



INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y Y
AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**CARACTERÍSTICAS MORFO-ANATÓMICAS, FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE
PLANTAS JÓVENES DE OLIVO (*Olea europaea* L.) OBTENIDAS *IN VITRO*, EN
FUNCIÓN DE LA FUENTE Y CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO**

Memoria presentada por el licenciado D. José Luis García
Fernández para optar al grado de Doctor en Biología

Sevilla, Febrero de 1999

DIRECTORES:

DR. ANTONIO TRONCOSO DE ARCE
Profesor de Investigación del CSIC

DR. RAFAEL SARMIENTO SOLÍS
Colaborador Científico del CSIC

TUTOR

DR. FRANCISCO JAVIER FLORENCIO BELLIDO
Profesor Titular de Bioquímica Vegetal y Biología
Molecular de la Universidad de Sevilla

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (C.S.I.C.), por lo que quiero agradecer en primer lugar a la Dirección del Instituto y a todo su personal el apoyo que me han brindado en todo momento.

En segundo lugar, pero no por ello menos importante, quiero agradecer a los Dres. Antonio Troncoso de Arce y Rafael Sarmiento Solís, directores de este trabajo, todo el tiempo que me han dedicado, su constante apoyo y colaboración, así como por su amistad.

Al Dr. Francisco Javier Florencio Bellido por haber accedido amablemente a ejercer de tutor de esta tesis.

A la Dra. Carmen Mazuelos le agradezco su colaboración en la realización de los análisis de elementos. Pero, además, tengo que resaltar su calidad humana, ejemplo para todos los que tenemos la suerte de trabajar con ella.

Al Dr. Eduardo Leidi por su ayuda en la realización de este trabajo.

Al Prof. Shimon Lavee le agradezco sus siempre atinadas sugerencias que han ayudado a enriquecer este trabajo.

A la Dra. Beatriz Cubero por su valiosa ayuda en la revisión del capítulo sobre marcadores polipéptidicos.

A mis compañeras de laboratorio, Carmen Grande y Asunción Castro que, además de colaborar con su trabajo a esta Tesis, me han otorgado su amistad.

A Manuel Cantos, Juana Liñán, Carmen Villalón y Carlos Carretero por su amistad y colaboración.

A mis amigos, Ana, José Carlos, Rafa, Bernardo y tantos otros que me han hecho y me hacen agradable el trabajo de todos los días.

A Mercedes, que me ha apoyado, ayudado y aguantado todo este tiempo, por todo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS EMPLEADAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
I. INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS	1
1. COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD DE GERMINACIÓN DE EMBRIONES AISLADOS Y CULTIVADOS <i>IN VITRO</i> , SEMILLAS Y SEMILLAS CON ENDOCARPO (HUESOS) DE OLIVO.	11
1.1. INTRODUCCIÓN.	13
1.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
2. INFLUENCIA DE LA FUENTE Y CONCENTRACIÓN DE N SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA COMPOSICIÓN DE EMBRIONES DE OLIVO GERMINADOS <i>IN VITRO</i>	23
2.1. INTRODUCCIÓN	25
2.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
2.3.1. Desarrollo de las plántulas.....	31
2.3.1.1. Pérdidas de embriones.....	31
2.3.1.2. Crecimiento del tallo.	32
2.3.1.3. Formación de hojas	35
2.3.1.4. Peso fresco, peso seco y grado de hidratación.	38
2.3.2. Composición mineral.	48
2.3.3. Fracciones de N.....	55
2.3.4. Aminoácidos libres.....	59
3. INFLUENCIA DE LA FUENTE Y CONCENTRACIÓN DE N SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE OLIVO EN INVERNADERO.	63
3.1. INTRODUCCIÓN	65
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	66

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
4. INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CARBONO EN LA PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL OLIVO.....	81
4.1. INTRODUCCIÓN	83
4.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	85
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
5. ANÁLISIS PRELIMINAR DE MARCADORES POLIPEPTÍDICOS RELACIONADOS CON LA JUVENILIDAD DE LA PLANTA DE OLIVO	97
5.1. INTRODUCCIÓN	99
5.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	102
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	103
II. DISCUSIÓN GENERAL	109
III. CONCLUSIONES	121
IV. BIBLIOGRAFÍA	127

ABREVIATURAS EMPLEADAS

%GH	Porcentaje de hidratación	PVC	Cloruro de polivinilo
°C	Grados Celsius	RuBisCo	Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxidasa
$\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Unidad de irradiancia	S.E.M.	Error estándar de la media
ACC	Ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico	SDS	Dodecil sulfato sódico
ADN	Ácido desoxirribonucleico	ser	Serina
ala	Alanina	sol.sat.	solución saturada
arcsen	Arcoseno	thr	treonina
arg	Arginina	tyr	Tirosina
ARN	Ácido ribonucleico	val	Valina
ARNm	ARN mensajero		
asp	Ácido aspártico		
ATP	Trifosfato de adenosina		
BSA	Seroalbúmina bovina		
CE	Conductividad eléctrica		
cv	cultivar		
cys	Cisteína		
dS/cm	unidad de conductividad eléctrica		
g	Aceleración gravitatoria		
GDP	Difosfato de guanosina		
glu	Ácido glutámico		
gly	Glicina		
GTP	Trifosfato de guanosina		
his	Histidina		
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia		
ile	Isoleucina		
kD	Kilodalton		
leu	Leucina		
lys	Lisina		
M.D.S.	Mínima diferencia signifi- cativa		
mA	Miliamperios		
MDH	Manitol deshidrogenasa		
met	Metionina		
NTP	Nucleósido-5'-trifosfato		
OM	Olive Medium		
p.s.	Peso seco		
phe	Fenilalanina		
PITC	Fenilisotiocianato		
PMSF	Fluoruro de metil fenil sulfonilo		
ppm	Partes por millón		
pro	Prolina		

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Posibles vías de expansión del cultivo del olivo por el Mediterráneo.....	4
Figura 1.1.	Tanto por ciento de germinación de semillas con endocarpo (huesos) y semillas de distintos cultivares de olivo en condiciones de invernadero.....	18
Figura 2.1.	Longitud media de las plántulas obtenidas en la prueba 1 para cada tratamiento	32
Figura 2.2.	Longitud media de las plántulas obtenidas en la prueba 2 para cada tratamiento	34
Figura 2.3.	Longitud media de las plántulas obtenidas en la prueba 3 para cada tratamiento	35
Figura 2.4.	Promedio de pares de hojas por plántula obtenido en la prueba 1 para cada tratamiento.....	35
Figura 2.5.	Promedio de pares de hojas por plántula obtenido en la prueba 2 para cada tratamiento.....	36
Figura 2.6.	Promedio de pares de hojas por plántula obtenido en la prueba 3 para cada tratamiento.....	37
Figura 2.7.	Peso fresco medio por plántula para cada tratamiento en la prueba 1	38
Figura 2.8.	Peso fresco medio por plántula obtenido para cada tratamiento en la prueba 2.....	40
Figura 2.9.	Peso fresco medio por plántula obtenido para cada tratamiento en la prueba 3.....	41
Figura 2.10.	Resumen de los resultados de las pruebas 1, 2 y 3 para la longitud de las plántulas	43
Figura 2.11.	Resumen de los resultados de las pruebas 1, 2 y 3 para el número de pares de hojas por plántula.....	43
Figura 2.12.	Resumen de los resultados de las pruebas 1, 2 y 3 para el peso fresco por plántula.....	45
Figura 3.1.	Crecimiento de la plántula de olivo (6 meses) en sustrato de arena, en cada tratamiento de N	69
Figura 3.2.	A: Evolución de la concentración de N-NH ₄ en la solución nutritiva en los contenedores. B: Evolución de la concentración de N-NO ₃ en la solución nutritiva en los contenedores.....	74
Figura 3.3.	Experimento 4: Crecimiento de la plántula de olivo (9 meses) en sustrato de arena en cada tratamiento de N.....	76
Figura 3.4.	Crecimiento medio de la plántula de olivo en relación con el tiempo de duración del experimento	77
Figura 3.5.	Crecimiento de las plántulas de olivo (9 meses) en sustrato de	

	arena y turba (1:1 v/v) en cada tratamiento	79
Figura 3.6.	Crecimiento de las plántulas de olivo (11 meses) en sustrato de arena y turba (1:1 v/v) en cada tratamiento de NH_4NO_3	80
Figura 4.1.	Longitud de los tallos (mm) y pares de hojas formados por explantos uninodales de olivo con dos yemas tras las aplicaciones crecientes de NH_4NO_3 a un medio basal conteniendo 15.96 mM de nitrato y 30 g.l ⁻¹ de manitol	95
Figura 5.1.	Perfiles electroforéticos de: (1) hojas de plántula juvenil obtenida por germinación de embriones <i>in vitro</i> ; (2) Hojas de plántula juvenil de semilla creciendo en el exterior; (3) hojas de planta adulta cultivada en maceta; (4) hojas de planta adulta creciendo en condiciones de campo; (5) hojas de vareta, creciendo de la base del tronco del árbol y (6) extracto de flores recogidas antes de la antesis.....	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.	Composición del medio de cultivo utilizado para la germinación <i>in vitro</i>	17
Tabla 1.2.	Tanto por ciento de germinación de embriones aislados y cultivados <i>in vitro</i> en medio OM de distintos cultivares, a los 10 días de la siembra	20
Tabla 1.3.	Días necesarios para la obtención de plántulas viables a partir de huesos, semillas o embriones de olivo	21
Tabla 2.1.	Composición del medio base de cultivo utilizado para la germinación de embriones <i>in vitro</i>	28
Tabla 2.2.	Incidencia de cada tratamiento en la mortalidad de los embriones cultivados <i>in vitro</i>	31
Tabla 2.3.	Peso seco y contenido de agua (% GH) encontrado para cada tratamiento en la prueba 1	39
Tabla 2.4.	Peso seco y contenido de agua (% GH) encontrado para cada tratamiento en la prueba 2	41
Tabla 2.5.	Peso seco y contenido de agua (% GH) encontrado para cada tratamiento en la prueba 3	42
Tabla 2.6.	Composición mineral de las plántulas obtenidas en los distintos tratamientos (Media de las pruebas 1 y 2)	48
Tabla 2.7.	pH final del medio de cultivo tras 60 días de cultivo <i>in vitro</i> para cada tratamiento	50
Tabla 2.8.	Composición mineral de las plántulas obtenidas en los distintos tratamientos para la prueba 3	53
Tabla 2.9.	Fracciones de N en relación con los tratamientos de las pruebas 1 y 2 (Media de ambas pruebas)	55
Tabla 2.10.	Niveles de aminoácidos libres ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ p.s.) tras los distintos tratamientos nitrogenados (Media de las pruebas 1 y 2)	62
Tabla 3.1.	Composición mineral de las hojas de plántulas de olivo cultivadas (6 meses) en sustrato de arena estéril en relación con los tratamientos nitrogenados (Experimento 3)	71
Tabla 3.2.	Fracciones de N en relación con los tratamientos nitrogenados (Experimento 3)	72
Tabla 3.3.	Contenidos de N-NH ₄ y N-NO ₃ en las soluciones nutritivas después de 100 días de almacenamiento en los contenedores (Experimento 3)	75
Tabla 3.4.	Contenido de N-NO ₃ en el sustrato de cultivo, 6 días después de recibir un riego con soluciones nutritivas.....	75
Tabla 3.5.	Composición mineral de las hojas de plántulas de olivo cultivadas (9 meses) en sustrato de arena estéril en relación con los tratamientos nitrogenados.....	78

Tabla 4.1.	Composición del medio de cultivo utilizado OM	86
Tabla 4.2.	Longitud media (mm) de los explantos obtenidos en cada subcultivo para la prueba A	87
Tabla 4.3.	Número medio de pares de hojas obtenido en cada subcultivo para la prueba A	89
Tabla 4.4.	Efecto de las tres concentraciones de carbohidrato probadas sobre explantos uninodales de olivo <i>in vitro</i> con 2 yemas axilares, tras 60 días de cultivo	91
Tabla 4.5.	Efecto del azúcar de procedencia y de destino sobre el crecimiento de explantos de olivo <i>in vitro</i>	92

I. INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

El olivo (*Olea europaea* L.) pertenece a la familia botánica Oleaceae, que comprende especies de plantas distribuidas por regiones tropicales y templadas de todo el mundo. Las plantas de esta familia son principalmente árboles y arbustos, a veces trepadores. Muchas de ellas producen aceites esenciales en sus flores o frutos, algunos de los cuales son utilizados por el hombre. De los 29 géneros de esta familia, los que tienen interés económico u hortícola son *Fraxinus* (fresno), *Jasminum* (jazmín), *Ligustrum* (aligustre), *Phyllyea* (agracejo), *Syringa* (lilo) y *Olea* (Heywood, 1978).

Hay unas 35 especies en el género *Olea*. Todos los olivos cultivados y también los acebuches u olivos silvestres están incluidos en la especie *Olea europaea* L. Hay diferencias de opinión sobre como subclasificarlos dentro de la especie, pero generalmente se considera que los olivos cultivados pertenecen a la subespecie *sativa* y los olivos silvestres (acebuches) a la subespecie *sylvestris*.

Olea europaea L., es la única especie de la familia Oleaceae con fruto comestible (Barranco *et al.*, 1997).

Aunque no se sabe con certeza la época en la que se inició el cultivo del olivo, se conoce por los textos más antiguos que las civilizaciones del Mediterráneo Oriental cultivaron esta planta y disponían, desde los albores de la historia, de métodos primitivos para la extracción del aceite.

Herodoto, Ovidio, Apollodoro, Pausania y otros escritores de la edad antigua, discrepan al situar el inicio de la olivicultura en un lugar u otro, aunque concuerdan en afirmar que este cultivo tuvo su origen en algún país bañado por el Mediterráneo. La tradición atribuye a Ermete el inicio del cultivo del olivo en los oasis de Silla, situados entre la Cirenaica y Egipto. Plinio y Cicerón indicaron que Aristeo fue el primer cultivador del olivo y el inventor del modo de extraer el aceite. En

consecuencia, según estas opiniones, Fenicia debió ser el lugar donde se cultivó el olivo por primera vez. Investigaciones más recientes (Morettini, 1950) han demostrado que el inicio del cultivo se debe atribuir a los pueblos Semito-Camicios que ocupaban los relieves montañosos del Sur del Cáucaso. El cultivo se habría desarrollado en Siria y Palestina y de ahí habría pasado a Egipto. Posteriormente, los fenicios lo habrían difundido por las costas de Asia Menor, las islas griegas y Grecia, y los egipcios y cartagineses por el norte de África y sur de España. Fenicios y griegos continuaron la expansión por las costas mediterráneas del sur de Europa. Mucho después, los conquistadores españoles llevaron este cultivo a América y en la actualidad se está produciendo una fuerte intensificación del mismo en Asia, Australia, Nueva Zelanda y África del Sur.

En la figura 1 se reproduce un mapa con la posible difusión del olivo (Lavee, 1994), aunque no se debe olvidar que al ser una especie autóctona de la cuenca del Mediterráneo, su cultivo y uso pudo existir en alguno de esos países incluso antes de la llegada de los pueblos colonizadores.

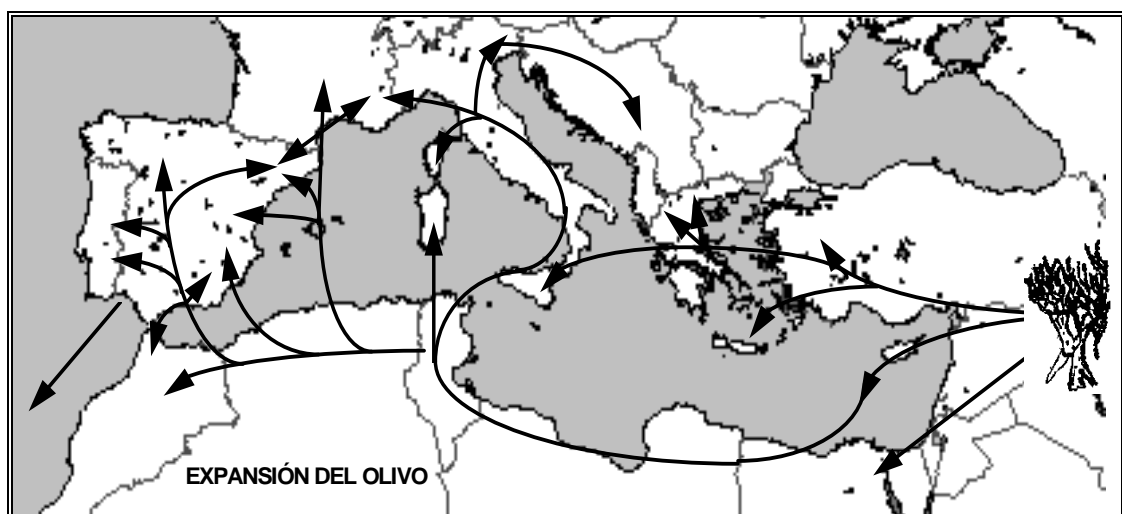


Figura 1. Posibles vías de expansión del cultivo del olivo por el Mediterráneo, durante la antigüedad (Lavee, 1994).

En las áreas indicadas, el olivo se desarrolló fundamentalmente en las laderas de las montañas, ya que las llanuras se dedicaron principalmente a los cereales y otros cultivos anuales. Por ello, la evolución natural dio lugar a poblaciones de olivos muy adaptadas a condiciones agrícolas marginales. El verano largo y seco y los suelos superficiales dieron lugar a que el olivo desarrollase mecanismos de resistencia a

situaciones de estrés ambiental. Esta resistencia está normalmente asociada a un crecimiento lento y un potencial de fructificación relativamente bajo.

El hecho de la antigüedad del cultivo del olivo y su amplia difusión ha dado lugar a una enorme variedad de cultivares locales, procedentes en su mayoría de selecciones fenotípicas de individuos silvestres, mantenidos generación tras generación por propagación agámica, por lo que las variedades actuales sólo están separadas por 1 ó 2 generaciones de sus ancestros silvestres. Esto quiere decir que el potencial genético de la especie *Olea europaea* L. no ha sido todavía realmente explotado.

La productividad del olivo es relativamente baja, particularmente en las explotaciones tradicionales de secano, lo que sumado a que la recolección del fruto no está totalmente mecanizada y a otros inconvenientes como la vecería o la baja capacidad de fructificación, limita seriamente la competitividad del olivar con respecto a otros cultivos frutales.

Por lo tanto, sería necesario un trabajo sistemático de mejora genética del olivar que rindiera nuevas variedades más adaptadas a las necesidades del agricultor en cuanto a la forma del árbol, calidad de fruto y contenido de aceite, resistencia a plagas y enfermedades, etc.

La mejora de la especie, hasta ahora, se ha basado fundamentalmente en procedimientos de selección clonal o mutagénesis artificial. Por selección se han obtenido clones mejorados de ciertos cultivares como Frantoio, Moraiolo, Leccino, Manzanillo, Picual, Ascolana, etc. (Armellini, 1960; Morettini, 1961; Toth, 1975; García-Berenguer, 1978; Abela y Fernandes-Serrano, 1983; Khlif y Trigui, 1984; Walali *et al.*, 1984; Parlati *et al.*, 1986) y mediante mutagénesis artificial se ha conseguido un nuevo cultivar italiano denominado Briscola (Roselli y Donini, 1982).

Tradicionalmente, ha existido entre los investigadores un cierto temor por abordar proyectos de mejora genética por hibridación del olivo y tan sólo recientemente están apareciendo publicaciones sobre el tema (Rugini y Lavee, 1992), habiéndose descrito los nuevos cultivares Kadesh (Lavee, 1978) y Barnea (Lavee *et al.*, 1986), producto de tales trabajos de cruzamiento.

Entre las causas que han provocado ese retraimiento se pueden citar: la baja relación floración-fructificación (1-4%) tanto en condiciones naturales (Morettini, 1972; Griggs *et al.*, 1975; Troncoso *et al.*, 1978) como tras polinización artificial y

controlada (Lavee y Datt, 1978); el largo periodo de tiempo necesario para que germine la semilla cubierta por el endocarpo leñoso así como su bajo e irregular nivel de germinación (Lalatta, 1959; Milella, 1962; Scaramuzzi y Baldini, 1963; Bini y Bellini, 1975; Diamantoglou y Mitrakos, 1979) y el excesivamente largo periodo de tiempo, a veces 10-12 años (Natividade, 1957; Rugini, 1986; Bellini, 1992), que necesita la plántula de olivo desde su germinación hasta la primera floración. Dicha fase improductiva, durante el cual la planta no florece ni puede ser inducida a florecer (Hackett, 1987), se denomina periodo juvenil y afecta a todas las especies leñosas. Su duración es variable según las especies, estando también influida por factores ambientales y genéticos (Hackett, 1985).

La transición desde el estado juvenil al estado adulto, en el cual los árboles adquieren la capacidad reproductora se ha denominado históricamente de diferentes formas: cambio de fase (Brink, 1962), envejecimiento ontogénico (Wareing, 1959; Fortanier y Jonkers, 1976) o envejecimiento meristemático (Molisch, 1922; Seeliger, 1924; Olesen, 1978). Durante este proceso se produce una alteración del desarrollo que se traduce, en general, en una reducción de la tasa de crecimiento y de la capacidad de propagación vegetativa (Schaffalitzky de Muckadell, 1959; Goodin, 1964; Sweet y Wells, 1974; Burger, 1980; Bonga, 1982; Greenwood, 1984), junto con cambios en diversos parámetros morfológicos que llevan, finalmente a la floración (Frydman y Wareing, 1973; Fortanier y Jonkers, 1976; Chang y Hsing, 1980; Cordero *et al.*, 1985).

Así pues, la maduración debe ser considerada como una acumulación de sucesos en el tiempo que producen distintos cambios, no sólo relacionados con la disminución de la tasa de crecimiento, capacidad de propagación vegetativa y floración sino que afectan a otras características morfológicas y de desarrollo, tales como plagiotropía, cambios en la morfología de la cutícula foliar (Franich *et al.*, 1977), filotaxia, plastocrono, desaparición de espinas y orientación de las ramas (Schaffalitzky de Muckadell, 1959; Cordero *et al.*, 1985), disminución de la formación de antocianinas (Murray *et al.*, 1994), distribución de fotosintatos entre el tallo principal y las ramas (Bolstad y Libby, 1982), anchura y longitud de las traqueidas (Olesen, 1982), características de la corteza (Rumball, 1963), ángulo de inserción de las ramas, número de ramas y patrón de ramificación (Libby y Hood, 1976) y resistencia a enfermedades y al frío (Hood y Libby, 1980). Sin embargo, no se ha

podido demostrar que ninguna de estas variaciones sea indispensable por si misma para la adquisición de la capacidad de florecer (Borchert, 1976; Hackett, 1987) por lo que, en general, se considera que la floración es el único hecho sólido que indica que el periodo juvenil ha terminado.

No obstante, en algunos casos se ha podido inducir floración precoz transitoria en ciertas condiciones ambientales (Hield *et al.*, 1966; Wareing, 1971) o con tratamientos con reguladores de crecimiento (Pharis y Morf, 1967 y 1968; Zimmerman *et al.*, 1985). En casos extremos, algunos embriones somáticos de *Panax ginseng* y *Phoenix dactylifera* L. pueden llegar a florecer (Chang y Hsing, 1980).

Por todo ello, Zimmerman *et al.* (1985) consideran que una planta inicia su fase adulta cuando: 1. Puede florecer y 2. Continúa floreciendo en su ambiente natural sin necesidad de estímulos artificiales.

El proceso de transición o maduración es de gran importancia práctica por las siguientes razones (Hackett, 1987):

1. La longitud del periodo juvenil está inversamente relacionada con la eficiencia de los programas de mejora genética de especies leñosas (Soost y Cameron, 1975; Hansche y Beres, 1980; Lyrene, 1981; Hansche, 1983).
2. La facilidad de propagación agámica, tanto *in vivo* como *in vitro*, es fuertemente dependiente de la edad ontogénica (Heybroek y Visser, 1976; Bonga, 1982; Hackett, 1985).
3. La cantidad y calidad de la productividad de una especie leñosa está relacionada con su grado de madurez (Heybroek y Visser, 1976).

Por lo tanto, es sumamente importante conocer el estado ontogénico del material que se selecciona, bien sea para propagación agámica o para programas de mejora genética. Sin embargo, la mayoría de los trabajos sobre el tema son solamente descriptivos (Schaffalitzky de Muckadell, 1959; Wareing, 1959; Doorenbos, 1965; Borchert, 1976), ya que se desconocen los mecanismos fisiológicos y metabólicos responsables de la transición del estado juvenil al adulto. Así, se sabe que una planta ha madurado cuando adquiere de forma permanente su capacidad reproductora, pero no se puede saber en qué momento esto ha ocurrido.

Se ha descrito que para que se produzca el cambio de fase juvenil-adulto, la planta tiene que alcanzar un desarrollo mínimo (Visser, 1965; Robinson y Wareing,

1959; Zimmerman, 1973) por lo que parece importante aumentar la velocidad de desarrollo de la planta para acortar el periodo juvenil.

Trabajos previos llevados a cabo en olivo han demostrado que la aceleración de dicha velocidad de crecimiento reduce el periodo juvenil, permitiendo que los árboles hayan podido florecer al 4º año de plantación en campo (Clavero-Ramírez, 1994; Alvarado, 1994; Mohedo, 1995). En este sentido, Lavee (1990) y Lavee *et al.* (1996), combinando tratamientos de fertilización y poda, incrementaron el ritmo de crecimiento de plántulas de olivo cultivadas en campo, con lo que acortaron sensiblemente el tiempo de juvenilidad. No obstante, aún permanecen otros factores limitantes como el grado y tiempo de germinación o el ritmo de desarrollo de la plántula en las primeras etapas de crecimiento (antes de ser plantada en campo), cuya mejora puede contribuir significativamente a un desarrollo más rápido y, con ello, acortar la fase juvenil y facilitar la realización de trabajos de mejora genética del olivo.

Sobre estas bases, en este trabajo se pretende:

- a) Incrementar el porcentaje de germinación y disminuir el tiempo que transcurre desde que se siembra la semilla hasta que germina, mediante el cultivo *in vitro* de embriones aislados.
- b) Determinar la influencia de la fuente y la concentración de N en el medio sobre el desarrollo de las plántulas *in vitro*.
- c) Determinar, asimismo, la influencia de la fuente y concentración de N en el sustrato sobre el desarrollo de plántulas en condiciones de invernadero, después de ser obtenidas *in vitro* y hasta su paso a condiciones de campo.
- d) Mejorar la propagación *in vitro* de los explantos de olivo obtenidos por germinación de embriones, variando algunos componentes del medio de cultivo.
- e) Buscar marcadores proteicos que ayuden a caracterizar las fases juvenil o adulta de la especie *Olea europaea* L.

La suma de los efectos positivos que se logren en cada uno de los objetivos planteados servirá para acelerar el crecimiento y desarrollo de las plántulas de olivo y así disminuir su periodo juvenil y ayudar a caracterizar la fase juvenil mediante proteínas específicas, asentando las bases para abordar con mayores garantías la mejora genética de esta especie.

Parte de los resultados expuestos en este trabajo han sido publicados en los siguientes artículos y comunicaciones a congresos:

Sarmiento R., Mazuelos C., García J.L., Liñán J. y Troncoso A. 1994. Effect of the form and concentration of N on the growth and mineral composition of young olive seedlings. *Acta Hortic.*, 356:156-151.

García J.L., Sarmiento R., Troncoso A. y Mazuelos C. 1994. Effect of the nitrogen source and concentration on N fractions in olive seedlings. *Acta Hortic.*, 356:193-196.

García J.L., Liñán J., Sarmiento R. y Troncoso A. 1997. Effect of different N forms and concentration on olive seedlings growth. III International Symposium on Olive Growing. Chania, Creta (Grecia).

García J.L., Troncoso A. y Sarmiento R. 1998. Fuentes de carbono en el cultivo *in vitro* del olivo. VII Simposio Nacional-III Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas. Madrid.

1. COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD DE GERMINACIÓN DE EMBRIONES AISLADOS Y CULTIVADOS *IN VITRO*, SEMILLAS Y SEMILLAS CON ENDOCARPO (HUESOS) DE OLIVO.

1.1. INTRODUCCIÓN.

Pierik (1990) resume la historia del cultivo de embriones *in vitro* refiriendo que Hanning (1904) fue el primero que obtuvo plántulas viables a partir de embriones aislados de crucíferas. Más tarde, Dietrich (1924) tuvo éxito al cultivar embriones de distintas especies vegetales y Tukey (1933a,b) logró obtener plántulas a partir de embriones abortivos de diferentes frutales de hueso.

La dormancia prolongada de la semilla del lirio iris se debe a la presencia de inhibidores en el endospermo (Randolph y Cox, 1943), lo que dificulta en gran medida su germinación. Randolph (1945) aisló el embrión y lo cultivó obteniendo plántulas con dos o tres hojas en 2-3 semanas.

Las semillas de algunos cultivares de manzano silvestre tardan en germinar 3-4 años en las condiciones más favorables, pero cultivando sus embriones aislados se produce la germinación en 24-48 horas (Nickell, 1951). Asen y Larson (1951) también consiguieron disminuir el tiempo de germinación de la rosa al utilizar embriones en lugar de semillas completas.

Al género *Ilex* pertenecen especies de gran valor medioambiental y decorativo, pero que presentan un nivel muy bajo de germinación debido a que el embrión no llega a madurar del todo dentro de la semilla. Hu (1975) desarrolló una técnica *in vitro* para germinar estos embriones inmaduros, consiguiendo que éstos maduraran y germinaran en el medio de cultivo, lo que demostró que la falta de maduración de los embriones dentro de la semilla se debía a la acción de compuestos inhibidores.

La semilla de la banana es un ejemplo de comportamiento negativo frente a la germinación. Rowe (1981) llegó conseguir hasta un 50% de germinación al emplear embriones aislados. Vanstone y Ronald (1982) cultivaron con éxito embriones de *Tilia*

americana L. y Ramming *et al.* (1990) obtuvieron buenos resultados con embriones de vid, tanto en medio líquido como en medio sólido, llegando a alcanzar, en algunos casos, germinaciones del 34%. Matte (1996) elevó esta cifra hasta el 95%.

Las variedades de maduración temprana de *Prunus* producen semillas que no germinan debido a que el embrión permanece inmaduro, tal como se indicó antes para las plantas del género *Ilex*. Burgos y Ledbetter (1994) cultivaron embriones de albaricoque en tres estadios de desarrollo y obtuvieron en todos los casos altos tantos por ciento de germinación.

Cheé (1994) puso a punto un método de cultivo *in vitro* de embriones de semillas de distintas variedades de *Taxus*.

Como se indicó antes, la obtención de plantas de olivo a partir de su semilla ha sido uno de los principales obstáculos para el avance de los proyectos de mejora genética de esta especie. Por una parte, el nivel de germinación suele ser bastante bajo, el 25% según Scaramuzzi y Baldini (1963) y cerca del 10% en algunas variedades (Lavee, comunicación personal) y, por otra, el proceso desde la recolección del fruto hasta la obtención final de una plántula viable es tan lento que, a veces, abarca más de tres años (Sotomayor y Caballero, 1990).

En los últimos tiempos se han conseguido algunas mejoras en los tantos por ciento de germinación al recolectar los frutos un poco antes de su total maduración (Lagarda *et al.*, 1983a; Caballero y Sotomayor, 1989) y, en especial, al emplear semillas desprovistas del endocarpo leñoso (Istambouli y Neville, 1977; Crisosto y Sutter, 1985). Lambardi *et al.* (1994) indicaron que la germinación de la semilla de olivo *in vitro* parece estar afectada por la presencia de compuestos que interfieren con la biosíntesis de etileno. Por esto, tratamientos con etefón o ACC (promotores de etileno) mejoraban la germinación. Recientemente, Sotomayor y Durán (1994), tras mantener las semillas en un flujo continuo de agua durante 30 días, incrementaron notablemente las posibilidades de germinación de la variedad Arbequina. No obstante, este sistema de germinación no se ha comprobado ulteriormente con otras variedades y aún conlleva un largo periodo de germinación.

En consecuencia, bien sea porque la capacidad de germinación es baja y/o porque el tiempo de la misma es muy prolongado, el uso de la semilla, con o sin endocarpo, no cubre totalmente las necesidades que se plantean en los proyectos de mejora genética del olivo. Como se ha indicado antes para otras especies vegetales, el

cultivo *in vitro* de embriones aislados se presenta como una alternativa interesante para la obtención de plantas seleccionadas o híbridos de interés por propagación sexual.

Istambouli y Neville (1977) aislaron y germinaron por primera vez embriones de olivo de la variedad Picholine, aunque indicaron que habían encontrado dormancia en los mismos. Otros autores (Lagarda *et al.*, 1983a), sin embargo, no encontraron dormancia para los embriones del cv. Manzanillo. Posteriormente, Rugini *et al.*, (1979), Cañas *et al.*, (1987), García *et al.* (1994), Sarmiento *et al.* (1994), Voyiatzis y Pritsa (1994) y Acebedo *et al.* (1997) en trabajos sucesivos mejoraron la técnica y los resultados.

1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Como material vegetal inicial se utilizaron frutos de los cultivares Arbequina (*Olea europaea herdensis* Colm.) y Picual (*Olea europaea rostrata* Risso), como representativas de la producción de aceite y Manzanilla (*Olea europaea pomiformis* Clem.) y Gordal (*Olea europaea regalis* Clem.), las más típicas como aceitunas de mesa.

En todos los casos los frutos se recolectaron después del envero, al principio de la maduración cuando ya el embrión había alcanzado su tamaño máximo y estaba completamente maduro (Liñán *et al.*, 1998). Después de recolectados, los frutos que iban a ser utilizados para la germinación de huesos y semillas se almacenaron tres meses en cámara fría a 4 °C, para que tuvieran el necesario periodo de reposo y frío que ayuda a vencer la dormancia (Istambouli y Neville, 1977; Voyiatzis y Pritsa, 1994). Por el contrario, los frutos para obtener embriones se utilizaron inmediatamente.

Para la obtención de huesos, los frutos se tomaron de la cámara fría y se les quitó la pulpa con una deshuesadora comercial de punzón. Los restos de pulpa adheridos al hueso se eliminaron frotándolos con un estropajo. Una vez completamente limpios, los huesos se pusieron en una solución salina (200 g.l⁻¹ de NaCl), desechándose aquéllos que flotaron.

Se sembraron individualmente 50 huesos de cada uno de los cultivares utilizados en vasos de polietileno de 300 cc con sustrato de perlita y turba (1:1 v/v) y se depositaron en el invernadero durante un año (Marzo-Marzo) cuidando de que el sustrato estuviese siempre húmedo. En este experimento no se utilizaron huesos de la

variedad Gordal debido a su bien conocida falta de respuesta a este tipo de germinación.

Para la obtención de las semillas se siguió la técnica de Sotomayor y Caballero (1990), cortando el endocarpo leñoso con un cortatubos. Las 50 semillas por variedad, seleccionadas por su buen desarrollo y aspecto, se sembraron de forma idéntica a la descrita para los huesos, dejándose en el mismo invernadero.

Para la obtención de embriones aislados no fue necesario esperar al periodo de almacenamiento en frío. A partir de los frutos recolectados, se obtuvieron los huesos y de éstos las semillas, tal como se describió antes. Las semillas fueron esterilizadas por inmersiones, primero en etanol absoluto (3 min) y, posteriormente, en una mezcla de hipoclorito sódico y HCl (30:1; v/v) durante 15 min en agitación constante. Finalmente, las semillas se enjuagaron con abundante agua estéril y se colocaron en placas de Petri, también con agua estéril, durante 48 h a 25 °C. De esta forma, se provocó una fuerte hinchazón de la semilla que facilitó la extracción del embrión, la cual se realizó cortando con bisturí dos secciones laterales del endospermo que dejaron visible el embrión, sacándolo entonces con la punta del bisturí. Se aislaron 90 embriones de cada cultivar que se sembraron individualmente en tubos de ensayo (21x150 mm) que contenían 10 ml de medio de cultivo OM (Rugini, 1984), diluido 1/2, sin reguladores de crecimiento (tabla 1.1), tapados con cubierta de plástico y sellados con parafilm y depositados en cámara de cultivo a 23 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 h de luz. La iluminación se realizó con tubos fluorescentes F38W/133ST Cool White que proporcionaron una intensidad luminosa de $30 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

En el cultivo *in vitro* de embriones se definió germinación como el inicio del crecimiento de la radícula y el hipocótilo y la apertura y cambio de color de los cotiledones. Los huesos y semillas se consideraron germinados cuando asomó el ápice del hipocótilo sobre la superficie del sustrato. El posterior desarrollo (formación de un verdadero sistema radical, epicótilo y hojas) se consideró como la constitución de una plántula verdadera. Las medidas de crecimiento se realizaron individualmente para cada plántula, tomándose como longitud del tallo la del epicótilo, es decir la distancia entre la inserción de los cotiledones y el ápice.

Tabla 1.1. Composición del medio de cultivo utilizado para la germinación de embriones in vitro. Este medio se completó con 10 g.l⁻¹ de sacarosa y 6 g.l⁻¹ de agar Merck como agente gelificante.

Macronutrientes	mg.l ⁻¹	Micronutrientes	mg.l ⁻¹	Vitaminas	mg.l ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	750.00	MnSO ₄ .H ₂ O	11.15	Ac. nicotínico	5.00
KNO ₃	550.00	ZnSO ₄ .5H ₂ O	7.15	Tiamina HCl	0.50
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	300.00	H ₃ BO ₃	6.20	Piridoxina HCl	0.50
KCl	250.00	KI	0.42	Ac. fólico	0.50
CaCl ₂ .2H ₂ O	220.00	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.13	Biotina	0.05
NH ₄ NO ₃	206.00	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.13	m-Inositol	50.00
KH ₂ PO ₄ .12H ₂ O	170.00	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.013	Glicina	1.00
Fe-EDTA					
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80				
Na ₂ EDTA	37.50				

Las plántulas procedentes de embriones aislados, después de 2 meses de cultivo *in vitro*, se transplantaron siguiendo el método indicado por Troncoso *et al.* (1991), individualmente a contenedores de 300 cc con sustrato de perlita y turba (1:1 v/v) para mantenerlos en las mismas condiciones que las plántulas provenientes de semillas y huesos, que se dejaron durante el año de ensayo en el contenedor de germinación.

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando se utilizaron huesos del cultivar Picual, los primeros síntomas de germinación aparecieron a los 240 días de la siembra, cuando fueron visibles los hipocótilos de 3 plantas (6%) (fig. 1.1). En los siguientes 30 días sólo se produjeron dos nuevas germinaciones, lo que hizo un total de 5 plántulas (10%). No fue hasta los 300 días desde la siembra cuando se alcanzó un elevado índice de germinación (60%) que ya sólo aumentó un 5% adicional durante el tiempo restante del experimento (360 días).

El máximo de germinación de huesos obtenido con esta variedad a los 11 meses de la siembra fue muy superior a los indicados para otras variedades por diferentes autores (Scaramuzzi y Baldini, 1963; Bini y Bellini, 1975; Diamantoglou y Mitrakos, 1979). Este valor tan elevado significó en primer lugar una buena predisposición del

cultivar Picual para germinar, así como que la selección previa de los huesos y las condiciones de germinación fueron adecuadas. En cualquier caso, el periodo de germinación fue elevado, casi 1 año, claramente excesivo para las necesidades que se plantean en los proyectos sobre mejora genética.

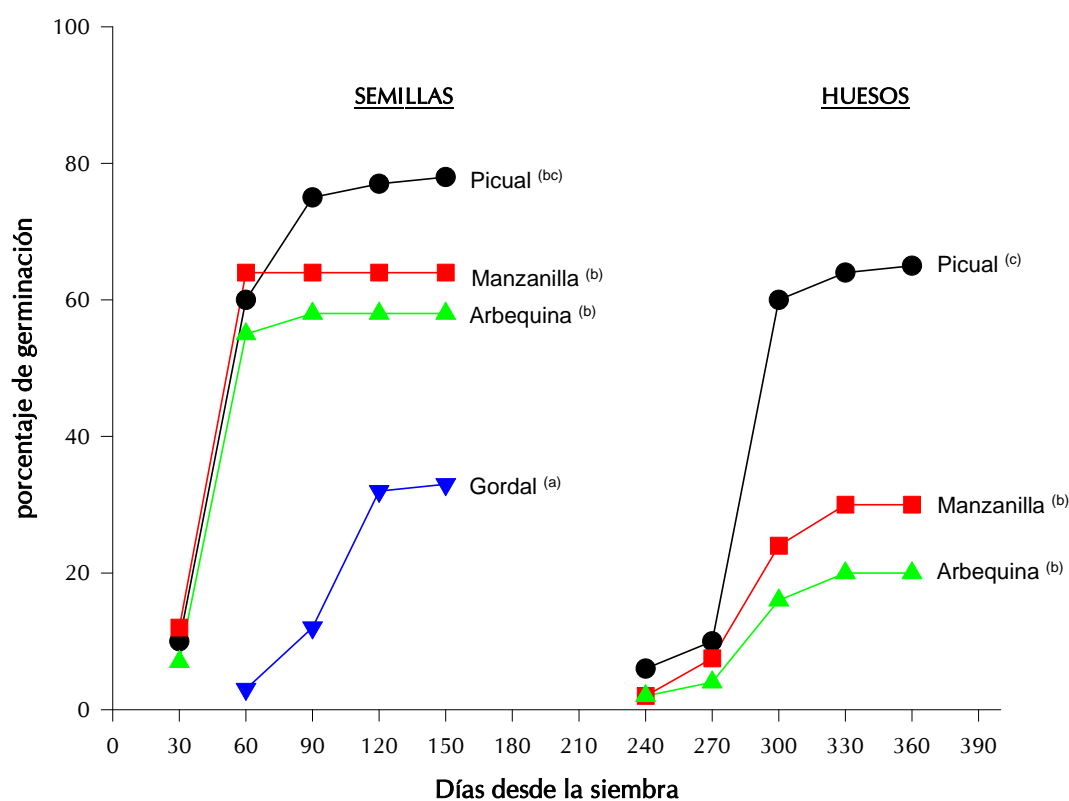


Figura 1.1. Porcentaje de germinación de semillas y semillas con endocarpo (huesos) de distintos cultivares de olivo en condiciones de invernadero. Letras distintas entre paréntesis indican significación estadística (*t* Student, $p < 0.05$)

Aunque con porcentajes finales de germinación más bajos que el anterior (Manzanillo 30% y Arbequina 20 %), la marcha del proceso de germinación de los huesos de estas dos variedades fue muy parecido a la de Picual: aparecieron las primeras germínolas aproximadamente a los 240 días desde la siembra, se mantuvo un nivel bajo de germinación durante el siguiente mes y fue a partir de los 300 días cuando se alcanzó el máximo nivel de germinación. Los porcentajes finales obtenidos para Manzanilla y Arbequina coincidieron con los indicados en la bibliografía para otras variedades y condiciones (Scaramuzzi y Baldini, 1963; Bini y Bellini, 1975; Diamantoglou y Mitrakos, 1979). El grado de germinación diferente mostrado entre la variedad Gordal y las otras dos estudiadas coincidió con lo indicado por Lalatta (1959)

y Milella (1962) sobre relación entre la capacidad de germinación y la variedad de olivo.

A los 60 días desde la germinación, es decir, a los 360 días desde la siembra, la longitud media del tallo (distancia entre la inserción de los cotiledones y el ápice) de las plántulas de las tres variedades en consideración, fue de 1.81 cm y se habían diferenciado 1-2 pares de hojas.

Al eliminar el endocarpo leñoso y dejar libre la verdadera semilla, la respuesta a la germinación de las tres variedades indicadas antes fue mejor que la obtenida con los huesos (fig. 1.1), tanto en el tiempo necesario para iniciar la germinación como en el porcentaje de plantas germinadas. Las semillas de los cultivares Picual, Manzanilla y Arbequina mostraron un comportamiento muy parecido entre sí. Las primeras germinaciones (cerca al 10%) se produjeron al mes de la siembra y en otro mes, es decir a los 60 días desde la siembra, se habían alcanzado niveles de germinación del orden del 60%, sin diferencias estadísticas entre las tres variedades. Este nivel prácticamente se mantuvo en los meses siguientes. En consecuencia, conjugando tiempo y rendimiento, se definió el periodo de dos meses como el necesario para lograr un porcentaje elevado de germinación en los cultivares Picual, Arbequina y Manzanilla.

El hecho de que las semillas de estas variedades mejoraran notablemente tanto el tiempo como el nivel de germinación, concordó con lo indicado por autores como Lambardi *et al.* (1994), Sotomayor y Durán (1994) y Rinaldi *et al.* (1994) y reforzó lo dicho por Lagarda *et al.* (1983b) y Crisosto y Sutter (1985) de que el endocarpo leñoso es una barrera mecánica para la germinación que, además, obstaculiza la hidratación, oxigenación y transpiración de la semilla (Mitrakos y Diamantoglou, 1984).

El cultivar Gordal mostró un comportamiento peor que los tres anteriores tanto en el nivel de germinación al alcanzarse solamente un 30%, como en el tiempo ya que el nivel indicado se logró a los 4 meses de la siembra (fig 1.1). Esta peor respuesta de la variedad Gordal a la propagación sexual coincidió con su comportamiento a la propagación agámica (Troncoso *et al.*, 1990; Sotomayor y Caballero, 1994).

El crecimiento de la germínula hasta formar una verdadera plántula también pareció estar influenciado por la presencia o no de endocarpo leñoso. Después de 60 días desde la germinación, la longitud del tallo medio de las nuevas plántulas alcanzó 4.10 cm y entre 3-4 pares de hojas. Es decir, un desarrollo claramente superior al

indicado antes para las plántulas provenientes de hueso (1.81 cm y 1-2 pares de hojas). Este mayor desarrollo de la parte aérea de la planta estuvo relacionado con un desarrollo proporcional del sistema radicular que, en consecuencia, se vio favorecido por la eliminación de la barrera física que representa el endocarpo.

En cuanto a los embriones aislados y cultivados *in vitro*, se produjo la germinación prácticamente total de los mismos 10 días después de su siembra (tabla 1.2). No obstante, un 6% de los embriones germinados no llegaron a formar plántulas, bien por fallos en el desarrollo del sistema radical o por falta de crecimiento del epicótilo para formar el tallo. Es decir, que se disminuyó drásticamente el tiempo necesario para la germinación de semillas (60-90 días según variedades) o de huesos (300-330 días), se elevó hasta el máximo posible el porcentaje de germinación y se eliminaron las diferencias entre variedades. De acuerdo con estos resultados, parece evidente el efecto inhibitorio o dormancia que ejerce el endospermo sobre la germinación de los embriones, ya descrito por otros autores (Istambouli y Neville, 1977; Mitrakos y Diamantoglou, 1984) y que se ha propuesto que se debe a inhibidores presentes en el endospermo (Istambouli y Neville, 1977; Diamantoglou y Mitrakos, 1979; Lagarda y Martin, 1983; Lagarda *et al.*, 1983b; Lambardi *et al.*, 1994).

Tabla 1.2. Porcentaje de germinación de embriones aislados y cultivados *in vitro* en medio OM (Rugini, 1984) de distintos cultivares, a los 10 días de la siembra.

Arbequina	Gordal	Manzanilla	Picual
100	98	99	100

Aunque recientemente se ha sugerido que los embriones aislados de olivo también presentan dormancia (Voyiatzis y Pritsa, 1994; Voyiatzis, 1995), sin embargo los resultados aquí expuestos demuestran que el embrión de olivo, incluso de un cultivar tan recalcitrante a la propagación como Gordal, no estuvo afectado por ningún proceso inhibitorio de la germinación, en concordancia con lo indicado por otros autores (Rugini *et al.*, 1979; Lagarda *et al.*, 1983a).

En consecuencia, de acuerdo con los resultados obtenidos a partir de huesos, semillas y embriones la máxima dificultad y mayor grado de dormancia la presentó el hueso, bajó bastante en la semilla al eliminar el efecto del endocarpo y desapareció

en el embrión aislado, lo que demuestra que el efecto dormancia estaba relacionado con los tejidos de la semilla que envuelven al embrión.

Tras 60 días de cultivo *in vitro* desde la germinación, los embriones habían dado lugar a plántulas de 2.8 cm de longitud media, dotadas de 2-3 pares de hojas. Es decir, que con el cultivo *in vitro*, en las condiciones de medio nutritivo empleadas se obtuvo un desarrollo intermedio entre el indicado para el hueso (1.8 cm y 1-2 pares de hojas) y la semilla (4.1 cm y 3-4 pares de hojas). En el trasplante de las plántulas así obtenidas a condiciones de invernadero se produjo, como promedio, un 7% de pérdidas sobre el total de las obtenidas. Esto significó que, de cada 100 embriones sembrados, 13 no llegaron a formar plántulas en condiciones de invernadero (6 se perdieron en el paso de germinación y 7 en el trasplante).

De los resultados indicados se pueden destacar los siguientes aspectos que sirven para definir las posibilidades de empleo de cada método de germinación:

El uso de huesos (semillas cubiertas por el endocarpo leñoso) determinó el rendimiento conjunto más bajo de germinación, con variaciones importantes entre cultivares (excepcionalmente alta en Picual y baja en Manzanillo y Arbequina), el tiempo más largo para obtener una plántula viable (tabla 1.3) y el menor desarrollo de dicha plántula en los primeros 60 días de su germinación. Estos datos desaconsejan por completo el uso de huesos para la obtención de plántulas en trabajos de mejora

Tabla 1.3. Días necesarios para la obtención de plántulas viables a partir de huesos, semillas o embriones de olivo.

Operación	Nº de días desde la recolección		
	Huesos	Semillas	Embriones
Almacenamiento a 4 °C	90	90	0
Preparación, Almacenamiento, Siembra	30	30	10
Germinación	300	60	10
Plántula Viable	60	60	60
TIEMPO TOTAL	480	240	80

genética, ya que ofrecen poca garantía de germinación, demasiado tiempo para llegar a obtenerlas y, en principio, una calidad mediocre de las mismas. No obstante, debido a la poca especialización necesaria para realizar esta metodología y a su bajo

coste económico, el procedimiento puede ser válido para la propagación masiva de portainjertos en viveros.

El uso de semillas para la obtención de plántulas incrementó el porcentaje de germinación de las variedades Manzanillo y Arbequina que habían tenido peor comportamiento al emplear huesos, aunque todavía un cultivar como Gordal, que siempre suele plantear problemas de propagación, mostró niveles bajos de germinación. El tiempo necesario para obtener una plántula viable y, en este caso, de buena calidad fue la mitad que el indicado para los huesos, aunque aún elevado.

Este procedimiento lo único que modificó al anterior fue en la operación de romper y eliminar el endocarpo, cosa no difícil ni excesivamente costosa. Por sus características, el uso de semillas puede reemplazar perfectamente y con ventajas al de huesos e incluso, es un material adecuado para la obtención de plántulas en trabajos de mejora en los que existan semillas suficientes por provenir de polinización cruzada libre o no se disponga de la técnica de cultivo *in vitro*.

El cultivo *in vitro* de embriones se mostró como el método más rápido para la obtención de plántulas y, en consecuencia, el que más ayudó a acortar el primer periodo de crecimiento y con ello la juvenilidad. También fue el que proporcionó el mayor porcentaje de germinación, incluso con cultivares que habían demostrado mala predisposición al uso de huesos o semillas. Por el contrario, este método exige una determinada especialización e infraestructura, además de ser económicamente costoso por lo que es recomendable en trabajos de mejora con semillas de interés.

2. INFLUENCIA DE LA FUENTE Y CONCENTRACIÓN DE N SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA COMPOSICIÓN DE EMBRIONES DE OLIVO GERMINADOS *IN VITRO*.

2.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior se vio que la germinación *in vitro* de embriones aislados de olivo es una poderosa herramienta que permite obtener plántulas viables de manera rápida y segura, con lo que se consigue un importante ahorro de tiempo frente a los métodos tradicionales de propagación mediante huesos y semillas. Complementariamente a la obtención de elevados porcentajes de germinación en poco tiempo, parece importante conseguir que los embriones que han germinado crezcan el máximo posible durante su estancia dentro del tubo de cultivo. De este modo, se puede acelerar aún más el desarrollo de las plántulas obtenidas para que éstas, una vez transplantadas a condiciones de invernadero o campo, se encuentren en la mejor disposición y, así, continuar un rápido crecimiento hasta plantas adultas, lo que ayudará a disminuir su periodo juvenil improductivo (Visser, 1965; Robinson y Wareing, 1969; Zimmerman, 1973).

En este sentido, los nutrientes minerales son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Marschner, 1986). De ellos, el N es uno de los más importantes al formar parte de innumerables compuestos orgánicos, componentes naturales de las plantas, como ácidos nucleicos, aminoácidos y proteínas, auxinas y citoquininas, etc., claves todos ellos para la vida vegetal.

El N se encuentra disponible en la biosfera en diferentes formas que incluyen N₂ molecular, amonio volátil u óxidos de N, N mineral (NH₄⁺ y NO₃⁻) y N orgánico (aminoácidos, péptidos, etc.). Debido a la gran necesidad de N que tienen las plantas no es sorprendente que puedan utilizar todas estas formas, con excepción del N₂ molecular que está restringido a aquellas especies que viven en simbiosis con bacterias fijadoras de N. Sin embargo, la utilización de estas fuentes de N está

fuertemente determinada por las condiciones ambientales y del suelo que son las que producen las diferentes formas de N (von Wirén *et al.*, 1997).

En suelos agrícolas bien aireados, el NO_3^- es la forma de N más abundante debido a los procesos naturales de nitrificación (Troncoso *et al.*, 1987), mientras que en suelos donde la nitrificación está inhibida, como por ejemplo en climas fríos, el NH_4^+ es la forma dominante (Sasakawa y Yamamoto, 1978).

Así pues, aunque las plantas toman NO_3^- o NH_4^+ según la disponibilidad de cada ion, en condiciones agrícolas la concentración en suelo del primero oscila entre 0.5 y 10 mM, mientras que la del segundo suele ser 10-1000 veces más baja (Marschner, 1995), por lo que el NO_3^- suele ser la forma normalmente utilizada por las plantas. No obstante, algunas especies como *Picea glauca* (Moench)Voss presentan una preferencia estricta por el NH_4^+ (Kronzucker *et al.*, 1997) y las plantas adaptadas a terrenos encharcados y suelos muy ácidos pueden incluso preferir la nutrición con N- NH_4 (Goyal y Huffaker, 1984).

Por lo tanto, el nitrato es la forma de N generalmente más disponible para la nutrición vegetal a pesar de ser una fuente de N metabólicamente más costosa que el amonio, entre otras cosas por el hecho de que el nitrato debe ser reducido a amonio tras ser captado del ambiente. Raven (1985) estimó que el coste energético para una planta que asimila amonio es de 296 fotones por mol de N asimilado, comparado con los 305 fotones por mol de N asimilado que consume la asimilación de nitrato. Por ello, en presencia de amonio, muchas plantas lo toman con preferencia sobre el nitrato (Wilcox *et al.*, 1985; Scheromm y Plassard, 1988; Marschner *et al.*, 1991; Kamminga-Van Wijk y Prins, 1993).

Por otra parte, existen evidencias de que el crecimiento vegetal se ve estimulado con la aplicación de ambas formas de N simultáneamente, en lugar de cada una por separado (Cox y Reisenauer, 1973; Lewis y Chadwick, 1983; Kirkby *et al.*, 1987; Hagin *et al.*, 1990). La razón de esto no está clara pues, en general, se considera que la asimilación de amonio inhibe la de nitrato (Ingestad, 1979; Boxman y Roelofs, 1988; Marschner *et al.*, 1991), aunque parece que dicha inhibición no es completa (MacKown *et al.*, 1982; Ullrich *et al.*, 1984; Kamminga-Van Wijk y Prins, 1993).

En los cultivos *in vitro*, en los que no se producen procesos de nitrificación, es sumamente importante la fuente y concentración de N que se suministra a las plantas,

ya que tiene efectos significativos en la tasa de crecimiento celular, morfología y totipotencia (Thorpe, 1980).

En condiciones de cultivo *in vitro*, las células vegetales tienen una asombrosa versatilidad a la hora de asimilar N. Por ejemplo, las células de tabaco han sido cultivadas con fuentes de N tan variadas como sólo nitrato (Behrend y Mateles, 1975; Bergmann *et al.*, 1976), sólo amonio (Behrend y Mateles, 1975; Behrend y Mateles, 1976), sólo urea (Skokut y Filner, 1980), hidrolizado de caseína o ácido α -aminobutírico (Filner, 1966; Heimer y Filner, 1970) y lo mismo se puede decir de otras especies como zanahoria o soja. Tanta versatilidad no es tan sorprendente si se considera que el N es el primer factor limitante del crecimiento de las plantas, por lo que las células se ven obligadas a adaptar sus sistemas asimilatorios a la fuente de N disponible.

La mayoría de los medios de cultivo para plantas, incluyendo aquéllos que se utilizan para especies forestales, incorporan tanto nitrato como amonio en su formulación (Street, 1973; Gamborg y Shyluk, 1981; Kirkby *et al.*, 1987). En los primeros trabajos realizados con cultivos celulares de zanahoria, se observó que la embriogénesis se veía fuertemente inhibida cuando el nitrato era la única fuente de N suministrada, mientras que la adición de pequeñas cantidades de amonio estimulaban tanto el crecimiento como la embriogénesis (Wetherall, 1978). Este efecto sinérgico parece deberse al patrón de utilización de ambas formas de N, pues las células de zanahoria, soja o *Ipomea* utilizan inicialmente amonio para después usar el nitrato (Veliky y Rose, 1973; Sargent y King, 1974; Rose y Martin, 1975).

Por tanto, parece claro que la fuente y concentración de N ejerce una notable influencia sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas cultivadas *in vitro*, siendo numerosos los investigadores que han evaluado dicho efecto (Anderson, 1984; Driver y Kuniyuki, 1984; Hutchinson, 1984; Evers, 1985; Loreti *et al.*, 1988; Pierik *et al.*, 1988; Vieitez *et al.*, 1989; Troncoso *et al.*, 1990; Sarmiento *et al.*, 1992; Villegas *et al.*, 1992), aunque sus conclusiones no son homogéneas, probablemente porque utilizaron especies diversas.

En olivo, no hay prácticamente experimentación sobre la influencia de la fuente y concentración del N en el crecimiento de esta especie *in vitro* (Troncoso *et al.*, 1991; García *et al.*, 1994; Sarmiento *et al.*, 1994). En este capítulo se pretende estudiar la influencia de la fuente y concentración de N en la germinación y

crecimiento de embriones aislados de olivo *in vitro*, con objeto de buscar las condiciones más adecuadas para este proceso y así obtener plántulas lo más desarrolladas posibles.

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

En todos los experimentos se utilizó como material vegetal, embriones aislados de olivo, cv. Manzanillo cuyo proceso de esterilización, aislamiento, siembra y cultivo *in vitro* (salvo el medio de cultivo) fue igual al descrito en el capítulo 1, apartado 1.2.

En la primera y segunda pruebas, se empleó como medio base el OM (Rugini, 1984) a $\frac{1}{2}$ de concentración (Cañas *et al.*, 1987), con sólo 300 mg.l⁻¹ de Ca(NO₃)₂ como fuente de N, tal y como se describe en la tabla 2.1. Para cada prueba se formaron 12 grupos de 48 embriones cada uno, cuyo medio nutritivo respectivo se obtuvo al añadir al base una de las sales de N probadas (KNO₃, NH₄NO₃ o (NH₄)₂SO₄) a una de las siguientes concentraciones: 5, 10, 20 y 30 mM de N. De este modo, la concentración de N real sobre la que se cultivó cada grupo de embriones fue de 7.54, 12.54, 22.54 y 32.54 mM, respectivamente.

Tabla 2.1. Composición del medio base de cultivo utilizado para la germinación de embriones in vitro. Este medio se completó con 10 g.l⁻¹ de sacarosa y 6 g.l⁻¹ de agar Merck como agente gelificante.

Macronutrientes	mg.l ⁻¹	Micronutrientes	mg.l ⁻¹	Vitaminas	mg.l ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	750.00	MnSO ₄ .H ₂ O	11.15	Ac. nicotínico	5.00
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	300.00	ZnSO ₄ .5H ₂ O	7.15	Tiamina HCl	0.50
KCl	250.00	H ₃ BO ₃	6.20	Piridoxina HCl	0.50
CaCl ₂ .2H ₂ O	220.00	KI	0.42	Ac. fólico	0.50
KH ₂ PO ₄ .12H ₂ O	170.00	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.13	Biotina	0.05
Fe-EDTA		CuSO ₄ .5H ₂ O	0.13	m-Inositol	50.00
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.013	Glicina	1.00
Na ₂ EDTA	37.50				

En el tercer ensayo se empleó como medio base el mismo descrito antes (tabla 2.1) pero sin N. Se cultivaron 48 embriones individualmente en tubos de ensayo

sobre este medio, lo que constituyó el control de la prueba. Se formaron además otros 9 grupos de 48 embriones cada uno, cultivados, en cada caso, sobre un medio obtenido al añadir al base una sal de N (KNO_3 , NH_4NO_3 ó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) a concentraciones de 1 y 3 mM de N.

Transcurridos 60 días desde la siembra de los embriones, a las plántulas obtenidas se le midieron los siguientes parámetros: Peso fresco, peso seco, longitud de la parte aérea y número de pares de hojas. El peso seco se determinó tras desecación en estufa a 60 °C durante 48 h. El grado de hidratación (%GH) se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ G.H.} = \frac{\text{Peso Fresco} - \text{Peso Seco}}{\text{Peso Fresco} \times 100}$$

Las plántulas desecadas se molieron y el polvo se usó para los análisis que se indican a continuación.

El N total se determinó por el método Kjeldahl con modificación del ácido salicílico (Nehring, 1960), el P por colorimetría, K y Na por fotometría de llama, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn y Zn por absorción atómica, siguiendo la técnica descrita por Pinta *et al.* (1969; 1973) y el S según el método de Bardsley y Lancaster (1965).

Las fracciones de nitrógeno: N-proteico, N-amínico, N-amídico, N-amoniacal y N-total se determinaron en la parte aérea de las plántulas según el método descrito por Sarmiento *et al.* (1977). Alrededor de 0.5 g del material vegetal seco y pulverizado se suspendieron en 35 ml de H_2SO_4 0.05N y fueron sometidos a baño maría durante 1 hora. Después, se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente y se filtró a través de papel Whatman nº 1. El residuo que quedó en el filtro se lavó con 50 ml de H_2SO_4 0.05N. Ambos filtrados se juntaron y la solución resultante se enrasó a 100 ml con agua destilada. En una alícuota del extracto sulfúrico anterior se determinó el contenido total de N soluble orgánico por el método de Kjeldahl. Para la determinación del N-amídico, otra alícuota del mismo extracto se destiló en aparato para microdeterminación de N con 6 ml de NaOH 40%. El destilado se recogió sobre una solución de ácido bórico 5% conteniendo unas gotas del indicador Tashiro y se valoró frente a HCl 0.002N. El N-amínico se calculó sustrayendo del valor obtenido para el N soluble orgánico total, el correspondiente al N-amídico.

El N-proteico se determinó a partir del residuo sólido que quedó en el filtro tras la extracción del N soluble orgánico total. Dicho residuo se llevó a sequedad en el

horno. En una alícuota de este residuo seco se determinó el contenido de N según el método de Kjeldahl.

Finalmente, la suma de los valores correspondientes al N soluble total y al N-proteico, condujo a la obtención del valor de N-total.

El procedimiento de extracción y purificación de aminoácidos llevado a cabo se basó en el descrito por Sarmiento (1974). Una alícuota de 0.5 g de material vegetal pulverizado fue suspendida en etanol 80% y sometida a baño maría durante 2-3 horas para su extracción. Después, la mezcla se centrifugó durante 15 min a 23500g y el sobrenadante se llevó a sequedad con un rotavapor, siendo posteriormente resuspendido el residuo seco con 25 ml de agua destilada caliente. Esta solución se purificó con 0.2 ml de acetato de plomo (sol.sat.) durante 10 min y posterior centrifugado (15 min a 23500g). El exceso de Pb en el sobrenadante se eliminó añadiendo 0.4 ml de Na_2HPO_4 (sol.sat.). Después de 10 min se volvió a centrifugar en las mismas condiciones que antes y el sobrenadante se pasó a través de columnas con resina Dowex-50W de cambio catiónico para separar los aminoácidos. Las columnas se habían activado previamente con 3 volúmenes de HCl 1N, seguido de lavado abundante con agua. Una vez pasado el extracto por la columna se lavó ésta con agua y los aminoácidos se eluyeron con NH_4OH 4N en etanol 50%. Se llevó a sequedad el eluato y se lavó el recipiente un par de veces con etanol. Finalmente, se redisolvió el extracto con 3 ml de agua Milli-Q, se centrifugó como antes y se filtró a través de filtros de 0.45 μm . Las muestras fueron guardadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización.

El análisis de las muestras se realizó mediante HPLC (Waters, EEUU), utilizando una columna Nova-Pak C_{18} (Waters Assoc., EEUU) de 15 cm de longitud y 4 μm de tamaño de partícula. Previamente, las muestras fueron sometidas a una reacción de derivatización con PITC según el método descrito por Heinrikson y Meredith (1984).

El aparato se calibró con una solución patrón de aminoácidos (Sigma AA-S-18) que contenía 2.5 $\mu\text{mol/ml}$ de los siguientes aminoácidos: Alanina, Arginina, Ácido Aspártico, Ácido Glutámico, Glicina, Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Prolina, Serina, Treonina, Tirosina y Valina. La Cistina se encontraba en concentración de 1.25 $\mu\text{mol/ml}$.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Desarrollo de las plántulas

2.3.1.1. Pérdidas de embriones

En el capítulo anterior se indicó que un 6% de los embriones germinados *in vitro* no llegaron a formar verdaderas plántulas, bien porque no desarrollaron el sistema radical o bien porque no creció el epicótilo para formar el tallo. Liñán *et al.* (1998) relacionaron estas pérdidas con el grado de madurez del embrión. De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 2.2, el medio nutritivo, en relación con el tipo de sal de N y su concentración, también influyó sobre las pérdidas de embriones maduros *in vitro*. Así, el uso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ provocó la muerte de un número significativamente superior de embriones con respecto a los otros tratamientos, sin que existieran diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos con las otras dos sales, las cuales mejoraron apreciablemente el resultado indicado en el Capítulo 1 (alrededor del 7% de pérdidas).

Tabla 2.2. Incidencia de cada tratamiento en la mortalidad en los embriones cultivados in vitro.

mM de N		% sobre nº de embriones sembrados		
añadido	real	KNO ₃	NH ₄ NO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄
5	7.54	0.00 ^a	1.67 ^{ab}	12.14 ^{cd}
10	12.54	0.67 ^{ab}	6.41 ^{bc}	16.81 ^{cde}
20	22.54	3.06 ^{ab}	4.17 ^{bc}	29.49 ^e
30	32.54	3.13 ^{ab}	1.67 ^{ab}	16.78 ^{de}

Media de 3 pruebas. Análisis de la varianza realizado con datos transformados ($\arcsen \sqrt{n}$). Letras distintas indican significación estadística para $p < 0.05$ (test de mínimas diferencias significativas).

En muchos casos, estas bajas se pudieron relacionar con un desarrollo deficiente del sistema radical, cuyas raíces fueron muy cortas, engrosadas y con necrosis en las puntas, denotando claros signos de toxicidad. Estos síntomas coincidieron con lo descrito por otros autores para plantas cultivadas con exceso de amonio en sistemas hidropónicos (Bennet *et al.*, 1964; Maynard y Barker, 1969; Cox y Reisenauer, 1973).

Por otra parte, Bartolini *et al.* (1991) describieron que el exceso de SO_4^{2-} afectó negativamente el desarrollo radicular de plantas jóvenes de olivo cultivadas en hidroponía. Con independencia del efecto tóxico atribuible a cada ion, que será considerado con posterioridad, quedó claro que la presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el medio afectó negativamente la supervivencia de los embriones.

2.3.1.2. Crecimiento del tallo.

Los resultados de la prueba 1 (fig. 2.1) indicaron que cuando se relacionó el tipo de sal nitrogenada y su concentración con el crecimiento del tallo (considerado como la longitud de la parte aérea de la plántula, desde el inicio de la raíz), las aportaciones de N como NH_4NO_3 fueron más efectivas que las de los otros compuestos. A los 60 días de cultivo *in vitro* se obtuvieron longitudes de tallo medias de 27.4 mm, sin diferencias significativas entre las distintas concentraciones de sal utilizadas.

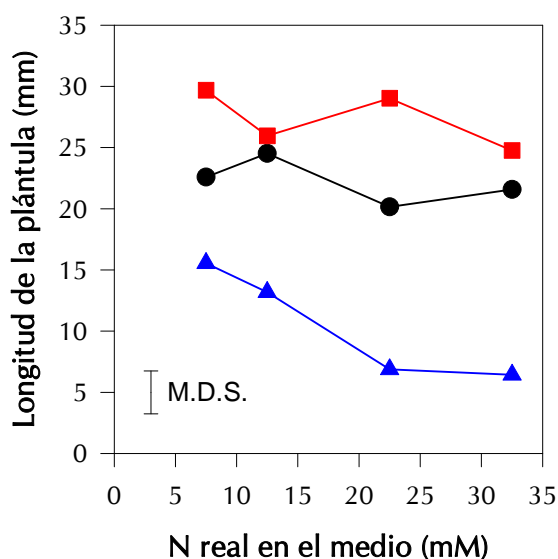


Figura 2.1. Longitud media de las plántulas obtenidas en la prueba 1 para cada tratamiento.

(●) KNO_3 ; (■) NH_4NO_3 ; (▲) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Mínima diferencia significativa (M.D.S.) para $p < 0.05$.

Los tratamientos con KNO_3 , sin variaciones significativas entre las distintas concentraciones aplicadas (fig 2.1) originaron un crecimiento medio del tallo de 22.2 mm a los 60 días de cultivo, inferior al indicado para NH_4NO_3 .

Es decir, que de los resultados expuestos en la figura 2.1 se desprende que, a partir de una concentración de 7.5 mM de N en el medio, los aumentos de las aportaciones de N en forma de NH_4NO_3 o KNO_3 tuvieron un efecto prácticamente

nulo sobre el crecimiento del tallo de los embriones y que, en general, el NH_4NO_3 fue más beneficioso que el KNO_3 .

Cuando se empleó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de N se obtuvieron los tallos con menor crecimiento, 10.5 mm como media, y en este caso presentaron una relación inversa ($r=-0.9432$) entre la concentración de N en el medio y el crecimiento del tallo. Esto significó la existencia de un efecto tóxico de la sal, mayor a medida que aumentó su concentración en el medio, como ya se había indicado para la supervivencia del embrión.

La mejor respuesta de crecimiento de tallo obtenida con las aplicaciones de NH_4NO_3 siguió la tónica generalmente aceptada de que la nutrición combinada de N es más beneficiosa para el desarrollo de las plantas (Kirkby *et al.*, 1987; Hagin *et al.*, 1990). Dicha mejor respuesta, así como el efecto tóxico de la presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en especial a concentraciones elevadas, coincidió con lo indicado por nosotros en trabajos previos con embriones de olivo (Troncoso *et al.*, 1991; Sarmiento *et al.*, 1994). Trabajando con microestaquillas, Troncoso *et al.* (1990) y Villegas *et al.* (1992) obtuvieron también resultados parecidos para la vida *in vitro*, aunque con necesidades de N más elevadas.

En el segundo experimento (fig 2.2), en general, se registraron crecimientos más altos que en el primero, lo que pudo estar relacionado con la calidad propia del embrión según los frutos de procedencia, ya que las condiciones de cultivo fueron iguales en ambas pruebas. No obstante, en general, los resultados se repitieron: los tratamientos con NH_4NO_3 produjeron los tallos con mayor longitud sin que existieran diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas. La aplicación exclusiva de N como nitrato bajó significativamente los crecimientos del tallo y, en este caso, con diferencias mayores respecto al uso de NH_4NO_3 que las obtenidas en la primera prueba. Los tratamientos con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a las concentraciones más bajas (5 y 10 mM de N) dieron resultados similares a los de KNO_3 a las mismas concentraciones, pero cuando se aumentaron las adiciones (20 y 30 mM de N) del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hubo un descenso muy acusado del tamaño de los tallos con lo que de nuevo se demostró el carácter tóxico de esta sal.

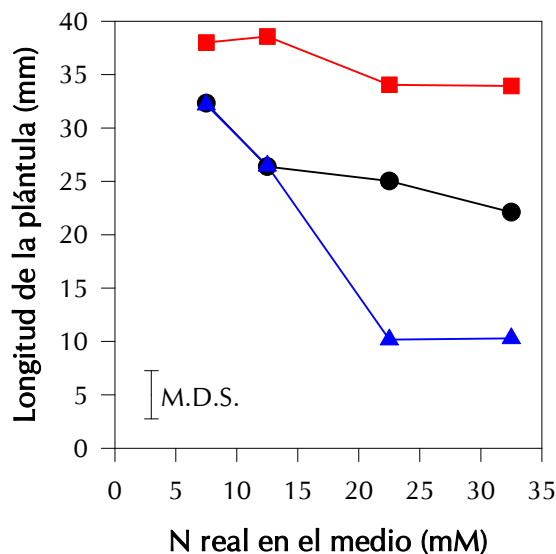


Figura 2.2. Longitud media de las plántulas obtenidas en la prueba 2 para cada tratamiento.

(●) KNO_3 ; (■) NH_4NO_3 ; (▲) $(NH_4)_2SO_4$

Mínima diferencia significativa (M.D.S.) para $p < 0.05$.

Dado que en ninguna de las dos pruebas realizadas se observó un efecto positivo del aumento de las aportaciones de N a partir del nivel de 5 mM (correspondiente a un contenido real de 7.54 mM de N), en la prueba 3 se ensayaron disponibilidades de N inferiores. En este caso, como se indicó en Material y Métodos, el medio base no tenía N por lo que las disponibilidades reales se correspondieron con el N añadido.

En la figura 2.3 se indica la longitud del tallo de las plántulas obtenidas a partir de los embriones *in vitro*, en la prueba 3. Las plántulas del control, sin N en el medio, fueron capaces de germinar y desarrollarse, sin que se produjeran bajas por mortalidad, aunque su crecimiento fue, lógicamente limitado.

La adición de pequeñas cantidades de N (1 ó 3 mM) en forma de KNO_3 o $(NH_4)_2SO_4$ no mejoró el crecimiento de las plántulas. Por el contrario, cuando la fuente de N fue NH_4NO_3 , incluso con 1 mM de N aumentó significativamente la longitud del tallo aunque sin llegar a los valores obtenidos antes con concentraciones más elevadas de N. Los resultados indicaron pues, que en todos los casos las concentraciones de N añadidas al medio en esta prueba fueron insuficientes y que la sal que contenía ambas formas de N (NO_3^- y NH_4^+) originó mejor respuesta de la plántula.

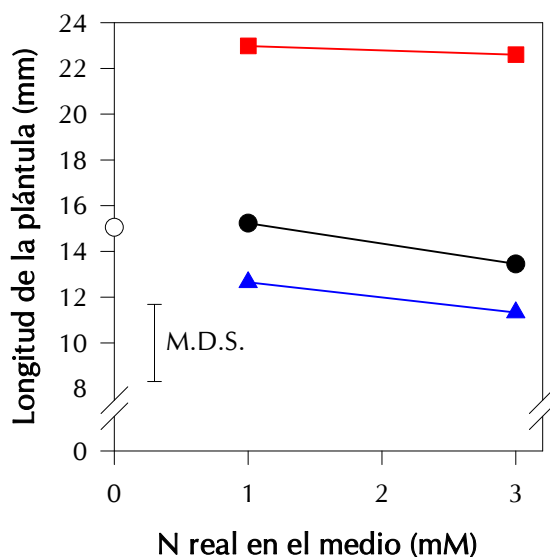


Figura 2.3. Longitud media de las plántulas obtenidas en la prueba 3 para cada tratamiento.

(○) control sin N; (●) KNO_3 ; (■) NH_4NO_3 ; (♦) $(NH_4)_2SO_4$
Mínima diferencia significativa (M.D.S.) para $p < 0.05$.

2.3.1.3. Formación de hojas

Al igual que en el caso anterior del crecimiento del tallo, las distintas sales de N añadidas al medio también influyeron sobre la formación de pares de hojas. La aplicación de $(NH_4)_2SO_4$ inhibió progresivamente el desarrollo de estos órganos (fig.

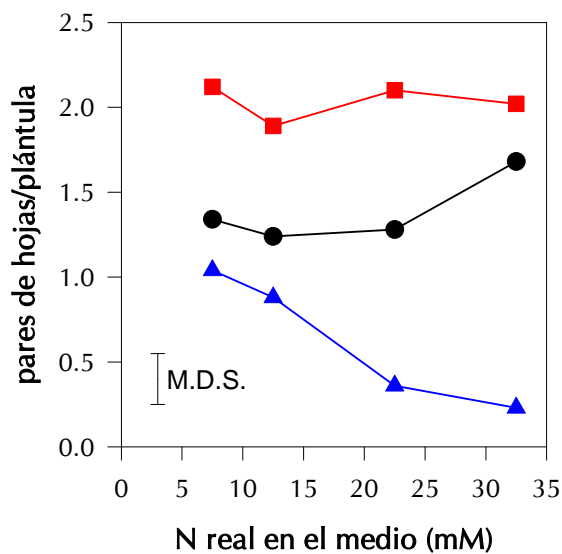


Figura 2.4. Promedio de pares de hojas por plántula obtenido en la prueba 1 para cada tratamiento.

(●) KNO_3 ; (■) NH_4NO_3 ; (♦) $(NH_4)_2SO_4$
Mínima diferencia significativa (M.D.S.) para $p < 0.05$.

2.4). Es decir, existió una relación inversa entre el número de pares de hojas formados y la concentración de la sal ($r=-0.9705$). De hecho, un elevado porcentaje de plántulas, que osciló entre el 38% a 5 mM de N añadido y el 65.5% a 30 mM, no fueron capaces de desarrollar hojas, mostrando de nuevo la toxicidad de esta sal sobre los tejidos del embrión.

En concordancia con lo indicado para el crecimiento del tallo, las adiciones de NH_4NO_3 originaron la formación del mayor número de pares de hojas, sin diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas (fig. 2.4). De nuevo, el KNO_3 tuvo un comportamiento intermedio. Estos resultados están en consonancia con los descritos por nosotros en trabajos previos, también con embriones de olivo (Troncoso *et al.*, 1991).

En la repetición del experimento (prueba 2; fig. 2.5), los resultados, en general, confirmaron lo comentado para la primera prueba, aunque también se produjeron algunas modificaciones que interesa destacar. Como ya ocurrió en lo referente al crecimiento del tallo, cada tratamiento del segundo experimento repercutió más favorablemente en la formación de pares de hojas que el respectivo de la primera

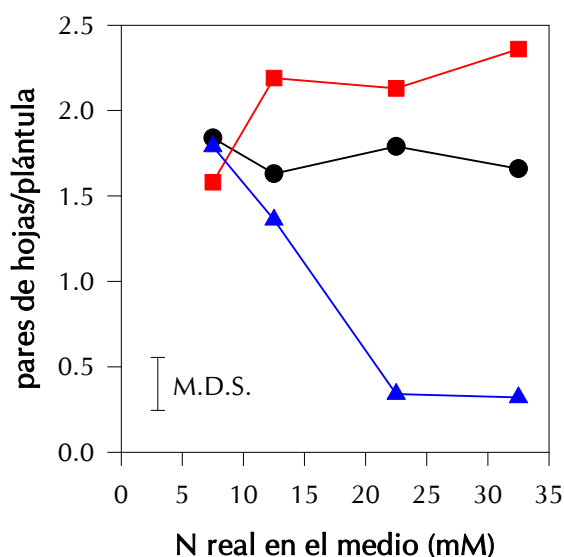


Figura 2.5. Promedio de pares de hojas por plántula obtenido en la prueba 2 para cada tratamiento.
 (●) KNO_3 ; (■) NH_4NO_3 ; (♦) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 Mínima diferencia significativa (M.D.S.) para $p < 0.05$

prueba. Dentro de este mejor comportamiento general, atribuible a la calidad de los embriones usados, de nuevo los tratamientos con NH_4NO_3 proporcionaron el mayor

número de hojas. En este caso, a diferencia de lo indicado para la primera prueba en la que la adición de 5 mM de N (7.54 mM de N en el medio) proporcionó resultados tan buenos como los obtenidos con concentraciones superiores de N, el número de pares de hojas formados al añadir sólo 5 mM de N fue inferior al obtenido con cantidades superiores (fig. 2.5). Las aplicaciones de KNO_3 , como viene siendo habitual dieron también en este caso resultados intermedios, sin variaciones al aumentar la concentración de N añadido. Por último, de nuevo la presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el medio, en especial a las concentraciones más elevadas, produjo perjuicios al desarrollo de la plántula, permitiendo sólo la formación de muy pocas hojas.

En relación con la tercera prueba (adición al medio base sin N de concentraciones pequeñas de este nutriente, fig. 2.6), se repitió la actuación de las sales de N indicada para el crecimiento del tallo. En el medio base sin N, el embrión fue capaz de formar algunos, pocos, pares de hojas (0.82 como media). Las adiciones de NH_4NO_3 , incluso a la concentración más baja (1 mM de N), prácticamente duplicaron el número de pares de hojas anterior, aunque sin llegar a las cifras indicadas antes para las concentraciones superiores. Los tratamientos con KNO_3 y

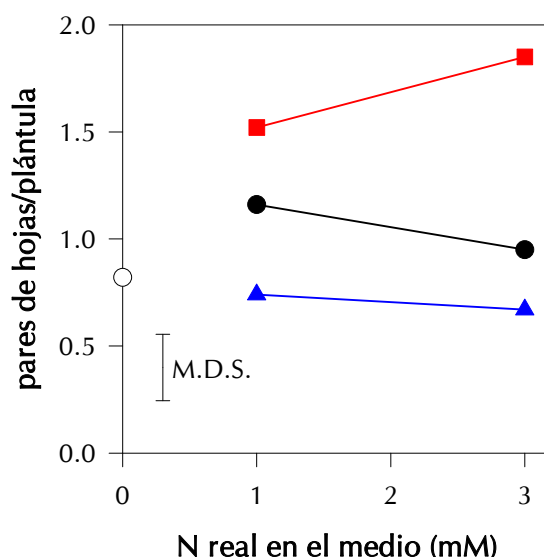


Figura 2.6. Promedio de pares de hojas por plántula obtenido en la prueba 3 para cada tratamiento.

(○) control sin N; (●) KNO_3 ; (■) NH_4NO_3 ; (▲) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Mínima diferencia significativa (M.D.S.) para $p < 0.05$.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, con 1 y 3 mM de N no modificaron significativamente el número de pares

de hojas obtenidos en el medio base, denotando de nuevo la falta de efecto de estas dos sales a concentraciones bajas.

2.3.1.4. Peso fresco, peso seco y grado de hidratación.

Relacionado con el crecimiento del tallo y con la formación de pares de hojas, es decir con el desarrollo de la plántula, también el peso fresco de las plantas tratadas con NH_4NO_3 fue superior al de aquéllas que recibieron KNO_3 o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Villegas *et al.* (1992) encontraron efectos similares de las adiciones de NH_4NO_3 sobre el peso fresco de plantas de vid *in vitro*, obtenidas a partir de explantos caulinares. Ahora bien, al contrario de lo indicado para el crecimiento del tallo que con una disponibilidad de 7.54 mM de N en el medio alcanzó una longitud no superada con la aplicación de concentraciones más altas (fig. 2.1), el peso fresco aumentó en relación directa con la concentración de la sal añadida (fig. 2.7). Este hecho se relacionó, en primer lugar, con un grado más alto de hidratación de los tejidos de las plántulas que recibieron concentraciones mayores de N (tabla 2.3) y también con un mayor desarrollo de los cotiledones de las plántulas sometidas a concentraciones salinas mayores.

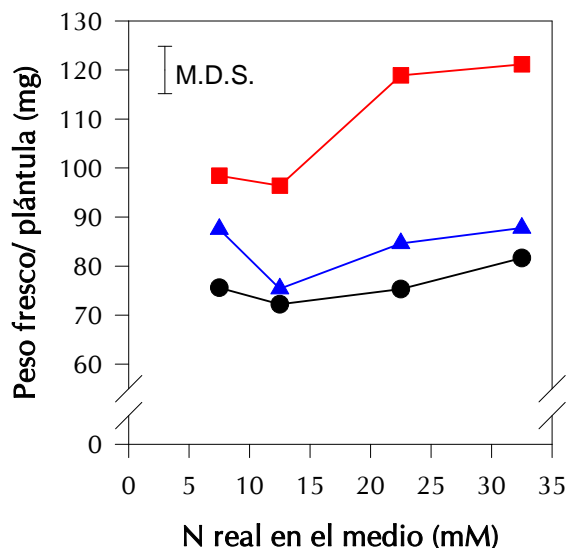


Figura 2.7. Peso fresco medio por plántula obtenido para cada tratamiento en la prueba 1.
 (●) KNO_3 ; (■) NH_4NO_3 ; (♦) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 Mínima diferencia significativa (M.D.S.) para $p < 0.05$.

Otra peculiaridad del peso fresco frente a la longitud del tallo y la formación de hojas fue que las plantas tratadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pesaron más, aunque poco, que aquéllas que recibieron KNO_3 y que la aplicación de sulfato a concentraciones más elevadas (20 y 30 mM de N) no originó descensos en el peso fresco de las plántulas, como había ocurrido con otras facetas del desarrollo vegetal.

En este caso, no existió un mayor grado de hidratación de los tejidos como con la aplicación de NH_4NO_3 , por lo que este factor no pudo explicar el relativamente alto peso fresco. La conservación del peso fresco de las plántulas tratadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a concentraciones elevadas, cuyos tallos habían crecido menos (fig. 2.1) y habían formado menor número de pares de hojas (fig. 2.5) se relacionó entonces con el mayor y anormal crecimiento habido en los cotiledones, lo que compensó el menor desarrollo de las plántulas. Este efecto, más acusado que en el caso indicado para NH_4NO_3 , también fue observado por Troncoso *et al.* (comunicación personal) en embriones de olivo sometidos a estrés salino (NaCl), lo que puede refrendar la acción tóxica del exceso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Es decir, que un efecto característico de un determinado grado de salinidad en el medio sobre el desarrollo del embrión de olivo aislado y cultivado *in vitro*, es la falta de crecimiento del tallo y raíz y, por el contrario, un fuerte y anormal desarrollo de los cotiledones.

En correspondencia con el peso fresco, el peso seco de las plántulas obtenidas y cultivadas con sales de N- NH_4 fue mayor, aunque con diferencias pequeñas, que aquéllas alimentadas sólo con N- NO_3 (tabla 2.3). Las plántulas cultivadas con KNO_3 tuvieron un peso seco medio de 12.5 mg frente a casi 15 mg para el NH_4NO_3 y 14.2 para el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Lewis y Chadwick (1983) ya habían encontrado en cebada que la

Tabla 2.3. Peso seco y contenido de agua (%GH) encontrado para cada tratamiento en la prueba 1.

mM de N		KNO_3		NH_4NO_3		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
añadido	real	p.s. (mg)	% G.H.	p.s. (mg)	% G.H.	p.s. (mg)	% G.H.
5	7.54	12.19	83.9	14.44	85.3	14.54	83.4
10	12.54	10.05	86.1	14.40	85.1	13.80	81.7
20	22.54	14.14	81.2	15.74	86.8	13.74	83.8
30	32.54	13.51	83.5	15.30	87.3	14.81	83.1

producción de materia seca era mayor cuando se utilizaba nitrato y amonio conjuntamente en lugar de cada fuente por separado, y en judía, el peso seco de las plantas fue mayor cuando se les suministró $N-NH_4$ (Thomson *et al.*, 1993).

La diferencia en peso seco entre las plantas cultivadas con NH_4NO_3 y las cultivadas con $(NH_4)_2SO_4$ fue menor que la encontrada para el peso fresco, lo que se explicó, como se indicó antes, por la diferente acumulación de agua en los tejidos de ambos grupos de plantas. Así, las primeras tuvieron un grado de hidratación medio del 86.1% frente al 83.0% de las segundas, que fue muy similar al de las plántulas cultivadas con KNO_3 (83.7%). El mayor grado de hidratación de las plantas tratadas con NH_4NO_3 fue además proporcional a la concentración de la sal en el medio ($r=0.9478$). Por otra parte, el hecho de que las plantas cultivadas en el medio con $(NH_4)_2SO_4$ no hubieran tenido un contenido de agua en los tejidos destacadamente superior a las sometidas a tratamientos con KNO_3 , confirmó que su mayor peso fresco, a pesar del menor desarrollo de esas plántulas, fue debido al crecimiento anormal de los cotiledones. Probablemente, el menor grado de hidratación de las plantas tratadas con $(NH_4)_2SO_4$ frente a la otra sal amónica pudo ser debido al efecto salino del ion SO_4^{2-} .

En la segunda prueba (fig. 2.8), cuyas plantas, como se indicó, registraron un mayor desarrollo medio que las de la primera, se confirmaron los resultados obtenidos

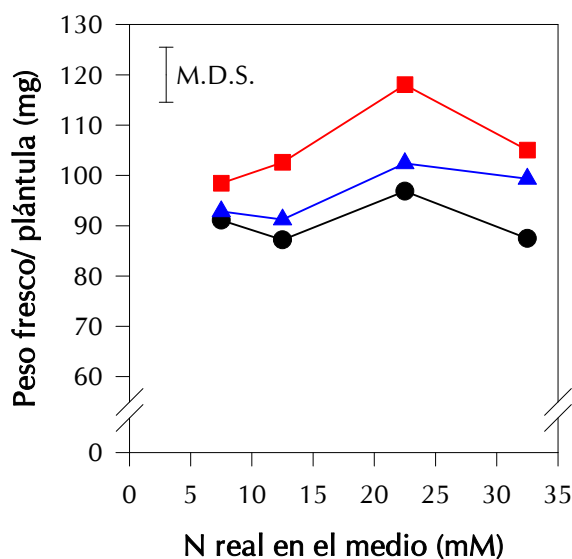


Figura 2.8. Peso fresco medio por plántula obtenido para cada tratamiento en la prueba 2.

(●) KNO_3 ; (■) NH_4NO_3 ; (◆) $(NH_4)_2SO_4$

Mínima diferencia significativa (M.D.S.) para $p < 0.05$

en ésta. No obstante, también existieron algunas diferencias. Así, las plantas tratadas con NH_4NO_3 a la concentración más elevada (30 mM de N) tuvieron menos peso fresco que las tratadas con 20 mM de N, a pesar de presentar un desarrollo similar (fig. 2.2 y 2.5). Esto se relacionó con un menor grado de hidratación de las plantas sometidas a mayor concentración de NH_4NO_3 (tabla 2.4), lo que no se había producido en el primer experimento.

Tabla 2.4. Peso seco y contenido de agua (%GH) encontrado para cada tratamiento en la prueba 2.

mM de N		KNO_3		NH_4NO_3		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
añadido	real	p.s. (mg)	% G.H.	p.s. (mg)	% G.H.	p.s. (mg)	% G.H.
5	7.54	13.92	84.7	14.31	85.5	14.90	84.0
10	12.54	13.38	84.7	14.65	85.7	14.14	84.5
20	22.54	14.32	85.2	15.63	86.8	15.30	85.1
30	32.54	13.60	84.5	15.10	85.6	15.10	84.8

En correspondencia con el pequeño desarrollo del embrión cultivado en ausencia de N (prueba 3; fig. 2.3 y 2.6), su peso fresco fue también muy reducido (fig.

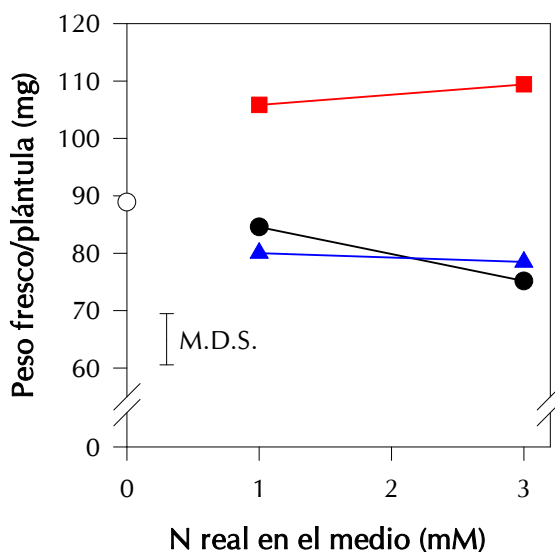


Figura 2.9. Peso fresco medio por plántula obtenido para cada tratamiento en la prueba 3.

(○) control sin N; (●) KNO_3 ; (■) NH_4NO_3 ; (▲) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 Mínima diferencia significativa (M.D.S.) para $p < 0.05$.

2.9). Como ya ocurrió para los casos del crecimiento caulinar y de la formación de hojas, pequeñas adiciones de NH_4NO_3 (1 y 3 mM de N) incrementaron significativamente el peso fresco de las plántulas (fig. 2.9) mientras que las adiciones de KNO_3 o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a esas mismas concentraciones de N no modificaron e incluso bajaron ligeramente el peso de las plántulas.

Cuando se analizó el peso seco de estas plántulas (tabla 2.5) se encontró que los cultivos con fuentes de N- NH_4 tuvieron mayor peso seco que los de nitrato sólo.

Tabla 2.5. Peso seco y contenido de agua (%GH) encontrado para cada tratamiento en la prueba 3.

mM de N	KNO_3		NH_4NO_3		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
	p.s. (mg)	% G.H.	p.s. (mg)	% G.H.	p.s. (mg)	% G.H.
control	14.94	83.2				
1	14.58	82.8	15.38	85.5	15.17	81.0
3	14.34	80.9	16.40	85.0	16.05	79.5

Llamó la atención que a estas concentraciones de N, los pesos secos de todos los tratamientos fueran incluso mayores que los de los tratamientos correspondientes a mayores concentraciones de N, lo que se relacionó con un menor contenido de agua en los tejidos. Es decir, que aparentemente, el aumento de la concentración de N en el medio de cultivo incidió en la absorción de agua por parte de las plántulas.

En la figura 2.10 se resumen los resultados de los 3 experimentos para la longitud del tallo. Tal como se indicó anteriormente, las aplicaciones de NH_4NO_3 fueron las que mejor crecimiento produjeron y la influencia de esta sal se notó desde las más bajas concentraciones hasta 7.54 mM de N en el medio. A partir de esta concentración, el aumento de la disponibilidad de N no consiguió mejorar el crecimiento de las plántulas. Dicha concentración de 7.54 mM de N fue la que dio mejores resultados para todas las sales ensayadas pero, para KNO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, menores concentraciones no fueron capaces de mejorar el crecimiento con respecto al medio sin N y en el caso de esta última sal, el aumento de la concentración de N en el medio fue claramente perjudicial.

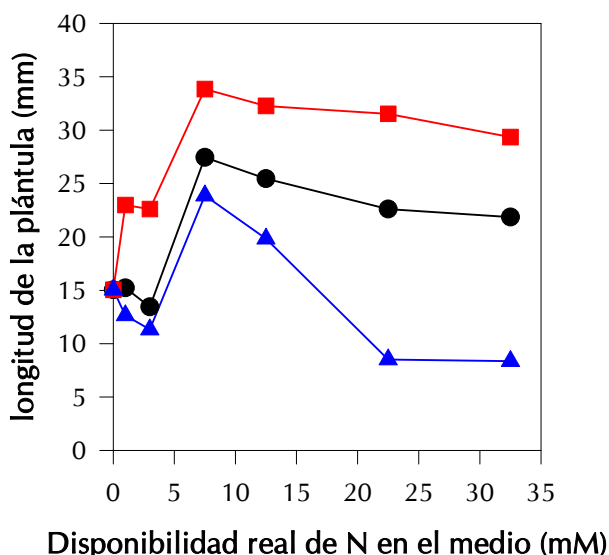


Figura 2.10. Resumen de los resultados de las pruebas 1, 2 y 3 para la longitud de las plántulas. A partir de 5 mM se representa la media de las pruebas 1 y 2 frente a la disponibilidad real de N en el medio: 7.54, 12.54, 22.54 y 32.54 mM de N.

(●) KNO_3 ; (■) NH_4NO_3 ; (▲) $(NH_4)_2SO_4$

En la figura 2.11 se consideran conjuntamente los resultados de formación de pares de hojas para todas las pruebas, que fueron muy similares a los de la figura anterior.

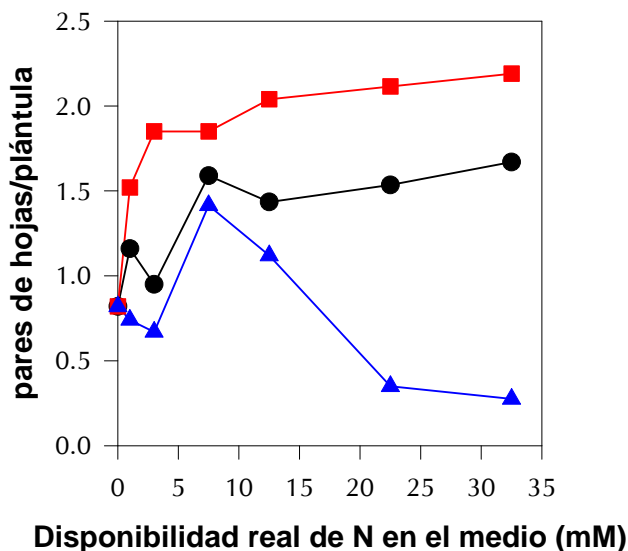


Figura 2.11. Resumen de los resultados de las pruebas 1, 2 y 3 para el número de pares de hojas por plántula. A partir de 5 mM se representa la media de las pruebas 1 y 2 frente a la disponibilidad real de N en el medio: 7.54, 12.54, 22.54 y 32.54 mM de N.

(●) KNO_3 ; (■) NH_4NO_3 ; (▲) $(NH_4)_2SO_4$.

Villegas *et al.* (1992) obtuvieron resultados parecidos trabajando con material de vid *in vitro*, indicando que el aumento progresivo de las aportaciones de NH_4NO_3 al medio hasta 10 mM de N, provocaron un fuerte incremento de la formación de brotes, mientras que concentraciones superiores de dicha sal ya no mejoraron el desarrollo de los explantos de vid *in vitro*. También demostraron que el KNO_3 no presentaba ninguna influencia destacable en el rango de concentraciones de 5-25 mM de N y cuando utilizaron $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, encontraron un efecto negativo de la sal por encima de 10 mM de N.

Estos autores partieron de un medio base con 10.4 mM de N en forma de nitrato al que añadieron las distintas sales en concentraciones crecientes, lo que supuso unas disponibilidades de N bastante superiores a las de los experimentos aquí descritos. En cambio, los embriones de olivo *in vitro* llegaron al máximo de crecimiento con adiciones de 5-10 mM de N, dependiendo de la sal usada (lo que supuso un 7.54-12.54 mM de N total) frente a los 20.4 mM de N del experimento de Villegas *et al.* (1992). Esta discrepancia en las cantidades de N aportadas se explicaría, por un lado, por las diferencias lógicas entre especies distintas y, por otro, en la probable existencia de reservas de N en los embriones aislados de olivo que seguramente rebajan las necesidades de N de los embriones cultivados *in vitro*.

Por otra parte, Bartolini *et al.* (1984) fijaron la concentración de 15 mM de N como la óptima para el crecimiento de plantas de olivo en hidroponía, mientras que concentraciones superiores tuvieron un efecto dañino para las plantas, aunque a medio-largo plazo.

En la figura 2.12 se resume la evolución del peso fresco de las plántulas considerando conjuntamente todas las pruebas. Se puede apreciar que las plántulas cultivadas con N- NH_4 presentaron mayor peso fresco que las que crecieron sólo en presencia de nitrato, efecto que fue más apreciable cuando se utilizó NH_4NO_3 como fuente de N. Como ya se ha dicho antes, el efecto perjudicial del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre la formación de brotes no tuvo reflejo sobre el peso fresco, debido a que la biomasa formada fue utilizada en engrosar los cotiledones.

La variación de la disponibilidad de N en el medio no tuvo un efecto claro sobre el peso fresco, no observándose aumentos o disminuciones definidas del peso fresco a lo largo del rango de concentraciones de N probado.

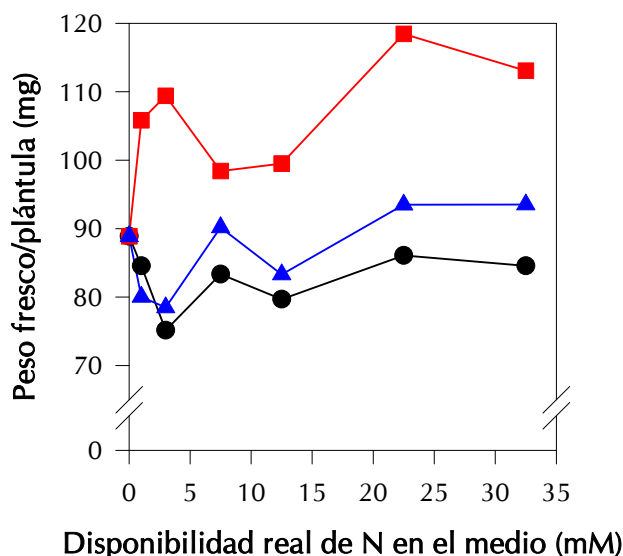


Figura 2.12. Resumen de los resultados de las pruebas 1, 2 y 3 para el peso fresco por plántula. A partir de 5 mM se representa la media de las pruebas 1 y 2 frente a la disponibilidad real de N en el medio: 7.5, 12.5, 22.5 y 32.5 mM de N.

(●) KNO_3 ; (■) NH_4NO_3 ; (◆) $(NH_4)_2SO_4$.

En general, las plántulas cultivadas con sales de N en cuya composición había N-NH₄ tuvieron mayor peso seco que las cultivadas sólo con N-NO₃, aunque las diferencias fueron más pequeñas que las encontradas para el peso fresco. Es decir, que junto al mayor o menor nivel de desarrollo, las plantas tratadas con N-NH₄ tuvieron mayor grado de hidratación.

Del conjunto de los resultados de las pruebas realizadas, se pudo deducir que el uso de NH_4NO_3 como fuente de N favoreció todos los parámetros considerados para definir el desarrollo del embrión de olivo *in vitro* (crecimiento del tallo, formación de hojas y peso). Esto concordó con lo indicado por nosotros en trabajos previos (Troncoso *et al.*, 1991; Sarmiento *et al.*, 1994), usando también embriones de olivo, por Therios y Sakellariadis (1988) estudiando plantas jóvenes de olivo en hidroponía y por Kirkby *et al.* (1987) y Hagin *et al.* (1990) en general para la alimentación de las plantas. Con NH_4NO_3 , el mayor desarrollo del embrión se obtuvo con aportaciones de 5-10 mM de N, que correspondió a una disponibilidad real de 7.54-12.54 mM de N en el medio. Es decir, que las adiciones de concentraciones superiores de N, dado de esta forma, no fueron convenientes. Estas necesidades relativamente bajas de N del embrión de olivo para germinar y formar una plántula, al contrario de lo que ocurre con otras especies *in vitro* (Cheé y Pool, 1987; Villegas *et al.*, 1992), se relacionaron con la probable existencia de reservas de N en sus tejidos. En efecto, en algunas de

las pruebas comentadas anteriormente, los embriones germinaron y crecieron, aunque con alguna dificultad, en ausencia total de N en el medio (fig 2.3 y 2.7). Esto confirmó que el embrión de olivo aislado disponía de reservas distintas a las que se encuentran en el endospermo, cuyos tejidos constituyen la despensa natural de la semilla.

Por otra parte, NH_4NO_3 fue la única sal entre las empleadas que produjo un efecto positivo sobre el desarrollo del embrión cuando se añadió a concentración muy baja (1 ó 3 mM de N), a un medio sin N. Esto pareció indicar que el N dado de esta forma fue más fácilmente y mejor asimilado que el añadido como cualquiera de las otras dos sales.

Al contrario de lo que ocurre con material agámico cultivado *in vitro* de diferentes especies vegetales, como castaño (Vieitez y Ballester, 1983), manzano (Broome y Zimmerman, 1984), melocotonero (Loreti *et al.*, 1988), rododendro (Anderson, 1984) o forestales (McCown y Sellmer, 1987) que muestran síntomas de daños cuando se cultivan con niveles altos de N, el embrión de olivo toleró bien, salvo para la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, hasta concentraciones de 32.54 mM de N en el medio, lo que indicó una tolerancia relativamente elevada del embrión a la salinidad del medio. Concentraciones de N de ese tipo fueron tóxicas para plantas de olivo de 1 año de edad, cultivadas en sustrato inerte (perlita) con soluciones nutritivas (Bartolini *et al.*, 1991).

Debido a la fuerte dominancia apical que caracteriza el crecimiento de la plántula de olivo *in vitro* y que no permitió el desarrollo de yemas laterales, no se observó influencia de la aplicación de NH_4NO_3 sobre la formación de brotes como se había demostrado para otras especies (Anderson, 1984; Villegas *et al.*, 1992).

En lo que se refiere al uso de sólo N- NO_3 se pudieron destacar los siguientes aspectos:

- Pequeñas adiciones de la sal, inferiores a 5 mM de N, no influyeron sobre el desarrollo del embrión de olivo *in vitro*. Es decir, que el embrión pareció utilizar sus propias reservas de N, como lo hacía al ser cultivado en un medio carente de N (fig. 2.3 y 2.7) y no fue capaz de asimilar tan bajas disponibilidades del nutriente en el medio.
- Niveles entre 7.54 y 12.54 mM de N mejoraron significativamente el desarrollo del embrión de olivo *in vitro*, pero concentraciones superiores de KNO_3 (hasta 32.54 mM de N) no continuaron dicha mejora aunque tampoco ocasionaron daños a la

plántula. Es decir, que ocurrió algo parecido a lo indicado para el NH_4NO_3 , aunque a un nivel inferior. En consecuencia, también en este caso, el embrión demostró una fuerte tolerancia a este tipo de sal.

El menor desarrollo relativo de la planta cultivada en KNO_3 frente a la tratada con NH_4NO_3 se relacionó con la preferencia de la plántula por el uso de amonio que, como indicaron Fowler *et al.* (1982), es utilizado primero, usándose el nitrato al faltar aquél. En este sentido, Bowman y Paul (1988) encontraron que en cultivo hidropónico, a las 48 h, se había reducido el 53% del nitrato absorbido, mientras que se había asimilado el 97% del amonio.

Esta preferencia por la utilización de amonio se basa en que el proceso de reducción de nitrato es energéticamente costoso, al requerir un aumento de la actividad del ciclo de las pentosas fosfato para la producción de coenzimas reducidos (Stewart y Rhodes, 1977). En el suelo, la cantidad de amonio disponible es normalmente baja debido a los procesos de nitrificación, por lo que el nitrato es la fuente predominante, pero en cultivo *in vitro* no ocurre igual por lo que resulta evidente que la ganancia de crecimiento cuando se utiliza NH_4NO_3 se debe a la presencia de amonio.

Por el contrario, el uso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de N resultó ser perjudicial para los embriones de olivo *in vitro*. Aportaciones crecientes de esta sal, por encima de 5 mM de N (que significaron una disponibilidad real de 7.54 mM de N) supusieron una inhibición del crecimiento de las plántulas tanto de la parte aérea como de las raíces, así como la muerte de un alto número de ellas, lo que indicó una acción tóxica de esta sal, que fue proporcional a su concentración. Este hecho ya se había puesto de manifiesto en otros trabajos con embriones de olivo *in vitro* (Troncoso *et al.*, 1991; Sarmiento *et al.*, 1994), así como con otras especies en cultivo hidropónico (Simonne *et al.*, 1993).

En general, se considera que el exceso de amonio es tóxico para las células vegetales al no poder ser acumulado en el citoplasma, habiéndose descrito que desacopla el transporte electrónico, favorece la oxidación de los nucleótidos de piridina e inhibe ciertas enzimas (Hageman, 1979). A estos efectos asociados al amonio, se podría sumar el efecto del SO_4^{2-} sobre las raíces que ha sido descrito para plantas de olivo en hidroponía por Bartolini *et al.* (1991).

A baja concentración (1 ó 3 mM de N), el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no produjo daños apreciables en las plántulas pero tampoco fue capaz de estimular el crecimiento de los embriones frente al obtenido en el control sin N. La adición de 5 mM de N (7.54 mM de N real) como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ofreció crecimientos relativamente buenos en comparación con los otros tratamientos. Esto significó que, a dicha concentración, no se produjeron efectos tóxicos y, por el contrario, el equilibrio entre el N- NH_4 añadido y el N- NO_3 existente en el medio (relación nitrato/amonio de 0.5) fue suficiente para soportar un cierto crecimiento de las plántulas. Sin embargo, a medida que esta relación fue haciéndose más pequeña por las sucesivas aportaciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, el crecimiento empeoró progresivamente, evidenciándose entonces los daños debidos al exceso de esta sal.

2.3.2. Composición mineral.

En la tabla 2.6 se especifican los niveles de nutrientes obtenidos por el análisis de las plántulas completas, tratadas con las diferentes sales y concentraciones de N.

Tabla 2.6. Composición mineral de las plántulas obtenidas en los distintos tratamientos (Media de las pruebas 1 y 2).

Tratamiento		% p.s.							ppm			
mM de N		N	P	K	Ca	Mg	Na	S	Fe	Mn	Zn	Cu
KNO_3	5	3.08	0.60	2.87	0.57	0.44	0.27	0.36	104	195	100	25
	10	3.28	0.61	3.17	0.59	0.44	0.30	0.25	114	189	101	27
	20	3.46	0.58	3.73	0.46	0.44	0.28	0.27	103	168	86	20
	30	3.65	0.63	4.90	0.51	0.41	0.21	0.32	118	166	63	23
NH_4NO_3	5	4.08	0.62	2.99	0.44	0.30	0.27	0.39	189	174	140	26
	10	4.52	0.64	2.57	0.44	0.28	0.26	0.60	236	157	141	27
	20	5.38	0.67	2.45	0.40	0.27	0.28	0.52	251	157	138	26
	30	5.89	0.75	2.11	0.39	0.25	0.29	0.53	269	143	138	27
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	3.62	0.59	2.22	0.30	0.23	0.29	0.69	149	104	145	26
	10	4.00	0.59	2.02	0.28	0.22	0.33	0.97	204	93	126	27
	20	4.38	0.60	1.79	0.29	0.22	0.31	1.42	298	78	135	29
	30	4.72	0.66	1.57	0.31	0.20	0.33	1.45	289	68	112	22

Los niveles de N (% sobre materia seca) fueron claramente afectados por los tratamientos. En todos los casos existió una relación directamente proporcional entre la cantidad de N en el medio y el nivel de este elemento en los tejidos de la planta ($r=0.9871$ para KNO_3 ; $r=0.9924$ para NH_4NO_3 y $r=0.9869$ para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Ahora bien, los aumentos producidos por la aplicación de KNO_3 fueron inferiores a los obtenidos en presencia de N- NH_4 . Es decir, en cultivo *in vitro*, existió una asimilación preferente por la planta de amonio frente a nitrato, como también habían observado otros autores en diferentes situaciones de cultivo (Fletcher, 1982; Fowler *et al.*, 1982; Wilcox *et al.*, 1985; Scheromm y Plassard, 1988; Marschner *et al.*, 1991; Kamminga-Van Wijk y Prins, 1993). Entre las dos sales con N- NH_4 , el NH_4NO_3 determinó, para la misma concentración de N en el medio, mayores niveles del elemento en la planta que $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Si se considera además que las plántulas cultivadas en medio con NH_4NO_3 tuvieron un mayor desarrollo y peso que las mantenidas en el medio con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, el contenido total de N en las primeras plantas fue muy superior al de las segundas, lo que indica que la sal con los dos tipos de iones de N fue la que más favoreció la asimilación de este nutriente. Este hecho concordó con lo señalado por Hagin *et al.* (1990) y con lo observado en nuestros trabajos previos con embriones de olivo (Sarmiento *et al.*, 1994), así como por Villegas *et al.* (1992) en explantos de vid *in vitro*. Por otra parte, las concentraciones de N alcanzadas con las aplicaciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a niveles elevados, al ser algo inferiores a los obtenidos con NH_4NO_3 , no justificaron el efecto tóxico de aquella sal sobre la supervivencia y el desarrollo del embrión de olivo *in vitro*. En cualquier caso, todas las plántulas *in vitro*, con cualquiera de los tratamientos, presentaron niveles de N muy superiores a los indicados por Bartolini *et al.* (1984) para plantas jóvenes de olivo cultivadas en hidroponía en invernadero y con daños muy severos por exceso de N.

El aumento moderado de la cantidad de N incorporada cuando se suministró exclusivamente nitrato se relacionó con el alto costo energético del proceso de asimilación de este ion por parte de las plantas.

Se han propuesto diferentes modelos para la absorción de nitrato: mediante un cotransporte con H^+ , (Ullrich y Novacky, 1981; Ullrich, 1987; McClure *et al.*, 1990a;b) o a través de un antiporte $2\text{NO}_3^-/1\text{OH}^-$ (Thibaud y Grignon, 1981). En cambio, la absorción de amonio se acompaña de la liberación de protones (Raven y

Wollenweber, 1992; Raven *et al.*, 1993). Es por esto que la absorción de nitrato por la planta produce una alcalinización del medio, mientras que la del amonio lo acidifica.

Tras los 60 días de cultivo *in vitro*, se examinó el pH final del medio de cultivo y los resultados se exponen en la tabla 2.7. Se pudo observar que con el tratamiento control, sin N, el crecimiento de los embriones produjo una acidificación apreciable del medio. Puesto que no hubo absorción de N, dicha acidificación pudo deberse a diversas causas: intercambios de H⁺ asociados a la incorporación de aniones a los tejidos (Smith, 1984), a la absorción del CO₂ disuelto en el medio de cultivo (Minocha, 1987) o la retirada de cationes del medio.

Tabla 2.7. pH final del medio de cultivo tras 60 días de cultivo in vitro para cada tratamiento. El pH inicial fue de 5.8 (5.5 tras el autoclavado) en todos los casos.

mM de N añadido	Tratamiento			
	Control	KNO ₃	NH ₄ NO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄
0	4.14 ± 0.09			
1		5.12 ± 0.08	5.26 ± 0.09	3.69 ± 0.13
3		5.76 ± 0.10	4.09 ± 0.06	3.54 ± 0.14
5		5.83 ± 0.10	3.60 ± 0.05	3.02 ± 0.02
10		5.75 ± 0.06	3.42 ± 0.05	3.09 ± 0.06
20		5.87 ± 0.07	3.49 ± 0.07	3.60 ± 0.08
30		5.69 ± 0.06	3.40 ± 0.04	3.75 ± 0.09

Media ± S.E.M.

Cuando sólo se adicionó KNO₃ al medio, el pH final se mantuvo bastante estable en todos los tratamientos y fue muy parecido al valor inicial. No se observó un aumento progresivo del pH final, paralelo al incremento de las cantidades de KNO₃ suministradas, lo que tal vez podría justificarse por la elevada incorporación de K a los tejidos que habría evitado la alcalinización del medio (Kirkby y Mengel, 1967; Blevins *et al.*, 1974; Ullrich *et al.*, 1989; Ullrich, 1992)

Por el contrario, los tratamientos con N-NH₄ produjeron la acidificación del medio de cultivo, como se podía esperar por el efecto de la asimilación de amonio (Raven y Wollenweber, 1992; Raven *et al.*, 1993). Dicha acidificación fue

proporcional a la concentración de amonio añadida hasta 10 mM de N. Cuando el N se suministró como NH_4NO_3 también se observó una acidificación del medio, en concordancia con otros autores (Veliky y Rose, 1973; Rose y Martin, 1975; Wetherall y Dougall, 1976; Kamminga-Van Wijk y Prins, 1993), y relacionada con la absorción preferente de amonio frente a nitrato. Algunos autores han señalado que la presencia de amonio afecta la absorción de nitrato en plantas superiores (Ingestad, 1979; Boxman y Roelofs, 1988; Marschner *et al.*, 1991) pero no la llega a inhibir del todo (MacKown *et al.*, 1982; Ullrich *et al.*, 1984; Kamminga-Van Wijk y Prins, 1993). Quizá por esta razón la acidificación producida por el NH_4NO_3 no fue tan intensa como la observada tras los tratamientos con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

En relación con los demás nutrientes analizados (tabla 2.6), se observó que los niveles de P no se vieron afectados por los tratamientos de N, en contraposición con otros autores (Wilcox *et al.*, 1985; Villegas, 1990) que han descrito un incremento de los niveles de P en plantas cultivadas con N- NH_4 .

Los niveles de K fueron mayores en las plantas cultivadas con KNO_3 y presentaron una correlación positiva con la concentración de la sal ($r=0.9823$), lo que se explica por la mayor disponibilidad de K en estos tratamientos. Por otro lado, sus niveles también podrían estar potenciados por el mecanismo de compensación de los protones tomados junto con el nitrato, tal como han descrito otros autores (Wollenweber, 1997). En los tratamientos con N- NH_4 los niveles de K fueron más bajos, especialmente con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, y descendieron a medida que aumentó la concentración de estas sales de N ($r=-0.9517$ para NH_4NO_3 y $r=-0.9931$ para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), lo que concuerda con las observaciones de otros autores en otras especies vegetales cultivadas con amonio en hidroponía (Ullrich y Gersper, 1985; Engels y Marschner, 1993) y con nuestros trabajos previos con embriones de olivo (Sarmiento *et al.* 1992). Este hecho puede deberse a una competencia entre los iones NH_4^+ y K^+ por la entrada a las células, como habían indicado otros autores (Kirkby y Mengel, 1967; Horst *et al.*, 1985). Más recientemente se ha descrito que la entrada de NH_4^+ a las células puede darse a través de los canales de K^+ (Schachtman y Schroeder, 1994; White, 1996). En estudios realizados con plantas completas se ha visto que el NH_4^+ tiene un efecto inhibitor del transporte de baja afinidad de K^+ , excepto en condiciones de deficiencia del mismo (Wang *et al.*, 1996), lo que no es el caso.

Otros macronutrientes afectados por los tratamientos fueron Ca y Mg. Cuando las plántulas se cultivaron con N-NH₄, estos elementos disminuyeron sus contenidos en los tejidos con respecto a los obtenidos con KNO₃. Este efecto fue más evidente cuando se utilizó (NH₄)₂SO₄, donde los niveles de Ca y Mg fueron prácticamente la mitad de los encontrados para los tratamientos con KNO₃, algo ya observado en nuestros trabajos preliminares (Sarmiento *et al.*, 1992). Otros autores (van Beusichem *et al.*, 1988) describieron que las plantas de *Ricinus communis* L. cultivadas con N-NH₄ incorporaban menos K, Ca y Mg que las que se cultivaban con N-NO₃, similares resultados a los obtenidos en *Capsicum annum* L. (Marti y Mills, 1991a;b) y *Zea mays* L. (Engels y Marschner, 1993). Sin embargo, Therios y Sakellariadis (1988) trabajando con estaquillas de olivo en sustrato de perlita y arena, encontraron una correlación positiva entre la concentración de N-NH₄ suministrada y los niveles de Ca y Mg en los tejidos. Es posible que este resultado discrepante se explique por el hecho de que estos autores no detectaron variaciones de pH en el sustrato de cultivo.

Algunos autores han encontrado que el pH del medio afecta a la absorción de K, Ca y Mg. Findenegg *et al.* (1989) encontraron en *Beta vulgaris* L. cultivada con N-NH₄, que las concentraciones de K y Ca en los tejidos disminuían cuando el pH del medio nutritivo era bajo. En el presente caso, la disminución del pH observada cuando se cultivaron las plántulas con tratamientos de N-NH₄ podría ser una explicación de la disminución observada en los niveles de Ca y Mg.

Los niveles de Na no se vieron afectados por los tratamientos y los de S fueron notablemente más elevados con los tratamientos de N-NH₄. En el caso del (NH₄)₂SO₄, los niveles de S presentaron una correlación positiva con la concentración de la sal añadida ($r=0.9351$). El elevado contenido de este elemento en los tejidos de las plántulas podría explicar en parte la toxicidad debida a esta sal. En este sentido, Bartolini *et al.* (1991) encontraron que la aplicación de Na₂SO₄ a plantas jóvenes de olivo en hidroponía provocaba fuertes daños en las plantas.

En cuanto a los micronutrientes analizados, se observó que los tratamientos con KNO₃ presentaron niveles de Fe mucho menores que los tratamientos con N-NH₄ (tabla 2.6), lo que podría deberse a que las altas concentraciones de nitrato fuesen oxidantes para el Fe²⁺, limitando su disponibilidad para las plántulas (Villegas, 1990). Además, en el último caso, el aumento de las aportaciones de N-NH₄ al medio aumentó el nivel de Fe en los tejidos. En este sentido, Alloush *et al.* (1990) ya habían

señalado que las plantas de *Cicer arietinum* L. se mostraban menos sensibles a la deficiencia de Fe cuando eran cultivadas con soluciones N-NH₄ que con N-NO₃.

El Zn se vio afectado fundamentalmente por los tratamientos con KNO₃, los cuales rebajaron apreciablemente sus contenidos, encontrándose una relación negativa entre el contenido de Zn y la concentración de KNO₃ añadida al medio ($r = -0.9634$). Engels y Marschner (1993) encontraron mayores niveles de Fe y Zn en plantas de judía cuando las cultivaban con N-NH₄, sugiriendo que este efecto se debía a que la acidificación del suelo incrementaba la disponibilidad de estos nutrientes.

El Mn por su parte pareció estar afectado por la presencia de N en el medio ya que todos los tratamientos disminuyeron sus niveles conforme aumentaba la concentración de N en el medio. Los tratamientos con N-NH₄ tuvieron mayor efecto y especialmente con (NH₄)₂SO₄, en cuyo caso los niveles de Mn presentaron una correlación negativa con la concentración de la sal ($r = -0.9889$).

El Cu, sin embargo, no pareció verse afectado por ninguno de los tratamientos.

A bajas concentraciones (tabla 2.8), no hubo grandes diferencias en el contenido de N, entre las distintas fuentes empleadas, aunque las plántulas tratadas con (NH₄)₂SO₄ mostraron para la misma concentración de N, contenidos algo superiores a

Tabla 2.8. Composición mineral de las plántulas obtenidas en los distintos tratamientos para la prueba 3.

Tratamiento		% p.s.						ppm			
		N	P	K	Ca	Mg	Na	Fe	Mn	Zn	Cu
Control		2.00	0.76	4.22	0.33	0.34	0.39	154	219	159	20
KNO ₃	1	2.56	0.65	3.79	0.41	0.34	0.37	99	216	130	29
	3	2.93	0.69	3.32	0.41	0.39	0.27	72	197	92	24
NH ₄ NO ₃	1	2.54	1.08	2.07	0.54	0.48	0.37	185	221	136	30
	3	2.94	1.16	2.34	0.47	0.38	0.30	259	213	141	23
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	2.75	0.65	3.30	0.23	0.23	0.20	122	132	98	34
	3	3.13	0.60	2.43	0.18	0.19	0.20	130	93	97	14

los de las otras sales. Este hecho pudo ser debido a que las plantas tratadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, al tener un crecimiento escaso acumularon mayores porcentajes de N.

Las plántulas del tratamiento control presentaron un contenido de N del 2.00%, el más bajo de todos los tratamientos, pero teniendo en cuenta que estas plántulas crecieron en un medio sin N, es obvio que todo este N proviene de las reservas propias del embrión, diferentes por tanto de las sustancias de reserva disponibles en el endospermo de la semilla. Para comprobarlo, se analizó el contenido de N de los embriones aislados sin germinar, resultando ser de 3.66%, lo que representa una cifra bastante elevada y explica, asimismo, por qué los embriones son capaces de germinar y desarrollarse en medios sin N.

Hasta 3 mM de N añadido al medio, los contenidos de este nutriente en las plántulas fueron muy similares, independientemente de la fuente usada. No obstante, hay que tener en cuenta que a estas concentraciones bajas de N se registró un crecimiento apreciablemente mayor en las plántulas cultivadas con NH_4NO_3 , por lo que su contenido total de N fue mayor que el de los otros tratamientos.

Cabe señalar el elevado contenido de K de las plántulas cultivadas con el tratamiento control, mayor incluso que el de las plántulas de los tratamientos con KNO_3 . A este nivel de concentraciones de N, también se apreciaron contenidos de K más bajos en las plántulas cultivadas con sales N- NH_4 .

Con respecto al Ca y Mg, se observó que a bajas concentraciones de N en el medio sólo los tratamientos con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tuvieron un efecto estimable, rebajando los contenidos de estos elementos con respecto a los que presentaron los otros tratamientos. Como se discutió anteriormente, esto puede estar relacionado con la acidificación del medio producida por la asimilación de amonio, la cual fue más intensa, a bajas concentraciones de N añadido, cuando se utilizó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Los micronutrientes tuvieron un comportamiento similar al descrito antes para concentraciones de N añadido por encima de 5 mM. El Fe, se vio afectado por la presencia de KNO_3 y el Mn por los tratamientos con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

En comparación con otros datos publicados en la bibliografía, referentes a la composición mineral de plantas de olivo cultivadas en condiciones de invernadero (Bartolini *et al.*, 1984; Bartolini *et al.*, 1991), las plántulas de olivo cultivadas *in vitro* presentan, en general, mayores contenidos de macro y micronutrientes. La única

excepción la constituye el Ca, el cual se encuentra en mayores niveles en las plantas cultivadas en condiciones de invernadero.

2.3.3. Fracciones de N

En la tabla 2.9 se presentan los resultados de los contenidos de las principales fracciones de N (N-amoniacal, N-amídico, N-amínico, N-proteico) y la suma de las mismas (N-total) en las plántulas de olivo, correspondientes a la media de las pruebas 1 y 2 (no hubo diferencias significativas entre ellas) en relación con los tratamientos de N.

Tabla 2.9. Fracciones de N en relación con los tratamientos de las pruebas 1 y 2 (media de ambas pruebas).

Tratamiento	mM de N	N-amoniacal		N-amídico		N-amínico		N-proteico		N-total
		% p.s.	% total	% p.s.	% total	% p.s.	% total	% p.s.	% total	% p.s.
KNO ₃	5	0.09	2.9	0.09	2.9	0.58	18.9	2.31	75.2	3.07
	10	0.11	3.4	0.13	4.1	0.62	19.4	2.33	73.0	3.19
	20	0.09	2.6	0.09	2.6	0.87	24.8	2.47	70.4	3.52
	30	0.10	2.8	0.12	3.3	0.97	27.0	2.41	67.1	3.60
NH ₄ NO ₃	5	0.17	4.1	0.11	2.7	1.17	28.4	2.68	65.0	4.13
	10	0.16	3.6	0.19	4.2	1.31	29.1	2.84	63.1	4.50
	20	0.26	4.9	0.29	5.5	1.90	35.9	2.83	53.5	5.28
	30	0.35	5.8	0.34	5.7	2.39	39.8	2.92	48.7	6.00
(NH ₄) ₂ SO ₄	5	0.12	3.3	0.22	6.1	0.95	26.3	2.32	64.3	3.61
	10	0.12	3.1	0.14	3.6	1.31	33.3	2.35	59.8	3.92
	20	0.29	6.7	0.21	4.9	1.45	33.7	2.35	54.7	4.30
	30	0.39	8.2	0.25	5.3	1.51	31.8	2.60	54.7	4.75

El N-total, obtenido al sumar los contenidos de cada fracción fue muy similar al determinado por análisis directo de los tejidos de las plántulas (tabla 2.6). De este modo, se comprobó de nuevo la existencia de una relación directa entre el contenido de N en el medio y el nivel del nutriente en los tejidos. Ahora bien, del mismo modo que antes, estas relaciones no fueron iguales para las distintas sales: NH₄NO₃ y (NH₄)₂SO₄, es decir los compuestos con N-NH₄, produjeron mayores acúmulos de N

que cuando la sal sólo tuvo N-NO₃. Entre las dos primeras sales fue NH₄NO₃, con los dos iones y menor proporción relativa de N-NH₄, la que originó los contenidos más altos de N-total. La similitud de resultados entre el N-total analizado y el obtenido al sumar las distintas fracciones dio garantía a ambos valores y, en consecuencia, a los resultados analíticos de las fracciones indicadas.

Las acumulaciones de N-total se reflejaron en mayor o menor grado en cada una de las fracciones de N, aunque como consecuencia de la mayor acumulación de N producida por las sales de N-NH₄, las fracciones de estas plántulas fueron en general más elevadas que las observadas en aquéllas cultivadas sólo con N-NO₃, resultado similar al encontrado por Sarmiento *et al.* (1992) en un trabajo similar con explantos de vid cultivados *in vitro*.

En todos los tratamientos con KNO₃ la fracción amoniacal fue muy baja y no se modificó al aumentar la concentración de la sal, indicando que no hubo acumulación de amonio en los tejidos de las plantas cultivadas en estas condiciones. Esto se relacionó con la mayor regulación del proceso de asimilación de nitrato que ha de ser reducido enzimáticamente antes de su incorporación a los esqueletos carbonados (Stewart y Rhodes, 1977; Campbell, 1988). Por el contrario, los tratamientos con N-NH₄ (NH₄NO₃ y (NH₄)₂SO₄), en especial a las concentraciones más elevadas (20 y 30 mM de N), prácticamente duplicaron los niveles de la fracción amoniacal, existiendo una relación entre disponibilidad de amonio en el medio y acumulación de N-amoniacal, resultado similar al descrito por Wilcox *et al.* (1985) para raíces y parte aérea de plantas de tomate cultivadas hidropónicamente con amonio. Sin embargo, los niveles de esta fracción no llegaron a ser tan elevados como los que encontraron otros autores (Villegas, 1990; Sarmiento *et al.*, 1992) en explantos de vid, cultivados *in vitro* con sales N-NH₄ y que relacionaron con los daños que observaron en las plantas. Si se consideran los porcentajes relativos de esta fracción con respecto al N-total (tabla 2.9), se advierte que cuando se cultivó con (NH₄)₂SO₄, a las concentraciones más altas existió una mayor proporción de amonio no metabolizado en los tejidos de estas plántulas con respecto a los demás tratamientos en general y a las aplicaciones de NH₄NO₃, en particular. Aunque es conocida la toxicidad de la acumulación de amonio en los tejidos (Bennet *et al.*, 1964; Maynard y Barker, 1969; Cox y Reisenauer, 1973; Hageman, 1979), sin embargo el nivel no excesivo alcanzado por la fracción amoniacal por los tratamientos con (NH₄)₂SO₄ y la igualdad

entre las cantidades de las fracciones amoniacales de los cultivos con N-NH₄, no parecen justificar los síntomas de toxicidad habidos en las plántulas que recibieron las aplicaciones de (NH₄)₂SO₄. En consecuencia, de nuevo hay que pensar en el exceso de S en los tejidos (tabla 2.6) como la causa principal de la mortandad y peor desarrollo de éstas últimas plántulas, tal y como ya habían descrito Bartolini *et al.* (1991) para plántulas de olivo cultivadas en hidroponía.

La fracción N-amídica (tabla 2.9) mostró una situación parecida a la anterior. Las aplicaciones de KNO₃ originaron bajos contenidos que tampoco se modificaron con las distintas concentraciones usadas. Los tratamientos con N-NH₄, especialmente a concentraciones altas, provocaron un incremento de esta fracción de N, siendo nuevamente el tratamiento con NH₄NO₃ el que mayores niveles presentó.

La fracción amínica (tabla 2.9) fue la que mejor reflejó la situación indicada antes para el N-total. Todos los tratamientos provocaron un incremento de este tipo de N, proporcional a la concentración del elemento en el medio. Ahora bien, al igual que se dijo para el N-total, los aumentos debidos al NH₄NO₃ fueron los mayores, seguidos por los originados por (NH₄)₂SO₄ y, finalmente, las aplicaciones de N-NO₃ como ion exclusivo provocaron los menores incrementos. Es decir, que el aumento de la asimilación de N encontrado para los cultivos con N-NH₄, se tradujo en una activa síntesis de aminoácidos como forma de almacenamiento. Si se toman los valores relativos de esta fracción con respecto a la suma total de las fracciones, se observa que el peso del N-amínico fue mayor en los tratamientos con NH₄NO₃, frente a los de (NH₄)₂SO₄, indicando una más eficiente transformación del N asimilado en aminoácidos.

Por último, la fracción proteica, la de mayor contenido, también aumentó al incrementarse el contenido de N en el medio, aunque en este caso las diferencias, tanto entre sales como entre concentraciones, fueron muy pequeñas en valores absolutos. Si se consideran los valores relativos frente al N-total, en todos los tratamientos el porcentaje de N-proteico disminuyó al aumentar el N-total asimilado. Este resultado concordó con el de otros autores para trabajos similares (Villegas, 1990; Sarmiento *et al.*, 1992). De esta forma, la disminución de este porcentaje fue mayor para los tratamientos con NH₄NO₃, en los que cayó hasta el 49% a 30 mM de N, seguido de los de (NH₄)₂SO₄ (55% a la misma concentración de N) mientras que con KNO₃ alcanzó el 67%. Es decir, que el aumento de la disponibilidad de N en los

tejidos, con el consiguiente aumento de la fracción amínica, no se tradujo en un aumento de igual magnitud de la fracción proteica, lo que pudo deberse a una mayor lentitud del proceso de síntesis de proteínas frente al de aminoácidos libres. En este sentido, Kirkby (1968) señaló que la asimilación más rápida del amonio ocasiona una deficiencia de estructuras carbonadas que trae como consecuencia que los aminoácidos no sean transformados en proteínas, quedando libres en mayor proporción.

En resumen, los tratamientos de KNO_3 , sin aportación de N-NH_4 no modificaron los niveles de N-amoniaco y amídico y aumentaron, proporcionalmente a su concentración, los contenidos de N-amínico y proteico, aunque éste último levemente. Se observó claramente que todo el N absorbido como N-NO_3 fue transformado primero y más rápidamente en aminoácidos y después, más lentamente, en proteínas.

Los tratamientos con N-NH_4 (NH_4NO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) aumentaron la fracción de N-amoniaco, pero a su vez, también elevaron los contenidos de N-amínico y amídico a las concentraciones más altas, consecuencia, en parte, del leve aumento de la fracción proteica.

Si se consideran los niveles de cada fracción de N en el caso de las plántulas con mayor desarrollo (tratamientos con NH_4NO_3) y se comparan con los de las otras plántulas de menor crecimiento, se pueden destacar los siguientes aspectos:

- Los pequeños acúmulos de N-amoniaco y amídico producidos por las adiciones de NH_4NO_3 a las concentraciones más altas no provocaron signos de toxicidad en las plántulas.
- El menor desarrollo de las plántulas tratadas con N-NO_3 exclusivamente, coincidió con una relativamente baja absorción de este anión de N, que se tradujo fundamentalmente en un menor contenido de N-amínico, es decir de aminoácidos.
- Los fuertes signos de toxicidad (muertes y poco desarrollo) provocados en las plántulas por los tratamientos con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a las concentraciones más altas, no se pudieron justificar por los niveles alcanzados por cualquiera de las fracciones de N. Por ello, hay que relacionarlos mejor con las acumulaciones de S en los tejidos (tabla 2.6).

2.3.4. Aminoácidos libres

En el apartado anterior, al hablar de las fracciones de N, se señaló que la fracción N-amínica fue la que más se incrementó como resultado del aumento de N asimilado por las plántulas. Los aminoácidos libres tuvieron un comportamiento similar al de la fracción amínica, aumentando sus niveles como consecuencia de la mayor disponibilidad de N en los tejidos, como ya se había visto en otras especies (Haynes y Goh, 1978; Darral y Wareing, 1981; Barneix *et al.*, 1984). Asimismo, dicho aumento fue mayor con las aplicaciones de N-NH₄. La utilización de NH₄NO₃ provocó los mayores niveles de aminoácidos libres de todos los tratamientos, en correlación con la mayor asimilación de N que se alcanzó con esta sal. Otros autores (Kirkby, 1968; Arnozis y Barneix, 1989) ya habían señalado que las sales de amonio favorecían la acumulación de aminoácidos, particularmente prolina, alanina y glutamato, en plantas de *Sinapis alba*. Por su parte, Hagin *et al.* (1990) indicaron que el suministro conjunto de amonio y nitrato a raíces de plantas superiores producía mayor acumulación de aminoácidos que cada fuente por separado.

En la tabla 2.10 se muestran los niveles de 17 aminoácidos libres analizados, agrupados de acuerdo al criterio de familias biosintéticas (Lea *et al.*, 1985), en relación con los distintos tratamientos realizados.

Todos los grupos de aminoácidos libres aumentaron sus contenidos como consecuencia de la mayor disponibilidad de N en los tejidos. Las familias de aminoácidos de cadena ramificada y aromáticos + histidina presentaron los niveles más bajos en todos los tratamientos, aumentando sus contenidos al aumentar la concentración de N en el medio, si bien el empleo de NH₄NO₃ produjo los mayores incrementos.

Los bajos niveles de fenilalanina y tirosina se debieron probablemente a que la ruta del ácido shikímico, de la que provienen, es precursora de la síntesis de importantes compuestos secundarios implicados en la organogénesis, tales como ácidos fenólicos, flavonas y flavonoides, etc. (Mifflin y Lea, 1977; Lea *et al.*, 1985).

La familia del aspartato mostró un fuerte incremento con las aplicaciones de N-NH₄, particularmente cuando la fuente fue NH₄NO₃, mientras que con (NH₄)₂SO₄ los niveles del grupo fueron relativamente estables y tendieron a disminuir cuando aumentó la concentración de esta sal. Dentro de este grupo fue el aspartato el aminoácido que mayor contenido presentó, seguramente por su cercanía biosintética

al ciclo glutamina sintetasa (GS)-glutamato sintasa (GOGAT), clave de la incorporación del N asimilado a los esqueletos carbonados (Mifflin y Lea, 1982). El aspartato se produce por transaminación de oxalacetato, con el glutamato como donador del grupo amino, por lo tanto una tasa elevada de funcionamiento del ciclo GS/GOGAT explicaría el aumento de concentración de aspartato, en condiciones de alta disponibilidad de N. En estas condiciones existe una gran demanda de esqueletos carbonados para fijar el N disponible en los tejidos (Lara, 1992), lo que acelera el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, aumentando los niveles de oxalacetato. El contenido del resto de los aminoácidos del grupo depende de su precursor (aspartato), de modo que la elevación de los niveles de éste redundaría en el de los demás.

La familia de la serina tuvo un comportamiento muy similar al descrito para los aminoácidos del grupo del aspartato, presentando un aumento de concentración cuando se usaron fuentes de N-NH₄. La biosíntesis de serina tiene lugar a partir de 3-fosfoglicerato y la de alanina por transaminación de piruvato, por lo que la elevación de sus niveles estaría ligada por un lado, a la tasa de glucolisis y por otro al funcionamiento del ciclo GS/GOGAT. Otros autores ya habían apuntado que la asimilación de N produce un fuerte flujo de esqueletos carbonados hacía la biosíntesis de aminoácidos (Paul *et al.*, 1978; Woo y Canvin, 1980a;b).

La familia del glutamato fue la que mayores concentraciones presentó con todos los tratamientos. Como en los demás grupos, las aplicaciones de N-NH₄ aumentaron notablemente sus niveles, siendo NH₄NO₃ la sal que produjo la acumulación más elevada de estos aminoácidos. Sin embargo, en esta familia de aminoácidos, el tipo de fuente de N empleada tuvo un efecto algo distinto en algunos de los componentes de este grupo.

Cuando la fuente de N fue NH₄NO₃, la familia del glutamato aumentó mucho sus niveles, destacando el incremento de las concentraciones de glutamato y arginina. El aumento del glutamato está probablemente relacionado con una alta tasa de funcionamiento del ciclo GS/GOGAT debida a la elevada disponibilidad de N. Sin embargo, el mayor aumento relativo fue el de arginina. Este aminoácido tiene un importante papel como molécula de almacenamiento de N, gracias a su elevada relación N:C (Mifflin y Lea, 1977), de modo que se podría pensar que la alta disponibilidad de N registrada, como consecuencia de los tratamientos con NH₄NO₃

indujo a una mayor síntesis de arginina como medio de almacenamiento en las plántulas (Nassar y Kliwer, 1966; Kluba *et al.*, 1978; Sarmiento *et al.*, 1992).

Los niveles de arginina aumentaron drásticamente con las aplicaciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, llegando a suponer entre el 30 y el 40% del total de aminoácidos libres analizados. Los niveles de glutamato tendieron a disminuir cuando las aplicaciones de esta sal llegaron a 30 mM de N, en concordancia con lo descrito por Sarmiento *et al.* (1992). Estos efectos, tomados conjuntamente, parecen indicar que la elevada proporción de amonio debida a los tratamientos con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ indujo una formación preferente de arginina, como consecuencia de lo cual se resintieron los niveles de glutamato y de aquellos aminoácidos de los que el glutamato es precursor directo vía transaminasas, en particular alanina, prolina y aspartato.

En resumen, el aumento de la asimilación de N como consecuencia de la mayor disponibilidad del mismo en el medio, se tradujo en una mayor síntesis de aminoácidos libres que fue más elevada con sales N- NH_4 y máxima cuando se utilizó NH_4NO_3 a 30 mM de N.

La presencia de amonio en el medio de cultivo provocó un fuerte aumento de los niveles de arginina como forma de almacenamiento de N, particularmente cuando se suministró $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En este caso, los niveles de arginina llegaron a suponer entre el 30 y el 40% del total de los aminoácidos libres analizados.

Tabla 2.10. Niveles de aminoácidos libres ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ p.s.) tras los distintos tratamientos nitrogenados (media de las pruebas 1 y 2).

	KNO ₃ (mM de N)				NH ₄ NO ₃ (mM de N)				(NH ₄) ₂ SO ₄ (mM de N)			
	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30
<i>aminoácidos de cadena ramificada</i>												
Leu	0.11	0.28	0.19	0.23	0.70	0.78	1.08	1.71	0.49	0.82	1.07	0.96
Val	0.17	0.28	0.23	0.31	0.86	0.95	1.31	1.92	0.47	0.90	1.04	0.83
	0.28	0.55	0.42	0.54	1.55	1.73	2.39	3.63	0.96	1.72	2.12	1.79
<i>aminoácidos aromáticos e histidina</i>												
Phe	0.82	1.35	0.24	0.24	0.30	0.44	0.58	1.01	0.26	0.37	0.56	0.43
Tyr	0.23	0.11	0.21	0.17	0.73	0.63	0.95	1.42	0.47	0.55	0.79	0.46
His	0.12	0.11	0.09	0.04	0.17	0.32	0.79	1.29	0.32	0.74	1.05	1.26
	1.17	1.57	0.55	0.45	1.20	1.39	2.32	3.72	1.04	1.66	2.41	2.14
<i>familia aspartato</i>												
Asp	0.41	0.68	0.95	1.26	2.55	2.69	3.40	4.17	2.44	2.71	2.68	1.58
Thr	0.08	0.14	0.15	0.24	0.82	1.15	1.69	2.73	2.26	1.83	2.50	2.19
Met	0.00	0.00	0.01	0.01	0.09	0.06	0.05	0.09	0.25	0.00	0.01	0.28
Ile	0.09	0.21	0.20	0.24	0.75	0.84	1.05	1.53	0.51	0.75	0.77	0.66
Lys	0.05	0.15	0.06	0.10	0.26	0.66	1.26	2.59	0.64	1.27	2.19	2.20
	0.63	1.19	1.37	1.84	4.48	5.40	7.45	11.10	6.10	6.56	8.15	6.92
<i>familia serina</i>												
Ser	0.21	0.53	0.21	0.30	3.26	3.92	5.80	8.79	3.81	3.82	3.39	1.96
Gly	0.67	1.14	0.44	0.41	0.99	1.30	1.67	2.28	0.82	1.79	0.93	1.38
Cys	0.04	0.05	0.09	0.07	0.07	0.08	0.13	0.12	0.12	0.22	0.08	0.19
Ala	0.56	1.15	1.02	1.51	3.01	3.68	4.69	5.49	1.56	2.40	2.85	1.97
	1.47	2.87	1.76	2.29	7.34	8.99	12.29	16.68	6.31	8.23	7.26	5.50
<i>familia glutamato</i>												
Glu	0.67	0.80	1.29	1.51	1.48	2.36	3.33	4.28	0.86	1.35	1.50	0.50
Pro	1.15	1.51	0.77	2.76	2.15	2.25	2.06	3.32	0.68	1.66	2.37	1.66
Arg	0.37	1.44	0.90	1.34	2.87	4.29	6.13	8.04	7.14	9.04	12.90	11.24
	2.18	3.74	2.97	5.60	6.49	8.90	11.52	15.64	8.68	12.06	16.77	13.40
<i>total aminoácidos libres</i>												
	5.73	9.93	7.07	10.73	21.06	26.41	35.97	50.77	23.08	30.22	36.70	29.76

3. INFLUENCIA DE LA FUENTE Y CONCENTRACIÓN DE N SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE OLIVO EN INVERNADERO.

3.1. INTRODUCCIÓN

Los capítulos anteriores se han centrado fundamentalmente en la obtención y desarrollo *in vitro* de una planta de olivo a partir de su embrión. Como se vio, la germinación de embriones y el uso de un medio con la formulación nitrogenada más adecuada permitió obtener un tanto por ciento muy elevado de plántulas viables y de calidad, en un corto espacio de tiempo. Una vez obtenidas así las nuevas plantas es necesaria su aclimatación al ambiente externo y su posterior desarrollo en contenedores con sustrato artificial, en condiciones de invernadero. En esta situación, las plantas siguen siendo muy sensibles a la nutrición y este aspecto puede ser utilizado para acelerar su crecimiento y con ello acortar el periodo juvenil.

Diversos experimentos con diferentes especies han puesto de manifiesto que, en estas condiciones de cultivo, la forma de N ejerce un importante efecto tanto sobre el crecimiento como sobre la composición mineral de las plantas (Ullrich y Gersper, 1985; Wilcox *et al.*, 1985; Peterson *et al.*, 1988; van Beusichem *et al.*, 1988; Marti y Mills, 1991a; b; Simonne *et al.*, 1993; Ali *et al.*, 1994). En olivo, algunos autores han realizado estudios en hidroponía para conocer mejor las exigencias nutricionales de la especie (Hartmann y Brown, 1953; Milella y Deidda, 1975; Bartolini *et al.*, 1983) aunque aún quedan aspectos de la nutrición nitrogenada que necesitan estudiarse en mayor profundidad. Therios (1984) mostró que el olivo es una planta con baja eficiencia de absorción de nitrato. Otros trabajos han ido encaminados a establecer los niveles de N óptimos en hidroponía (Bartolini *et al.*, 1984) y sólo algunos se han centrado en la influencia de las formas de N sobre el crecimiento de las plantas (Therios y Sakellariadis, 1988; Tattini *et al.*, 1990).

En este capítulo, siguiendo las directrices expuestas en el capítulo 2, se ha estudiado la influencia de las distintas formas de nutrición nitrogenada pero en condiciones de invernadero, con objeto de encontrar las condiciones nutritivas más adecuadas para acelerar el crecimiento de las plántulas de olivo y, así, acortar su periodo juvenil.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Experimento 1.

Como material vegetal se usaron plántulas de olivo, cv. Manzanillo (*Olea europaea pomiformis* L.), obtenidas por germinación *in vitro* de embriones aislados que se transplantaron a vasos de PVC de 250 cc de capacidad con sustrato de perlita y turba (1:1 v/v), cubiertos con una bolsa de plástico transparente para mantener la planta en un ambiente de humedad elevada. Las plántulas así preparadas se instalaron en el invernadero y a intervalos de 5-6 días se fueron cortando trozos de la bolsa plástica hasta, paulatinamente, dejar la plántula en contacto directo con el ambiente. En estas condiciones permanecieron 3 meses hasta su aclimatación total, recibiendo solamente riegos con agua. Después de ese tiempo, las plantas se transplantaron a contenedores de 8 l con sustrato de arena estéril lavada a los ácidos y, por un sistema de riego gota a gota, recibieron uniformemente solución nutritiva de Hoagland 20%.

Tras un mes en esas condiciones se midió el tamaño de cada planta, expresándolo como una longitud (suma de la longitud de cada brote) y se hicieron 10 grupos homogéneos de 30 plantas cada uno (3 repeticiones de 10 plantas) que se regaron, manteniendo siempre la capacidad de campo medida por tensiómetros de mercurio, de la siguiente forma:

Grupo 1.- (testigo) Solución base (Hoagland 20% con 1.6 mM de N como $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$).

Grupo 2.- Solución base más 10 mM de N como KNO_3 .

Grupo 3.- Solución base más 15 mM de N como KNO_3 .

Grupo 4.- Solución base más 20 mM de N como KNO_3 .

Grupo 5.- Solución base más 10 mM de N como NH_4NO_3 .

Grupo 6.- Solución base más 15 mM de N como NH_4NO_3 .

Grupo 7.- Solución base más 20 mM de N como NH_4NO_3 .

Grupo 8.- Solución base más 10 mM de N como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Grupo 9.- Solución base más 15 mM de N como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Grupo 10.- Solución base más 20 mM de N como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Experimento 2

Debido a que en el primer experimento se observaron fuertes daños en las plantas, excepto las del grupo testigo, que se atribuyeron a un exceso de N, el segundo experimento se diseñó igual que el primero pero variando las concentraciones de N añadidas a la solución base.

En pequeños experimentos adicionales se determinó que la concentración máxima de N que soportaban las plántulas en las condiciones descritas fue de 5 mM. Por ello, las sales nitrogenadas empleadas se añadieron a concentraciones de 2.5, 3.8 y 5 mM de N a la solución base (testigo) que consistió en una solución Hoagland 20% más 1.6 mM de N como $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Es decir que existieron los mismos 10 grupos de plantas pero con las concentraciones de N más bajas.

Después de 6 meses de cultivo, se determinó de nuevo el tamaño de cada planta y al restarle el medido al principio del experimento se obtuvo el crecimiento habido con cada tratamiento de N.

En los contenedores donde se mantuvieron las soluciones nutritivas de KNO_3 , NH_4NO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se realizaron controles sucesivos de las concentraciones respectivas de nitrato y amonio (Bremmer y Keeney, 1966; Keeney y Nelson, 1982).

Una vez finalizado el experimento se cortaron las plantas a nivel de la superficie del sustrato y se dejaron en el invernadero durante el invierno.

Experimento 3

Se inició esta prueba a finales de invierno, utilizando como material vegetal las mismas plantas del experimento anterior que estaban comenzando a rebrotar.

Los tratamientos y controles fueron iguales a los indicados en el segundo experimento con la única variación de que el control de las concentraciones de nitrato y amonio en los contenedores sólo se hizo una vez (tabla 3.3) y este tipo de control para nitrato se extendió además al sustrato de cultivo de cada grupo de plantas, tomado 6 días después de efectuado un riego con las distintas soluciones nutritivas (tabla 3.4).

La determinación de los elementos minerales y fracciones de N se realizó según la metodología descrita en el apartado 2.2.

Experimento 4

Esta prueba fue una repetición del segundo experimento con las siguientes modificaciones:

- Se elevó a 3 mM el contenido de N de la solución nutritiva del testigo.
- Se renovaron quincenalmente las soluciones nutritivas en los contenedores, para evitar la oxidación de amonio a nitrato.
- Se aumentó a 9 meses el tiempo de duración del experimento.

En esta prueba no se realizaron análisis de las fracciones de N ni de los niveles de amonio y nitrato en los contenedores.

Experimento 5

Esta prueba fue contemporánea y similar a la anterior, con la única diferencia de que el sustrato de cultivo en lugar de arena estéril fue una mezcla de arena y turba (1:1 v/v).

Experimento 6

Como en pruebas anteriores, el material vegetal estuvo formado por plántulas de olivo, cv. Manzanillo, obtenidas *in vitro* de embriones aislados. Después de un periodo de 3 meses de aclimatación (como en el experimento 1) se cultivaron en invernadero, en contenedores de 8 l con sustrato de arena y turba (1:1, v/v) y fertirrigados con solución Hoagland 20% durante 8 meses. Después de ese tiempo, las plantas se cortaron por la base y se dividieron en 8 grupos de 30 plantas cada uno, que se sometieron a los siguientes tratamientos:

Grupo 1.- Solución Hoagland 20% sin N (testigo).

Grupos 2 al 8.- Solución base (Hoagland 20% sin N) y adiciones respectivas de 3.5, 7, 14, 21, 28, 40 y 46 mM de N como NH_4NO_3 .

Tras 11 meses en estas condiciones se midió el tamaño de cada planta (suma del tamaño de sus brotes).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el primer experimento, al objeto de estudiar concentraciones de N equiparables a las utilizadas en las pruebas de cultivo *in vitro*, se ensayaron 10, 15 y 20 mM de N de cada uno de los compuestos nitrogenados comparados (KNO_3 , NH_4NO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Todas las concentraciones de N provocaron fuertes daños e incluso la muerte de muchas plántulas. Es decir, que la planta de olivo obtenida *in vitro*, aclimatada a condiciones externas, puesta en sustrato de arena estéril y fertirrigada con soluciones nitrogenadas, mostró una cierta sensibilidad a la

concentración salina del medio nutritivo. Una situación parecida habían indicado Bartolini *et al.* (1984), trabajando con plantas jóvenes de olivo obtenidas en nebulización, a partir de estaquillas y también cultivadas en arena estéril.

Tras distintos ensayos reduciendo las concentraciones de N anteriores, se llegó a la conclusión de que las plantas, en las condiciones de cultivo indicadas, no soportaban adiciones de N superiores a 5 mM. Por ello, los tratamientos con cada uno de los compuestos nitrogenados se llevaron a cabo con concentraciones de 2.5, 3.8 y 5 mM de N. En la primera prueba con estas concentraciones (experimento 2), de 6 meses de duración, existió una diferencia significativa de crecimiento entre el testigo tratado con la solución base (Hoagland 20% con sólo 1.6 mM de N como $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) y el resto de los tratamientos nitrogenados (fig. 3.1A). Por el contrario, no existieron diferencias significativas entre los crecimientos de las plantas tratadas con los distintos compuestos nitrogenados o las diferentes concentraciones de N, lo que se contradice con los resultados obtenidos para las plántulas *in vitro*, en los que la forma de N tuvo un efecto muy acusado sobre el crecimiento.

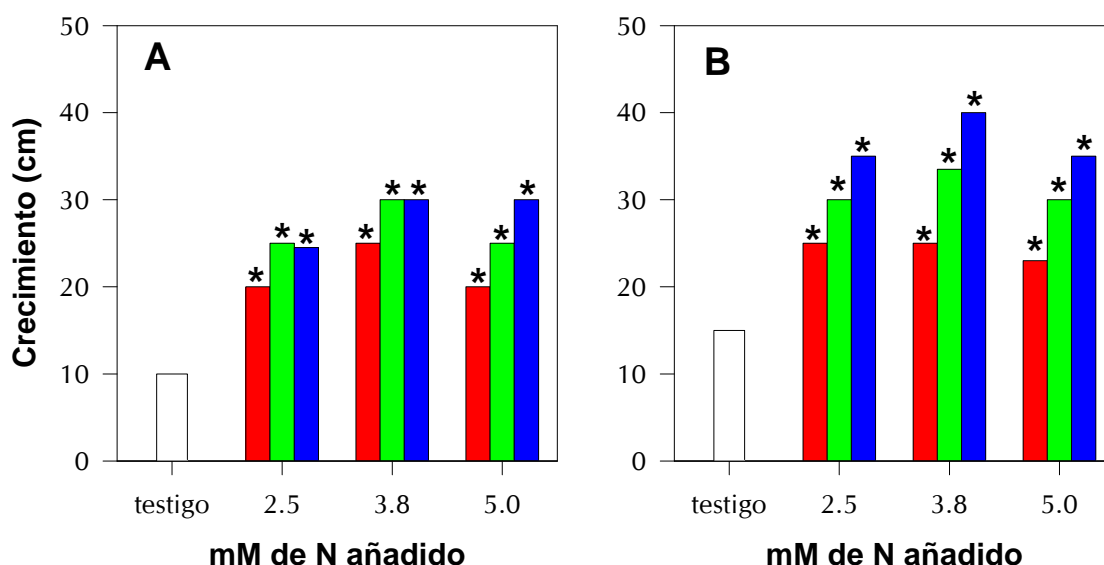


Figura 3.1. Crecimiento de la plántula de olivo (6 meses) en sustrato de arena, en cada tratamiento de N. (□) testigo; (■) KNO_3 ; (■) NH_4NO_3 ; (■) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A: Experimento 2. B: Experimento 3. El asterisco indica significación estadística respecto al testigo (*t* Student, $p < 0.05$).

Resultados muy parecidos se obtuvieron en el experimento 3, que fue una repetición del anterior, realizado al año siguiente (fig. 3.1B). De nuevo existieron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo, pero no así entre las

diferentes formas de N ensayadas, aunque las plantas tratadas con N-NH₄ crecieron claramente más.

De los resultados de este primer conjunto de experimentos se pudieron deducir algunas consecuencias de interés:

La plántula joven de olivo cultivada en sustrato de arena inerte mostró una fuerte sensibilidad a la aplicación de más de 5 mM de N, disueltos en solución Hoagland al 20%. Al mismo tiempo, cuando sólo se aplicó una concentración de 1.6 mM de N (testigo), se obtuvo un crecimiento muy pequeño que denotó una cierta deficiencia del nutriente. Esta posible deficiencia en la disponibilidad de N para la planta se confirmó al aplicar N en concentraciones de 2.5, 3.8 ó 5 mM, ya que se incrementó significativamente el crecimiento. En consecuencia, existió muy poco margen en cuanto al posible N a aplicar entre una situación de deficiencia o de toxicidad.

Probablemente debido a las pequeñas concentraciones de N aplicadas y a que el tiempo de experimentación fue también corto, no se encontraron diferencias significativas entre los crecimientos habidos en las plantas cultivadas en las distintas concentraciones o fuentes de N.

En consonancia con la semejanza de crecimiento, no se encontraron grandes diferencias en la composición mineral de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de N (tabla 3.1).

El contenido más bajo de N (1.81%) lo presentaron las hojas de las plantas testigo. No obstante, dicho valor es bastante elevado y está lejos de poderse considerar como de deficiencia. Es decir, las plantas del control que solo habían recibido 1 mM de N redujeron su ritmo de crecimiento, antes que modificar drásticamente sus niveles de N. Este comportamiento, observado previamente por Bartolini *et al.* (1984), probablemente es un mecanismo de defensa de la planta ante una situación adversa.

Contenidos ligeramente superiores (1.93%) al indicado antes mostraron las hojas de las plantas tratadas con KNO₃, sin que existieran diferencias entre las tres concentraciones ensayadas. Las plantas que recibieron N-NH₄ aumentaron algo más sus niveles de N en hoja (2.19% para NH₄NO₃ y 2.31% para (NH₄)₂SO₄) aunque sin llegar a las grandes diferencias encontradas previamente en las plantas cultivadas *in vitro*. En general, todos los niveles de macro y micronutrientes fueron menores a los

Tabla 3.1. Composición mineral de las hojas de plántulas de olivo cultivadas 6 meses en sustrato de arena estéril en relación con los tratamientos nitrogenados (Experimento 3).

mM de N		% p.s.						ppm				
		N	P	K	Ca	Mg	Na	S	Fe	Mn	Zn	Cu
testigo	1.6	1.81	0.12	0.84	0.69	0.09	0.03	0.12	74	19	26	148
KNO ₃	2.5	1.95	0.10	1.01	0.62	0.10	0.02	0.13	73	12	33	171
	3.8	1.89	0.10	0.90	0.61	0.10	0.02	0.12	64	16	24	135
	5.0	1.94	0.09	0.98	0.71	0.11	0.03	0.16	74	16	23	129
NH ₄ NO ₃	2.5	2.22	0.12	0.96	0.62	0.11	0.03	0.13	75	14	26	180
	3.8	1.99	0.11	0.98	0.49	0.07	0.02	0.10	51	21	17	63
	5.0	2.37	0.13	0.95	0.80	0.18	0.07	0.15	88	23	39	56
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5	2.08	0.13	0.95	0.72	0.11	0.03	0.12	89	23	28	136
	3.8	2.14	0.16	1.06	0.61	0.08	0.03	0.14	85	29	33	111
	5.0	2.72	0.16	1.00	0.75	0.19	0.03	0.16	73	44	51	114

encontrados en las plántulas *in vitro* a concentraciones similares (tablas 2.6 y 2.8), con la sola excepción del Ca, cuyos contenidos fueron mayores en las plantas cultivadas en invernadero, no observándose la inhibición de su asimilación vista en los cultivos *in vitro*.

En los restantes nutrientes analizados (tabla 3.1), tampoco se encontraron diferencias entre tratamientos. Llamaron la atención los niveles tan elevados de Cu en hojas (los valores normales en hojas de olivo son de alrededor de 5-15 ppm), lo que se relacionó con un tratamiento fungicida realizado con oxiclورو de cobre.

No obstante las pocas diferencias existentes entre los contenidos de N-total en las hojas de las plántulas sometidas a los distintos tratamientos (tabla 3.1), a continuación se detallan los niveles de las distintas fracciones de N en relación con los tratamientos con objeto de poder compararlas con lo observado antes para las plantas *in vitro* (tabla 3.2).

Las plantas control, tratadas solamente con 1.6 mM de N tuvieron un 0.030% de N-amoniacoal, lo que representó la cifra más baja del conjunto de los tratamientos. Las tratadas con KNO₃ (2.5, 3.8 y 5 mM respectivamente) aumentaron muy poco el valor anterior, presentando una media de 0.040%, sin grandes diferencias entre los niveles relativos a cada concentración. Las dos concentraciones más bajas de NH₄NO₃

Tabla 3.2. Fracciones de N en relación con los tratamientos nitrogenados (Experimento 3).

Tratamiento mM de N	N-Amoniacal % p.s.	N-Amídico % p.s.	N-Amínico % p.s.	N-Proteico % p.s.	N-total % p.s.	
testigo 1.6	0.030	0.045	0.313	1.46	1.85	
KNO ₃	2.5	0.044	0.029	0.220	1.65	1.94
	3.8	0.030	0.030	0.237	1.60	1.89
	5.0	0.045	0.031	0.226	1.64	1.94
	2.5	0.044	0.029	0.251	1.77	2.36
NH ₄ NO ₃	3.8	0.044	0.029	0.248	1.69	2.02
	5.0	0.082	0.014	0.205	2.10	2.40
	2.5	0.057	0.014	0.185	1.79	2.05
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.8	0.074	0.009	0.212	1.97	2.26
	5.0	0.073	0.009	0.322	2.38	2.78

mantuvieron contenidos de N-amoniacal similares a los anteriores (0.044%), mientras que subió hasta 0.082% con la concentración más alta de N. Los tratamientos con (NH₄)₂SO₄, los de mayor proporción de N-NH₄, también provocaron contenidos superiores al del control de esta fracción de N, en especial a las concentraciones más elevadas.

En comparación con las plantas cultivadas *in vitro* con 5 mM de N (tabla 2.9), las plantas crecidas en invernadero con esa misma concentración de N mostraron contenidos de N-amoniacal mucho menores, aunque en ambos grupos de plantas se observó la tendencia al aumento de esta fracción de N al suministrar N-NH₄.

Los contenidos de N-amídico (tabla 3.2) de las plantas cultivadas en invernadero fueron, en media, del orden del 0.024%, sin grandes variaciones con los tratamientos, aunque con la tendencia a disminuir al aumentar las aplicaciones de N-NH₄. En las plántulas cultivadas *in vitro*, el comportamiento fue el contrario (tabla 2.9).

La fracción de N-amínico (tabla 3.2) fue más elevada que las dos anteriores ya que la media de los tratamientos alcanzaron el 0.24%, pero tampoco se encontraron diferencias importantes debidas a los compuestos o concentraciones empleados. Al igual que ocurrió con las fracciones anteriores, las plantas *in vitro* (tabla 2.9) mostraron niveles mucho más altos de N-amínico que las de invernadero.

La fracción de N-proteico sí denotó cierta dependencia de los tratamientos. El valor más bajo (1.46%) se obtuvo en las plantas del grupo testigo, mientras que las tratadas con KNO_3 alcanzaron una media de 1.63%, no presentando diferencias entre las concentraciones probadas. Cuando se utilizaron sales N- NH_4 , la fracción de N-proteico fue más elevada que en los tratamientos anteriores y además aumentó con las concentraciones crecientes de N suministrado. Así, las plantas tratadas con NH_4NO_3 alcanzaron un 2.10% y las que recibieron $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ llegaron hasta el 2.38%. Es decir, la presencia de amonio en el medio aumentó el contenido de proteínas de la planta. Aunque en valor absoluto los niveles de N-proteico de las plantas cultivadas *in vitro* (tabla 2.9) fueron superiores, en valor relativo, comparados con cualquiera de las fracciones o con el N-total, fueron superiores las plantas mantenidas en invernadero. Así, en las plantas *in vitro*, en media para los tratamientos con 5 mM de N, el N-proteico representó entre el 75-65% del N-total, mientras que en las plantas en invernadero llegó hasta el 84%. Es decir que las plantas ya más desarrolladas, con mejor sistema radical, más hojas que las cultivadas *in vitro* y que recibían luz solar, junto con un mayor tiempo de cultivo, incrementaron claramente los contenidos relativos de proteínas. El aumento relativo de la síntesis de proteínas encontrado con los tratamientos con N- NH_4 puede ser la causa de la disminución de las fracciones N-amídica y N-amínica.

El N-total obtenido por la suma de las fracciones indicadas coincidió prácticamente con el indicado antes (tabla 3.1), obtenido por análisis directo. En consecuencia, junto a tener una confirmación de la validez de los resultados, son igualmente válidos aquí los comentarios hechos antes.

Existe abundante bibliografía sobre el proceso de nitrificación del N amoniacal o uréico en condiciones de campo (Duisberg y Buehrer, 1954; Gasser y Iordanou, 1967; Walker, 1976; Bhuija y Walker, 1977; Mengel y Kirkby, 1982). Chaves *et al.* (1978) demostraron que también se produce nitrificación cuando se abona con N- NH_4 o con N-uréico a plantas cultivadas en contenedores con suelo de granito o pizarra como sustrato. Por ello y debido a que los distintos tratamientos no provocaron diferencias significativas en el crecimiento de las plantas, se estudió la evolución de N- NH_4 (fig. 3.2A) y la de N- NO_3 (fig. 3.2B) en los contenedores donde se mantuvieron las distintas soluciones nutritivas de NH_4NO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, correspondientes al experimento 2.

Se debe indicar que, aunque no aparece en las figuras, las soluciones nutritivas con sólo KNO_3 no cambiaron con el tiempo sus respectivas concentraciones iniciales de N-NO_3 y prácticamente no apareció N-NH_4 .

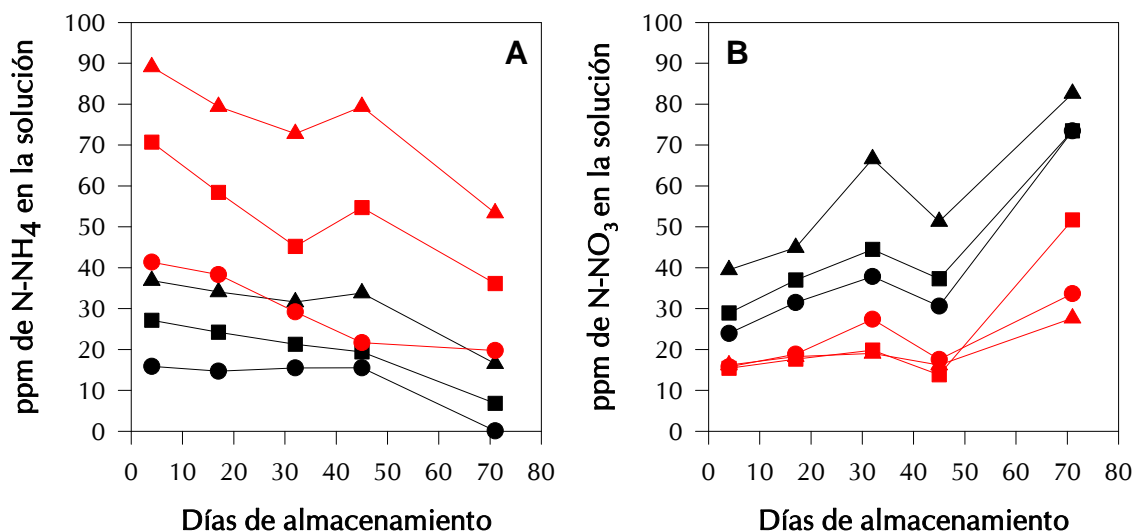


Figura 3.2.: Evolución de la concentración de N-NH_4 (A) y N-NO_3 (B) en la solución nutritiva en los contenedores.

- NH_4NO_3 2.5 mM de N
- NH_4NO_3 3.8 mM de N
- ◆ NH_4NO_3 5 mM de N
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 mM de N
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.8 mM de N
- ◆ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 mM de N

Las soluciones con N-NH_4 (NH_4NO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) mostraron un descenso en el contenido de NH_4^+ (fig. 3.2A) y, en paralelo, un aumento del de NO_3^- (fig. 3.2B), proporcional a la concentración de N-NH_4 en la solución y al tiempo de almacenamiento. Es decir, que incluso en las condiciones establecidas en la prueba para la conservación de las soluciones nutritivas que se mantenían en bombonas de PVC, recubiertas con un forro negro opaco, también de PVC, y tapadas, se produjo la oxidación parcial del N-NH_4 a N-NO_3 .

Como comprobación de lo anterior se realizó un control de los niveles de N-NH_4 y N-NO_3 en las soluciones nutritivas en los contenedores, correspondientes al experimento 3 (tabla 3.3), tras 100 días de almacenamiento.

De nuevo se observó que las soluciones con sólo N-NO_3 prácticamente no mostraron contenidos de N-NH_4 , mientras que las que tenían N-NH_4 presentaron cantidades importantes de N-NO_3 , llegando ambas formas a estar prácticamente en equilibrio cuando la solución nutritiva fue $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Es decir, se confirmó la

existencia de un proceso de oxidación $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$ en los contenedores de almacenamiento.

Tabla 3.3. Contenidos de N-NH₄ y de N-NO₃ en las soluciones nutritivas después de 100 días de almacenamiento en los contenedores (Experimento 3).

Solución nutritiva	Contenido de N-NH ₄ (ppm)	Contenido de N-NO ₃ (ppm)	C.E. dS/m	
testigo	0.40	36.0	2.00	
KNO ₃	2.5	0.24	64.5	2.18
	3.8	0.17	79.5	2.27
	5.0	0.11	102.0	2.46
NH ₄ NO ₃	2.5	4.70	61.9	2.14
	3.8	13.90	70.1	2.20
	5.0	21.70	76.2	2.28
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5	23.60	32.0	2.22
	3.8	41.40	42.6	2.33
	5.0	59.60	46.2	2.45

En la tabla 3.4 se indican los contenidos de N-NO₃ en el sustrato de cultivo (arena), 6 días después de haber realizado un riego.

Tabla 3.4. Contenidos de N-NO₃ (ppm) en el sustrato de cultivo, 6 días después de recibir un riego con soluciones nutritivas.

Tratamientos									
testigo (mM de N)	KNO ₃ (mM de N)			NH ₄ NO ₃ (mM de N)			(NH ₄) ₂ SO ₄ (mM de N)		
1.6	2.5	3.8	5.0	2.5	3.8	5.0	2.5	3.8	5.0
10.9	21.2	27.6	36.8	20.5	26.6	40.3	20.6	25.6	27.7

Como se indicó antes para el caso de los contenedores, también en el sustrato aparecieron cantidades importantes de N-NO₃ en todos los casos, incluso cuando se

utilizó solamente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, de tal forma que 6 días después del riego, todas las plantas disponían de prácticamente la misma cantidad de nitrato en el sustrato.

Este proceso de oxidación junto al tiempo relativamente pequeño, 6 meses, de duración del experimento pueden explicar en gran parte las pequeñas diferencias habidas en el crecimiento de las plantas tratadas con distintas formas y concentraciones de N.

Como consecuencia, en el experimento 4, tal como se indicó en el capítulo de Material y Métodos, se realizaron tres modificaciones: se elevó a 3 mM el contenido de N de la solución nutritiva dada a las plantas del grupo testigo; se renovaron mensualmente las soluciones madre y se aumentó a 9 meses el tiempo de experimentación.

Estas modificaciones cambiaron significativamente los resultados obtenidos (fig. 3.3). Se produjo un crecimiento similar entre las plantas testigo y las tratadas con KNO_3 , sin que existieran diferencias entre las tres concentraciones usadas. Por el contrario, los tratamientos con N- NH_4 , salvo para la concentración más baja de NH_4NO_3 , provocaron en las plantas respectivas crecimientos significativamente superiores a los anteriores, sin diferencias estadísticas entre si. Es decir, el disponer de soluciones nutritivas más frescas, con menos posibilidades de oxidación ($\text{NH}_4^+ \rightarrow$

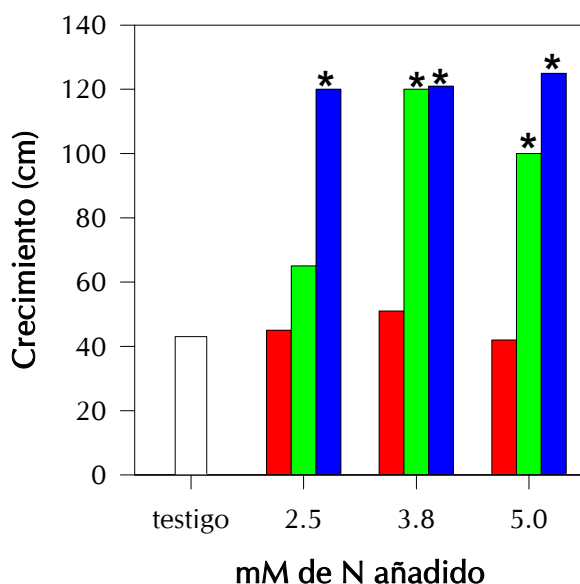


Figura 3.3. Experimento 4: Crecimiento de la plántula de olivo (9 meses) en sustrato de arena en cada tratamiento de N. (□) testigo; (■) KNO_3 ; (■) NH_4NO_3 ; (■) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El asterisco indica significación estadística respecto al testigo (*t* Student, $p < 0.05$).

NO_3^-) y la mayor duración del experimento permitió observar la acción positiva sobre el crecimiento de la planta de las aplicaciones de N-NH_4 , como se había indicado en trabajos anteriores con plántulas de olivo en hidroponía (Therios y Sakellariadis, 1988) e *in vitro* (Sarmiento *et al.*, 1994) o en esta memoria.

En la figura 3.4 se comparan los crecimientos medios de todas las plantas cultivadas durante 6 meses, independientemente del tratamiento al no existir diferencias significativas entre ellos, con las cultivadas durante 9 meses tratadas con solución base o con KNO_3 (media de todos los tratamientos) y con las también cultivadas durante 9 meses pero tratadas con NH_4NO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (excepto NH_4NO_3 a 3 mM). Los crecimientos de los dos primeros grupos siguieron un ritmo bajo y similar, mientras que las que recibieron N-NH_4 elevaron significativamente su ritmo de desarrollo.

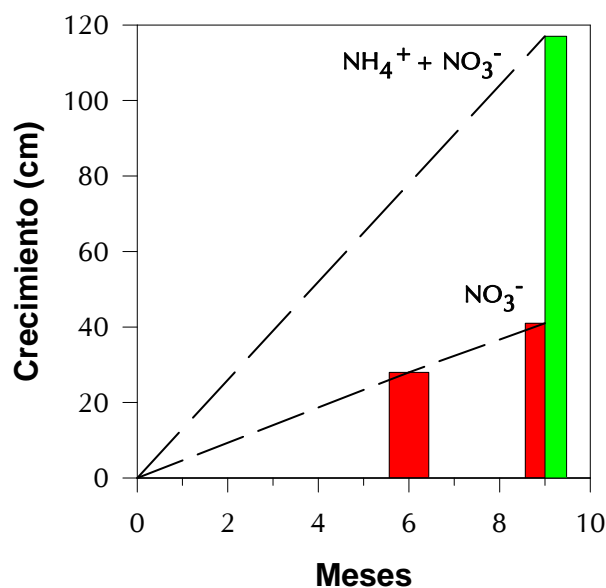


Figura 3.4. Crecimiento medio de la plántula de olivo en relación con el tiempo de duración del experimento.

(■) NO_3^- ; (■) $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$

No obstante estas diferencias de crecimiento no aparecieron grandes diferencias en la composición mineral entre los grupos de plantas de la prueba de 9 meses (tabla 3.5) como ocurriera con el experimento de 6 meses.

Cabe destacar que se encontraron contenidos superiores de P en las hojas de las plantas tratadas con N-NH_4 , resultado similar al descrito para otros cultivares (Therios y Sakellariadis, 1988). Por su parte, el K presentaba mayores concentraciones en las

Tabla 3.5. Composición mineral de las hojas de plántulas de olivo cultivadas 9 meses en sustrato de arena estéril en relación con los tratamientos nitrogenados (Experimento 4).

		% p.s.							ppm			
mM de N		N	P	K	Ca	Mg	Na	S	Fe	Mn	Zn	Cu
testigo	3.0	2.11	0.10	2.15	0.90	0.22	1.16	0.28	50	11	42	17
KNO ₃	2.5	2.39	0.09	1.85	0.81	0.18	0.38	0.17	114	12	13	8
	3.8	2.21	0.09	2.06	0.71	0.12	0.22	0.19	116	21	14	7
	5.0	2.11	0.08	2.26	1.10	0.21	0.70	0.15	111	33	44	8
NH ₄ NO ₃	2.5	2.19	0.16	1.36	0.82	0.21	0.47	0.17	102	31	42	10
	3.8	2.19	0.20	1.29	1.02	0.25	0.20	0.18	145	53	128	8
	5.0	2.30	0.23	1.28	1.00	0.29	0.22	0.16	114	48	114	9
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5	2.16	0.23	1.07	1.16	0.31	0.26	0.28	104	22	21	8
	3.8	2.31	0.27	1.13	0.90	0.27	0.39	0.24	106	23	19	10
	5.0	2.66	0.25	1.25	1.05	0.31	0.25	0.28	122	29	23	8

hojas de las plantas tratadas con KNO₃ y con la solución testigo que en las de las tratadas con sales de amonio, concordando con lo encontrado para las plántulas cultivadas *in vitro* (tablas 2.6 y 2.8) y con otros resultados publicados anteriormente (Sarmiento *et al.*, 1994). Como ya se explicó en el apartado 2.3.2, este hecho puede deberse a una competencia entre los iones K⁺ y NH₄⁺ durante el proceso de absorción (Horst *et al.*, 1985; Kirkby y Mengel, 1987).

Al no existir tratamientos con oxiclورو de cobre, los niveles de este nutriente en hojas fueron los normales para el olivo y muy por debajo de lo indicado en las pruebas de 6 meses (tabla 3.1).

El uso de sustrato de arena lavada ofreció la ventaja de que las variaciones en la composición de la solución nutritiva, en especial cuando se procuró moderar el proceso de oxidación de NH₄⁺ a NO₃⁻, tuvieron un reflejo adecuado sobre el crecimiento de la planta. Ahora bien, también tuvo la dificultad de sólo permitir la aplicación de concentraciones bajas de N ya que el intervalo entre la deficiencia y el exceso fue muy reducido.

En la figura 3.5 se indican los resultados obtenidos al someter a las plantas a los mismos tratamientos anteriores pero en sustrato de arena y turba (1:1 v/v), durante 9

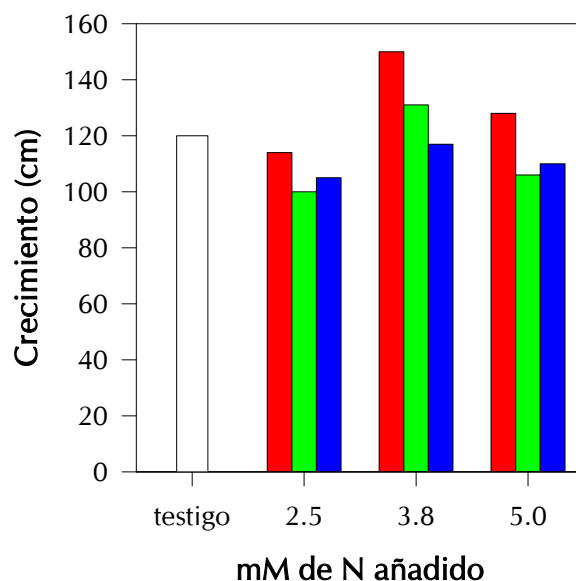
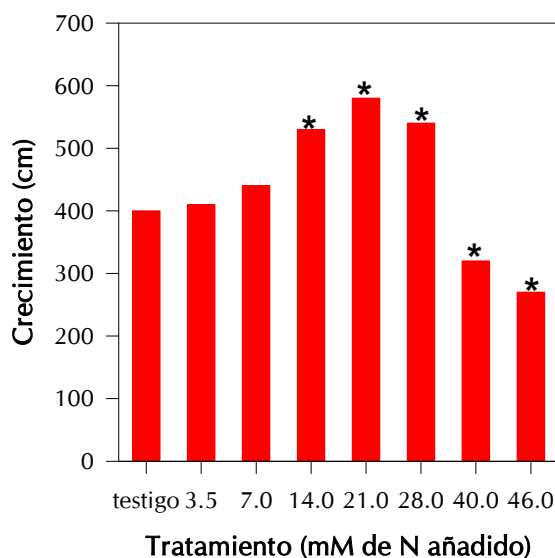


Figura 3.5. Crecimiento de las plántulas de olivo (9 meses) en sustrato de arena y turba (1:1 v/v) en cada tratamiento.
 (□) testigo; (■) KNO_3 ; (■) NH_4NO_3 ; (■) $(NH_4)_2SO_4$.

meses (experimento 5). En este caso, no existieron diferencias de crecimiento estadísticamente significativas entre las plantas sometidas a los distintos tratamientos.

Es decir, al contrario de lo ocurrido en el sustrato de arena lavada, la presencia de turba en el medio impidió que las concentraciones relativamente pequeñas y no muy distantes entre sí, modificaran el crecimiento de las plantas. No obstante, el crecimiento medio en este sustrato fue superior al obtenido en la arena sólo, así como el aspecto de la planta que fue mucho mejor.

Por último, en la figura 3.6 se indica el crecimiento de plantas cultivadas primero durante 8 meses en sustrato de arena y turba y fertilizadas sólo con solución nutritiva de Hoagland al 20%. Después de ese periodo de aclimatación, se sometieron a los tratamientos con concentraciones crecientes de NH_4NO_3 (experimento 6). Al igual que ocurrió en el experimento anterior, las concentraciones bajas de N (3.5 y 7 mM) no modificaron significativamente el crecimiento de las plantas. Es decir, el efecto amortiguador del sustrato con turba enmascaró la posible acción del N. Al aumentar la concentración de N (14, 21 ó 28 mM) aumentó significativamente el crecimiento de las plantas. Por tanto, cuando se dispuso de una cantidad suficiente de N se sobrepasó la acción enmascaradora de la turba y la presencia de N tuvo reflejo en la planta. Cantidades mayores de N (40, 46 mM) provocaron un efecto tóxico que se reflejó en un crecimiento significativamente menor de la planta.



*Figura 3.6. Crecimiento de las plántulas de olivo (11 meses) en sustrato de arena y turba (1:1 v/v) en cada tratamiento de NH_4NO_3 . El asterisco indica significación estadística con respecto al testigo (*t* Student, $p < 0.05$).*

Como conclusión, se puede indicar que en condiciones de invernadero, al igual que en el caso de los cultivos *in vitro*, fue necesaria la presencia de amonio, para obtener un crecimiento óptimo de las plántulas de olivo. Por otro lado, la naturaleza del sustrato utilizado demostró ser decisiva, ya que la arena estéril no permitió el uso de concentraciones elevadas de N, comprometiendo de esta forma la tasa de crecimiento vegetal. Por el contrario, la turba solucionó este problema consiguiéndose importantes mejoras del crecimiento de las plántulas, en combinación con el uso de ambas formas de N.

4. INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CARBONO EN LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL OLIVO.

4.1. INTRODUCCIÓN

Ya en los primeros trabajos realizados sobre el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, se observó la necesidad de un aporte exógeno de carbohidratos como fuente de C y energía para su supervivencia (Gautheret, 1939; 1941; White, 1939; Earle y Torrey, 1965a,b). Aunque posteriormente se consiguieron generar cultivos fotoautotróficos (Yamada *et al.*, 1978; Barz y Husemann, 1982; Yamada *et al.*, 1982; Niu y Kozai, 1997), su establecimiento, además de difícil de lograr, puede ser incompatible con muchas de las aplicaciones de la tecnología del cultivo de tejidos por lo que, en general, se considera esencial la existencia de una fuente externa de carbohidrato para el éxito del cultivo.

En los primeros estudios se vio que diversos carbohidratos eran capaces de promover el crecimiento *in vitro* (Gautheret, 1941; 1945; Hildebrandt y Riker, 1949) pero con el tiempo se ha impuesto la sacarosa, en general, como la mejor fuente de C y energía lo que tiene que ver, sin duda, con el hecho de que la sacarosa sea el principal azúcar de transporte y almacenamiento en la mayoría de las plantas. Esto es particularmente cierto en el caso de los trabajos de micropropagación de especies leñosas en los que la sacarosa es mayoritariamente utilizada como carbohidrato de elección a concentraciones entre el 2 y el 4% (Murashige y Skoog, 1962; Street, 1969; Thorpe, 1982; Thorpe y Patel, 1984; Thompson y Thorpe, 1987). Sin embargo, a pesar del uso generalizado de la sacarosa, no siempre es el carbohidrato más efectivo en propagación y así, plantas que transportan y metabolizan otros carbohidratos (por ejemplo Rosaceae y Oleaceae) pueden crecer con ellos tan bien o mejor que con sacarosa (Wolter y Skoog, 1966; Chong y Taper, 1974; Coffin *et al.*, 1976; Oka y

Ohyama, 1982; Pua y Chong, 1984; Nadel *et al.*, 1989; Marchal *et al.*, 1992; Vu *et al.*, 1993). En muchas ocasiones, estos carbohidratos alternativos son polialcoholes.

Los polialcoholes o alditoles son moléculas acíclicas que provienen de la reducción del grupo aldehídico o cetónico del azúcar correspondiente y que hasta ahora han recibido poca atención, cosa sorprendente dada su abundancia y amplia distribución en el reino vegetal. En hongos, algas y líquenes son frecuentemente el mayor carbohidrato presente (Bielecki, 1982; Lewis, 1984). En estos organismos, así como en las angiospermas, juegan un papel central en su fisiología, sirviendo en muchas ocasiones como moneda de cambio del metabolismo de carbohidratos, en lugar de azúcares neutros tales como sacarosa o almidón.

Lewis (1984) dio una lista de los 17 polialcoholes más frecuentes, indicando que sólo los de 6 átomos de C o hexitoles, han sido estudiados con algún detalle. En angiospermas, se han aislado al menos 13 polialcoholes, de los cuales el manitol es el más abundante, encontrándose en más de 70 familias de plantas superiores. Por otra parte, se ha establecido una interesante relación entre familia taxonómica y polialcohol más abundante. Así por ejemplo, el galactitol es típico de *Celestraceae*, el sorbitol de *Rosaceae* y el manitol de *Scrophulariaceae*, *Rubiaceae*, *Umbelliferae* y *Oleaceae*.

Entre los posibles papeles fisiológicos sugeridos para los polialcoholes se incluye el almacenamiento de C reducido y poder reductor, la regulación de coenzimas, osmorregulación y actuación como solutos compatibles (Loescher, 1987). Se sabe que en ciertas plantas superiores los polialcoholes se transportan por el floema (Zimmerman y Ziegler, 1975) y que algunos de ellos son productos tempranos de la fotosíntesis, como el sorbitol en muchas especies de *Rosaceae* y el manitol en *Umbelliferae*, *Rubiaceae* y *Oleaceae* (Bielecki, 1982).

En el olivo, el manitol es un compuesto importante que se forma a partir de la fotosíntesis, se transporta por el floema y alcanza elevadas concentraciones en las hojas (Flora y Madore, 1993). Por ello, el manitol podría ser utilizado como fuente de C alternativa en la propagación *in vitro* del olivo, como se ha visto para otras especies. Hasta ahora, las investigaciones que se han llevado a cabo sobre el cultivo *in vitro* del olivo se han centrado en la manipulación de los componentes minerales del medio de cultivo y el uso de diversos tipos de sustancias fitoreguladoras, permitiendo algunas mejoras en esta técnica (Fiorino y Leva, 1986; Cañas *et al.*, 1987; Rugini y Fedeli;

1990; Cañas *et al.*, 1992). Sin embargo, el olivo cultivado *in vitro* sigue manifestando un comportamiento heterogéneo, dependiente de la variedad utilizada, así como una proliferación limitada debido fundamentalmente a la fuerte dominancia apical que impide la formación de brotes secundarios (Rugini, 1990).

Recientemente, se han realizado algunos trabajos en los que el uso de manitol ha dado buenos resultados en la propagación *in vitro* de explantos de olivo obtenidos de árboles adultos de la variedad Maurino (Leva *et al.*, 1994; 1995b). No obstante, estos resultados son todavía preliminares y limitados a una única variedad de olivo, por lo que sería interesante comprobar la eficacia de este polialcohol con material vegetal de otras variedades y en diferente situación fisiológica.

Por esto, en este capítulo se estudiará el efecto que ejerce el manitol, en comparación con la sacarosa, sobre el crecimiento *in vitro* de explantos procedentes de embriones germinados. Complementariamente, se evaluará la influencia sobre el crecimiento *in vitro* del olivo de adiciones crecientes de NH_4NO_3 , la fuente de N que mejor resultado dio en los capítulos anteriores, en asociación con la presencia de manitol en el medio de cultivo.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Como material vegetal se utilizaron explantos uninodales de olivo, cultivar Manzanillo (*Olea europaea pomiformis* L.). Primero se obtuvieron plántulas por germinación *in vitro* de embriones aislados. Después, por distintos subcultivos, se procedió a una propagación clonal *in vitro* de dichas plántulas en medio OM (tabla 4.1), con 30 g.l^{-1} de sacarosa y 1 mg.l^{-1} de zeatina como regulador de crecimiento. Una vez conseguido suficiente material vegetal, se prepararon los explantos y se sembraron individualmente en tubos de ensayo (21x150 mm) que contenían 8 ml del respectivo medio de cultivo. Los tubos con los explantos se depositaron en cámara de cultivo a $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, con una intensidad luminosa de $30 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16 h de luz por día.

Las pruebas realizadas fueron las siguientes:

A. Explantos uninodales con una sola yema (la opuesta fue eliminada) se cultivaron *in vitro* en medio OM (tabla 4.1) con la adición de sacarosa o manitol a concentraciones de 7.5, 15 o 30 g.l^{-1} . Se realizaron, pues, 6 tratamientos distintos de 24 explantos cada uno. Con las plántulas obtenidas en cada caso se prepararon nuevos explantos similares a los primeros que se subcultivaron en un medio

idéntico al de la planta de procedencia. Esta operación se repitió 5 veces por lo que en total se realizaron 6 subcultivos sucesivos *in vitro* para cada tratamiento.

B. Se ensayaron los mismos tratamientos que en la prueba A pero utilizando explantos uninodales con las dos yemas axilares. En este caso no se realizaron subcultivos sucesivos.

Tabla 4.1. Composición del medio de cultivo utilizado (OM) (Rugini, 1984). Este medio se completó con la fuente de C correspondiente, 6 g.l⁻¹ de agar Merck como agente gelificante y 1 mg.l⁻¹ de zeatina como regulador de crecimiento.

Macronutrientes	mg.l ⁻¹	Micronutrientes	mg.l ⁻¹	Vitaminas	mg.l ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	1500.00	MnSO ₄ .H ₂ O	22.30	Ac. nicotínico	5.00
KNO ₃	1100.00	ZnSO ₄ .5H ₂ O	14.30	Tiamina HCl	0.50
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	600.00	H ₃ BO ₃	12.40	Piridoxina HCl	0.50
KCl	500.00	KI	0.83	Ac. fólico	0.50
CaCl ₂ .2H ₂ O	440.00	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	Biotina	0.05
NH ₄ NO ₃	412.00	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.25	m-Inositol	100.00
KH ₂ PO ₄ .12H ₂ O	340.00	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	Glicina	2.00
Fe-EDTA					
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80				
Na ₂ EDTA	37.50				

C. 24 explantos uninodales con una sola yema se cultivaron *in vitro* en medio OM (tabla 4.1) con 15 g.l⁻¹ de sacarosa como fuente de C. Otros 24 explantos similares se cultivaron en el mismo medio pero, en este caso, con 15 g.l⁻¹ de manitol. A partir de las plantas obtenidas en cada cultivo se prepararon nuevos explantos uninodales con una yema que se subcultivaron de la siguiente forma:

- 24 explantos procedentes de medio con 15 g.l⁻¹ de sacarosa a un medio OM con 30 g.l⁻¹ de sacarosa.
- 24 explantos procedentes de medio con 15 g.l⁻¹ de sacarosa a un medio OM con 30 g.l⁻¹ de manitol.
- 24 explantos procedentes de medio con 15 g.l⁻¹ de manitol a un medio OM con 30 g.l⁻¹ de sacarosa.
- 24 explantos procedentes de medio con 15 g.l⁻¹ de manitol a un medio OM con 30 g.l⁻¹ de manitol.

D. En esta prueba se realizaron tratamientos con distintas concentraciones de NH_4NO_3 (2.5, 5, 7.5, 10 y 12.5 mM), añadidas a un medio base OM (tabla 4.1) al que se le había retirado el NH_4NO_3 , por lo que sólo contenía nitrato a concentración de 15.96 mM. Este medio base se consideró el control de la prueba. Así pues, se hicieron 6 tratamientos con concentraciones de N de: 15.96 (control), 20.96, 25.96, 30.96, 35.96 y 40.96 mM y en cada uno de ellos se cultivaron 24 explantos uninodales con una sola yema. En todos los tratamientos se utilizó manitol a 30 g.l^{-1} .

Tras 60 días de cultivo *in vitro*, a cada una de las plantas obtenidas en cada prueba, se le midió individualmente la longitud y el número de pares de hojas de los brotes formados. La significación estadística de los resultados obtenidos se comprobó mediante análisis de varianza, según el test de la mínima diferencia significativa.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según los resultados de la primera prueba (adición de sacarosa o manitol a distintas concentraciones) (tabla 4.2), en el medio con la concentración más baja de sacarosa (7.5 g.l^{-1}) se produjo el menor crecimiento del explanto al considerar la

Tabla 4.2. Longitud media (mm) de los explantos obtenidos en cada subcultivo para la prueba A. En cada fila, letras distintas indican diferencias significativas según el test de mínima diferencia significativa para $p < 0.05$.

subcultivo	sacarosa (g.l^{-1})			manitol (g.l^{-1})		
	7.5	15	30	7.5	15	30
1	9.36 ^a	20.04 ^b	21.00 ^b	20.45 ^b	39.74 ^c	43.21 ^c
2	19.92 ^b	18.00 ^{ab}	19.64 ^{ab}	10.76 ^a	45.40 ^c	49.83 ^c
3	21.09 ^a	39.33 ^c	22.95 ^{ab}	29.75 ^b	54.89 ^d	68.40 ^e
4	11.50 ^a	19.25 ^a	30.95 ^b	12.50 ^a	40.59 ^c	51.95 ^d
5	9.91 ^a	27.23 ^c	23.36 ^{bc}	20.13 ^b	41.79 ^d	51.83 ^e
6	27.00 ^{bc}	17.20 ^a	20.00 ^{ab}	31.35 ^c	46.13 ^d	56.56 ^e
media	16.46 ^a	23.51 ^a	22.98 ^a	20.82 ^a	44.76 ^b	53.63 ^c

media de los 6 subcultivos lo que, en principio, indicó que la cantidad de sacarosa usada fue insuficiente. Junto al bajo crecimiento global, las plantas de olivo *in vitro* cultivadas con la concentración más baja de sacarosa también mostraron fuertes

oscilaciones en el crecimiento del tallo habido en uno u otro subcultivo (tabla 4.2), motivo por el cual la media de los 6 subcultivos con dicha concentración no se diferenció estadísticamente de las otras dos concentraciones de sacarosa usadas.

Cuando se utilizó una concentración superior de sacarosa (15 g.l^{-1}) se modificó la situación antes indicada ya que aumentó sustancialmente el crecimiento medio y existió mayor uniformidad entre los distintos subcultivos (tabla 4.2). La adición de mayores cantidades de sacarosa (30 g.l^{-1}) no aportó ventajas al crecimiento aéreo de la planta de olivo *in vitro*. Estos resultados coinciden bastante con lo indicado en la bibliografía. Se ha visto que cantidades excesivas de sacarosa en el medio de cultivo tienden a disminuir la capacidad fotosintética de las plantas *in vitro*, con la consiguiente repercusión en su desarrollo (Langford y Wainwright, 1988). Cheé y Pool (1988) también indicaron que cuando había en el medio de cultivo 30 g.l^{-1} de sacarosa se obtenían plantas de vid de mala calidad y con poca facilidad para resistir el trasplante. Por otra parte, cantidades excesivamente bajas de sacarosa tampoco son beneficiosas para los explantos *in vitro*. Así, Langford y Wainwright (1988) encontraron que concentraciones de sacarosa inferiores a 10 g.l^{-1} provocaban bajos contenidos de clorofila y tendencia a la vitrificación de brotes de rosa cultivados *in vitro*. Por lo tanto, una adecuada concentración de sacarosa mejora la capacidad fotosintética de la planta *in vitro* y con ello, su desarrollo y crecimiento, así como su capacidad de adaptación a las condiciones externas (Conner y Thomas, 1982). Igualmente, Barlass y Skene (1981) y Troncoso *et al.* (1997) trabajando con explantos de vid *in vitro* obtuvieron los mejores resultados al aplicar 20 g.l^{-1} de sacarosa al medio de cultivo. Aunque no tenemos constancia de trabajos similares realizados con olivo, los medios más utilizados en la propagación de esta especie *in vitro* suelen emplear 30 g.l^{-1} de sacarosa (Rugini, 1984; Fiorino y Leva, 1986; Rugini y Fedeli, 1990).

Cuando en lugar de sacarosa se utilizó manitol como fuente de C en el medio de cultivo, aumentó significativamente el crecimiento obtenido. En este caso, existieron incrementos muy importantes del crecimiento del explanto al aumentar la concentración de manitol ($r=0.9017$). Como en el caso de la sacarosa, también la concentración más baja de manitol (7.5 g.l^{-1}), junto a un menor crecimiento, produjo fuertes oscilaciones del mismo entre los diferentes subcultivos (tabla 4.2). El aumento de la concentración del polialcohol a 15 g.l^{-1} y, en especial a 30 g.l^{-1} , produjo un

incremento espectacular de la longitud del tallo del explanto y una mayor homogeneidad entre los crecimientos de cada subcultivo (tabla 4.2). Es decir, existió un mayor aprovechamiento por parte de los tejidos de la planta del C procedente del manitol que del de la sacarosa, lo que indicó una mejor metabolización de aquél incluso a concentraciones elevadas de 30 g.l⁻¹. Con sacarosa, esta concentración no aportó nada sobre la inmediata inferior (15 g.l⁻¹). Estos resultados concuerdan con lo indicado por Leva *et al.* (1994; 1995b) para explantos de árboles adultos del cultivar Maurino cultivados *in vitro*.

En consecuencia, la aplicación de manitol a concentración de 30 g.l⁻¹, produjo un fuerte crecimiento del tallo a partir de la única yema existente en el explanto, lo que fue un buen índice para la obtención de una planta de calidad. Por otra parte, según Leva *et al.* (1994), aportaciones de manitol superiores a 30 g.l⁻¹ disminuyen el crecimiento y desarrollo del explanto de olivo *in vitro*.

En lo que se refiere al número de pares de hojas neoformados por los explantos, en cada uno de los casos considerados (tabla 4.3) también hubo diferencias con el tipo de azúcar y su concentración. En general, existió una correlación entre el crecimiento del tallo y el número de pares de hojas, aunque esta relación estuvo afectada por el mayor o menor crecimiento de los entrenudos. Así, a igualdad de concentración de azúcar, el número de nudos fue inferior cuando se utilizó sacarosa en comparación a los medios con manitol y dentro de cada azúcar, fue inferior con la concentración más baja. Como en el caso del crecimiento de los tallos, también

Tabla 4.3. Número medio de pares de hojas obtenido en cada subcultivo para la prueba A. En cada fila, letras distintas indican diferencias significativas según el test de mínima diferencia significativa para $p < 0.05$.

subcultivo	sacarosa (g.l ⁻¹)			manitol (g.l ⁻¹)		
	7.5	15	30	7.5	15	30
1	4.00 ^a	4.29 ^a	3.87 ^a	4.55 ^a	6.09 ^b	5.88 ^b
2	3.42 ^{ab}	3.38 ^{ab}	4.21 ^b	2.71 ^a	6.85 ^c	6.39 ^c
3	4.27 ^a	6.58 ^b	5.00 ^a	6.19 ^b	8.44 ^c	8.27 ^c
4	2.69 ^a	4.13 ^b	4.58 ^b	4.33 ^b	5.91 ^c	5.64 ^c
5	2.59 ^a	4.09 ^b	3.55 ^b	3.96 ^b	6.63 ^c	6.92 ^c
6	4.18 ^b	3.27 ^a	4.06 ^b	5.41 ^c	7.56 ^d	7.81 ^d
media	3.53 ^a	4.29 ^a	4.21 ^a	4.53 ^a	6.91 ^b	6.82 ^b

existió heterogeneidad entre el número de pares de hojas formados en cada subcultivo cuando se usó la concentración más baja de cada carbohidrato. La diferencia más importante con respecto a lo indicado para la longitud de los tallos fue que con 30 g.l⁻¹ de manitol, que produjeron las mayores plantas, no se originaron mayor número de pares de hojas que con la mitad de concentración del polialcohol. Es decir, que la mayor concentración de manitol sirvió principalmente para elongar los entrenudos, dando plantas de mayor porte.

En cualquier caso, tanto por su crecimiento como por el número de nuevas yemas formadas, estas plantas fueron de gran calidad, lo que puede ser importante para acelerar el crecimiento y así disminuir el periodo juvenil.

Junto a la eficaz estimulación del crecimiento de los explantos de olivo *in vitro*, existieron otros efectos del manitol a nivel morfológico, de más difícil cuantificación. Así por ejemplo, en los cultivos realizados con manitol, las yemas axilares de los explantos presentaron un aspecto distinto, más grandes y de color oscuro, en comparación con las de los explantos crecidos con sacarosa, de pequeño tamaño, casi indistinguibles a simple vista y verdes. La morfología de las hojas también resultó afectada, al cambiar la relación longitud/anchura de 3.04 con sacarosa a 2.33 con manitol, siendo las hojas en éste último caso más cortas y anchas. También se pudo destacar la tendencia a la formación de brotes secundarios que se observó en los cultivos realizados con manitol, hecho también observado por Leva *et al.* (1995b) para material adulto. El olivo *in vitro* presenta una fuerte dominancia apical por lo que la formación de brotes secundarios es un hecho poco habitual. En los subcultivos que se realizaron con una sola yema axilar por explanto y sacarosa, se observó que aproximadamente un 15% de las plántulas desarrollaron brotes secundarios, mientras que con 7.5 g.l⁻¹ de manitol este porcentaje aumentó al 20% y llegó a ser del 40% con 15 y 30 g.l⁻¹, lo que indicaría que el manitol, además de favorecer el crecimiento de la yema principal, estimula también la brotación lateral, con lo se atenúa la dominancia apical. Este aspecto es de gran importancia al incidir, por un lado en la mejora del factor de multiplicación *in vitro* del olivo y, por otro, en que al incrementarse el número de hojas formado aumentaría la capacidad fotosintética de los explantos

Cuando se cultivaron explantos con dos yemas axilares (prueba B), ambas yemas brotaron en todos los cultivos con manitol y con la cantidad más baja de sacarosa

(tabla 4.4), mientras que el aumento de la concentración de sacarosa determinó la inhibición de una de ellas.

Tabla 4.4. Efecto de las tres concentraciones de carbohidrato probadas sobre explantos uninodales de olivo *in vitro* con 2 yemas axilares, tras 60 días de cultivo.

	g.l ⁻¹	Brotos por explanto	Pares de hoja por brote	Longitud media del brote (mm)	Pares de hojas por explanto
sacarosa	7.5	2.0 ^c	2.86 ^a	11.07 ^a	5.7 ^a
	15	1.6 ^{ab}	3.23 ^a	16.38 ^{ab}	5.3 ^a
	30	1.4 ^a	2.00 ^a	8.57 ^a	2.8 ^a
manitol	7.5	1.9 ^{bc}	5.23 ^b	24.23 ^{cd}	9.7 ^b
	15	2.0 ^c	5.16 ^b	21.25 ^{bc}	10.3 ^b
	30	2.0 ^c	5.00 ^b	31.28 ^d	10.0 ^b

En cada columna, letras distintas indican diferencias significativas para $p < 0.05$, según el test de mínimas diferencias significativas.

Como consecuencia de la brotación de más de una yema, el crecimiento de cada brote se resintió, obteniéndose en todas las pruebas menor longitud y número de pares de hojas por brote que cuando se utilizaron explantos con una sola yema (tablas 4.2 y 4.3). Se constató, por tanto, que ambos brotes interfirieron entre sí, probablemente al competir entre ellos por los nutrientes, pero el número de pares de hojas producido por cada explanto fue superior al de los explantos con una sola yema. Este parámetro fue significativamente mayor con manitol que con sacarosa.

Por tanto, el manitol mejoró sustancialmente y en mayor medida que la sacarosa, el factor de multiplicación del olivo *in vitro* ya que, junto a un mayor crecimiento, permitió, a concentraciones de 15 y 30 g.l⁻¹, el desarrollo de más brotes por explanto, con un desarrollo importante de cada uno de ellos, lo que volvió a demostrar la positiva influencia del polialcohol sobre el olivo *in vitro*.

Como en el experimento anterior, 30 de manitol no incrementaron el número de pares de hojas formado con respecto a 15 g.l⁻¹, sino la longitud de los brotes, confirmando el efecto antes descrito sobre la elongación de los entrenudos.

A partir de estos resultados no parece posible deducir si este efecto sobre el estímulo de la brotación lateral se debe a una acción energética del manitol o bien esconde otro papel diferente. Leva *et al.* (1995b) han sugerido una acción

fitorreguladora del manitol, debido precisamente a sus efectos sobre la morfología de las hojas y yemas axilares, así como su capacidad de estimular la formación de brotes secundarios en explantos de olivo *in vitro*. Existen precedentes en la literatura con respecto a un papel regulador de los carbohidratos. Así por ejemplo, Kikuta y Okazawa (1984) encontraron que el manitol, sorbitol e inositol producían formación de brotes mientras que la sacarosa determinaba el desarrollo de raíces en cultivos de tejido de patata, indicando que la fuente de carbohidrato influía en el tipo de órgano que se diferencia. En embriones zigóticos inmaduros de girasol, altas concentraciones de sacarosa provocaron embriogénesis somática, mientras que a baja concentración se producía organogénesis (Jeannin *et al.*, 1995). En otros casos se ha visto que para la iniciación de brotes eran necesarias altas concentraciones de manitol y bajas concentraciones de sacarosa (Shepard y Totten, 1977). Por otra parte, las plántulas de patata subcultivadas *in vitro* con altas concentraciones de manitol pueden sufrir un proceso de metilación genómica (Harding, 1994).

En la prueba C se pretendió conocer la acción residual del manitol sobre explantos recultivados en distintas condiciones. Para ello, como se indicó en Material y Métodos, de plántulas previamente cultivadas con sacarosa o manitol se obtuvieron explantos uninodales con una sola yema que se subcultivaron respectivamente en el mismo o en el otro carbohidrato (tabla 4.5).

De acuerdo con los resultados expuestos en la tabla, los explantos que procedían de medio con manitol y fueron cultivados de nuevo con manitol, crecieron significativamente más que los que se cultivaron con cualquier otra combinación.

Tabla 4.5. Efecto del azúcar de procedencia y de destino sobre el crecimiento de explantos de olivo *in vitro*.

Procedencia (15 g.l ⁻¹)	destino (30 g.l ⁻¹)	longitud tallo (mm)	nº nudos
sacarosa	sacarosa	13.41 ^a	4.06 ^a
	manitol	41.78 ^c	7.48 ^b
manitol	manitol	49.00 ^d	7.73 ^b
	sacarosa	26.08 ^b	5.00 ^a

En cada columna, letras distintas indican significación estadística a $p < 0.05$, según el test de mínimas diferencias significativas.

Siguieron a éstos los provenientes de sacarosa y recultivados en manitol. En tercer lugar estuvieron los cultivados en manitol y subcultivados en sacarosa, mientras que el menor crecimiento lo presentaron aquéllos que siempre recibieron sacarosa como fuente de C. Estos datos indicaron de nuevo que el manitol es mucho más favorable que la sacarosa en el cultivo de material de olivo *in vitro* y, además, que este polialcohol ofrece una acción residual persistente sobre dicho material que tiene reflejo en el subcultivo siguiente. Esto puede ser una prueba adicional sobre la acción metabólica del manitol en el olivo *in vitro*.

De acuerdo con los resultados expuestos, el manitol promueve el desarrollo de los explantos de olivo *in vitro* con mayor eficiencia que la sacarosa, indicando su importancia fisiológica en el metabolismo del olivo. Se ha descrito en la literatura la existencia de una relación de especificidad entre carbohidrato y especie vegetal para obtener un crecimiento y morfogénesis óptimos *in vitro*. Así, se ha visto que el banano utiliza preferentemente fructosa (Marchal *et al.*, 1992), los cítricos el glicerol (Vu *et al.*, 1993), el género *Malus* sorbitol (Chong y Taper, 1973; 1974) y el fresno y apio el manitol (Wolter y Skoog, 1966; Nadel *et al.*, 1989).

El manitol es un compuesto muy abundante en las plantas, siendo uno de los carbohidratos principales en muchas especies de las familias Scrophulariaceae, Rubiaceae, Umbelliferae y Oleaceae (Bialeski, 1982). Por otra parte, se ha visto que es un producto temprano de la fotosíntesis en especies como el apio (Rumpho *et al.*, 1983; Loescher *et al.*, 1992) y en algunas especies de la familia Oleaceae como fresno y lilo (Trip *et al.*, 1963), se transporta por el floema y puede acumularse en grandes concentraciones en diferentes tejidos (Zimmerman y Zeigler, 1975; Keller y Matile, 1989; Davis y Loescher, 1990). Flora y Madore (1993), encontraron que el manitol era el segundo carbohidrato más abundante en las hojas de olivo, después de la glucosa, mucho más que la sacarosa, y que se transporta por el floema. Cuando marcaron fotosintéticamente hojas de olivo con $^{14}\text{CO}_2$ encontraron que el manitol se marcaba apreciablemente tan sólo 15 s después del inicio del pulso, con un patrón muy parecido al que seguía la sacarosa, indicando que aquél se forma muy cerca del sitio de fijación de CO_2 . Todos estos datos hacen pensar en el manitol como un producto importante del metabolismo del olivo y no sólo como un mero compuesto secundario.

La ruta de biosíntesis de manitol se ha establecido en tejido fotosintético de hojas de apio (Rumpho *et al.*, 1983; Loescher *et al.*, 1992) a partir de dihidroxiacetona-P que es exportada desde el cloroplasto. Sin embargo, poco se sabe de su catabolismo en plantas superiores. Se ha visto que el uso del manitol en plantas vasculares tiene lugar en tasas bajas en cultivos celulares de pino y zanahoria (Thompson *et al.*, 1986) pero en mayor medida en hojas de fresno, apio y lilo (Trip *et al.*, 1963; Fellman y Loescher, 1987), especies éstas últimas que fotobiosintetizan importantes cantidades de manitol. Todo esto parece indicar que la capacidad de crecer con manitol está restringida a aquellas especies que lo sintetizan y transportan a los tejidos (Stoop y Pharr, 1993). Recientemente se ha descubierto y purificado en apio, una enzima manitol 1-oxidoreductasa (MDH) (Stoop y Pharr, 1992; 1994; Stoop *et al.*, 1995), la cual cataliza la oxidación del manitol a manosa, que es fosforilada y posteriormente convertida en fructosa-6P, entrando así al metabolismo central. Otros trabajos con cultivos celulares de apio han aportado evidencias de que esta enzima sería la responsable de la capacidad de utilización del manitol por los tejidos (Stoop y Pharr, 1993).

Aunque no se han realizado trabajos parecidos en olivo, parece lógico pensar que exista un mecanismo similar en esta especie, dado que sintetiza manitol y lo transporta por el floema (Flora y Madore, 1993). El hecho de que los explantos caulinares de olivo cultivados *in vitro* con manitol como única fuente de C sean capaces de crecer activamente, indica claramente su capacidad de utilizarlo eficientemente.

Las razones por las que el manitol resulta más efectivo que la sacarosa en promover el crecimiento del olivo *in vitro* son desconocidas. En otros trabajos se ha descrito que el manitol puede sustituir a la sacarosa como fuente de C pero con rendimientos similares (Wolter y Skoog, 1966; Stoop y Pharr, 1993). Sin embargo, en el caso del olivo, la utilización de manitol presenta considerables ventajas como se muestra en los resultados aquí expuestos y en los de otros autores (Leva *et al.*, 1994; 1995b). Los hexitoles en general, tienen un papel similar a la sacarosa como carbohidrato de transporte, pero presentan ventajas químicas como almacén de energía (Lewis, 1984), existiendo evidencias de que pueden servir como carbohidrato de almacenamiento ya que su concentración se eleva en condiciones favorables y es utilizado durante las fases de crecimiento activo (Bielecki, 1982).

Finalmente, como continuación de los experimentos realizados en capítulos anteriores con embriones aislados y plántulas jóvenes en invernadero, se quiso comprobar la respuesta de los explantos de olivo cultivados *in vitro* en presencia de manitol, a la variación de la concentración de NH_4NO_3 , la fuente de N que mejor resultado dio en los capítulos anteriores mencionados.

El resultado de esta prueba (fig. 4.1) indicó que con sólo nitrato el crecimiento de los explantos fue muy pobre, peor que el de los embriones aislados, dónde una concentración de 10 mM de N como nitrato produjo un resultado aceptable. El aumento de las aportaciones de N en forma de NH_4NO_3 determinó una fuerte estimulación tanto del crecimiento de los tallos como del número de pares de hojas formado, en comparación con el medio que sólo contuvo nitrato. Sin embargo, las aportaciones de NH_4NO_3 superiores a 5 mM (25.96 mM de N total) no supusieron ninguna mejora en el crecimiento como sucedió con los experimentos con embriones.

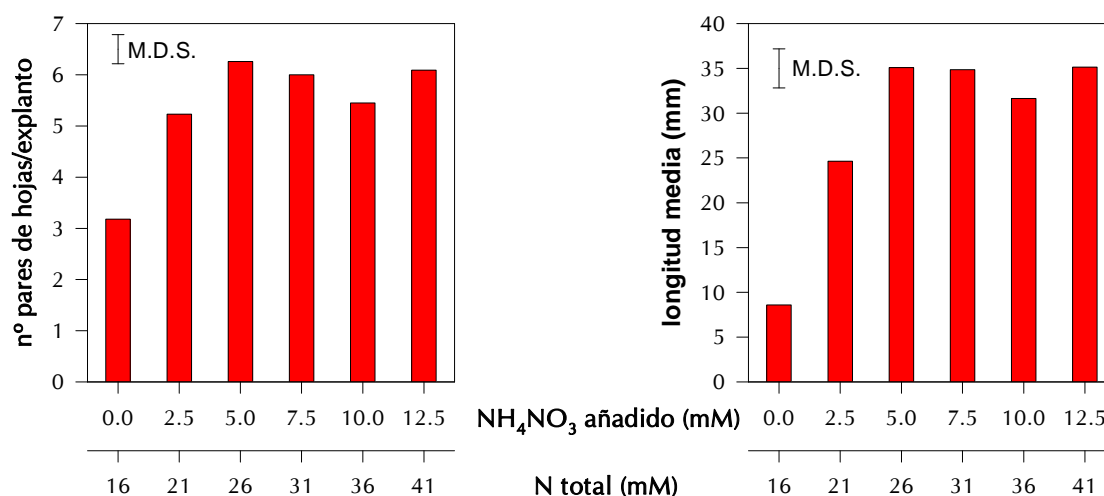


Figura 4.1. Longitud de los tallos (mm) y número de pares de hojas formados por explantos uninodales de olivo con una yema tras las aplicaciones crecientes de NH_4NO_3 a un medio basal conteniendo 15.96 mM de nitrato y 30 g.l⁻¹ de manitol. Mínima diferencia significativa (M.D.S.) para $p < 0.05$.

Estos resultados son similares a los encontrados por Villegas *et al.* (1992) para la vid *in vitro*, aunque estos autores alcanzaron la mejor respuesta con adiciones de 5 mM de NH_4NO_3 (20.51 mM de N total), menores requerimientos de N que los mostrados por el olivo, hecho probablemente relacionado con la diversidad de las especies.

Es decir, que como se encontró en los capítulos anteriores se necesitan ambas formas de N para obtener un crecimiento adecuado de los explantos de olivo *in vitro*, ya que con sólo nitrato el desarrollo de los mismos fue muy pobre.

Como conclusión, los resultados expuestos muestran que los explantos de olivo *in vitro* utilizan el manitol con mayor eficiencia que la sacarosa, indicando que dicho carbohidrato cubre suficientemente las necesidades de C y energía de las plantas así cultivadas. Esto se traduce en un crecimiento significativamente mayor, mejor calidad de las plántulas obtenidas, además de mayor uniformidad en los cultivos cuando se usa manitol, en comparación con la sacarosa. Por otra parte, este polialcohol permite la obtención de más de un brote por explanto, incrementando así la tasa de multiplicación *in vitro*. Todos estos aspectos unidos mejoran el rendimiento de la propagación *in vitro* de la especie, lo que permite la obtención de cantidades suficientes de plantas escogidas y, al acelerar el crecimiento de las mismas, ayuda a acortar el periodo juvenil del olivo.

5. ANÁLISIS PRELIMINAR DE MARCADORES POLIPEPTÍDICOS
RELACIONADOS CON LA JUVENILIDAD DE LA PLANTA DE
OLIVO

5.1. INTRODUCCIÓN

Hasta ahora normalmente se han utilizado criterios morfológicos o fisiológicos para diferenciar el material adulto del juvenil (Heslop-Harrison, 1967; Fortanier y Jonkers, 1976; Bonga, 1982; Greenwood, 1984) como por ejemplo, la forma y tamaño del domo apical o la morfología foliar (Rogler y Dahmus, 1974; Monteuis, 1988). Sería interesante contar con algún tipo de marcador bioquímico que permitiera un seguimiento del proceso, particularmente para aquellos trabajos en los que se pretende acortar la fase juvenil o un rejuvenecimiento de material adulto (Thompson, 1984). Hay que tener en cuenta que en los programas de mejora genética no se puede hacer una selección de individuos hasta que los árboles han florecido, lo que suele implicar un largo tiempo, y los tratamientos clásicos de rejuvenecimiento no causan probablemente más que una recuperación parcial de algunas características juveniles (Meier-Dinkel y Kleinschmidt, 1990). Zimmerman (1973) considera que la maduración sólo tiene lugar en las plantas obtenidas de semilla, mientras que en las plantas propagadas vegetativamente a partir de árboles adultos sólo se produce un envejecimiento fisiológico. Sin embargo, el desconocimiento de las bases moleculares de los procesos que confluyen en la maduración de las plantas constituye una importante limitación para la determinación de marcadores que permitieran conocer el grado de juvenilidad (Davies y Hartmann, 1988).

Con estas premisas, muchos autores se han lanzado a la búsqueda de parámetros bioquímicos o moleculares diferenciales entre los tejidos adultos y juveniles, que ayudaran a caracterizar cada fase. Como resultado se han encontrado muchos compuestos cuyos niveles difieren entre plantas adultas y juveniles, entre los que se pueden citar: carbohidratos (Monteuuis y Genestier, 1989), niveles de

elementos minerales (Millikan y Jankiewicz, 1966; Von Arnold y Roomans, 1983; Boulay, 1985; Verschoore-Martouzet, 1985; Bekkaoui, 1986), reguladores de crecimiento (Hackett, 1985; Galoch, 1985; Maldiney *et al.*, 1986; Fouret, 1987; Fernández *et al.*, 1990; Vidal *et al.*, 1994), terpenos (Hayman y Weavers, 1990) o poliaminas (Rey *et al.*, 1994), pero hasta ahora no se han encontrado marcadores universales que definan ambas fases.

No obstante, cualquiera que sea el mecanismo de la maduración, éste ha de estar regulado genéticamente por lo que se podrían esperar diferencias en la expresión génica entre tejidos adultos y juveniles. En este sentido se ha propuesto que la presencia de ARNm específicos se podría utilizar como marcador (De Vries *et al.*, 1985). En algunos estudios sobre *Larix laricina* (Hutchison *et al.*, 1987) no se han observado diferencias importantes en la producción de ARN entre las fases juvenil y adulta, pero en *Ficus pumila* L., el contenido total de ARN es mayor en la fase juvenil (Davies, 1984). En *Hedera helix* L., la fase juvenil acumula antocianina en la epidermis de los tallos y peciolo, cosa que no ocurre en la fase adulta, lo que se ha relacionado con la carencia de la actividad dihidroflavonol reductasa en ésta última (Murray y Hackett, 1991). En posteriores trabajos se ha visto que esto se refleja a nivel de transcripción de ARNm (Murray *et al.*, 1994).

En *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) Buchh., la relación ARN/ADN aumenta en material juvenil y no en adulto durante el reposo vegetativo, aunque estas diferencias desaparecen en primavera. Por otra parte, los cocientes ATP/NTP y GDP/GTP son mayores en la fase juvenil, en cualquier etapa del crecimiento (Monteuuis y Gendraud, 1987; Bon, 1988b).

Recientemente se ha identificado un gen (Gl15) que está implicado en la transición de fase en maíz, afectando a la diferenciación de las células epidérmicas (Moose y Sisco, 1994).

Como consecuencia de la diferente expresión génica entre las fases adulta y juvenil deberían encontrarse diferencias en el patrón proteico. Existe un cierto número de trabajos en los que se ha detectado alguna diferencia más o menos importante en el patrón de proteínas de dichas fases.

En *Hedera helix* L., Aghion (1978) encontró diferencias cuantitativas y/o cualitativas en proteínas durante la maduración. Posteriormente, Hackett (1989) detectó polipéptidos característicos de las fases juvenil y adulta de esta especie.

Bon y Monteuis (1987) observaron un descenso en el contenido total de proteínas en el meristemo durante el rejuvenecimiento de *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) Buchh. Posteriormente, Bon (1988a) identificó una proteína asociada a la membrana, J16, que sólo estaba presente en tejido juvenil. Igualmente, Hand *et al.* (1996) detectaron un polipéptido asociado a la fase juvenil de *Prunus avium* L. que también estaba presente en los rebrotes de raíz de árboles adultos.

También se han detectado diferencias en material vegetal cultivado *in vitro*. Así, Amo-Marco *et al.* (1993) encontraron diferencias entre el patrón proteico de brotes de la copa y de renuevos basales de *Castanea sativa* Mill. y en *Sequoia sempervirens* (Lamb.) Endl. se han encontrado variaciones cuantitativas en 23 proteínas asociadas a membrana, todas ellas en mayor cantidad en material procedente de renuevos basales, que en el procedente de la copa (Bon *et al.*, 1994). En esta misma especie, Huang *et al.* (1992) encontraron también diferentes proteínas en los tejidos de plantas adultas y en los de plantas rejuvenecidas mediante microinjerto *in vitro*. Posteriormente identificaron isoesterasas e isoperoxidasas características de cada tipo de planta (Huang *et al.*, 1996).

El olivo es una especie caracterizada por un periodo juvenil muy largo, lo que ha limitado tradicionalmente los planes de mejora genética. Solamente se ha logrado acortar la duración del periodo juvenil de esta especie combinando tratamientos de fertilización y poda que, al aumentar el ritmo de crecimiento de la planta, lograban acortar el periodo de transición a la fase adulta (Lavee, 1990; Lavee *et al.*, 1996), pero prácticamente no existen trabajos sobre la búsqueda de marcadores bioquímicos relacionados con la juvenilidad. En el caso del olivo, tales marcadores serían de gran importancia, no tanto para la selección de material adecuado para su propagación vegetativa, como para poder monitorizar la evolución de la fase juvenil durante los tratamientos de acortamiento del periodo no productivo, lo que redundaría en la efectividad de los programas de mejora genética.

Hasta ahora se han descrito diferencias en el contenido total de proteínas y en el patrón proteico en relación con otros tipos de transición fisiológica del olivo, como la alternancia productiva (Lavee y Avidan, 1994). Recientemente, Tazzari *et al.* (1995) encontraron diferencias en el patrón electroforético de extractos de hojas de la copa de árboles adultos frente a los de hojas de varetas. Así pues, parece importante profundizar en este tipo de estudios con el fin de encontrar marcadores de juvenilidad

que caractericen las fases juvenil y adulta del olivo, para tratar de dilucidar los aspectos fisiológicos que subyacen al proceso de maduración.

En este trabajo se intentará encontrar algún polipéptido que esté relacionado con la juvenilidad de las plantas de olivo, mediante análisis electroforético en geles de SDS-poliacrilamida.

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal usado en este estudio procedió de distintos tipos de plantas de olivo, cv. Manzanillo:

- Plántulas obtenidas por germinación de embriones y cultivadas *in vitro*.
- Plantas de 2 años de edad obtenidas por germinación de embriones y cultivadas en macetas.
- Árboles adultos en producción creciendo en macetas.
- Árboles adultos en condiciones de campo con varetas creciendo de la base de su tronco.

De estas plantas se tomaron las hojas para obtener los extractos de proteínas y en su caso, flores antes de la antesis.

Extracción de proteínas

Las proteínas se extrajeron según el método de Coleman *et al.* (1991), modificado por nosotros para adaptarlo al olivo. El material vegetal recogido se enjuagó rápidamente con agua, se secó y se sumergió inmediatamente en nitrógeno líquido. En un mortero previamente enfriado se molieron 1 ó 2 g del material vegetal en nitrógeno líquido. Al polvo resultante se le añadieron 5 ml por cada gramo de tejido de tampón de extracción (borato sódico 50 mM, ácido ascórbico 50 mM, pH 9 + 1% β -mercaptoetanol + 10 mM de PMSF) y se homogeneizó en Omnimixer (Sorvall, EEUU). El homogenado se centrifugó en frío 30 min a 35000g, descartándose el sedimento. Al sobrenadante se le añadió una solución fría de acetato amónico 0.1 M en metanol en relación 1:4 (v/v) y se dejaron precipitar las proteínas toda la noche a -20 °C. Éstas fueron recogidas por centrifugación a 10000g, 15 min, y el sedimento resultante se enjuagó con 10 ml de la solución fría de acetato amónico 0.1 M en metanol, seguido por centrifugación en las mismas condiciones de antes. Este paso se repitió 3 veces, descartando siempre el sobrenadante. Finalmente, el sedimento se lavó una vez con acetona fría y se centrifugó de nuevo 10 min a 10000g. El residuo

resultante se secó bajo una suave corriente de aire y se redisolvió en 1 ml de tampón de muestra (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol, 10% glicerol) por gramo de material vegetal y se hirvió en baño maría 5 min. Después de dejar enfriar a temperatura ambiente, se centrifugaron los extractos 5 min a 14000g y el sobrenadante se decantó en un tubo limpio.

La concentración de proteínas de los extractos obtenidos se determinó mediante el método de Bensadoun y Weinstein (1976), utilizando BSA como patrón.

Análisis electroforético

Se utilizaron geles de SDS-poliacrilamida según Laemmli (1970), en un sistema discontinuo, compuesto de un gel de separación con un gradiente de acrilamida (8-15%) y un gel de concentración (4% de acrilamida). Se cargaron 60 μ g de proteína de cada muestra en volúmenes iguales en cada pocillo y se desarrolló la electroforesis a corriente constante, primero de 25 mA y cuando las muestras penetraron en el gel de separación se aumentó a 35 mA, hasta que el frente de azul de bromofenol llegó al borde inferior del gel. Tras la electroforesis, los geles se revelaron tiñéndolos con Azul de Coomasie al 0.25% en 50% metanol, 10% ácido acético durante 30 min. El exceso de colorante se eliminó con lavados repetidos con 40% metanol, 10% ácido acético hasta que el fondo del gel quedó transparente.

Los pesos moleculares de las bandas se determinaron por comparación con patrones de referencia cuyos pesos moleculares estaban comprendidos entre 14.4 y 116.3 kD.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El perfil proteico de los extractos analizados fue muy homogéneo, aparentando estar más influido por el estado fisiológico de las plantas que por su identidad genética (fig. 5.1). Es decir, que a pesar de la variedad de individuos y condiciones de cultivo de las plantas utilizadas, la población de proteínas observada en los geles fue muy similar.

En todos los extractos de hojas se comprobó la existencia de dos bandas bien definidas y con una intensidad de tinción similar para todas las muestras, de unos pesos moleculares aproximados de 55 y 14 kD. Dichas bandas sólo estuvieron ausentes total o parcialmente en el extracto de tejido floral. Los pesos moleculares de estas dos bandas coincidieron con los referidos en la bibliografía para la subunidad

grande y pequeña de RuBisCo, característica de los tejidos fotosintéticos (Hubbs y Roy, 1992).

En general, las diferencias que se aprecian en los patrones electroforéticos de los extractos son cuantitativas antes que cualitativas, es decir que los polipéptidos estuvieron presentes en todos los extractos pero en distinta cantidad según la planta de procedencia.

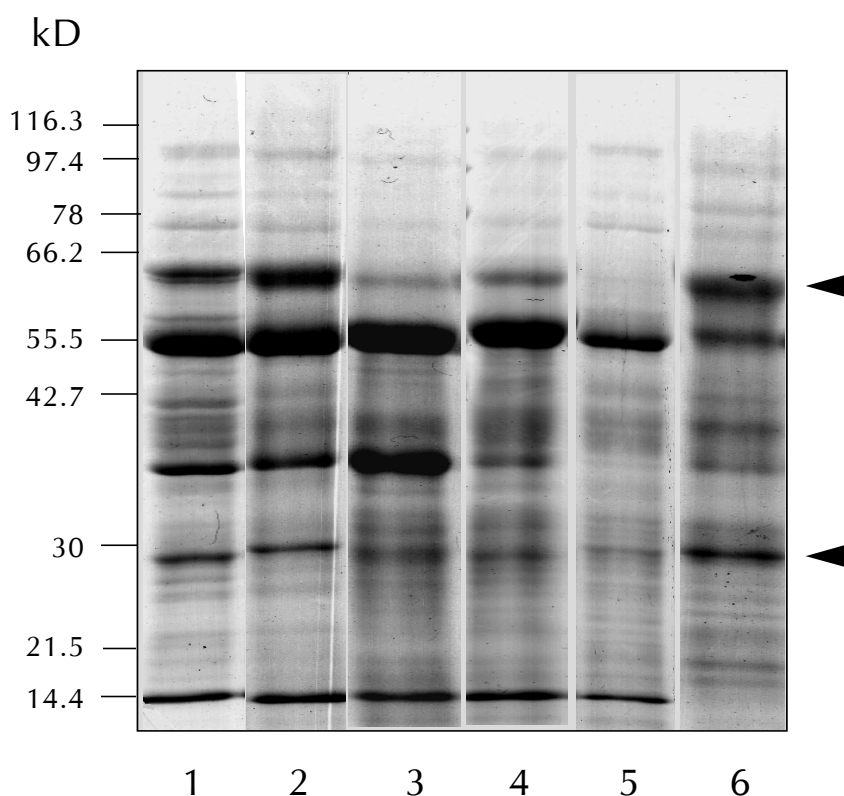


Figura 5.1. Perfiles electroforéticos de:

- (1) hojas de plántula juvenil de 2 meses de edad, cultivada in vitro y procedente de la germinación de un embrión;
- (2) hojas de plántula juvenil de 2 años de edad, cultivada en maceta con 4 l de sustrato de turba: arena (1:1) y procedente de la germinación de un embrión;
- (3) hojas de planta adulta en producción de 10 años de edad, cultivada en un contenedor con 8 l de suelo rojo arenoso y procedente de una estaquilla autoradicada;
- (4) hojas de planta adulta en plena producción creciendo en condiciones de campo;
- (5) hojas de varetas basales (chupones) de la planta anterior;
- (6) extracto de flores recogidas antes de la antesis.

En todos los casos se cargaron 60 μ g de proteína. Las condiciones en que se realizó el gel están descritas en el apartado 5.2 Materiales y Métodos. Las puntas de flecha señalan las bandas de 63 y 29 kD, que presentaron diferencias cuantitativas entre las plantas adultas y juveniles.

Los perfiles proteicos de los extractos de hojas de plántulas juveniles (fig. 5.1; carriles 1 y 2) fueron prácticamente idénticos entre si, a pesar de que las plantas se

encontraban en situaciones de cultivo distintas (*in vitro* y en maceta), y mostraron diferencias con respecto a los de las plantas adultas (fig. 5.1; carriles 3 y 4) en dos bandas de aproximadamente 63 y 29 kD, las cuales se encontraron en mayor cantidad en el material juvenil. Dada la homogeneidad de las poblaciones de proteínas en ambos tipos de extractos, parece que estas diferencias se deben al diferente estado ontogénico de las plantas de origen.

Otra banda, de aproximadamente 35 kD, mostró un comportamiento contradictorio ya que se encontró en mayor cantidad en los extractos de hojas de plántulas juveniles (fig. 5.1; carriles 1 y 2) que en el de hojas de árbol adulto en condiciones de campo (fig. 5.1; carril 4), pero aparecía también, y aún en más cantidad, en el extracto de hojas de planta adulta cultivada en maceta (fig. 5.1; carril 3), por lo que no fue posible extraer conclusiones definitivas sobre su relación con la juvenilidad.

Las hojas de vareta (fig. 5.1; carril 5), por su parte, mostraron un perfil proteico singular que las diferenció tanto de las plantas adultas como de las juveniles. El nivel de proteína de 29 kD que mostraba este extracto fue similar al tipo adulto pero por el contrario, careció prácticamente de la proteína de 63 kD, así como de la de 35 kD. Estas características sugieren que la vareta es un material con una situación fisiológica particular y coinciden con los resultados de Tazzari *et al.* (1995). Estos autores, al comparar los perfiles electroforéticos de las hojas de vareta y de ramos productivos de la copa de plantas adultas de olivo, cv Leccino, también observaron que en las hojas de vareta faltaba una proteína de 66 kD que sí estaba en las hojas de los ramos productivos.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que las varetas del olivo no se pueden considerar un material juvenil. En múltiples estudios se ha puesto de manifiesto que las partes terminales y periféricas de un árbol, cronológicamente más recientes, son ontogénicamente más adultas (Bonga, 1982; Hackett, 1987; Franclet y Boulay, 1989), mientras que las partes basales e interiores pueden retener tejidos con características juveniles (Schaffalitzky de Muckadell, 1959; Ball, 1978; Mazalewsky y Hackett, 1979; Hackett, 1985) que dan lugar a brotes con mayor poder de crecimiento vegetativo y de enraizamiento. Las varetas de olivo utilizadas en este trabajo provienen de yemas formadas en la madera ("óvulos") y están dotadas, durante el primer año de brotación, de un fuerte crecimiento y desarrollo vegetativos, sin capacidad de fructificación, lo

que recuerda a las características típicas de las plántulas juveniles de olivo obtenidas de semilla. Sin embargo, las varetas son un material agámico que no se puede considerar juvenil, sino más bien joven o rejuvenecido y según el perfil electroforético presentado en este trabajo, su expresión genotípica difiere de la de las plantas verdaderamente juveniles.

La mayoría de los trabajos en los que se comparan perfiles electroforéticos adultos y juveniles no utilizan plantas verdaderamente juveniles, sino material adulto rejuvenecido. En este sentido, es muy interesante el trabajo de Bon (1988a) quien encontró una proteína de membrana, J16, la cual estaba presente en los ápices de plantas juveniles de semilla y de material adulto rejuvenecido de *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) Buchh. pero no en los de árboles adultos. En otros trabajos con esta misma especie se han encontrado diferencias en múltiples polipéptidos entre los tejidos de material adulto y rejuvenecido (Bon y Monteuis, 1991).

En otras plantas igualmente se han encontrado diferencias entre plantas adultas y rejuvenecidas. Así, Amo-Marco *et al.* (1993) observaron que los extractos de plantas cultivadas *in vitro* y procedentes de ramas de la copa contenían dos proteínas de 43.6 y 38 kD que no se encontraban en los explantos que se habían obtenido de los renuevos basales del tronco del mismo castaño, pero no pudieron localizar polipéptidos similares a los descritos por Bon (1988a). No obstante, Amo-Marco *et al.* (1993) utilizaron para su trabajo un material de origen similar al de las varetas del olivo que también presentó diferencias con respecto al adulto en producción.

Una situación similar describen Bon *et al.* (1994) al encontrar diferencias cuantitativas en hasta 23 proteínas de membrana que se hallaban en mayor cantidad en material cultivado *in vitro* procedente de renuevos basales que en el de la copa de *Sequoia sempervirens* (Lamb.) Endl., sugiriendo que el rejuvenecimiento implica un cambio drástico del contenido proteico de los meristemas.

En esta misma especie, Huang *et al.* (1992) consiguieron recuperar la capacidad de enraizado de plantas adultas mediante microinjertos sucesivos de material adulto sobre portainjertos juveniles *in vitro*, lo que se acompañó de la aparición y desaparición de proteínas específicas de las hojas. Posteriormente, este proceso se relacionó con la desaparición de isoesterasas e isoperoxidases típicas de material adulto y la aparición de otras diferentes, características de la situación rejuvenecida (Huang *et al.*, 1996).

Todos estos trabajos vienen a confirmar que la maduración de las plantas debe estar regulada genéticamente como habían propuesto algunos autores (Hackett, 1987; Meier-Dinkel y Kleinschmidt, 1990), lo que se refleja en una expresión genotípica diferenciada de los tejidos adultos y juveniles. No obstante, como ya quedó dicho anteriormente, salvo el trabajo de Bon (1988a) con la proteína J16, la mayoría de estos trabajos se han realizado con material adulto rejuvenecido, no verdaderamente juvenil. En general, es muy difícil distinguir entre el rejuvenecimiento completo y el parcial o revigorización ya que en este último caso, aunque se recuperan ciertas características juveniles como la capacidad de morfogénesis o de enraizado, en realidad no supone una reversión real y completa de la fase adulta (Bonga, 1982). En la mayoría de los casos, el rejuvenecimiento completo sólo se ha obtenido, hasta ahora, a través del proceso sexual (Bonga, 1987) y la obtención de embriones somáticos (Boulay, 1985; Hackett, 1985; Merckle y Sommer, 1986; Tulecke, 1987, Francllet y Boulay, 1989).

En este sentido, parece interesante señalar que las bandas de 63 y 29 kD que marcaron las diferencias más claras entre las plantas adultas y juveniles se encontraron también en el extracto de tejido floral (fig. 5.1; carril 6), con un nivel de expresión génica similar al de los extractos de hojas de plántulas juveniles (fig. 5.1; carriles 1 y 2). Las flores se inducen en meristemas vegetativos adultos y, a través de meiosis y fertilización, producen embriones completamente juveniles, lo que implica una cierta desdiferenciación y, tal vez, reprogramación de la información genética del núcleo. Es decir, que el cambio epigenético de maduro a juvenil puede tener lugar en algunos tejidos florales antes de la formación del embrión (Meyer, 1983). Parece, por ello, significativo que los polipéptidos asociados a juvenilidad en el olivo se expresen de manera similar en el tejido floral compartiendo, así, características con las plantas juveniles. Hay algunos ejemplos que indican que la flor puede ser una fuente adecuada de explantos para la formación de tejidos juveniles. En vid se ha inducido la formación de embriones somáticos a partir de óvulos aislados y no fertilizados (Mullins y Srinivasan, 1976). Igualmente, se han iniciado embriones adventicios en callos de filamentos y anteras de *Aesculus hippocastanum* L. (Kiss *et al.*, 1992) y *Sorbus domestica* L. (Arrillaga *et al.*, 1995), así como en tejido floral de *Theobroma cacao* L. (Alemanno *et al.*, 1996).

En olivo existe muy poca bibliografía sobre la relación de proteínas específicas con situaciones fisiológicas determinadas de la planta. Lavee y Avidan (1994) encontraron diferencias en el contenido proteico y su composición entre años productivos y no productivos en hojas y corteza. Como se discutió anteriormente, Tazzari *et al.* (1995) describieron una banda de 66 kD que no se encontraba en los extractos de hojas de vareta y sí estaba presente en las hojas de ramos productivos del mismo árbol adulto.

Nuestros resultados sugieren la existencia de dos proteínas de 63 y 29 kD que estarían relacionadas con la juvenilidad de las plantas al mostrar apreciables diferencias cuantitativas entre los extractos de las hojas de plantas adultas y juveniles, relación que se vería apoyada por el hecho de que ambas proteínas se expresan también en el tejido floral.

La existencia de proteínas relacionadas con la juvenilidad de las plantas apoya la idea de que el cambio de fase está programado genéticamente. No obstante, dada la diversidad de polipéptidos que se han descrito en la bibliografía relacionados con la maduración en plantas superiores, parece que este proceso presenta una regulación genética específica para cada especie.

II. DISCUSIÓN GENERAL

La mejora genética del olivo se encuentra muy retrasada con respecto a otras especies frutales, no obstante la importancia económica y medioambiental que tiene su cultivo en nuestro país y en todo el área mediterránea.

Una de las causas, probablemente la principal, de este retraso histórico es el largo periodo juvenil que caracteriza a la especie *Olea*, que llega a mantenerla hasta 10-12 años sin fructificar (Natividade, 1957; Rugini, 1986; Bellini, 1992), lo que ha desanimado a los investigadores a avanzar en este campo.

Pero la obtención de híbridos de interés en el olivo también está lastrada por la baja relación floración-fructificación (1-4%) que se produce tanto en condiciones naturales (Morettini, 1972; Griggs *et al.*, 1975; Troncoso *et al.*, 1978), como artificiales (Lavee y Datt, 1978), así como el bajo e irregular nivel de germinación de las semillas con endocarpo (hueso) (Lalatta, 1959; Milella, 1962; Scaramuzzi y Baldini, 1963; Bini y Bellini, 1975; Diamantoglou y Mitrakos, 1979).

La obtención de nuevas plantas de olivo a partir de huesos se muestra como un proceso lento y poco eficaz ya que la germinación no comienza hasta 240 días después de la siembra, con porcentajes normalmente bajos y muy dependientes del cultivar utilizado (Lalatta, 1959; Milella, 1962). Así, en las condiciones experimentales de este trabajo, germinaron el 60% de los huesos de la variedad Picual, mientras que para Manzanillo y Arbequina sólo se alcanzó el 30 y el 20% respectivamente, a los 360 días de la siembra.

La eliminación del endocarpo leñoso acortó sensiblemente los plazos del proceso, comenzando a germinar las semillas sólo 30 días después de la siembra y obteniéndose porcentajes de germinación del 60% para las 3 variedades anteriores, 30 días más tarde (60 días después de la siembra). En el caso de Manzanillo y

Arbequina, además se incrementó el nivel de germinación respecto al obtenido partiendo de huesos. Estos resultados fueron algo mejores que los obtenidos por Acebedo *et al.* (1997) para estas variedades de olivo. La mejora, tanto en tiempo como en grado de germinación de la semilla frente al hueso significó que el endocarpo ejerció de barrera, dificultando fuertemente el proceso de germinación, como ya habían indicado otros autores (Lagarda *et al.*, 1983b; Crisosto y Sutter, 1985; Lambardi *et al.*, 1994; Sotomayor y Durán, 1994; Rinaldi *et al.*, 1994). No obstante, también la germinación de semillas estuvo influida por la variedad utilizada, ya que las semillas de Gordal tuvieron peor comportamiento al tardar 30 días más que las otras en comenzar a germinar, alcanzando sólo el 30% de semillas germinadas, lo que también coincidió con la mala respuesta de esta variedad a la propagación agámica (Troncoso *et al.*, 1990; Sotomayor y Caballero, 1994).

Por otra parte, la presencia del endocarpo leñoso también influyó en la calidad de las plántulas obtenidas, ya que 60 días después de la germinación se habían desarrollado considerablemente menos que las procedentes de semillas sin hueso.

Si se considera el tiempo necesario para la germinación más el que requiere el almacenamiento a 4 °C de las semillas antes de ser usadas y la preparación y siembra de las mismas, fueron necesarios un total de 480 días para obtener plántulas trasplantables a partir de huesos y 240 cuando se utilizaron semillas sin endocarpo. En este sentido, Alvarado (1994) desarrolló una metodología para la germinación de semillas y forzado de crecimiento que permitía obtener plántulas de olivo con 2 pares de hojas en 3 meses.

Cuando se pusieron a germinar embriones aislados *in vitro*, estos plazos se acortaron significativamente. Los embriones comenzaron a germinar prácticamente de inmediato (a los 10 días de ser sembrados *in vitro*) y 60 días después habían dado lugar a plantas con un desarrollo apreciable y unos porcentajes de germinación cercanos al 100% para todas las variedades utilizadas, incluida Gordal. Esto confirmó que, además del endocarpo, el endospermo ejerce también un efecto inhibitorio o dormancia sobre la germinación de las semillas (Istambouli y Neville, 1977; Diamantoglou y Mitrakos, 1979; Lagarda *et al.*, 1983b; Mitrakos y Diamantoglou, 1984; Lambardi *et al.*, 1994). En nuestro caso, el cultivo *in vitro* del embrión aislado permitió un nivel de germinación casi total, en contra de lo apuntado por otros

autores (Voyiatzis y Pritsa, 1994; Voyiatzis, 1995), quienes describieron una dormancia asociada al propio embrión.

Por lo tanto, el cultivo *in vitro* de embriones aislados mejoró claramente el nivel de germinación de la semilla de olivo, en especial el de aquellas variedades más reticentes, igualando la respuesta con las de buena germinación y acortó ostensiblemente el tiempo necesario para obtener una nueva plántula transplantable. Estos resultados avalan a esta técnica como una herramienta muy valiosa en los trabajos de mejora genética del olivo, en especial si se considera que las semillas obtenidas por hibridación suelen ser pocas y difíciles de conseguir y que la disminución en el tiempo de formación de una plántula viable puede ser una ayuda apreciable en el acortamiento de la fase juvenil. Un aspecto muy interesante del cultivo *in vitro* de embriones de olivo es su posible aplicación a las nuevas técnicas de biotecnología que requieren de un material susceptible de ser manipulado. En este sentido, se han conseguido obtener recientemente embriones somáticos a partir de cotiledones inmaduros *in vitro* (Leva *et al.*, 1995a). Por otra parte, el cultivo de embriones de olivo se está empleando con éxito en la selección *in vitro* de híbridos resistentes a estrés salino (Troncoso, comunicación personal).

El tipo de sal y la concentración de N usadas en el medio nutritivo también influyeron sobre las posibilidades de acortar la duración de la fase juvenil de la planta de olivo, al actuar significativamente sobre el desarrollo y la calidad de la plántula obtenida *in vitro*.

Los embriones sembrados *in vitro* fueron capaces de germinar y desarrollarse, aunque de forma limitada, en ausencia total de N en el medio, lo que puso de manifiesto la existencia de reservas de N en sus tejidos, distintas a las del endospermo. Esto fue confirmado mediante el análisis de la composición mineral de los embriones aislados, antes de ser sembrados, que mostraron contenidos de N-total del 3.66% del peso seco. Adiciones al medio de cultivo de cantidades de N inferiores a 3 mM no modificaron el desarrollo básico indicado antes, cuando las sales usadas fueron KNO_3 o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Por el contrario, la aplicación de esas mismas concentraciones de N en forma de NH_4NO_3 produjo un aumento importante del desarrollo de la plántula germinada. Estos resultados pusieron de manifiesto que, no obstante las reservas naturales de N del embrión, existían posibilidades de mejorar el desarrollo de la plántula, incluso con adiciones de pequeñas cantidades del nutriente

al medio, y que la sal más apropiada era el NH_4NO_3 que contiene las dos formas de N.

Los ensayos llevados a cabo añadiendo cantidades más elevadas de N indicaron que el embrión y la plántula reaccionaron claramente a la mayor presencia del nutriente, aunque de forma distinta para cada sal utilizada. Se encontró que el uso de NH_4NO_3 añadido a concentraciones comprendidas entre 5 y 30 mM favoreció todos los parámetros considerados (longitud del tallo, número de pares de hojas, peso fresco y seco), más que las otras sales de N probadas (KNO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Con KNO_3 el desarrollo del embrión fue menor pero sin que éste mostrara síntomas de toxicidad, mientras que el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tuvo una marcada acción tóxica cuando se aplicó a concentraciones superiores a 5 mM de N. Estos resultados confirmaron los obtenidos por nosotros en trabajos previos (Sarmiento *et al.*, 1994) y por Villegas *et al.* (1992), en este caso con explantos de vid *in vitro*, y demostraron la importancia del tipo de sal y de la concentración de N en el desarrollo y calidad de la plántula de olivo obtenida *in vitro* y, en consecuencia, en las posibilidades de acortar la duración de la fase juvenil. Los resultados también pusieron de manifiesto el carácter fuertemente tóxico del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aplicado *in vitro* como fuente de N. A diferencia de lo descrito para el material agámico de otras especies vegetales cultivadas *in vitro*, que sufre daños provocados por el exceso de N (Vieitez y Ballester, 1983; Anderson, 1984; Broome y Zimmerman, 1984; McCown y Sellmer, 1987; Loreti *et al.*, 1988), el embrión de olivo soportó cantidades elevadas de N en forma de KNO_3 o NH_4NO_3 por lo que se debe pensar en que la acción tóxica del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ estuvo en gran medida relacionada con un exceso de SO_4^{2-} en el medio. Este efecto negativo del sulfato, aunque con menor intensidad, había sido descrito anteriormente en plantas de olivo de un año de edad, cultivadas en hidroponía (Bartolini *et al.*, 1991)

Es decir, que el uso de ambas formas de N (NO_3^- y NH_4^+) dio mejor resultado que cada fuente por separado, lo que concordó con nuestros resultados previos (Troncoso *et al.*, 1991; Sarmiento *et al.*, 1994) y con los de otros trabajos realizados con plantas de olivo en hidroponía (Therios y Sakellariadis, 1988) o en general para la nutrición vegetal (Kirkby *et al.*, 1987; Hagin *et al.*, 1990).

El aumento de la disponibilidad de N en el medio como consecuencia de los tratamientos, originó una mayor asimilación de este nutriente, proporcional a la concentración de N aportada. Sin embargo, el contenido de N en los tejidos fue

mayor cuando se emplearon fuentes de N-NH₄, lo que indicó una asimilación preferente del amonio frente al nitrato, como habían observado otros autores (Fletcher, 1982; Fowler *et al.*, 1982; Wilcox *et al.*, 1985; Scheromm y Plassard, 1988; Marschner *et al.*, 1991; Kamminga-Van Wijk y Prins, 1993). No obstante, el NH₄NO₃ originó, a igualdad de concentración de N, mayores contenidos del elemento en las plantas que el (NH₄)₂SO₄. Teniendo en cuenta que el primero produjo plantas con mayor desarrollo, el contenido total de N cuando se cultivó con NH₄NO₃ fue muy superior, en concordancia con nuestros trabajos previos (Sarmiento *et al.*, 1994) y con las observaciones de otros autores (Hagin *et al.*, 1990; Villegas *et al.*, 1992).

Estas diferencias en la cantidad de N asimilado según el tratamiento nitrogenado se reflejaron igualmente en las fracciones de N, las cuales fueron mayores cuando se suministró N-NH₄. Con este tipo de fuente de N, aumentó ostensiblemente la fracción N-amoniacal con respecto al tratamiento con N-NO₃, donde se mantuvo muy baja, seguramente debido a la mayor regulación del proceso de asimilación de nitrato (Stewart y Rhodes, 1977; Campbell, 1988). Sin embargo, no hubo diferencias importantes en esta fracción entre los tratamientos con NH₄NO₃ y (NH₄)₂SO₄ y no fueron tan elevadas como las descritas por otros autores que las relacionaron con los daños observados en el material *in vitro* (Villegas, 1990; Sarmiento *et al.*, 1992). Por lo tanto, el efecto tóxico producido por las aplicaciones de (NH₄)₂SO₄ no parece deberse a una acumulación excesiva de amonio en los tejidos.

El aumento de la disponibilidad de N se tradujo en una activa síntesis de aminoácidos, como se desprende del aumento observado en la fracción N-amínica y en las concentraciones de aminoácidos libres. Dicho aumento fue mucho más acentuado con los tratamientos con N-NH₄, como consecuencia de la mayor disponibilidad de N en los tejidos (Haynes y Goh, 1978; Darral y Wareing, 1981; Barneix *et al.*, 1984; Arnozis y Barneix, 1989). No obstante, nuevamente la utilización de ambas formas de N fue la que mayor síntesis de aminoácidos produjo (Hagin *et al.*, 1990). Pero este aumento de la síntesis de aminoácidos no se tradujo en un aumento proporcional de la síntesis de proteínas, lo que pudo deberse a que el proceso de síntesis proteica sea más lento que el de aminoácidos y dependiente de otros factores reguladores. Con fuentes N-NH₄ se observó que se sintetizaba arginina en mayor proporción como medio de almacenamiento de N, en particular con (NH₄)₂SO₄, en cuyo caso el contenido de arginina llegó a suponer entre el 30 y el 40% del total de

aminoácidos libres analizados. Aparentemente, la elevada disponibilidad de amonio que se produjo con los tratamientos con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ indujo a las plántulas a formar gran cantidad de este aminoácido para retirar el amonio libre del tejido y evitar su efecto tóxico.

Los tratamientos nitrogenados afectaron la asimilación de otros nutrientes, particularmente K, Ca y Mg que vieron disminuidos sus contenidos cuando hubo amonio en el medio. En el caso del K, se ha descrito que existe una competencia con el amonio por su entrada a los tejidos (Kirkby y Mengel, 1967; Horst *et al.*, 1985; Schachtman y Schroeder, 1994; White, 1996; Wang *et al.*, 1996). El efecto sobre el Ca y el Mg también ha sido visto anteriormente (van Beusichem *et al.*, 1988; Marti y Mills, 1991a;b; Engels y Marschner, 1993) y podría estar relacionado con la acidificación del medio producida por la asimilación de amonio (Findenegg *et al.*, 1989).

Dado que los tratamientos con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ produjeron contenidos de N algo inferiores a los de NH_4NO_3 y que el nivel de fracción N-amoniaco fue similar en ambos grupos de plantas, no pudo establecerse una relación directa entre los daños observados en las plantas cultivadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y un exceso de N o amonio en sus tejidos. Por el contrario, las plantas cultivadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presentaron unos niveles de S mucho más elevados que las demás, lo que sugirió que el ion SO_4^{2-} pudo tener un papel importante en la toxicidad de la sal, en concordancia con lo señalado por Bartolini *et al.* (1991).

En condiciones de invernadero, los resultados también mostraron la mayor eficacia de la nutrición combinada de N. Sin embargo, surgió un problema importante debido al almacenamiento de las soluciones nutritivas con sales de N- NH_4 . Así, se observó que dichas soluciones nutritivas estuvieron afectadas por un proceso de oxidación que convirtió parte del amonio en nitrato, dando como resultado que ambas formas de N estuvieran prácticamente en equilibrio. Por esta causa, en todos los tratamientos, las plantas dispusieron de prácticamente la misma cantidad de nitrato en el sustrato y, de ahí, la falta de diferencia de crecimiento entre los distintos tratamientos. Cuando se solucionó el problema de la oxidación del amonio y se alargó el tiempo de cultivo, sí se observó la acción positiva de los tratamientos con N- NH_4 que crecieron significativamente más que con KNO_3 elevando, además, su ritmo de crecimiento. En condiciones de invernadero se observó que la presencia de N- NH_4

en la solución nutritiva aumentó el contenido de proteínas de las plantas, mostrando unos valores relativos de N-proteico superiores a los encontrados en las plantas cultivadas *in vitro*, probablemente debido al mayor desarrollo de las plantas cultivadas en invernadero en cuanto a sistema radical y número de hojas, lo que permitió una mayor disponibilidad de otros nutrientes, especialmente C fotosintético, junto con un tiempo más largo de cultivo.

En condiciones de invernadero también se reveló la importancia del sustrato utilizado. Así, el uso de arena estéril impidió aplicaciones superiores a 5 mM de N, puesto que producían daños en las plantas e incluso su muerte posterior, a diferencia de lo que ocurrió *in vitro*. Debido a esto, el margen de variación de concentraciones fue muy estrecho.

El empleo de turba en el sustrato permitió aumentar las dosis de N que se proporcionaban a las plantas y, así, con dosis de entre 14 a 28 mM de N, dadas como NH_4NO_3 se lograron los crecimientos más elevados tras 11 meses de cultivo. Por encima de 28 mM de N se inhibió el crecimiento con respecto al testigo. Es decir, que igual que en el caso de los embriones *in vitro*, la nutrición combinada de $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ proporcionó el mejor resultado de crecimiento de las plantas jóvenes de olivo.

Como se ha visto, la germinación de embriones *in vitro* es una herramienta de gran interés para los programas de mejora genética ya que asegura la obtención de nuevas plántulas a partir de un número limitado de semillas seleccionadas. Una vez germinados los embriones, éstos pueden ser multiplicados *in vitro* para obtener un número elevado de plantas iguales con las que continuar el proceso de selección. En los medios de cultivo *in vitro*, junto con la formulación mineral que dota a las planta de los nutrientes necesarios para desarrollarse, es necesario añadir carbohidratos en elevada concentración como fuente de C y energía, debido a que, en estas condiciones de cultivo, las plantas no son autotróficas.

Cuando se comparó la respuesta de los explantos de olivo *in vitro* a la adición de distintas concentraciones de sacarosa o manitol, se observó que éste último produjo el mejor crecimiento.

A baja concentración de sacarosa (7.5 g.l^{-1}) el crecimiento de los explantos fue pobre y se mostró irregular entre unos subcultivos y otros, debido a que la cantidad de carbohidrato fue insuficiente. Este resultado mejoró con 15 y 30 g.l^{-1} del azúcar, pero no hubo diferencia entre estas concentraciones. Cuando se utilizó manitol, la

concentración más baja de 7.5 g.l⁻¹ proporcionó un crecimiento similar al obtenido con las concentraciones altas de sacarosa, pero cuando se aumentó hasta 15 g.l⁻¹, el crecimiento de los explantos mejoró espectacularmente, casi duplicando la longitud y el número de pares de hojas que formaron los explantos a la misma concentración de sacarosa. Con 30 g.l⁻¹ de manitol el número de pares de hojas fue igual que con 15 g.l⁻¹, pero la longitud de los brotes fue significativamente superior, indicando que hubo mayor influencia en la elongación de los entrenudos que en la formación de pares de hojas. El efecto del manitol fue, además, persistente y cuando se cultivaron en sacarosa explantos que habían crecido en manitol, su crecimiento fue significativamente mayor que aquéllos que volvieron a cultivarse en sacarosa. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Leva *et al.* (1994; 1995b) trabajando con explantos de ramos adultos de olivo.

Dado que el olivo es una especie que sintetiza activamente manitol a partir de la fotosíntesis y lo transporta por el floema (Flora y Madore, 1993), el hecho de que este azúcar sea capaz de promover el crecimiento *in vitro* más eficazmente que la sacarosa debe radicar en una mejor metabolización del mismo por esta especie. Existen otros ejemplos de especies que son capaces de crecer *in vitro* con fuentes de C distintas a la sacarosa, como glicerol (Vu *et al.*, 1993), fructosa (Marchal *et al.*, 1992), sorbitol (Chong y Taper, 1973; 1974) y manitol (Wolter y Skoog, 1966; Nadel *et al.*, 1989). Generalmente, tal capacidad está ligada a la importancia que el carbohidrato correspondiente tiene en el metabolismo de cada especie.

En apio, especie que sintetiza manitol y crece con él *in vitro*, se ha descubierto una enzima que cataliza la oxidación de manitol a manosa, siendo la vía de entrada al metabolismo central de la planta (Stoop y Pharr, 1992; Stoop *et al.*, 1995). Parece lógico pensar que el olivo disponga de una maquinaria similar que le permita el uso eficiente de manitol.

Otro efecto beneficioso del manitol fue que estimuló la formación de brotes secundarios cuando se cultivaron explantos con una sola yema axilar y la brotación de ambas yemas cuando se utilizaron explantos que disponían de las dos yemas axilares. En contraste, el aumento de la concentración de sacarosa tendió a inhibir la brotación de una de ellas.

En resumen, nuestros resultados muestran que el manitol es una fuente de C y energía más eficiente que la sacarosa (tradicionalmente empleada) ya que produce un

crecimiento mucho más elevado de los explantos de olivo *in vitro*. Por otra parte, al permitir el desarrollo de más de un brote por explanto, mejora sustancialmente el factor de multiplicación del olivo *in vitro*.

Cuando se ensayó el efecto de adiciones crecientes de NH_4NO_3 sobre los explantos de olivo cultivados con manitol se observó que, cuando sólo hubo nitrato en el medio, el crecimiento fue deficiente, pero las adiciones de NH_4NO_3 , hasta 5 mM (26 mM de N total) provocaron una fuerte estimulación del crecimiento de los explantos. Posteriores incrementos de la concentración de dicha sal ya no mejoraron el resultado, lo que concordó con los resultados de Villegas *et al.* (1992) para explantos de vid *in vitro* y con los presentados en este trabajo utilizando embriones aislados.

En consecuencia, se ha demostrado en todos los casos (embriones aislados *in vitro*, explantos *in vitro* y plantas en invernadero) que la aplicación de ambas formas de N en las dosis apropiadas contribuyen a mejorar notablemente el crecimiento y desarrollo de las plantas.

La combinación de las técnicas empleadas en este trabajo: germinación y desarrollo de embriones *in vitro* en las condiciones nutritivas adecuadas, el cultivo de explantos con manitol como fuente de C y el posterior desarrollo en invernadero con la fertilización nitrogenada adecuada, disminuyen el tiempo necesario para la obtención de plantas viables y de calidad para ser transplantadas a campo. Estas plantas de mejor calidad, obtenidas en poco tiempo, son un factor importante para disminuir el periodo juvenil.

Cuando se compararon los patrones electroforéticos de los tejidos de plantas adultas y juveniles se encontraron diferencias cuantitativas que se pudieron asociar al estado ontogénico de cada planta. Así, existieron dos polipéptidos de 63 y 29 kD que se presentaron en mayor cantidad en los extractos de hojas de plantas juveniles, tanto cultivadas *in vitro* como en maceta, en comparación con los de hojas de plantas adultas, lo que indicaría que el proceso de maduración está regulado genéticamente (Hackett, 1987; Meier-Dinkel y Kleinschmidt, 1990).

Las hojas de vareta presentaron un patrón electroforético singular que les diferenció tanto de las plantas adultas como de las juveniles, caracterizado por carecer casi por completo del polipéptido de 63 kD, lo que coincidió con los resultados de Tazzari *et al.* (1995).

En muchos estudios se considera que las partes basales e interiores de un árbol pueden retener tejidos con características juveniles (Schaffalitzky de Muckadell, 1959; Ball, 1978; Mazalewsky y Hackett, 1979; Hackett, 1985), los cuales darían lugar a brotes rejuvenecidos. Las varetas son un material agámico que crece a partir de yemas formadas en la madera de los troncos y tienen algunas características típicas del material juvenil. Nuestros resultados muestran que no pueden ser consideradas juveniles ya que su patrón de expresión proteico difiere del verdaderamente juvenil.

La mayoría de los trabajos en los que se han encontrado proteínas diferenciales entre estado adulto y juvenil comparan material adulto y rejuvenecido, no verdaderamente juvenil (Bon y Monteuuis, 1991; Huang *et al.*, 1992; Amo-Marco *et al.*, 1993; Bon *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1996). En este sentido es muy interesante el trabajo de Bon (1988a) que encontró una proteína de membrana, J16, presente en los ápices de plántulas de semilla y en material rejuvenecido de *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) Buchh., pero ausente en el material adulto.

Hasta ahora, el rejuvenecimiento completo sólo se ha observado tras el proceso sexual (Bonga, 1982) o mediante la obtención de embriones somáticos (Boulay, 1985; Hackett, 1985; Merckle y Sommer, 1986; Tulecke, 1987, Franclet y Boulay, 1989), en ocasiones obtenidos a partir de tejidos florales (Mullins y Srinivasan, 1976; Eichholtz, 1979; Kiss *et al.*, 1992; Alemanno *et al.*, 1996). Si el cambio epigenético de maduro a juvenil se da en las flores antes de la formación del embrión (Meyer, 1983), el hecho de que las proteínas de 63 y 29 kD, características de la fase juvenil del olivo de acuerdo con nuestros resultados, se encuentren también en los extractos de tejido floral con un nivel de expresión similar al de las hojas de las plantas juveniles, parece apoyar la relación de dichos polipéptidos con la juvenilidad en el olivo.

En consecuencia, de acuerdo con nuestros resultados, se han caracterizado tres tipos de material en el olivo, según su perfil electroforético: juvenil (las flores y plántulas obtenidas de embriones aislados), joven (las varetas, material no juvenil aunque comparte algunas características con el que sí lo es) y adulto.

III. CONCLUSIONES

1. El cultivo *in vitro* de embriones aislados de olivo permitió aumentar el nivel de germinación hasta casi el 100%, incluso en las variedades más reticentes, así como disminuir significativamente el tiempo necesario para germinar una semilla (10 días) y obtener una plántula (60 días), lo que es de gran interés para los proyectos de mejora genética del olivo.
2. Se ha demostrado la influencia que tiene el tipo de sal de N y su concentración en el medio de cultivo sobre la calidad, crecimiento y desarrollo de la plántula de olivo *in vitro*. Así, las concentraciones de NH_4NO_3 en el medio de 5-10 mM de N, es decir presencia conjunta de NO_3^- y NH_4^+ , proporcionaron las mejores plántulas en todos los aspectos. Concentraciones mayores, hasta 30 mM de N, de la sal no dañaron pero tampoco mejoraron el resultado, por lo que no se justificó su uso. Las adiciones al medio de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a concentraciones superiores a 10 mM de N, provocaron daños importantes en la calidad y desarrollo de las plántulas y fuerte aumento de S en los tejidos, lo que apunta al exceso de SO_4^{2-} en el medio como posible responsable del efecto tóxico de esta sal.
3. Junto a la influencia sobre la calidad, crecimiento y desarrollo de las plántulas de olivo *in vitro*, la presencia en el medio de cultivo de N- NH_4 , en especial en combinación con N- NO_3 , mejoró la asimilación de N por los tejidos, puesta de manifiesto por los aumentos en todas las fracciones de N, especialmente la N-amónica, reflejo de una mayor síntesis de aminoácidos.
4. El uso de manitol a concentración de 30 g.l⁻¹, en lugar del clásico de la sacarosa, como fuente de C para la propagación del material de olivo *in vitro*, mejoró significativamente su calidad, crecimiento y capacidad de brotación. Con ello, se

incrementó su factor de multiplicación *in vitro*, lo que también es de interés en los trabajos de mejora genética. El efecto positivo del manitol se mantuvo en el siguiente subcultivo del material, incluso ya sin la presencia de este carbohidrato en el medio, lo que indicó una buena metabolización de este compuesto por los tejidos del olivo.

5. Después de 60 días de cultivo *in vitro* en las condiciones nutritivas más adecuadas (10 mM de N como NH_4NO_3 y 30 g.l^{-1} de manitol como fuente energética y de C), las plántulas habían alcanzado un tamaño y fortaleza suficientes para ser transplantadas con éxito (90% de supervivencia) a condiciones externas (invernadero). En esta situación (periodo de aclimatación y crecimiento previo a la implantación en campo), también la fuente y concentración de N así como la presencia de turba en el sustrato, influyeron sobre la calidad y desarrollo de la plántula. Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar como sustrato una mezcla de arena y turba al 50% y 14-28 mM de N en forma de NH_4NO_3 .
6. La presencia de N- NH_4 en la solución nutritiva de las plantas cultivadas en condiciones de invernadero, como en el caso de las cultivadas *in vitro*, también influyó sobre el proceso de asimilación de N. En este caso, la fracción N-proteica fue la que experimentó un mayor aumento relativo, llegando a suponer un 84% del N-total asimilado, lo que se relacionó con el nivel de desarrollo de las plantas en invernadero (mejor sistema radical y más hojas que las cultivadas *in vitro*) y el mayor tiempo de cultivo en estas condiciones.
7. Conjugando todos los métodos utilizados en este trabajo (cultivo *in vitro* de embriones y adecuado desarrollo de la plántula *in vitro* y en condiciones de invernadero), se lograron plántulas de unos 600 cm de longitud (suma de todos sus ramos y tallo) en aproximadamente 2 años desde la formación de la semilla (antesis), reduciendo en más de un año el tiempo necesario para obtener una planta similar a partir de la semilla. Los métodos utilizados, también permitieron incrementar significativamente el número de plántulas obtenidas en relación con el de semillas usadas.
8. Por primera vez se han encontrado en el olivo diferencias en la expresión génica entre material adulto en condiciones de producir, brotes no productores de plantas adultas y material juvenil (plántulas). Las diferencias se refieren a la presencia y

concentración de dos polipéptidos de 29 y 63 kD que permiten distinguir estos tres tipos de material y con ello comenzar a caracterizar, a nivel molecular, el material juvenil de olivo.

IV. BIBLIOGRAFÍA

- Abela V. y Fernandes-Serrano J.M. 1983. Selección clonal del olivo. *Olea*, 15:27-35.
- Acebedo M.M., Lavee S., Liñán J. y Troncoso A. 1997. In vitro germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. *Sci. Hort.*, 69:207-215.
- Aghion J. 1978. Un caractère protéique de l'état juvénile dans les plantes vertes. *Physiol. Vég.*, 16:131-135.
- Alemanno L., Berthouly M. y Michaux-Ferriere N. 1996. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues of cocoa. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 46:187-194.
- Ali I.A., Kafkati U., Sugimoto Y. y Inanaga S. 1994. Response of sand grown tomato supplied with varying ratios of nitrate/ammonium to constant and variable root temperatures. *J. Plant Nutr.*, 17:2001-2024.
- Alloush G.A., Le Bot J., Sanders F.E. y Kirkby E.A. 1990. Mineral nutrition of chickpea plants supplied with NO₃ or NH₄-N. I. Ionic balance in relation to iron stress. *J. Plant Nutr.*, 13:1575-1590.
- Alvarado J. 1994. Métodos para la germinación y crecimiento forzado de plántulas en olivo. *Trabajo Profesional Fin de Carrera*, ETSIAM, Universidad de Córdoba.
- Amo-Marco J.B., Vidal N., Vieitez A.M. y Ballester A. 1993. Polypeptide markers differentiating juvenile and adult tissues in chestnut. *J. Plant Physiol.*, 142: 117-119.
- Anderson W.C. 1984. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of Rhododendron. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 109:343-347.
- Armellini S. 1960. L'Ascolana tenera 'Valle Fiorana' Clone 50, pregevole oliva da tavola. *Inf. Ortoflorott.*, 1:74-75.
- Arnoz P.A. y Barneix A.J. 1989. PEP- carboxylase activity during ammonium-assimilation in wheat plants. *J. Plant Nutr.*, 12:85-94.
- Arrillaga I., Lerma V., Pérez-Bermúdez P. y Segura J. 1995. Callus and somatic embryogenesis from cultured anthers of service tree (*Sorbus domestica* L.). *HortScience*, 30:1078-1079.
- Asen S. y Larson R.E. 1951. Artificial culturing of rose embryos. *Prog. Rep. #40*, Agri. Exp. Sta. Pennsylvania State Coll.
- Ball E.A. 1978. Cloning *in vitro* of *Sequoia sempervirens*. En: KW Hughes, R Henke & M Constantin (eds.), *Propagation of Higher Plants Through Tissue Culture*. Techn. Inf. Centre, Springfield, Virginia, pp 259.
- Bardsley C.F. y Lancaster J.D. 1965. Sulfur. En: *Methods of Soil Analysis. Part 2 (Chemical and Microbiological Properties)*. Agronomy n° 9. Amer. Soc. Agron., Madison, Wisconsin, pp 1102-1116.
- Barlass M. y Skene K.G.M. 1981. Relative NaCl tolerance of grapevine cultivars and hybrids *in vitro*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 102:147-156.

- Barneix A.J., James D.M., Watson E.F. y Hewitt E.J.** 1984. Some effects of nitrate abundance and starvation on metabolism and accumulation of nitrogen in barley (*Hordeum vulgare* cv. Sonja). *Planta*, 162:465-476.
- Barranco D., Fernández-Escobar R. y Rallo L.** 1997. *El Cultivo del Olivo*. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca y Ediciones Mundi-Prensa.
- Bartolini G., Fiorino P. y Troncoso A.** 1983. Influence of several nutritional balances on olive plant development in hydroponic culture. *Acta Hort.*, 133:111-118.
- Bartolini G., Mazuelos C. y Troncoso A.** 1991. Influence of Na₂SO₄ and NaCl salts on survival, growth and mineral composition of young olive plants in inert sand culture. *Adv. Hort. Sci.*, 2:73-76.
- Bartolini G., Valentini A. y Troncoso A.** 1984. Ecceso e carenza di azoto in giovani piante di olivo allevate in idroponica. *Riv. Ortofrutt. It.*, 68:169-180.
- Barz W. y Husemann W.** 1982. Aspects of photoautotrophic cell suspension cultures. En: A Fujiwara (ed.), *Plant Tissue Culture 1982, Proc 5th Int Cong Plant Tissue Cell Cult.* Tokyo, pp 245-248.
- Behrend J. y Mateles R.I.** 1975. Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. I. Effect of amino acids on growth. *Plant Physiol.*, 56:584-589.
- Behrend J. y Mateles R.I.** 1976. Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. II. Role of organic acids during growth on ammonia. *Plant Physiol.*, 58:510-512.
- Bekkaoui F.** 1986. Microbouturage *in vitro* et culture de méristèmes de Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): problèmes liés à l'âge et au milieu de culture. *Th. de Doctorat.*, Univ. Paris IV.
- Bellini E.** 1992. Behaviour of some genetic characters in olive seedlings obtained by cross-breeding. *Acta Hort.*, 317:197-208.
- Bennet W.F., Pesek J. y Hanway J.J.** 1964. Effects of nitrate and ammonium on growth of corn in nutrient solution sand culture. *Agron. J.*, 56:342-345.
- Bensadoun A. y Weinstein D.** 1976. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.*, 70:241-250.
- Bergmann L., Grosse W. y Koth P.** 1976. Influences of ammonium and nitrate on nitrogen metabolism, malate accumulation and malic enzyme activity in suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 80:60-65.
- Bhuija Z.H. y Walker N.** 1977. Autotrophic nitrifying bacteria in acid tea soils from Bangladesh and Sri Lanka. *J. Appl. Bact.*, 42:253-257.
- Bialeski R.L.** 1982. Sugar alcohols. En: FA Loewus & W Tanner (eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol 13A*. Springer-Verlag, New York, pp 158-192.
- Bini G. y Bellini E.** 1975. Parental effects on the germinating ability of seeds. Studies with olive. *Riv. Ortofrutt. It.*, 59:371-384.

- Blevins D.G., Hiatt A.J. y Lowe R.H.** 1974. The influence of nitrate and chloride uptake on expressed sap pH, organic acid synthesis, and potassium accumulation in higher plants. *Plant Physiol.*, 54:82-87.
- Bolstad P.V. y Libby W.J.** 1982. Comparison of radiata pine cuttings of hedge and tree-form origin after 7 growing seasons. *Silvae Genet.*, 31:489-495.
- Bon MC.** 1988a. J16: An apex protein associated with juvenility of *Sequoiadendron giganteum*. *Tree Physiol.*, 4: 381-387.
- Bon MC.** 1988b. Nucleotide status and protein synthesis *in vivo* in the apices of juvenile and mature *Sequoiadendron giganteum* during budbreak. *Physiol. Plant.*, 72:796-800.
- Bon M.C., Riccardi F. y Monteuis O.** 1994. Influence of phase change within a 90-year-old *Sequoia sempervirens* on its *in vitro* organogenic capacity and protein patterns. *Trees*, 8:283-287.
- Bon M.C. y Monteuis O.** 1987. Application de la technique micro 2D PAGE au microgreffage de *Sequoiadendron giganteum* Bucholtz. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 305:667-670.
- Bon M.C. y Monteuis O.** 1991. Rejuvenation of a 100-year-old *Sequoiadendron giganteum* through *in vitro* meristem culture. II. Biochemical arguments. *Physiol. Plant.*, 81:116-120.
- Bonga J.M.** 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. En: JM Bonga & DJ Durzan (eds.), *Tissue Culture in Forestry*. . Martinus Nijhoff/Dr. Junk Publ., The Hague, pp 387-412.
- Bonga J.M.** 1987. Clonal propagation of mature trees: Problems and possible solutions. En: JM Bonga & DJ Durzan (eds.), *Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. 1. General Principles and Biotechnology*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp 249-271.
- Borchert R.** 1976. The concept of juvenility in woody plants. *Acta Hortic.*, 56:57-69.
- Boulay M.** 1985. Some practical aspects and applications of the micropropagation of forest trees. En: *In Vitro Propagation of Forest Tree Species*. Proc. Int. Symp., Bologna, 51-81.
- Bowman D.C. y Paul J.L.** 1988. Uptake and assimilation of NO₃ and NH₄ by nitrogen deficient perennial ryegrass turf. *Plant Physiol.*, 88:1303-1309.
- Boxman A.W. y Roelofs J.G.M.** 1988. Some effects of nitrate versus ammonium nutrition on the nutrient fluxes in *Pinus sylvestris* seedlings: Effects of mycorrhizal infection. *Can. J. Bot.*, 66:1091-1097.
- Bremmer J.M. y Keeney D.R.** 1966. Determination and isotope ratio analysis of different forms of nitrogen in soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 30:577-582.
- Brink R.A.** 1962. Phase change in higher plants, and somatic cell heredity. *Quart. Rev.*

Biol., 37:1-22.

- Broome C.O. y Zimmerman R.H. 1984. Culture of shoot meristems: Fruit plants. En: *Cell Culture And Somatic Cell Genetics Of Plants. Vol 1*, pp 111-122.
- Burger D.W. 1980. The use of cell and tissue culture systems to study juvenility and reproductive maturation in *Citrus*. *Tesis Doctoral*, Universidad de California, Davis.
- Burgos L. y Ledbetter C.A. 1994. Observations of male sterility in apricot. *HortScience*, 29(2):127.
- Caballero J.M. y Sotomayor E.M. 1989. Harvestime for seed germination. International Symposium on Olive Growing. *Olea*, 20:30.
- Campbell W.H. 1988. Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. *Physiol. Plant.*, 74:214-219.
- Cañas L.A., Avila J., Vicente M. y Benbadis A. 1992. Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.). En: YPS Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 18: High-Tech and Micropropagation II*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 439-505.
- Cañas L.A., Carramolino L. y Vicente M. 1987. Vegetative propagation of the olive tree from in vitro cultured embryos. *Plant Sci.*, 50:85-90.
- Chang W. y Hsing Y. 1980. *In vitro* flowering of embryoids derived from mature root callus of ginseng (*Panax ginseng*). *Nature*, 284:341-342.
- Chee P.P. 1994. *In vitro* culture of zygotic embryos of Taxus species. *HortScience*, 29:695-697.
- Cheé R. y Pool R.M. 1987. Improved inorganic media constituents for in vitro multiplication of Vitis. *Sci. Hortic.*, 32:85-95.
- Cheé R. y Pool R.M. 1988. Sucrose and NAA influence growth of subcultured shoots and in vitro root production in Vitis. *HortScience*, 23:776.
- Chen J.J. y Liao Y.J. 1993. Nitrogen-induced changes in the growth and metabolism of cultured potato tubers. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 118:831-834.
- Cheung G.P., Rosenblum I.Y. y Sallach H.J. 1968. Comparative studies of enzymes related to serine metabolism in higher plants. *Plant Physiol.*, 41:1813-1822.
- Chong C. y Taper C.D. 1973. *Malus* tissue cultures. I. Sorbitol (D-Glucitol) as a carbon source for callus initiation and growth. *Can. J. Bot.*, 50:1399-1404.
- Chong C. y Taper C.D. 1974. *Malus* tissue cultures. II. Sorbitol metabolism and carbon nutrition. *Can. J. Bot.*, 52:2361-2364.
- Clavero-Ramírez I. 1994. Acortamiento del periodo juvenil en olivo (*Olea europaea* L.). I. Cultivo *in vitro* de embriones. II. Efecto del fotoperiodo en el crecimiento de plántulas. *Tesis Doctoral*, Universidad de Málaga.

- Coffin R., Taper C.D. y Chong C. 1976. Sorbitol and sucrose as carbon sources for callus culture of some species of the Rosaceae. *Can. J. Bot.*, 54:547-551.
- Coleman G.D., Chen T.H.H., Ernst S.G. y Fuchigami L. 1991. Photoperiod control of poplar bark storage protein accumulation. *Plant Physiol.*, 96:686-692.
- Conner A.J. y Thomas M.B. 1982. Re-establishing plantlets from tissue culture: a review. *Proc. Int. Plant. Prop. Soc.*, 31:342-357.
- Cordero R.E., Murray J.R. y Hackett W.P. 1985. Plastochron indices for juvenile and mature forms of *Hedera helix* L. (Araliaceae). *Am. J. Bot.*, 72:324-327.
- Cox W.J. y Reisenauer H.M. 1973. Growth and ion uptake by wheat supplied nitrogen as nitrate, or ammonium or both. *Plant and Soil*, 38:363-380.
- Crisosto C. y Sutter E. 1985. Role of the endocarp in "Manzanillo" olive seed germination. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 110:50-52.
- Darral N.M. y Wareing P.F. 1981. The effect of nitrogen nutrition on cytokinin activity and free amino acids in *Betula pendula* Roth. and *Acer pseudoplatanus* L. *J. Exp. Bot.*, 32:369-379.
- Davies F.R. 1984. Shoot RNA, cambial activity and indolebutyric acid effectivity in seasonal rooting of juvenile and mature *Ficus pumila* cuttings. *Physiol. Plant.*, 62:571-575.
- Davies F.T.Jr. y Hartmann H.T. 1988. The physiological basis of adventitious root formation. *Acta Hortic.*, 227:113-120.
- Davis J.M. y Loescher W.H. 1990. [¹⁴C]Assimilate translocation in the light and dark in celery (*Apium graveolens*) leaves of different ages. *Physiol. Plant.*, 79:656-662.
- De Vries S.C., De Vos W.M., Harmsen M.C. y Wessels J.G.H. 1985. A shoot specific mRNA from pea: nucleotide sequence and regulation as compared to light-induced mRNAs. *Plant. Mol. Biol.*, 4:95-102.
- Diamantoglou S. y Mitrakos K. 1979. Sur la culture in vitro de l'embryon d'olivier (*Olea europea* L. var. Oleaster). *C. R. Acad. Sci. Paris*, t.288 (Serie D):1537-1540.
- Dietrich H. 1924. *Flora*, 17:379-417
- Driver J.A. y Kuniyuki A.H. 1984. In vitro propagation of paradox walnut rootstock. *Hort. Sci.*, 19:507-509.
- Doorenbos J. 1965. Juvenile and adult phases in woody plants. *Handb. Pflanzenphysiol.*, 15:1222-1235.
- Duisberg P.C. y Buehrer T.F. 1954. Effect of ammonia and its oxidation products on rate of nitrification and plant growth. *Soil Sci.*, 78:37-49.
- Earle E.D. y Torrey J.G. 1965a. Colony formation by isolated *Convolvus* cells plated on defined media. *Plant Physiol.*, 40:520-528.

- Earle E.D. y Torrey J.G. 1965b. Morphogenesis in cell colonies grown from *Convulvus* cell suspensions plated on synthetic media. *Am. J. Bot.*, 52:891-899.
- Eichholtz D.A. 1979. Adventive embryony in apple. *HortScience*, 14:699-700.
- Engels C. y Marschner H. 1993. Influence of the form of nitrogen supply on root uptake and translocation of cations in the xylem exudate of maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.*, 44:1695-1701.
- Evers P.W. 1985. Growth and morphogenesis of shoot initials of Douglas fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) franco, in vitro. *Neth. J. Agr. Sci.*, 33:1211-1226.
- Fasolo F., Zimmerman R.H. y Fordham I. 1989. Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoots of apple cultivars. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 16:75-87.
- Fellman J.K. y Loescher W.H. 1987. Comparative studies of sucrose and mannitol utilization in celery (*Apium graveolens*). *Physiol. Plant.*, 69:337-341.
- Fernández J.L., Rodríguez R., Cañal M.J., Andrés H. y Rodríguez A. 1990. Levels of cytokinins in aging and rejuvenated *Corylus avellana* L. Tissues. En: R Rodríguez, R Sánchez-Tamés & DJ Durzan (eds.), *Plant Aging: Basic and Applied Approaches*. Plenum Press, New York, pp 435-438.
- Filner P. 1966. Regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 118:299-310.
- Findenegg G.R., Nelemans J.A. y Arnozis P.A. 1989. Effect of external pH and Cl on the accumulation of NH₄ ions in the leaves of sugar beet. *J. Plant Nutr.*, 12:593-602.
- Fiorino P. y Leva A.R. 1986. Investigation on the micropropagation of the olive (*Olea europaea* L.). Influence of some mineral elements on the proliferation and rooting of explants. *Olea*, 17:101-104.
- Fletcher J.S. 1982. Control of nitrogen assimilation in suspension cultures of Paul's scarlet rose. En: *Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, pp 229-230.
- Flora L.L. y Madore M.A. 1993. Stachyosa and mannitol transport in olive (*Olea europaea* L.). *Planta*, 189:484-490.
- Fortanier E.J., Jonkers H. 1976. Juvenility and maturity of plants as influenced by their ontogenetical and physiological ageing. *Acta Hort.*, 56: 37-44.
- Fouret Y. 1987. Étude *in vitro* du rajeunissement préalable à la micropropagation chez le *Sequoia sempervirens* (Endl.): recherche de marqueurs morphologiques, physiologiques et biochimiques. *Th. de Doctorat*, Univ. Paris VI.
- Fowler M.W., Watson R. y Lyona I. 1982. Substrate utilisation, carbon and nitrogen by suspension cultured plant cells. En: *Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue And Cell Culture*, pp 225-228.
- Francllet A. y Boulay M. 1989. En: JS Pereira & JJ Landsberg (eds.), *Biomass Production by*

- Fast Growing Trees*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, pp 267-274.
- Franich R.A., Wells L.G. y Barnett J.R. 1977. Variation with tree age of needle cuticle topography and stomatal structure in *Pinus radiata* D. Don. *Ann. Bot.*, 41:621-626.
- Frydman V.M. y Wareing P.F. 1973. Phase change in *Hedera helix* L. II. The possible role of roots as a source of shoot gibberellin-like substances. *J. Exp. Bot.*, 24:1139-1148.
- Galoch E. 1985. Comparison at the content of growth regulators in juvenile and adult plants of birch. *Acta Physiol. Plant.*, 7:205-215.
- Gamborg O.L. y Shyluk J.P. 1981. Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures. En: TA Thorpe (ed.), *Plant Tissue Culture: Methods And Applications In Agriculture*. Academic Press, New York, pp. 21-44.
- García-Berenguer A. 1978. Selección clonal en olivo. *Olea*, 7:7-15.
- García J.L., Sarmiento R., Troncoso A. y Mazuelos C. 1994. Effect of the nitrogen source and concentration on N fractions in olive seedlings. *Acta Hortic.*, 356:193-196.
- Gasser J.K.R. y Iordanou I.G. 1967. Effects of ammonium sulphate and calcium nitrate on the growth yield and nitrogen uptake of barley, wheat and oats. *J. Agric. Sci.*, 68:307-316.
- Gautheret R.J. 1939. Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *C. R. Acad. Sci.*, 208:118-121.
- Gautheret R.J. 1941. Action du saccharose sur la croissance des tissus de Carotte. *C. R. Soc. Biol.*, 135:875-877.
- Gautheret R.J. 1945. Une voie nouvelle en biologie végétale: La culture des tissus. Gaillimard, Paris.
- Greenwood M.S. 1984. Phase change in loblolly pine: shoot development as a function of age. *Physiol. Plant.*, 61:518-522.
- Griggs W., Hartmann H.T., Bradley M.V., Iwakiri B.T. y Whisler J.E. 1975. Olive pollination in California. *Calif. Agric. Exp. Stn.*, Bull No. 869.
- Goodin J.R. 1964. Shoot growth rates as a factor in growth phase transitions in *Hedera*. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 84:600-605.
- Goyal S.S. y Huffaker R.C. 1984. Nitrogen toxicity in plants. En: RD Hauck (ed.), *Nitrogen in Crop Production*. Am. Soc. Agron., Madison WI, pp 97-118.
- Hackett W.P. 1985. Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants. *Hortic. Rev.*, 7:109-155.
- Hackett W.P. 1987. Juvenility and Maturity. En: JM Bonga & DJ Durzan (eds.), *Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. 1. General Principles and Biotechnology*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp 216-231.

- Hackett W.P.** 1989. Biochemical, cellular and molecular analysis of maturation related characteristics in *Hedera helix*. En: *Proc. 5th Moët Hennessy Conf., Maîtrise de la Morphogenèse*. Moët Hennessy Luis Vuitton, Paris, 1.
- Hageman R.R.** 1979. Integration of nitrogen assimilation in relation to yield. En: EJ Hewitt & CW Cutting (eds), *Nitrogen Assimilation In Plants*. Academic Press, New York, pp 591-611.
- Hagin J., Olsen S.R. y Shaviv A.** 1990. Review of interaction of ammonium-nitrate and potassium nutrition of crops. *J. Plant Nutr.*, 13:1211-1226.
- Hand P., Besford R.T., Richardson C.M. y Peppit S.D.** 1996. Antibodies to phase related proteins in juvenile and mature *Prunus avium*. *Plant Growth Reg.*, 20:25-29.
- Hanning E.** 1904. Zur Physiologie pflanzlicher Embryonen. I. Ueber die Cultur von Cruciferen-Embryonen ausserhalb des Embryosacks. *Bot. Ztg.*, 62:45-80.
- Hansche P.E.** 1983. Response to selection. En: JN Moore & J Janick (eds.), *Methods in fruit breeding*. Purdue University Press. West Lafayette, pp 154-171.
- Hansche P.E. y Beres W.** 1980. Genetic remodeling of fruit and nut trees to facilitate cultivar improvement. *HortScience*, 15:710-715.
- Harding K.** 1994. The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 37:31-38.
- Hartmann H.T. y Brown J.G.** 1953. The effect of certain mineral deficiencies on the growth, leaf appearance, and mineral content of young olive trees. *Hilgardia*, 22: 119-130.
- Hayman A.R. y Weavers R.T.** 1990. Terpene of foliage oils from *Halocarpus bidwillii*. *Phytochemistry*, 29:3157-3162.
- Haynes R.J. y Goh, K.M.** 1978. Ammonium and nitrate nutrition of plants. *Biol. Rev.*, 53:465-510.
- Heimer Y.M. y Filner P.** 1970. Regulation of nitrate assimilation pathway of cultured tobacco cells. II. Properties of a variant cell line. *Biochim. Biophys. Acta*, 215:152-165.
- Heinrikson R.L. y Meredith S.C.** 1984. Aminoacid analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.*, 136:65-74.
- Heslop-Harrison J.** 1967. Differentiation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 18:325-348.
- Heybroek H.T. y Visser T.** 1976. Juvenility in fruit growing and forestry. *Acta Hortic.*, 56:71-80.
- Heywood H.U.** 1978. *Flowering Plants of the World*. Oxford University Press, London.
- Hield H.Z., Coggins C.W. y Lewis L.N.** 1966. Temperature influence on flowering of

- grapefruit seedlings. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 89:175-181.
- Hildebrandt A.C. y Riker A.T. 1949. The influence of various carbon compounds on the growth of marigold, paris-daisy, periwinkle, sunflower and tobacco tissue *in vitro*. *Am. J. Bot.*, 36:74-85.
- Hood J.V. y Libby W.J. 1980. A clonal study of intraespecific variability in radiata pine. I. Cold and animal damage. *Austral. For. Res.*, 10:9-20.
- Horst G.L., Fenn L.B. y Dunning N.B. 1985. Bermudagrass turf responses to nitrogen sources. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 110:759-761.
- Hu C.Y. 1975. *In vitro* culture of rudimentary embryos of eleven Ilex species. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 100:221-225.
- Huang H.J., Chen Y., Kuo J.L., Kuo T.T., Tzeng C.C., Huang B.L., Chen C.M. y Huang L.C. 1996. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* in vitro: changes in isoesterases and isoperoxidases. *Plant-and-Cell-Physiol.*, 37:77-80
- Huang L.-C., Lius S., Huang B.-L., Murashige T., Mahdi El F.M. y Gundy R.V. 1992. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks in vitro. *Plant Physiol.*, 98:166-173.
- Hubbs A. y Roy H. 1992. Synthesis and assembly of large subunits into Ribulose Biphosphate Carboxylase Oxygenase in chloroplast extracts. *Plant Physiol.*, 100:272-281.
- Hutchinson J.F. 1984. In vitro propagation of *Dionaea muscipula ellis* (venus fly trap). *Sci. Hort.*, 22:189-194.
- Hutchison K.W., Singer P.B. y Greenwood M.S. 1987. Molecular genetic analysis of development and maturation in Larch. En: WM Cheliak & AC Yapa (eds.), *Molecular Genetics of Forest Trees*. Proc. 2nd IUFRO Working Party on Molecular Genetics, Chalk River, pp 26-33.
- Ingestad T. 1979. Mineral nutrient requirements of *Pinus silvestris* and *Picea abies* seedlings. *Physiol. Plant.*, 45:373-380.
- Istambouli A. y Neville P. 1977. Etudé de la "dormance" des semences d'olivier (*Olea europaea* L.). Mise en evidence d'une dormance embryonnaire. *C. R. Acad. Paris, Serie D*, 284:2503-2506.
- Jeannin G., Brunner R. y Hahne G. 1995. Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annus* L.) cultivated *in vitro*: role of the sugar. *Plant Cell Rep.*, 15:200-204.
- Kammaing-Van Wijk C. y Prins H.B.A. 1993. The kinetics of NH₄⁺ and NO₃⁻ uptake by Douglas fir from single N-solutions and from solutions containing both NH₄⁺ and NO₃. *Plant and Soil*, 151:91-96.
- Keeney D.R. y Nelson D.W. 1982. Nitrogen-Inorganic forms. En: *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical And Microbiological Properties. Agronomy Monograph*

No. 9 (2nd edition). Amer. Soc. Agron.

- Keller F. y Matile P. 1989. Storage of sugars and mannitol in petioles of celery leaves. *New Phytol.*, 113:291-299.
- Khelif M. y Trigui A. 1984. Observations préliminaires a une sélection clonale de la variété d'olivier 'Chemlali'. *Olea*, 17:183-185.
- Kikuta Y. y Okazawa Y. 1984. Control of root and shoot bud formation from potato tuber tissue cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 61:8-12.
- Kirkby E.A. 1968. Influence of ammonium and nitrate nutrition on the cation-anion balance and nitrogen and carbohydrate metabolism of white mustard plants grown in dilute nutrient solution. *Soil Sci.*, 105:133-141.
- Kirkby E.A., Leustek T. y Lee M.S. 1987. Nitrogen Nutrition. En: JM Bonga, DJ Durzan (eds), *Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. 1. General Principles and Biotechnology*. Martinus Nijhoff Publishers, pp 67-81.
- Kirkby E.A. y Mengel K. 1967. Ionic balance in different tissues of the tomato plant in relation to nitrate, urea or ammonium nutrition. *Plant Physiol.*, 42:6-14.
- Kiss J., Heszky L.E., Kiss E. y Gvulai G. 1992. High-efficiency adventive embryogenesis on somatic embryos of anther, filament and immature proembryo origin in horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) tissue culture. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 30:59-64.
- Kluba R.M., Mattick L.R. y Hackler L.R. 1978. Changes in the free and total amino acid composition of several *Vitis labruscana* grape varieties during maturation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 29:102-111.
- Kronzucker H.J., Siddiqi M.Y. y Glass A.D.M. 1997. Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. *Nature*, 385:59-61.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Lagarda A. y Martin G.C. 1983. "Manzanillo" olive seed dormancy as influenced by exogenous hormone application and endogenous abscisic acid concentration. *HortScience*, 18(6):869-871.
- Lagarda A., Martin G.C. y Kester D.E. 1983a. Influence of environment, seed tissue and seed maturity on "Manzanillo" olive seed germination. *HortScience*, 18:868-869.
- Lagarda A., Martin G.C. y Polito V.S. 1983b. Anatomical and morphological development of Manzanillo olive seed in relation to germination. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 108:741-743.
- Lalatta F. 1959. Horticultural seeds: ripening of seeds of tree fruit species. *Sementi Elette*, 5(1):65-66.
- Lambardi M., Rinaldi L.M.R., Menabeni D. y Cimato A. 1994. Ethylene effect on "in

- vitro" olive seed germination (*Olea europaea* L.). *Acta Hort.*, 356: 54-57.
- Langford P.J. y Wainwright H. 1988. Influence of sucrose concentration on the photosynthetic ability of *in vitro* grown rose shoots. *Acta Hort.*, 227:305-310.
- Lara C. 1992. Photosynthetic nitrate assimilation: Interactions with CO₂ fixation. En: J Barber, H Medrano & MG Guerrero (eds), *Trends In Photosynthesis Research*. Intercept Ltd, Londres, pp 195-208.
- Lavee S. 1978. 'Kadesh' Table olive. *Hort. Sci.*, 13:62-63.
- Lavee S. 1990. Aims, methods, and advances in breeding of new olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Acta Hort.*, 286:23-36.
- Lavee S. 1994. ¿Porqué la necesidad de nuevas variedades de olivo?. En: L Rallo & A Troncoso (eds.), *Avances en Olivicultura*. Fundación "la Caixa"-Fruticultura Profesional-SECH. Editorial Agrolatino, pp 29-37.
- Lavee S. y Avidan N. 1994. Protein content and composition of leaves and shoot bark in relation to alternate bearing of olive trees (*Olea europaea* L.). *Acta Hort.*, 356:143-147.
- Lavee S., Avidan N., Haskal A. y Ogradovich A. 1996. Juvenility period reduction in the olive seedlings - A tool for enhancement of breeding. *Olivae*, 60: 33-41.
- Lavee S. y Datt Z. 1978. The necessity of cross-pollination for fruit set of "Manzanillo" olives. *J. Hort. Sci.*, 53:361-366.
- Lavee S., Haskal A. y Wodner M. 1986. 'Barnea'. A new olive cultivar from first breeding generation. *Olea*, 17:95-99.
- Lea P.J., Wallsgrove R.M. y Mifflin B.J. 1985. The biosynthesis of Amino Acids in Plants. En: GC Barrett (ed.), *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*. Chapman and Hall, Londres, pp 197-226.
- Leva A.R., Muleo R. y Petruccelli R. 1995a. Long-term somatic embryogenesis from immature olive cotyledons. *J. Hort. Sci.*, 70:417-421.
- Leva A.R., Petruccelli R. y Bartolini G. 1994. Mannitol in "in vitro" culture of *Olea europaea* L. (Cv. Maurino). *Acta Hort.*, 356:43-46.
- Leva A.R., Petruccelli R., Muleo R., Goretti R. y Bartolini G. 1995b. Influenza di fattori trofici, regolativi e condizioni del mezzo nutritivo sulla coltura *in vitro* di diverse cultivar di olivo. *Atti del Convegno: L'Olivicoltura Mediterranea: stato e prospettive della coltura e della ricerca*, pp 239-248.
- Lewis D.H. 1984. Physiology and metabolism of alditols. En: DH Lewis (ed.), *Storage Carbohydrates in Vascular Plants*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 157-179.
- Lewis O.A.M. y Chadwick S. 1983. A ¹⁵N investigation into nitrogen assimilation in hydroponically grown barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Clipper) in response to

- nitrate, ammonium and mixed nitrate and ammonium nutrition. *New Phytol.*, 95:635-646.
- Libby W.J. y Hood J.V. 1976. Juvenility in hedged radiata pine. *Acta Hortic.*, 56:91-98.
- Lillo C. 1989. Effects of media components and environmental factors on shoot formation from protoplast-derived calli of *Solanum tuberosum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, 19:103-111.
- Liñán J., Rapoport H.F. y Troncoso A. 1998. Olive embryo development stage and the possibility of obtaining viable seeds. *Acta hortic.*, (en prensa)
- Loreti F., Morini S. y Concetti S. 1988. Effect of potassium and nitrogen concentration on growth of peach shoots cultured *in vitro*. *Acta Hortic.*, 227:311-317.
- Loescher W.H. 1987. Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiol. Plant.*, 70:553-557.
- Loescher W.H., Tyson R.H., Everard J.D., Redgwell R.J. y Bieleski R.L. 1992. Mannitol synthesis in higher plants. Evidence for the role and characterization of a NADPH-dependent mannosa 6-phosphate reductase. *Plant Physiol.*, 98:1396-1402.
- Lyrene P.M. 1981. Juvenility and production of fast-rooting cuttings from blueberry shoot cultures. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 106:396-398.
- MacKown C.T., Jackson W.A. y Volk R.J. 1982. Restricted nitrate influx and reduction in corn seedlings exposed to ammonium. *Plant Physiol.*, 69:353-359.
- Maldiney R., Pelese F., Pilate G., Sotta B., Sossountzov L. y Miginiac E. 1986. Endogenous levels of abscisic acid, indole-3-acetic acid, zeatin and zeatin-riboside during the course of adventitious root formation in cuttings of craigella and craigella lateral suppressor tomatoes. *Physiol. Plant.*, 68:426-430.
- Marchal J., Sens I. y Teisson C. 1992. Influence des sucre et de facteurs bioclimatiques sur la culture *in vitro* du bananier. *Fruit*, 47:17-24.
- Marschner H. 1986. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, Londres.
- Marschner H. 1995. *Mineral Nutrition in Higher Plants*. Academic Press, Londres.
- Marschner H., Häusling M. y George E. 1991. Ammonium and nitrate uptake rates and rhizosphere pH in non-mycorrhizal roots of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Trees*, 5:14-21.
- Marti H.R. y Mills H.A. 1991a. Nutrient uptake and yield to sweet pepper as affected by stage of development and N form. *J. Plant Nutr.*, 14:1165:1175.
- Marti H.R. y Mills H.A. 1991b. Calcium uptake and concentration in bell pepper plants as influenced by nitrogen form and stages of development. *J. Plant Nutr.*, 14:1177:1185.
- Matte C.R. 1996. Evaluación y selección de material de vid por su tolerancia a la

salinidad del medio. *Tesis Doctoral*, Universidad de Sevilla.

- Maynard D.N. y Barker A.V. 1969. Studies on the tolerance of plants to ammonium nutrition. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 94:235-239.
- Mazalewsky R.L. y Hackett W.P. 1979. Cutting propagation of *Eucalyptus ficifolia* using cytokinin-induced basal trunk sprouts. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 29:118-124.
- McCown B.H. y Sellmer J.C. 1987. General media and vessels suitable for woody plant culture. En: JM Bonga, DJ Durzan (eds), *Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. 1. General Principles and Biotechnology*. Martinus Nijhoff Publishers, pp 4-16.
- McClure P.R., Kochian L.V., Spanswick R.M. y Shaff J.R. 1990a. Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. I. Effects of nitrate on the membrane potential. *Plant Physiol.*, 93:281-289.
- McClure P.R., Kochian L.V., Spanswick R.M. y Shaff J.R. 1990b. Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. II. Measurements of NO₃⁻ and NH₄⁺ fluxes with ion-selective microelectrodes. *Plant Physiol.*, 93:290-294.
- Meier-Dinkel A. y Kleinschmidt J. 1990. Aging in tree species: present knowledge. En: R Rodriguez, R Sánchez-Tamés & DJ Durzan (eds.), *Plant Aging: Basic and Applied Approaches*. Plenum Press, New York, pp 51-63.
- Mengel K. y Kirkby E.A. 1982. Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute, Worblaufen-Berna.
- Merckle S.A. y Sommer H.E. 1986. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Liriodendron tulipifera*. *Can. J. For. Res.*, 16:420-422.
- Meyer M.M. Jr. 1983. Clonal propagation of perennial plants from flower by tissue culture. *Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society*, 33:402-407.
- Mifflin B.J. y Lea P.J. 1977. Amino acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 28:299-329.
- Mifflin B.J. y Lea P.J. 1982. Ammonia assimilation and amino acid metabolism. En: D Boulder & B Parthier (eds), *Encyclopedia of Plant Physiology, New Ser., vol 14A*. Springer, Berlin, pp 3-64.
- Milella A. 1962. The germinative capacity of wild olive seeds in relation to the ripeness of the fruit. *Studi Sassar Sez III 1960*, 8:85-89 (*Hort. Abstr.*, 32(2):472).
- Milella A. y Deidda P. 1975. La nutrizione minerale dell'olivo in coltura artificiale. *Ital. Agr., anno 112, n. 11*.
- Millikan D.F. y Jankiewicz L.S. 1966. Mineral and protein changes associated with juvenile and adult forms of *Hedera helix*. *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.*, XIV, 11-12:801-803.

- Minocha S.C.** 1987. pH of the medium and the growth and metabolism of cells in culture. En: JM Bonga, DJ Durzan (eds), *Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. 1. General Principles and Biotechnology*. Martinus Nijhoff Publishers, pp 125-141.
- Mitrakos K. y Diamantoglou S.** 1984. Endosperm dormancy breakage in olive seeds. *Physiol. Plant.*, 62:8-10.
- Mohedo A.** 1995. Acortamiento del periodo juvenil del olivo. *Trabajo Profesional Fin de Carrera*, ETSIAM, Universidad de Córdoba.
- Molisch H.** 1922. Pflanzenphysiologie als Theorie der Gartnerei. *Aufl. Jena* 3, 326.
- Monteuuis O.** 1988. Aspects du clonage de séquoias géants jeunes et âgés. *PhD Th.*, Univ. Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.
- Monteuuis O. y Gendraud M.** 1987. Nucleotide and nucleic acid status in shoot tips from juvenile and mature clones of *Sequoiadendron giganteum* during rest and growth phases. *Tree Physiol.*, 3:257-263.
- Monteuuis O. y Genestier S.** 1989. Analyse cytophotométrique comparé des parois du mésophylle de feuilles de *Sequoiadendron giganteum* jeunes et âgés. *Bull. Soc. Bot. Fr.*
- Moose S.P. y Sisco P.H.** 1994. Glossy15 controls the epidermal juvenile-to-adult phase transition in maize. *Plant-Cell*, 6:1343-1355.
- Morettini A.** 1950. Olivicoltura. *Trattati di Agricoltura vol. 9º*. Ramo editoriale degli agricoltori. Roma.
- Morettini A.** 1961. Selezione clonale del 'Moraiolo' e del 'Frantoio'. *Italia Agricola*, 98:21-29.
- Morettini, A.** 1972. Olivicoltura. *REDA*, Roma.
- Mullins M.G. y Srinivasan C.** 1976. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet-Sauvignon) by apomixis in vitro. *J. Exp. Bot.*, 27:1022-1030.
- Murashige T. y Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultires. *Physiol. Plant.*, 15:473-479.
- Murray J.R. y Hackett W.P.** 1991. Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L.. *Plant Physiol.*, 97:343-351.
- Murray J.R., Smith A.G. y Hackett W.P.** 1994. Differential dihydroflavonol reductase transcription and anthocyanin pigmentation in the juvenile and mature phases of ivy (*Hedera helix* L.). *Planta*, 194:102-109.
- Nadel B.L., Altman A. y Ziv M.** 1989. Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspensions. I. Promoting effects of mannitol on somatic embryo development. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 18:181-189.

- Nassar A.R. y Kliewer W.M. 1966. Free amino acids in various parts of *Vitis vinifera* at different stages of development. *Am. Soc. Hort. Sci. Proc.*, 89:281-294.
- Natividade, V.Y. 1957. Juvenildade na *Olea europaea* L. *Agronomia Lusitana*, 19:145-159.
- Nehring K. 1960. Agrikulturchemische Untersuchungs-methoden fun Dunge- und Futtermittel, Boden und Milch: Bestimmung des Gesamtstickstoffs, Methode van O. foerster Verlag Paul Parey-Hamburg.
- Nickell L.G. 1951. Embryo culture of weeping crabapple. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 57:401-405.
- Niu G. y Kozai T. 1997. Simulation of the growth of potato plantlets cultured photoautotrophically *in vitro*. *Trans-ASAE*, 40:255-260.
- Olesen P.O. 1978. On cyclophysis and topophysis. *Silvae Genetica*, 27:173-178.
- Olesen P.O. 1982. The effect of cyclophysis on tracheid width and basic density in Norway spruce. *For. Tree Improve Arbor (Horsholm)*, 15:1-80.
- Oka S. y Ohyama K. 1982. Sugar utilisation in mulberry (*Morus alba* L.) bud culture. En: A Fujiwara (ed.), *Plant Tissue Culture 1982. Proc 5th Int Congr Plant Tissue Cell Cult.* Tokyo, pp 67-68.
- Parlati M.V., Bellini E. y Menna C. 1986. Selezione clonale dell'olivo nel Lazio 2. Un interessante clone Carboncella Pianace B'. *Ann. Ist. Spec. Olivicoltura, Cosenza*, 8:61-69.
- Paul J.S., Cornwell K.L. y Bassham J.A. 1978. Effects of ammonia on carbon metabolism in photosynthesizing isolated cells from *Papaver somniferum* L. *Planta*, 142:49-54.
- Peterson L.A., Stang E.J. y Dana M.N. 1988. Blueberry response to NH₄-N and NO₃-N. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 113:9-12.
- Pharis R.P. y Morf W. 1967. Experiments on the precocious flowering of western red cedar and four species of *Cupressus* with gibberellins A3 and A4/A7 mixture. *Can. J. Bot.*, 45:1519-1524.
- Pharis R.P. y Morf W. 1968. Physiology of gibberellin induced flowering in conifers. En: F Wightman & G Setterfield (eds.), *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*. Runge Press, Ottawa, pp 1341-1356.
- Pierik R. 1990. Rejuvenation and micropropagation. En: HJJ Nijkamp, Van Der Plas & Van aartrijk (eds.), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Kluwer Academic Pu., pp 91-101.
- Pierik R.L.M., Van Leeuwen P. y Rigter G.C.C.M. 1988. Regeneration of leaf explants of *anthunum andraeanum* Lind. In vitro. *Neth. J. Agric. Sci.*, 27:221-226.
- Pinta M. y Membres du Comité Inter-Instituts d'Etude des Techniques du Diagnostic Foliare. 1969. Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux

dans les végétaux: Azote, Phosphore, Potassium, Sodium, Calcium, Magnésium. *Oléagineux*, 24:497-504.

- Pinta M. y Membres du Comité Inter-Instituts d'Etude des Techniques du Diagnostic Foliare.** 1973. Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux. Détermination des éléments Ca, Mg, Fe, Mn, Zn et Cu par absorption atomique. *Oléagineux*, 28:87-92.
- Pua E.-C. y Chong C.** 1984. Requirement for sorbitol (D-glucitol) as carbon source for *in vitro* propagation of *Malus robusta* No. 5. *Can. J. Bot.*, 62:1545-1549.
- Ramming D.W., Emershad R.L., Spiegel-Roy P., Sahar N. y Baron I.** 1990. Embryo culture of early ripening seeded grape (*Vitis vinifera*) genotypes. *HortScience*, 25:339-342.
- Randolph L.H.** 1945. Embryo culture of iris seed. *Pl. Garden*, 1:241-246.
- Randolph L.H. y Cox L.G.** 1943. Factors influencing the germination of iris seed and the relation of inhibiting substances to dormancy. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 43:284-300.
- Raven J.A.** 1985. Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular plants: a cost benefit analysis in relation to efficiency of use of energy, nitrogen and water. *New Phytol.*, 101:25-77.
- Raven J.A. y Wollenweber B.** 1992. Temporal and spatial aspects of acid-base regulation. En: DD Randall, RE Sharp, AJ Novacky & DG Blevins (eds), *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology*. The Interdisciplinary Plant Group, Missouri, Columbia, pp 270-294.
- Raven J.A., Wollenweber B. y Handley L.L.** 1993. The quantitative role of ammonia/ammonium transport and metabolism by plants in the global N cycle. *Physiol. Plant.*, 89:512-518.
- Rey M., Tiburcio A.F., Díaz-Sala C. y Rodríguez R.** 1994. Endogenous polyamine concentrations in juvenile, adult and *in vitro* reinvigorated hazel. *Tree Physiol.*, 14:191-200.
- Rinaldi L.M.R., Menabeni D., Lambardi M. y Cimato A.** 1994. Changes of carbohydrates in olive seeds (*Olea europaea* L.) during fruit maturation and their correlation with germination. *Acta Hortic.*, 356:58-61.
- Robinson L.W. y Wareing P.F.** 1969. Experiments on the juvenile-adult phase change in some woody species. *New Phytol.*, 68:67-78.
- Rogler C.E. y Dahmus M.E.** 1974. Gibberellic acid-induced phase change in *Hedera helix* as studied by deoxyribonucleic-ribonucleic acid hybridization. *Plant Physiol.*, 54:88-94.
- Rose D. y Martin S.M.** 1975. Effect of ammonium on growth of plant cells (*Ipomea* sp.) in suspension culture. *Can. J. Bot.*, 53:1942-1949.

- Roselli G. y Donini P. 1982. 'Briscola', nuova cultivar di olivo a sviluppo comato. *Riv. Ortoflorofrott. It.*, 66:103-104.
- Rowe P. 1981. Breeding an "intractable" crop: bananas. En: KO Rachie & JM Lyman (eds.), *Genetic Engineering for Crop Improvement*. The Rockefeller Foundation, New York, pp 66-86.
- 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. *Sci. Hortic.*, 24:123-134.
- Rugini E. 1986. Olive (*Olea europaea* L.). En: YPS. Bajaj (ed.), *Biotechnology In Agriculture And Forestry. I. Trees*. Springer Verlag, Berlin, N.Y., Tokyo, pp 253-267.
- Rugini E. 1990. In vitro culture of the olive: An overview of the present scientific status. *Acta Hortic.*, 286:93-96.
- Rugini E. y Fedeli E. 1990. Olive (*Olea europaea* L.) as an oilseed crop. En: YPS Bajaj (ed.), *Biotechnology In Agriculture And Forestry, Vol. 10: Legumes And Oilseed Crop I*. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlín, pp 593-641.
- Rugini E., Fontanazza G. y Bongi G. 1979. Ricerche preliminare sulla coltura *in vitro* della specie *Olea europaea*. *Atti. Inc. Tec. Col. Vitro*, 193-202.
- Rugini E. y Lavee S. 1992. Olive. En: FA Hammerschlag & RE Litz (eds.), *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. CAB International, Wallingford, Oxford, pp 371-382.
- Rumball W. 1963. Wood structure in relation to heteroblastism. *Phytomorphology*, 13:206-214.
- Rumpho M.E., Edwards G.E. y Loescher W.H. 1983. A pathway for photosynthetic carbon flow to mannitol in celery leaves. *Plant Physiol.*, 73:869-873.
- Sargent P.A. y King J. 1974. Investigations of growth promoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium within they grow: ammonium, glutamine and amino acids. *Can. J. Bot.*, 52:1747-1755.
- Sarmiento R. 1974. Aspectos fisiológicos y bioquímicos en relación con el proceso de floración en plantas de *Olea europaea* L., variedad "Manzanillo". *Tesis Doctoral*, Universidad de Sevilla.
- Sarmiento R., Catalina L., Valpuesta V. y González García F. 1977. El metabolismo nitrogenado en árboles de *Olea europaea* L., var. Manzanillo, en relación con la floración. I. Estudio de las fracciones nitrogenadas orgánicas. *An. Edaf. Agrobiol.*, 36:565-572.
- Sarmiento R., García J.L., Mazuelos C., Liñán J. y Troncoso A. 1994. Effect of the form and concentration of N on the growth and mineral composition of olive seedlings. *Acta Hortic.*, 356:156-161.
- Sarmiento R., Villegas A., Mazuelos C., García J.L. y Troncoso A. 1992. Influence of the

nitrogen source and concentration on N fractions and free amino acid levels of grape vine explants. *Plant and Soil*, 144:255-258.

Sasakawa H. y Yamamoto Y. 1978. Comparison of the uptake of nitrate and ammonium by rice seedlings - influences of light, temperature, oxygen concentration, exogenous sucrose, and metabolic inhibitors. *Plant Physiol.*, 62:665-669.

Scaramuzzi F. y Baldini B. 1963. Olive da tavola. *Agricola*, Bologna

Schachtman D.P. y Schroeder J.I. 1994. Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature*, 370:655-658.

Schaffalitzky de Muckadell M. 1959. Investigations on ageing of apical meristems in woody plants and its importance in silviculture. *Forstl. Forsgsv. Danm.*, 25:310-455.

Scheromm P. y Plassard C. 1988. Nitrogen nutrition of non-mycorrhized maritime pine (*Pinus pinaster*) grown on nitrate or ammonium. *Plant Physiol. Biochem.*, 26:261-269.

Seeliger R. 1924. Topophysis und zylophysis pflanzlicher organe und ihre Bedeutung fur die Pflanzenkultur. *Angew Bot.*, 6:191-200.

Shepard J.F. y Totten R.E. 1977. Mesophyll cell protoplasts of potato: isolation, proliferation, and plant regeneration. *Plant Physiol.*, 60:313-316.

Simonne E.H., Smittle D.A. y Mills H.A. 1993. Turnip growth, leaf yield and leaf nutrient composition responses to nitrogen forms. *J. Plant. Nutr.*, 16:2341-2351.

Skokut T.A. y Filner P. 1980. Slow adaptative changes in urease levels of tobacco cells cultured on urea and other nitrogen sources. *Plant Physiol.*, 65:995-1003.

Smith F.A. 1984. Regulation of the cytoplasmic pH of *Chara corallina*: Response to changes in external pH. *J. Exp. Bot.*, 3:43-50.

Soost R.K. y Cameron J.W. 1975. Citrus. En: JN Moore & J Janick (eds.), *Advances In Fruit Breeding*. Purdue University Press, West Lafayette, pp 507-540.

Sotomayor E.M. y Caballero J.M. 1990. An easy method of breaking olive stones to remove mechanical dormancy. *Acta Hortic.*, 286:113-116.

Sotomayor E.M. y Caballero J.M. 1994. Propagation of Gordal "Sevillana" olive by grafting onto rooted cuttings or seedlings under plastic-closed frames without mist. *Acta Hortic.*, 356:39-41.

Sotomayor E.M. y Durán J.M. 1994. Breaking of dormancy in olive (*Olea europaea* L.) seeds. *Acta Hortic.*, 356:137-141.

Stewart G.R. y Rhodes D. 1977. Control of enzyme levels in the regulation of nitrogen assimilation. En: H. Smith (ed.), *Regulation of Enzyme Synthesis and Activity in Higher Plants*. Academic Press, London, pp 1-22.

- Stoop J.M.H. y Pharr D.M. 1992. Partial purification and characterization of mannitol:mannose 1-oxidoreductase from celeriac (*Apium graveolens* var. *rapaceum*) roots. *Arch. Biochem. Biophys.*, 298:612-619.
- Stoop J.M.H. y Pharr D.M. 1993. Effect of different carbon sources on relative growth rate, internal carbohydrates, and mannitol 1-oxidoreductase activity in celery suspension cultures. *Plant Physiol.*, 103:1001-1008.
- Stoop J.M.H. y Pharr D.M. 1994. Growth substrate and nutrient salt environment alter mannitol to hexose partitioning in celery petioles. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 119:237-242.
- Stoop J.M.H., Williamson J.D., Conkling M.A. y Pharr D.M. 1995. Purification of NAD-dependent mannitol dehydrogenase from celery suspension cultures. *Plant Physiol.*, 108:1219-1225.
- Street H.E. 1969. Knowledge gained by culture of organs and tissue explants. En: FC Steward (ed.), *Plant Physiology: A Treatise, Vol VB*. Academic Press, New York, pp 3-224.
- Street H.E. 1973. Plant cell cultures: their potential for metabolic studies. En: Millborrow (ed.), *Biosynthesis And Its Control In Plants*. BV Academic Press, New York, pp. 71-100.
- Sweet G.B. y Wells L.G. 1974. Comparison of the growth of vegetative propagules and seedlings of *Pinus radiata*. *N. Z. J. For. Sci.*, 4:399-409.
- Tattini M., Cimato A., Bertoni P. y Lombardo M. 1990. Nitrogen nutrition of self-rooted olive in sand culture. Effect of NH₄-N/NO₃-N on growth and nutritional status. *Acta Hortic.*, 286:311-314.
- Tazzari L, Bartolini G., Msallem M. y Pestelli P. 1995. Phase change in *Olea europaea* L.: leaf proteins in juvenile and adult shoots. *Ninth Consultation of the Inter-regional Cooperative Research Network on Olives, Hammamet (Tunisia)*. Publicado por: Coordination Centre. C.I.D.A., Córdoba, pp 65.
- Therios I.N. 1984. Kinetics and energetics of nitrate absorption by olive plants (cv Chondrolia Chalkidikis). *Riv. Ortoflorofrott. It.*, 68:255-263.
- Therios I.N. y Sakellariadis S.D. 1988. Effects of nitrogen form on growth and mineral composition of olive plants (*Olea europaea* L.). *Sci. Hortic.*, 35:167-177.
- Thibaud J.B. y Grignon C. 1981. Mechanism of nitrate uptake in corn roots. *Plant Sci. Lett.*, 22:279-289.
- Thompson D.G. 1984. En: ML Duria & GL Brown (eds.), *Seedling Physiology and Reforestation Success*. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp 12-17.
- Thompson M.R., Douglas T.J., Obata-Sasamoto H. y Thorpe T.A. 1986. Mannitol metabolism in cultured plant cells. *Physiol. Plant.*, 67:365-369.
- Thompson M.R. y Thorpe T.A. 1987. Metabolic and non-metabolic role of

carbohydrates. En: JM Bonga & DJ Durzan (eds.), *Cell and Tissue Culture in Forestry, vol 1*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp 89-112.

Thomson C.J., Marschner H. y Romheld V. 1993. Effect of nitrogen fertilizer form on pH of the bulk soil and rhizosphere, and on the growth, phosphorous, and micronutrient uptake of bean. *J. Plant Nutr.*, 16:493-506.

Thorpe T.A. 1980. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. En: IK Vasil (ed.), *International Review of Cytology, Supplement 11A, Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture*. Academic Press, New York, pp 71-112.

Thorpe T.A. 1982. Carbohydrate utilisation and metabolism. En: JM Bonga & DJ Durzan (eds.), *Tissue Culture in Forestry*. Martinus/Nijhoff/Dr W Junk, The Hague, pp 325-368.

Thorpe T.A. y Patel K.R. 1984. Clonal propagation: adventitious buds. En: IK Vasil (ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, vol 1*. Academic Press, New York, pp 49-60.

Toth E. 1975. La selection clonale de la variete 'Bertzerai'. *Sci. Hortic.*, 48:111-120.

Trip P., Krotkov G. y Nelson C.D. 1963. Biosynthesis of mannitol-C¹⁴ from C¹⁴O₂ by detached leaves of white ash and lilac. *Can. J. Bot.*, 41:1005-1010.

Troncoso A., Barroso M., Martín-Aranda J., Murillo J.M. y Moreno F. 1987. Effect of the fertilization level on the availability and loss of nutrients in an olive-orchard soil. *J. Plant Nutr.*, 10:9-16.

Troncoso A., Han N., García J.L. y Sarmiento R. 1991. Efecto de la forma y concentración de nitrógeno en el desarrollo de embriones de olivo *in vitro*. 8th Consultation of the European Cooperative Research Network on Olive. Bornova, Izmir (Turquía). *Olea*, 21:28.

Troncoso A., Liñán J., Prieto J. y Cantos M. 1990. Influence of different olive rootstocks on growth and production of "Gordal Sevillana". *Acta Hortic.*, 286:133-136.

Troncoso A., Matte C., Venegas M.J. y Cantos M. 1997. Influencia de la concentración de sacarosa en el medio, sobre la respuesta del material de vid *in vitro*. En: R Sarmiento, EO Leidi & A Troncoso (eds.), *Nutrición Mineral de las Plantas en la Agricultura Sostenible*. Dir. Gen. Inv. Formación Agraria, Junta de Andalucía, pp 457-463.

Troncoso A., Prieto J. y Liñán J. 1978. Aclareo químico de frutos en el olivar Manzanillo de Sevilla. *An. Edaf. Agrob.*, 37:881-893.

Troncoso A., Villegas A., Mazuelos C. y Cantos M. 1990. Growth and mineral composition of grape-vine rootstocks cultured *in vitro* with different levels of ammonium nitrate. En: ML van Beusichem (ed.), *Plant Nutrition and Applications*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 653-654.

Tukey H.B. 1933a. *J. Hered.*, 24:7-12

- Tukey H.B. 1933b. *Bot. Gaz.*, 94:433-468.
- Tulecke W. 1987. Somatic embryogenesis in woody perennials. En: JM Bonga & DJ Durzzan (eds.), *Cell and Tissue Culture in Forestry, vol. 2*. Nijhoff, Dordrecht, pp 61-71.
- Ullrich W.R. 1987. Nitrate and ammonium uptake in green algae and higher plants: Mechanism and relationship with nitrate metabolism. En: WR Ullrich, PJ Aparicio, PJ Syrett & F Castillo (eds.), *Inorganic Nitrogen Metabolism*. Springer, Berlín, pp 32-38.
- Ullrich W.R. 1992. Nitrate and ammonium transport through plant membranes. En: K Mengel & DJ Pilbeam (eds.), *Nitrogen Metabolism of Plants*. Clarendon Press, Oxford, pp 121-137.
- Ullrich W.R. y Gersper P.L. 1985. Influence of nitrate and ammonium on critical nitrogen deficiency concentrations and mineral composition of *Dupontia fisheri* grown hydroponically in a controlled environment. *J. Plant Nutr.*, 8:861-889.
- Ullrich W.R., Jaenicke H. y Brandl G. 1989. Nitrate uptake in roots: induction and charge balance. En: J Dainty, MI De Michelis, E Marrè & F RAsi-Caldogno (eds.), *Plant membrane transport: the current position*. Elsevier, Amsterdam, pp 335-338.
- Ullrich W.R., Larsson M., Larsson C.-M., Lesch S. y Novacky A. 1984. Ammonium uptake in *Lemna gibba* G1, related membrane potential changes, and inhibition of anion uptake. *Physiol. Plant.*, 61:369-376.
- Ullrich W.R. y Novacky A. 1981. Nitrate-dependent membrane potential changes and their induction in *Lemna gibba* G1. *Plant sci. Lett.*, 22:211-217.
- van Beusichem M.L., Kirkby E.A. y Baas R. 1988. Influence of nitrate and ammonium nutrition on the uptake, assimilation and distribution of nutrients in *Ricinus communis* L. *Plant Physiol.*, 86:914-921.
- Vanstone D.E. y Ronald W.G. 1982. Seed germination of american bassweed in relation of seed maturity. *Can. J. Plant Sci.*, 62:709-713.
- Veliky I.A. y Rose D. 1973. Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 51:1837-1844.
- Verschoore-Martouzet B. 1985. Étude de la variation topophysique au cours du clonage de *Sequoia sempervirens* (Endlicher). *Th. 3éme Cycle*, Univ. París VI.
- Vidal N., Ballester A., Vieitez A.M., Kevers C. y Gaspar T. 1994. Biochemical characteristics of chestnut shoots related to *in vitro* multiplication and rooting capacities. *Adv. Hort. Sci.*, 8:19-24.
- Vieitez A.M. y Ballester A. 1983. *In vitro* plantlet regeneration of mature chestnut. *J. Hort. Sci.*, 58(4):457-463.
- Vieitez A.M., Barciela J. y Ballester A. 1989. Propagation of *Camellia japonica* cv *Alba plena* by tissue culture. *J. Hort. Sci.*, 64:177-182.

- Villegas A.** 1990. Efecto de la fuente y concentración de nitrógeno en el desarrollo *in vitro* de explantos de portainjetos de vid. *Tesis Doctoral*, Universidad de Córdoba.
- Villegas A., Mazuelos C., Cantos M. y Troncoso A.** 1992. Influencia del nitrógeno sobre el desarrollo *in vitro* del portainjerto de vid 161-49. *Suelo y Planta*, 2:529-539.
- Visser T.** 1965. On the inheritance of the juvenile period in apple. *Euphytica*, 14:125-134.
- von Wirén N., Gazzarrini S. y Frommer W.B.** 1997. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant and Soil*, 196:191-199.
- Von Arnold S. y Roomans G.M.** 1983. Analyses of mineral elements in vegetative buds and needles from young and old trees of *Picea abies*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 9:253-261.
- Voyiatzis D.G.** 1995. Dormancy and germination of olive embryos as affected by temperature. *Physiol. Plant.*, 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 Hortic.*, 356:148-151.
- Vu J.C.V., Neidz R.P. y Yelonosky G.** 1993. Glycerol stimulation of chlorophyll synthesis, embryogenesis, and carboxylation and sucrose metabolism enzymes in nucellar callus of "Hamlin" sweet orange. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, 33:75-80.
- Walali D.M., Chmitah M., Loussert R., Mahhov A. y Boulouha B.** 1984. Caracteres morfológicos y fisiológicos de clones de olivo de la variedad Picholine marroquí. *Olivae*, 3:26-31.
- Walker N.** 1976. Report of the Rothamstead Experimental Station, Part I, p. 283.
- Wang M.Y., Siddiqi M.Y. y Glass A.D.M.** 1996. Interactions between K^+ and NH_4^+ : effects on ion uptake by rice roots. *Plant Cell Environ.*, 19:1037-1064.
- Wareing P.F.** 1959. Problems of juvenility and flowering in trees. *J. Linn. Soc. (London)*, 56:282-289.
- Wareing P.F.** 1971. Determination in plant development. *Trans. Bot. Soc. Edin.*, 41:109-118.
- Wetherall D.F.** 1978. *In vitro* embryoid formation in cells derived from somatic plant tissues. En: TA Thorpe (ed.), *Frontiers of Plant Tissue Culture, 1978. Int. Assoc. Plant Tissue Culture*. University of Calgary Press, Canadá, pp. 265-278.
- Wetherall D.F. y Dougall D.K.** 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiol. Plant.*, 37:97-103.
- White P.J.** 1996. The permeation of ammonium through a voltage-independent K^+ channel in the plasma membrane of rye roots. *J. Membr. Biol.*, 152:89-99.

- White P.R.** 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial medium. *Am. J. Bot.*, 26:59-64.
- Wilcox G.E., Magalhaes J.R. y Silva F.L.I.M.** 1985. Ammonium and nitrate concentrations as factors in tomato growth and nutrient uptake. *J. Plant Nutr.*, 8:989-998.
- Wollenweber B.** 1997. A sensitive computer-controlled pH-stat system allows the study of net H⁺ fluxes related to nitrogen uptake of intact plants *in situ*. *Plant, Cell & Environ.*, 20:400-408.
- Wolter K.E. y Skoog F.** 1966. Nutritional requirements of *Fraxinus* callus cultures. *Am. J. Bot.*, 53:263-269.
- Woo K.C. y Canvin D.T.** 1980a. Effects of ammonia on photosynthetic carbon fixation in isolated spinach leaves cells. *Can. J. Bot.*, 58:505-510.
- Woo K.C. y Canvin D.T.** 1980b. Effect of ammonia, nitrite, glutamate, and inhibitors of N metabolism on photosynthetic carbon fixation in isolated spinach cells. *Can. J. Bot.*, 58:511-516.
- Yamada Y., Sato F. y Hagimori M.** 1978. Photoautotrophism in green cultured cells. En: TA Thorpe (ed.), *Frontiers in Plant Tissue Culture 1978, Int Assoc Plant Tissue Cult.* University of Calgary Press, Canadá, pp 453-462.
- Yamada Y., Sato F. y Watanabe K.** 1982. Photosynthetic carbon metabolism in cultured photoautotrophic cells. En: A Fujiwara (ed.), *Plant Tissue Culture 1982, Proc 5th Int Cong Plant Tissue Cell Cult.* Tokyo, pp 249-250.
- Zimmerman R.H.** 1973. Juvenility and flowering in fruit trees. *Acta Hortic.*, 34:139-142.
- Zimmerman R.H., Hackett W.P. y Pharis R.P.** 1985. Hormonal aspects of phase change and precocious flowering. En: RP Pharis & DM Reid (eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology 11(NS)*, Springer-Verlag, Heidelberg, pp 79-115.
- Zimmerman M.H. y Zeigler H.** 1975. List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. En: MH Zimmerman & JA Milburn (eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series Vol 1: Transport in plants.* Springer-Verlag, Heidelberg, pp 482-503.