2010).** "Plant regeneration from alginate-encapsulated somatic embryos of *Dalbergia sissoo* Roxb." Indian Journal of Biotechnology **9**: 319-324.
- Singh, I. P., P. J. Handique y V. A. Parthasarathy (2001).** "Morphogenetic response of microshoots of *C. limon* and *C. limettioides* to paclobutrazol." Progressive Horticulturae **33**(2): 118-121
- Singh, M., K. Chaudhary, H. Singal, C. Magill y K. S. Boora (2006).** "Identification and characterization of RAPD and SCAR markers linked to anthracnose resistance gene in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]." Euphytica **146**(1-2): 179-187.
- Singh, R., S. Srivastava, S. Singh, M. Sharma, T. Mohopatra, N. K. Singh, N. K. Singh, S. B. Singh y S. B. Singh (2008).** "Identification of new microsatellite DNA markers for sugar and related traits in sugarcane." Sugar tech **10**(4): 327-333.
- Singh, S. K., M. K. Rai, P. Asthana y L. Sahoo (2010).** "Alginate-encapsulation of nodal segments for propagation, short-term conservation and germplasm exchange and distribution of *Eclipta alba* (L.)." Acta Physiologiae Plantarum **32**(3): 607-610.
- Singh, A. K., M. Sharma, R. Varshney, S. S. Agarwal y K. C. Bansal (2006).** "Plant regeneration from alginate-encapsulated shoot tips of *Phullanthus amarus* schum and thonn, a medicinally important plant species." *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **42**: 109-113.
- Singh, A. K., R. Varshney, M. Sharma, S. S. Agarwal y K. C. Bansal (2006).** "Regeneration of plant from alginate-encapsulated shoot tips of *Withania somnifera* (L.) Dunal, a medicinally important plant species." Journal of Plant Physiology **163**: 220-223.
- Singh, H., S. Kumar y B. D. Singh (2015).** "*In vitro* conservation of pointed gourd (*Trichosanthes dioica*) germplasm through slow-growth shoot cultures: Effect of flurprimidol and triiodobenzoic acid." Scientia Horticulturae **182**: 41-46.
- Skirvin, R., K. McPheeters y M. Norton (1994).** "Sources and frequency of somaclonal variation." Hortscience **29**: 1232-1237.
- Smith, E. F., A. V. Roberts y J. Mottley (1990).** "The preparation *in vitro* of *chrysanthemum* for transplantation to soil." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **21**(2): 133-140.
- Smith, E. F., A. V. Roberts, J. Mottley y S. Denness (1991).** "The preparation *in vitro* of *chrysanthemum* for transplantation to soil. IV: The effects of eleven growth retardants on wilting." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **27**: 309-313.
- Smýkal, P., L. Valledor, R. Rodriguez y M. Griga (2007).** "Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.)." Plant Cell Reports **26**: 1985-1998.
- Sonail-Dixit, s., s. A. Ghosh, Mandal, P. S. Srivastasa, Mandal y P. S. Srivastasa (2005).** "Metabolic stability of plants regenerated from cryopreserved shoot tips of *Dioscorea deltoidea* an endangered medicinal plant." Scientia Horticulturae **105**: 513-517.
- Soriguer, F., M. C. Almaraz, M. S. Ruiz-de-Adana, I. Esteva, F. Linares, J. M. García-Almeida, S. Morcillo, E. García-Escobar, G. Oliveira-Fuster y G. Rojo-Martínez (2009).** "Incidence of obesity is lower in persons who consume olive oil." European Journal of Clinical Nutrition **63**(11): 1371-1374.
- Sotomayor-León, E. M. y J. M. Caballero (1990).** "An easy method of breaking olive stones to remove mechanical dormancy." Acta Horticulturae **286**: 113-116.
- Souza, D. S., D. L. Siqueira, P. R. Cecon y D. Santos (2010).** "Micropropagation of banana trees 'Prata Anã' and 'FHIA 01' explants from plants treated with paclobutrazol." Revista Brasileira Fruticultura Jaboticabal **32**(2): 561-570.

- Standardi, A. (2009).** "Una nuova tecnologia vivaistica *in vitro*." *Georgofili: Atti della Accademia dei Georgofili* **4**(2): 685-704.
- Standardi, A. y M. Micheli (2013).** "Encapsulation of *in vitro*-derived explants: An Innovative Tool for Nurseries." *Encapsulation Technologies for Nursery* **994**: 397-418.
- Standardi, A. y E. Piccioni (1998).** "Recent Perspectives on Synthetic Seed Technology Using Nonembryogenic *In vitro*-Derived Explants." *International Journal of Plant Sciences* **159**(6): 968-978.
- Stuiver, C., L. Kok, J. Clement y P. Kuiper (1995).** "How indicative are changes in major metabolites for freezing tolerance of wheat?" *Botanica Acta* **108**: 106-110.
- Suttle, J. C., S. R. Abrams, L. De Stefano-Beltrán y L. Huckle (2012).** "Chemical inhibition of potato ABA-80-hydroxylase activity alters *in vitro* and *in vivo* ABA metabolism and endogenous ABA levels but does not affect potato microtuber dormancy duration." *Journal of Experimental Botany* **63**(15): 5717-5735.
- Swamy, P. M. y B. N. Smith (2005).** "Role of Abscisic acid in plant stress tolerance." *Current Science* **76**: 1220-1227.

## T

- Tadeo, F. R. y A. Gómez-Cadenas (2008).** "Fisiología de las plantas y el estrés." En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, J. Azcón y M. Bieto (eds). McGraw-Hill/Interamericana, Barcelona. pp 577-594.
- Tao, R., J. Ito y A. Sugiura (1994).** "Comparison of growth and rooting characteristics of micropropagated adult plants and juvenile seedlings of persimmon (*Diospyros kaki* L.)." *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **63**(3): 537-541.
- Tapia, R., R. Castillo, N. Nieves, M. A. Blanco, J. L. González, M. Sánchez y Y. Rodríguez (1999).** "Inducción, maduración y encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) var Cp 5243." *Biotecnología Aplicada* **16**(1): 20-23.
- Taylor, P., T. Fraser, H. Ko y R. Henry (1995).** "RAPD analysis of sugarcane during tissue culture." En: *Current issues in Plant*, M. Terzi, R. Cella y A. Falavigna (eds). Springer, Netherlands. pp 241-246.
- Tester, M. y P. Langridge (2010).** "Breeding Technologies to Increase Crop Production in a Changing World." *Science* **327**(5967): 818-822.
- Thakur, R., A. Sood, P. K. Nagar, S. Pandey, R. C. Sobti y P. S. Ahuja (2006).** "Regulation of growth of *Lilium* plantlets in liquid medium by application of paclobutrazol or ancymidol, for its amenability in a bioreactor system: growth parameters." *Plant Cell Reports* **25**(5): 382-391.
- Thomashow, M. F. (1999).** "Plant Cold Acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms." *Plant Physiology* **50**: 571-599.
- Thorpe, T., C. Stasolla, E. Yeung, G. J. De Klerk, A. V. Roberts y E. F. George (2008).** "The components of plant tissue culture media II: Organic Additions." *Plant Propagation by Tissue Culture* **1**: 115-174.
- Toma, R. y M. Duhoky (2010).** "Factors Involved in *in vitro* Shoot-tip Grafting of Apple (*Malus domestica* Borkh.) and Pear (*Pyrus* sp. L.)." *World Food System: A Contribution for Europe*: 14-16.
- Torres, A. M., N. F. Weeden y A. Martín (1993).** "Linkage among isozyme, RFLP, and RAPD markers in *vicia-faba*." *Theoretical and Applied Genetics* **85**(8): 937-945.
- Tous, J. y A. Romero (1993).** "Variedades de Olivo. Con especial referencia a Cataluña." Fundación "La Caixa"-AEDOS.



- Trabelsi, E., S. Bouzid, M. Bouzid, N. Elloumi, Z. Belfeleh, A. Benabdallah y R. Ghezal (2003).** "In vitro regeneration of olive tree by somatic embryogenesis." *Journal of Plant Biology* **46**(3): 173-180.
- Trabelsi, E. B., S. Naija, N. Elloumi, Z. Belfeleh, M. Msellem, R. Ghezal y S. Bouzid (2011).** "Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive *Olea europaea* (L.) 'Chetoui'." *Acta Physiologiae Plantarum* **33**: 319-324.
- Trifunovic, M., S. Jevremovic, M. Nikolic, A. Subotic y L. Radojevic (2007).** "Micropropagation of Chrysanthemum Cultivars -Effect of Cold Storage on Plant Regeneration *in vitro*." XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: International Symposium on Plant Biotechnology **764**: 319-324.
- Tripathi, S., N. Mathish y K. Gurumurthi (2006).** "Use of genetic markers in the management of micropropagated Eucalyptus germplasm." *New Forests* **31**(3): 361-372.
- Trujillo, I. y A. Morales (2005).** "Identificación de variedades de olivo por marcadores moleculares." En: *Variedades de olivo en España*, L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C. Del Río, A. Marín, J. Tous y I. Trujillo, (eds). Mundi Prensa, Madrid. pp 431-450.
- Tsvetkov, I. y J. F. Hausman (2005).** "In vitro regeneration from alginate-encapsulated microcuttings of *Quercus* sp." *Scientia Horticulturae* **103**(4): 503-507.
- Tsvetkov, I., L. Jouve y J. F. Hausman (2006).** "Effect of alginate matrix composition on regrowth of *in vitro* derived encapsulated apical microcuttings of hybrid aspen." *Biologia Plantarum* **50**(4): 722-724.
- ## U
- Umezawa, L., T. Nakashima, T. Miyakawa, M. Kuromori, K. Tanokura, K. Shinozaki y K. Yamaguchi-Shinozaki (2010).** "Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport." *Plant Cell Physiology* **51**: 1821-1839.
- Unai, E. I. y T. E. García (2004).** "Comparison of characteristics of bananas (*Musa* sp.) from the somaclone CIEN BTA-03 and its parental clone Williams." *Fruits* **59**: 257-263.
- ## V
- Valdés, A. E., A. B. Fernández y M. L. Centeno (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.
- Valpuesta, V. y M. A. Botella (2005).** "Identificación de variedades de olivo por marcadores moleculares." En: *Variedades de olivo en España*, L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C. Del Río, A. Marín, J. Tous y I. Trujillo, (eds). Mundi Prensa, Madrid. pp 431-450.
- Vanacker, H., H. Lu, D. Rate y J. Greenberg (2001).** "A role for salicylic acid and NPR1 in regulating cell growth in Arabidopsis." *The Plant Journal* **28**: 209-216.
- Van Staden, J., E. Zazimalova y E. F. George (2008).** "Plant Growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists." En: *Plant Propagation by Tissue Culture*, E.F. George, A.H. Michael y G.J. De Klerk (eds). Springer, Netherlands. pp 205-226.
- Vargas, P., F. M. Garmendia y J. Hess (2000).** "*Olea europaea* subsp. *guanchica* and subsp. *maroccana* (*Oleaceae*), two new names for olive tree relatives." *Anales del Jardín Botánico de Madrid* **58**(2): 360-361.
- Varlaro, M. E., T. Casacchia, B. Alfei y C. Briccoli-Bati (2009).** *In vitro* adaptability of some Italian olive genotypes. *Acta Horticulturae*. **812**: 125-128.
- Vasil, I. K. (2008).** "A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops." *Plant Cell Reports* **27**(9): 1423-1440.

- Vavilov, N. I. (1951).** "The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants." *Soil Science* **72**(6): 482.
- Vega, M. P. y P. García (2000).** "Análisis de la variación genética en las poblaciones." En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal, M.P. Vega y P. García (eds). Servicio de Publicaciones, Madrid. pp 409-440.
- Veisz, O., G. Galiba y J. Sutka (1996).** "Effect of abscisic acid on the cold hardiness of wheat seedlings." *Journal of Plant Physiology* **149**(3): 439-443.
- Venkatachalam, L., R. Sreedhar y N. Bhagyalakshmi (2007).** "Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers." *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **43**: 267-274.
- Venkatachalam, L., R. Sreedhar y N. Bhagyalakshmi (2008).** "The use of genetic markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and phylogenetic relationships among banana cultivars." *Molecular Phylogenetics* **47**(3): 974-985.
- Ventatachalam, P. y N. Jayabalan (1997).** "Effect of auxins and cytokinins on efficient plant regeneration and multiple-shoot formation from cotyledons and cotyledonary-node explants of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) by *in vitro* culture technology." *Appl. Biochem. Biotechnol.* **67**: 237-247.
- Verma, S. K., M. K. Rai, P. Asthana, V. S. Jaiswal y U. Jaiswal (2010).** "*In vitro* plantlets from alginate-encapsulated shoot tips of *Solanum nigrum* L. ." *Scientia Horticulturae* **124**(4): 517-521.
- Veselova, S., R. Farhutdinov, S. Veselov, G. R. Kudoyarova, D. S. Veselov y W. Hartung (2005).** "The effect of root cooling on hormone content, leaf conductance and root hydraulic conductivity of durum wheat seedlings (*Triticum durum* L.)." *Journal of Plant Physiology* **162**: 21-26.
- Vidal, M. y E. García (2000).** "Analysis of a *Musa* spp. somaclonal variant resistant to yellow Sigatoka." *Plant Molecular Biology Reporter* **18**: 23-31.
- Vidal, N., G. Arellano y M. San-Jose (2003).** "Developmental stages during the rooting of *in-vitro*-cultured *Quercus robur* shoots from material of juvenile and mature origin." *Tree* **23**: 1247-1254.
- Vidoy-Mercado, I. (2014).** "Rejuvenecimiento y Micropropagación de olivo (*Olea europaea* L.)." Tesis Doctoral, Universidad de Málaga (España).
- Vidoy-Mercado, I., I. Imbroda-Solano, A. Barceló-Muñoz y F. Pliego-Alfaro (2012a).** "Differential *in vitro* behavior of the Spanish olive (*Olea europaea* L.) cultivars 'Arbequina' y 'Picual'." *Acta Horticulturae* **949**: 27-30.
- Vidoy-Mercado, I., I. Imbroda-Solano, A. Barceló-Muñoz, M. A. Viruel y F. Pliego-Alfaro (2012b).** "The influence of *in vitro* micrografting on vegetative propagation of the olive cv. Arbequina." *Acta Horticulturae* **949**: 31-34.

## W

- Watad, A. A., J. Ben-Jacob, S. Cohen, E. Tal y H. Solomon (1992).** "*In vitro* shoot establishment of *Protea obtusifolia*." *Acta Horticulturae* **316**: 59-62.
- Watt, M., N. Thokoane, D. Mycock y F. Blakeway (2000).** "*In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **61**: 161-164.
- Wagh, R., K. McLean, A. Flawell, S. Pearce, A. Kumar, B. B. Thomas y W. Powell (1997).** "Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP)." *Molecular and General Genetics* **253**(6): 687-694.
- Weising, K., H. Nybom, M. Pfenninger, K. Wolff y G. Kahl (2005).** DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. CRC Press.

- Welsh, J., R. Honeycutt, M. McClelland y B. W. Sobral (1991).** "Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR)." *Theoretical and Applied* **82**: 473-476.
- Welter, L., N. Göktürk-Baydar, M. Akkurt, E. Maul, R. Eibach, R. Töpfer y E. M. Zyprian (2007).** "Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L)." *Molecular* **20**(4): 359-374.
- West, T. P., M. B. Ravindra y J. E. Preece (2006).** "Encapsulation, cold storage, and growth of *Hibiscus moscheutos* nodal segments." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **87**(3): 223-231.
- Wen, Z. Z., Y. Lin, Y. Q. Liu, M. Wang, Y. Q. Wang y W. Liu (2013).** "Effects of paclobutrazol *in vitro* on transplanting efficiency and root tip development of *Dendrobium nobile*." *Biologia Plantarum* **57**(3): 576-580.
- Wiesman, Z. y S. Lavee (1994).** "Vegetative growth retardation, improved rooting and viability of olive cuttings in response to application of growth retardants." *Plant Growth Regulation* **14**(1): 83-90.
- Williams, D. R., B. Potts y P. J. Smethurst (2003).** "Promotion of flowering in *Eucalyptus nitens* by paclobutrazol was enhanced by nitrogen fertilizer." *Canadian Journal of Forest Research* **33**(1): 74-81.
- Williams, J., A. Kubelik y K. Livak (1990).** "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." *Nucleic acids* **18**: 6531-6535.
- Wolfe, A. (2000).** "ISSR Resource Website."
- Wright, S. (1965).** "The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating." *Evolution* **19**(3): 395-420.

## X

- Xia, J., H. Zhao, W. Liu, L. Li y Y. He (2009).** "Role of cytokinin and salicylic acid in plant growth at low temperatures." *Plant Growth Regulation* **57**(3): 211-221.
- Xiao, Y., G. Niu y T. Kozai (2010).** "Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **105**(2): 149-158.
- Xiong, L., M. Ishitani, H. Lee y J. Zhu (2001).** "The *Arabidopsis* LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress–and osmotic stress–responsive gene expression." *The Plant Cell* **13**: 2063-2083.

## Y

- Yang, G. y P. E. Read (1997).** "*In vitro* shoot proliferation of 5-leaf aralia explants from field grown plants and forced dormant stems." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **47**(3): 289-291.
- Yang, W., Q. Zhang, H. Pan y M. Sun (2010).** "*In vitro* regeneration of *Lilium tsingtauense* Gilg. and analysis of genetic variability in micropropagated plants using RAPD and ISSR techniques." *Propag Ornament Plants* **10**(2): 59-66.
- Yang, Y., M. Qi y C. Mei (2004).** "Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress." *The Plant Journal* **40**: 909-919.
- Yari, R., F. Farahani y M. Sheidai (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., F. Farahani, M. Sheidai, S. Montasser y H. Fahimi (2011b).** "The effects of prolonged vegetative reproduction of the two Iranian olive cultivars (Dezful Baghmalek and Dezful Safiabad) on morphological traits." *African Journal of Biotechnology* **10**(45): 9076-9081.

- Yaseen, M., T. Ahmad, N. A. Abbasi y I. A. Hafiz (2009).** "Assessment of apple rootstocks M 9 and M 26 for *in vitro* rooting potential using different carbon sources." *Pakistan Journal of Botany* **41**(2): 769-781.
- Yaseen, M., T. Ahmed, N. A. Abbasi y I. A. Hafiz (2009).** "*In vitro* shoot proliferation competence of apple rootstocks M. 9 and M. 26 on different carbon sources." *Pakistan Journal of Botany* **41**(4): 1781-1795.
- Yiu, J. C., C. W. Liu, C. T. Kuo, M. J. Tseng, Y. S. Lai y J. W. Lai (2008).** "Changes in antioxidant properties and their relationship to paclobutrazol induced flooding tolerance in Welsh onion." *Journal Science Food Agriculture* **88**(7): 1222-1230.
- Yuan, S. y H. H. Lin (2008).** "Minireview: role of salicylic acid in plant abiotic stress." *Zeitschrift für Naturforschung C* **63**(5-6): 313-320.
- Yu, X., X. Li, X. Zhao, L. Jiang y G. Miao (2011).** "Tissue culture-induced genomic alteration in maize (*Zea mays*) inbred lines and F1 hybrids." *Annals of Applied Biology* **158**(3): 237-247.

## Z

- Zabeau, M. y P. Vos (1993).** "Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting." *European Patent Application* **92402629**(3).
- Zacarías, L., M. T. Lafuente y M. T. Lafuente (2008).** "Etileno, ácido abscísico y otros reguladores del desarrollo." En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, J. Azcón y M. Bieto (eds). McGraw-Hill/Interamericana, Barcelona. pp 445-466.
- Zacchini, M. y M. Agazio (2004).** "Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation." *Biologia Plantarum* **48**(4): 589-592.
- Zaid, A., H. Kaabi y H. Kaabi (2003).** "Plants-off types in tissue culture-derived date palm (*Phoenix dactylifera* L.)." *Emirates journal os agriculture sciencies* **15**: 17-35.
- Zhai, Z., Y. Wu, F. Engelmann, R. Chen y Y. Zhao (2003).** "Genetic stability assessments of plantlets regenerated from cryopreserved *in vitro* cultured grape and kiwi shoot-tips using RAPD." *CryoLetters* **24**: 315-322.
- Zhang, W., B. Jiang, L. Lou, M. Lu, M. Yang, J. F. Chen y J. F. Chen (2011).** "Impact of salicylic acid on the antioxidant enzyme system and hydrogen peroxide production in *Cucumis sativus* under chilling stress." *für Naturforschung C* **66**(7-8): 413-422.
- Zheng, C.-L., T. Halaly, A. K. Acheampong, Y. Takebayashi, Y. Jikumaru, Y. Kamiya y E. Or (2015).** "Abscisic acid (ABA) regulates grape bud dormancy, and dormancy release stimuli may act through modification of ABA metabolism." *Journal of Experimental Science* **66**(5): 1527-1542.
- Zheng, R.-R., Y. Wu y I.-P. Xia (2012).** "Chlorocholine chloride and paclobutrazol treatments promote carbohydrate accumulation in bulbs of *Lilium Oriental* hybrid 'Sorbonne'." *J Zhejiang Univ Sci B* **13**(2): 136-144.
- Zhou, Z., H. Ma, K. Liang, G. Huang y K. Pinyopusarerk (2012).** "Improved tolerance of teak (*Tectona grandis* L.f.) seedlings to low-temperature stress by the combined effect of arbuscular mycorrhiza and paclobutrazol." *Journal of Plant Growth Regulation* **31**(3): 427-435.
- Zhou, Z. S., K. Guo, A. A. Elbaz y Z. M. Yang (2009).** "Salicylic acid alleviates mercury toxicity by preventing oxidative stress in roots of *Medicago sativa*." *Environmental and Experimental Botany* **65**(1): 27-34.
- Žiauka, J. y S. Kuusienė (2010).** "Different inhibitors of the gibberellin biosynthesis pathway elicit varied responses during *in vitro* culture of aspen (*Populus tremula* L.)." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **102**(2): 221-228.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski y D. Labuda (1994).** "Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification." *Genomics* **20**(2): 176-783.

- Zimmerman, J. L. (1993).** "Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants." *The Plant Cell* **5**(10): 1411-1423.
- Zimmerman, R. H. (1972).** "Juvenility and flowering in woody plants." *Hortscience* **7**(5): 447-455.
- Zimmerman, R. H. (1984).** "Rooting apple cultivars *in vitro*: Interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **3**(4): 301-311.
- Zimmerman, R. H. (1987).** "Micropropagation of Woody Plant: Post Tissue Culture Aspects." *Acta Horticulturae* **227**: 489-499.
- Zimmerman, R. H., W. P. Hackett y R. P. Pharis (1985).** "Hormonal aspects of phase change and precocious flowering." *Encyclopedia Plant Physiology* **11**(4): 79-115.
- Zuccherelli, G. y S. Zuccherelli (2002).** "*In vitro* propagation of fifty olive cultivars." *Acta Horticulturae* **586**: 931-934.