

OLI-11

INFLUENCIA DE LA MICORRIZA VESICULO ARBUSCULAR GLOMUS FASCICULATUM, SOBRE EL DESARROLLO DE PLANTAS JOVENES DE OLIVO.

ANTONIO TRONCOSO DE ARCE, JUANA LIÑÁN BENJUMEA, CARLOS LUÍS CARRETERO MONTERO, JOSÉ LUÍS GARCÍA FERNÁNDEZ, JAVIER TRONCOSO MENDOZA, MARÍA GARCÍA LIÑÁN Y MANUEL CANTOS BARRAGÁN.

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (CSIC). Avda. Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, España.

FORO DEL OLIVAR Y EL MEDIO AMBIENTE.

RESUMEN

Alcanzar un alto nivel de germinación y acortar la fase juvenil improductiva del olivo, es muy importante para los trabajos de mejora genética.

Mediante cultivo in vitro de embriones maduros, se alcanzó un 100% de germinación en sólo 10 días y transcurridos otros 50, las plántulas se pudieron trasplantar a condiciones externas.

La mitad de las plántulas se trasplantaron a macetas de 2 kg con un sustrato arenoso desinfectado de baja fertilidad y la otra mitad a contenedores similares con el mismo suelo, pero adicionando 5 g/contenedor de un cultivo del hongo *Glomus fasciculatum*. Después de 180 días de cultivo, el grupo de plantas micorrizadas mostraron una mayor supervivencia (88% frente al 71% de las no tratadas), peso fresco (18 g/planta frente a 2.5 g/planta), peso seco (7.6 g/planta frente a 2.5 g/planta). En consecuencia, la micorriza afectó positivamente a la supervivencia de la plántula y su desarrollo ayudando, por tanto, a acortar la fase juvenil del olivo.

INTRODUCCIÓN

Para los trabajos de mejora genética del olivo es muy importante alcanzar una elevada proporción de germinación de semillas en el menor tiempo posible y un acortamiento de la fase improductiva juvenil de la planta obtenida. Mediante el cultivo in vitro de embriones maduros se han obtenido porcentajes muy altos de germinación (Troncoso et al., 1991; Voyiatzis y Pritsa, 1994; Voyiatzis, 1995) en pocos días, alcanzándose incluso un 100% (Acebedo et al., 1997). Por el uso de formas y concentraciones apropiadas de nitrógeno (García et al., 1994; Sarmiento et al., 1994) y azúcares (García et al., 2002) se ha logrado un alto crecimiento in vitro de las plántulas. Un buen sustrato (Rugini, 1984), así como soluciones nutritivas (García et al., 1999) y fotoperíodo (Alvarado, 1994) adecuados durante la fase de endurecimiento, también aumentan el desarrollo de la planta en condiciones de cámara o de invernadero. Con plantas en campo, las condiciones de poda y de cultivo también influyen en su velocidad del crecimiento (Lavee, 1996; García-Ortiz et al., 2001; Navarro y Parra, 2001). Debido a la existencia de una relación entre el desarrollo de la planta y la duración de la fase juvenil (Natividade, 1957; Rugini, 1986; Bellini, 1993) el aumento del crecimiento indicado en los trabajos anteriores conduce a un acortamiento del período juvenil de la planta de olivo (Acebedo et al., 1997; Liñán et al., 1999). Sin embargo, es necesario acortar aún más el período juvenil de la planta de olivo mediante el aumento adicional de la velocidad de crecimiento. El uso de micorrizas arbusculares es un método muy eficaz para aumentar la supervivencia y el desarrollo de muchas plantas durante su cultivo (Hooker et al., 1994; Azcón-Aguilar et al., 1997) y por lo tanto, ayudaría a acortar la juvenilidad. Por ello, el presente trabajo pretende conocer el efecto de la micorriza vesículo arbuscular *Glomus fasciculatum* sobre la supervivencia y desarrollo en la fase de endurecimiento en invernadero, de plántulas de olivo obtenidas in vitro por germinación de embriones. También, como el olivo crece normalmente en suelos de baja calidad, los resultados obtenidos con las plantas de olivos jóvenes micorrizadas creciendo en un sustrato pobre podrían ser de interés para su aplicación en condiciones de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plántulas de olivo, obtenidas in vitro por germinación de embriones procedentes de cv. manzanillo, se trasplantaron, después de 60 días de cultivo, a condiciones externas según Cantos et al. (1993). Después de 20 días de un primer período de aclimatación en cámara de cultivo, 16 plantas se transfirieron nuevamente a macetas con 2 kilogramos de suelo arenoso de baja fertilidad (Tabla 1) esterilizado en autoclave a vapor fluente, 1 hora cada día durante tres días sucesivos. Otras 16 plantas se pasaron a contenedores similares con la misma cantidad y tipo de suelo también esterilizado pero micorrizado tras la esterilización con el hongo *Glomus intraradices* (aislado 11AG8903). El inóculo de micorriza fue proporcionado por la Dra. Rosario Azcón (E.E. Zaidin, CSIC, Granada, España) y consistió en una mezcla de inóculo de rizosfera conteniendo esporas, hifas y fragmentos de raíz micorrizada. Se agregaron veinte gramos de inóculo a cada contenedor. Los contenedores con las plantas se colocaron en un invernadero donde recibieron solamente agua de la red, manteniendo el sustrato a capacidad de campo.

El número de plantas muertas y el crecimiento de tallo, brotes y crecimiento total de cada planta se midieron en el momento 0 (inicial), 30 y 180 días (final) del experimento. Al final de la prueba se comprobó la presencia del hongo en las raíces de la planta mediante tratamiento de las mismas con KOH 10% en caliente, y teñido posterior con azul Trypan 0,05% en ácido láctico y decoloración con glicerol al 50%, (Phillips y Hayman, 1970). A continuación las raíces se montaron sobre portaobjetos y se observaron directamente al microscopio. Se analizó el estado nutritivo de las plantas (raíces, tallo y brotes y hojas) mediante determinación del N fue por digestión Kjeldahl y de los nutrientes minerales (P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn) por oxidación con HNO₃ bajo presión usando microondas Milestone Ethos y análisis de los extractos por ICP-OES (Hamilton, 1980).

La distribución de tamaño de partícula en las muestras del suelo (2 milímetros) se determinó por el método del hidrómetro (Gee y Bauder, 1986) y las características químicas del suelo (Tabla 1) de acuerdo con Page et al. (1982).

La longitud del tallo y de los brotes se midió considerando el tamaño total de la planta como la suma de la longitud del tallo y de cada brote. El peso fresco se midió por pesada rápida y el peso seco por pesada después de tres días en estufa a 70°C. La hidratación se calculó por la fórmula:

$$H = \frac{fw - dw}{fw} \times 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El suelo usado como sustrato (Tabla 1) es de textura arenolimoso, pH neutro y muy pobre en carbonato de calcio. Posee niveles muy bajos de materia orgánica (OM), de N, Ca y Mg y también de P, K, y de Fe. Por tanto, se puede considerar de fertilidad bastante baja.

La foto 1 demuestra la presencia de hifas de *Glomus intraradices* en las raíces de las plantas de olivo micorrizadas, indicando que la simbiosis ocurre. Por el contrario, las plantas sin micorrizar y sometidas al mismo tratamiento con azul trypan, no presentan presencia de hifas o esporas en la raíz (foto 2). De este modo, demostrada la colonización por el hongo de los tejidos de la raíz, las diferencias que se producen entre ambos grupos de plantas se asocian con la micorriza. Como consecuencia del trasplante murieron 7 plantas del grupo control y solamente 3 de las micorrizadas. Éste fue un primer efecto beneficioso de la simbiosis planta-hongo. Otros autores (Gianinazzi et al., 1990; Hooker et al., 1994; Lovato et al., 1996; Azcón-Aguilar y Barea, 1997 y Azcón-Aguilar et al., 1997) trabajando con distintas especies, también observaron la influencia positiva de la micorriza sobre la supervivencia de la planta en situaciones de estrés como se produce en el trasplante in vitro. No se encontraron diferencias significativas entre el crecimiento, apical (tallo) y el lateral (brotes) y, en consecuencia del crecimiento total de los dos grupos de plantas, durante los primeros 30 días de cultivo (tabla 2). Pero al final del experimento (180 días), el tallo de las plantas micorrizadas había alcanzado doble longitud que el de las plantas control (tabla 2). También el número de brotes laterales nuevos de las plantas tratadas fue significativamente más alto que el de las plantas control. No obstante, y en relación con este mayor número de brotes, no existió diferencia significativa en el crecimiento individual del brote de cada grupo de plantas. Ahora bien, debido a su

mayor número, el crecimiento medio del conjunto de los brotes laterales de plantas inoculadas fue más alto que el de las control (tabla 2). El mayor crecimiento lateral y apical provocó que las plantas micorrizadas alcanzaran después de 180 días de cultivo una longitud tres veces mayor que las plantas del control (tabla 2).

Debido a su mayor tamaño, las plantas micorrizadas alcanzaron pesos frescos y secos más altos para cada órgano considerado y en total (tabla 3). La micorriza también provocó un nivel más alto de hidratación en la raíz y la hoja, lo que indica una absorción más eficiente del agua. Todos estos hechos se relacionan con el mayor tamaño del sistema radicular efectivo que provocan las hifas del hongo. Autores como Schubert et al., 1990; Clark y Zeto, 2000 confirman esta relación entre ambos parámetros.

Los niveles de nutrientes también fueron afectados por la micorriza (tablas 4 y 5). Cuando el contenido nutriente se considera a nivel relativo como porcentaje de peso seco o ppm, sólo los valores de P y Fe de las plantas micorrizadas fueron claramente más altos que el de las control (tabla 4). Pero si se compara la cantidad total por planta de cada elemento, las plantas micorrizadas, debido a su mayor tamaño, tuvieron niveles más altos que el control para todos los nutrientes considerados, particularmente P y Fe. Debido a la fertilidad baja del sustrato (tabla 1) y al riego solamente con agua, las plantas control se desarrollaron (tablas 2 y 3), menos que las plantas de olivo regadas con soluciones nutritivas (Troncoso et al., 1986; Sarmiento et al., 1994), lo que demostró la baja fertilidad del sustrato y malas condiciones de cultivo. A pesar de las malas condiciones indicadas, las plantas de olivo inoculadas con *Glomus intraradices* mejoraron la supervivencia después del trasplante in vitro-ex vitro y aumentaron su desarrollo (tablas 2 y 3). La influencia positiva de la micorriza en el desarrollo vegetal fue reseñada por Abbott y Robson, (1984) para cultivos bajo condiciones de pobre fertilidad. El efecto positivo de la micorriza fue relacionado con una mejor hidratación de los tejidos de la raíz y de la hoja (tabla 3) y una absorción, principalmente P y Fe, mas alta de nutrientes (tablas 4 y 5). Rosendahl y Rosendahl 1991; Subramanian et al., 1997; Abdel-Fattah y Shabana 2002 reseñaron la influencia positiva de la micorriza en el contenido de agua de la planta y Timmer y Leyder, (1978); Tinker, (1980); Allen y Cunningham, (1983); Pons et al., (1983); Barea, (1991); Tobar et al., (1994 a, b); Azcón et al., (1996) relacionaron la micorriza con un mejor estado nutritivo de la planta. Clark y Zeto (2000) achacaron este buen comportamiento de la simbiosis planta-hongo con una mayor colonización del volumen de suelo, absorción y excreción de algunos compuestos químicos.

Así, las micorrizas mejoran la supervivencia y el desarrollo de plántulas de olivo en condiciones de suelo pobre con escasa fertilidad. Este comportamiento puede ser de gran interés para un mayor acortamiento de la fase juvenil y la mayoría del cultivo en plantas de olivo en suelos de baja fertilidad natural.

TABLA 1. Características del suelo usado como sustrato.

Arena %	Limo %	Arcilla %	pH	CaCO ₃ %	OM %	N %	P mgkg ⁻¹	K mgkg ⁻¹	Ca mgkg ⁻¹	Mg mgkg ⁻¹	Fe mgkg ⁻¹
76	8	16	7	1	0.8	0.03	16	199	161	113	20

TABLA 2. Valores medios de crecimiento de plantas de olivo no micorrizadas (control) y micorrizadas. Letras diferentes en horizontal indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$) entre plantas control y micorrizadas.

Días desde el trasplante		Tratamiento	
		Plantas no micorrizadas	Plantas micorrizadas
0	Tallo (cm)	6.43 a	6.56 a
	Brote (cm)	0.40 a	0.43 a
	Brote (nº)	0.25 a	0.31 a
	Total (cm)	6.59 a	7.21 a
30	Tallo (cm)	7.55 a	7.34 a
	Brote (cm)	1.57 a	2.31 a
	Brote (nº)	1.14 a	1.27 a
	Total (cm)	8.88 a	9.61 a

180	Tallo (cm)	21.22 a	44.76 b
	Brote (cm)	6.06 a	8.42 a
	Brote (nº)	1.62 a	6.00 b
	Total (cm)	31.33 a	91.03 b

TABLA 3. Pesos fresco y seco e hidratación de plantas de olivo micorrizadas y no micorrizadas después de 180 días de cultivo. Letras diferentes en horizontal indican diferencias significativas ($p \leq 0.01$) entre el control y las plantas micorrizadas.

Días desde el trasplante		Tratamiento	
		Plantas no micorrizadas	Plantas micorrizadas
Raíz	p.f. (g)	3.0 a	6.9 b
	p.s. (g)	1.0 a	1.8 ab
	H (%)	66.6 a	73.9 b
Tallo y brotes	p.f. (g)	1.5 a	5.7 b
	p.s. (g)	0.8 a	3.0 b
	H (%)	46.6 a	47.3 a
Hoja	p.f. (g)	1.5 a	5.5 b
	p.s. (g)	0.8 a	2.4 b
	H (%)	46.6 a	56.4 b
Total planta	p.f. (g)	6.0 a	18.1 b
	p.s. (g)	2.6 a	7.2 b
	H (%)	56.6 a	60.2 ab

TABLA 4. Contenido de nutrientes en plantas de olivo no micorrizadas y micorrizadas después de 180 días de cultivo.

	% p.s.					ppm				
	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn	B
No micorrizadas	1.66	0.04	0.77	0.86	0.15	568	66	16	11	17
Micorrizadas	1.46	0.10	0.78	0.85	0.15	1023	48	22	10	15

TABLA 5. Contenido total de nutrientes en las plantas no micorrizadas y micorrizadas después de 180 días de cultivo.

	mg por planta					µg por planta				
	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn	B
No micorrizadas	40	1	20	22	4	1	0.2	0.04	0.03	0.04
Micorrizadas	110	7	56	61	11	7	0.3	0.15	0.07	0.10

BIBLIOGRAFÍA

- **Abbott L.K. and Robson A.D.** 1984. The effect of mycorrhizas on plant growth. In VA Mycorrhiza. Powell, C.L.I., Bagyaraj, D.J. (eds), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp113-130.
- **Abdel-Fattah GM and Shabana YM.** 2002. Efficacy of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* in protection of cowpea plants against root rot pathogen *Rhizoctonia solani*. ZEITSCHRIFT FÜR PFLANZENKRANKHEITEN UND PFLANZENSCHUTZ-JOURNAL OF PLANT DISEASES AND PROTECTION. 109(2):207-215.
- **Acebedo, M.M.; Lavee, S.; Liñán, J. and Troncoso, A.** 1997. In vitro germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. Scientia Horticulturae, 69: 207- 215.
- **Allen E.B. and Cunningham G.L.** 1983. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizae on *Distichlis spicata* under three salinity levels. New Phytol. 93: 227-236.
- **Alvarado, J.** 1994. Métodos para la germinación y crecimiento forzado de plántulas en olivo. Trabajo Profesional Fin de Carrera, ETSIAM, Universidad de Córdoba.
- **Azcón R., Gómez M. and Tobar R. M.** 1996. Physiological and nutritional responses by *Lactuca sativa* L. to nitrogen sources and mycorrhizal fungi under drought conditions. Biol. Fertil. Soils, 22: 156-161.

- **Azcón-Aguilar C. y Barea J.M.** 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Sci. Horticult*, 68:1-24.
- **Azcón-Aguilar C., Troncoso A., Cantos M. and Barea, J.M.** 1997. Beneficial effect of arbuscular mycorrhizas on acclimatization of micropropagated cassava plantlets. *Scientia Horticulturae*, V. 72, 1:63-71.
- **Barea J.M.** 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. *Advances in Soil Science*. 15:1-39.
- **Bellini, E.**, 1993. Variabilidad genética y heredabilidad de algunos caracteres en las plantas de semillas de olivo obtenidas por cruzamiento. *Olivae*, 49: 21-34.
- **Cantos M., Liñán J., Pérez-Camacho F. and Troncoso A.** 1993. Obtención de plantas selectas de vid, variedad Zalema, libres de virosis de entrenudo corto. *Actas de Horticultura*, 1: 705-709.
- **Clark R.B. and Zeto, S.K.** 2000. Mineral Acquisition by Arbuscular Mycorrhizal Plants. *Journal of Plant Nutrition*, v 23, 7: 867-902.
- **García, J.L.; Sarmiento, R.; Troncoso, A.; Mazuelos, C. (1994).** "Effect of the nitrogen source and concentration on N fractions in olive seedlings". *Acta Horticulturae*, 356: 193-196.
- **García, J.L.; Liñán, J. and Troncoso, A. (1999)** "Effect of different N forms and concentrations on Olive seedlings growth." *Acta Horticulturae*. nº 474. Vol. 1 323-328.
- **García, J.L., Troncoso, J.; Sarmiento, R. and Troncoso, A.** 2002. "Influence of carbon source and concentration on the in vitro development of olive zygotic embryos and explants raised from them". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*., 69: 95-100.
- **García-Ortiz, A.; Fernández, A.; Pastor, M. and Humanes, J.** 2001 En: *El cultivo del olivo*. Eds. Barranco, D. Fernández-Escobar, Rallo, L. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca y Ediciones Mundi-Prensa. 335-370.
- **Gee G.W. and Bauder J.W.**, 1986. Particle-size Analysis. Cap. 15, pág. 383-411 en Klute A. ed., *Methods of Soil Analysis. Part 1. Physical and Mineralogical Methods*.. 2ª Ed. Monografía nº 9 de la serie Agronomy. American Society of Agronomy. Madison. Wisconsin.
- **Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. and Trouvelot A.** 1990. Potentialities and procedures for the use of endomycorrhizas with special emphasis on high value crops. In: J.M. Whipps y B. Lumsden (Editors), *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 41-54.
- **Hamilton, T.W., Ellis, J., Florence, T.M.** 1980. *Anal. Chim. Acta*. 119-225.
- **Hooker, J.E.; Gianinazzi, S.; Vestberg, M.; Barea, J.M. Atkinson, D.** (1994) The application of arbuscular mycorrhizal fungi to micropropagation systems: an opportunity to reduce inputs. *Agric. Sci. Fin.* 3, 227-232.
- **Lavee, S., Avidan, N., Haskal, A. and Ogdovich, A.** 1996. Juvenility period reduction in olive seedlings a tool for enhancement of breeding. *Olivae*, 60: 33-41.
- **Liñán, J.; Troncoso, A. and Rapoport, H.F.** 1999. Olive embryo development stage and the possibility of obtaining viable seedlings. *Acta Horticulturae*. 474-1: 75-78
- **Lovato P.E., Gianinazzi-Pearson V., Trouvelot, A. y Gianinazzi S.** 1996. The state of art of mycorrhiza and micropropagation. *Adv Hortic. Sci.*, 10: 46-52.
- **Natividade, J.V.**, 1957. Juventude na *Olea europaea* L. *Agron. Lusit.*, 19: 145-159.
- **Navarro, C and Parra, M.A.** 2001 En: *El cultivo del olivo*. Eds. Barranco, D. Fernández-Escobar, Rallo, L. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca y Ediciones Mundi-Prensa. 173-216.
- **Page A.L., Miller R.H., Keeney D.R.** ed., 1982. *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. 2ª ed. Monografía nº 9 de la serie Agronomy. American Society of Agronomy. Madison. Wisconsin.
- **Phillips, J.M. and Hayman, D.S.** 1970. Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55, 158.
- **Pons F., Gianinazzi- Pearson V., Gianinazzi S. y Navatel J.C.** 1983. Studies of VA mycorrhizal synthesis of axenically propagated wild cherry (*Prunus avium* L.) plants. *Plant Soil*, 71: 217-221.
- **Rosendahl C.N., Rosendahl S.** 1991. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* sp) on the response of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Environmental and Experimental Botany* Vol.31, no.3, s. 313-8.
- **Rugini E.** (1984). In vitro propagation of some olive (*Olea europea sativa* L.) cultivars with different rootability, and medium development using analytical data from developing brotes and embryos. *Scientia Horticulturae*, 24: 123-134.
- **Rugini E. (1986).** *Olive (Olea europea L.) Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Trees I. Springer-Verlag. Berlín . 515 pp.
- **Sarmiento, R.; Garcia, J. L., C. Mazuelos, J. Liñán, A. Troncoso,** 1994. Effect of the form and concentration of N on the growth and mineral composition of young olive seedlings. *Acta Horticulturae*, 356: 156-161
- **Schubert, A., Mazzitelli, M, Ariusso, Eynard, L.** 1990. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizae fungi on micropropagated grapevines: influence of endophyte strain. P. fertilization and growth medium. *Vitis* 29: 5-13.
- **Subramanian KS, Charest C, Dwyer LM, Hamilton RI.** 1997. Effects of arbuscular mycorrhizae on leaf water potential, sugar content, and P content during drought and recovery of maize. *Canadian Journal of Botany*. 75(9): 1582-1591; 46 ref.
- **Timmer L.W. and Leyden R.F.** 1978. Stunting of citrus seedlings in fumigated soils in Texas and its correction by phosphorus fertilization and inoculation with mycorrhizal fungi. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 103: 533-537.

- **Tinker P.B.** 1980. Role of rhizosphere micro-organisms in phosphorus uptake by plants. In the Role of Phosphorus in Agriculture. Eds S.E. Kwasahneh, E.C. Sample and E.J. Kamprath. American Society of Agronomy. Madison. pp. 617-654.
- **Tobar R. M., Azcón R. and Barea J. M.** 1994a. Improved nitrogen uptake and transport from ¹⁵N-labelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. *New Phytologist.*, 126: 119-122.
- **Tobar R. M., Azcón R. and Barea J. M.** 1994b. The improvement of plant N acquisition from an ammonium-treated, drought-stressed soil by the fungal symbiont in arbuscular mycorrhizae. *Mycorrhiza*, 4: 105-108.
- **Troncoso, A.; Cerdá, A. y Bartolini, G.** 1986. Acción del N sobre el desarrollo y la composición mineral de plantas de olivo. *Olea*. 16- (17): 161-163.
- **Troncoso A., Han N., García J.L. y Sarmiento R. (1991).** Efecto de la concentración de Nitrógeno en el desarrollo de embriones de olivo "in vitro". Congreso. Consultation of the European Cooperative Research net-work on olive. Turquía. Bornova, Ishmir.
- **Voyiatzis, D.G.** (1995). Dormancy and germination of olive embryos as affected by temperature. *Phisyol. Plantarum*, 95: 444-448.
- **Voyiatzis, D.G. and Pritsa T.** (1994). The onset and disappearance of relative dormancy of olive embryos as affected by age. *Acta Horticulturae* 356, 148-151.