

Micropropagación e injerto in vitro de pistacho

E. García; P. Lorente; J. A. Marín; A. Arbeloa; P. Andreu
Estación Experimental de Aula Dei-CSIC
Av. Montañana 1005. 50059 Zaragoza España
egarcia@eead.csic.es

Resumen

El cultivo del pistachero (*P. vera* L.) ha despertado un gran interés en zonas de España en las que cultivos tradicionales, como la vid o el olivo, han perdido rentabilidad. Sin embargo, su expansión está frenada por la dificultad de propagación por injerto de las variedades de interés y la selección de un patrón clonal propagado vegetativamente. La aplicación de las técnicas de cultivo in vitro a las especies de *Pistacia* permitirá, además de la propagación clonal y masiva, profundizar en el estudio de los problemas que afectan al injerto al disponer de un modelo experimental eficaz y flexible que permita el seguimiento del injerto durante las etapas iniciales, donde es más probable la aparición de síntomas de falta de afinidad entre la variedad y el patrón que lleven a la falta de prendimiento del injerto. Se iniciaron cultivos de *P. vera* a partir de explantos nodales y de *P. terebinthus* a partir de semillas germinadas in vitro. La multiplicación in vitro de ambas especies se aproximó a 2 brotes por brote cada 3 semanas. Se obtuvo un alto enraizamiento del patrón *P. terebinthus* (82 %) en un medio WPM modificado y las plantas fueron trasplantadas en invernadero con éxito. Ápices de brotes de *P. vera* de 10-20 mm fueron injertados in vitro sobre brotes enraizados o sin enraizar del patrón *P. terebinthus* y se estudió histológicamente la evolución de los injertos. Más del 70 % de las plantas injertadas sobrevivieron durante las 3-5 semanas iniciales y algunas plantas continuaron su crecimiento en invernadero. De la misma forma se realizaron homoinjertos de control entre *P. terebinthus* consigo mismo y su estudio reveló que la técnica utilizada es prometedora, aunque deberá ser perfeccionada en posteriores trabajos.

Palabras clave: *Pistacia vera*, *P. terebinthus*, cultivo in vitro

Micropropagation and in vitro grafting of pistachio

Abstract

Pistachio culture is becoming highly interesting in Spain, where traditional crops as grape and olive have reduced their profitability. However, its expansion is hampered by both the difficulty of propagation by grafting of varieties of interest and by the lack of a clonal selected rootstock. The application of in vitro culture techniques would allow the clonal propagation of *Pistacia* species, as well as to perform in-depth studies of the problems affecting grafting. In vitro techniques provide an effective and flexible experimental model that allows us monitoring the graft union during the initial stages, when lack of affinity symptoms are most likely to appear. In vitro *P. vera* cultures were initiated from nodal explants, whereas cultures of *P. terebinthus* were initiated from seeds germinated in vitro. The in vitro multiplication of

both species was close to 2 shoots per shoot every 3 weeks. A high rooting percentage (82%) of *P. terebinthus* was obtained in a modified WPM medium and plants were successfully transplanted to the greenhouse. Shoot apices of *P. vera* of 10-20 mm length were grafted in vitro on rooted or unrooted shoots of *P. terebinthus* in which the apex was removed and the evolution of the graft unions were studied. Over 70% of the grafted plants survived during the first 3-5 weeks and some plants continued their growth in the greenhouse. Similarly, control self-grafted *P. terebinthus* were studied. Homografts showed that the technique of grafting in vitro is promising but should be improved in future works.

Keywords: *Pistacia vera*, *P. terebinthus*, in vitro culture

El cultivo del pistachero (*P. vera* L.) ha despertado un gran interés en zonas de España en las que cultivos tradicionales, como la vid o el olivo, han perdido rentabilidad. Sin embargo, su expansión está frenada por la dificultad de propagación por injerto de las variedades de interés y la selección de un patrón clonal propagado vegetativamente. El patrón cornicabra o terebinto (*Pistacia terebinthus* L.) posee una adecuada adaptación al clima y suelo español por ser autóctono, además de vigor moderado y tolerancia a las enfermedades de suelo (Guerrero et al., 2004). Los trabajos de selección de este patrón se basan en su propagación por semilla, ya que no propaga por estaquilla, además de por sus caracteres pomológicos, como su vigor, porte o producción (Guerrero et al., 2002) y tolerancia a la sequía (Gijón et al., 2010). La falta de un adecuado método de propagación limita la selección clonal de este patrón.

En este trabajo se inician estudios preliminares de su propagación in vitro como herramienta de apoyo a su selección. *P. terebinthus* ha sido propagado in vitro tanto a partir de material juvenil (Chelli y Drira, 2002) como adulto (Gannoun et al., 1995), aunque será necesario ajustar el protocolo a las condiciones de cultivo y al material de interés, ya que es una especie que plantea problemas de falta de adaptación al cultivo in vitro (Tabiyeh et al, 2006) con una frecuente presencia de exudados en el medio que provocan su oscurecimiento y modificación. La micropropagación permite vencer la falta de aptitud al enraizamiento y la multiplicación masiva de plantas, por lo que es la técnica de elección para este patrón.

Según Guerrero et al. (2004) el éxito del injerto depende de numerosos factores como, entre otros, la temperatura, que determina el crecimiento de los tejidos de cicatrización, la humedad ambiental, que puede provocar estrés hídrico en la variedad injertada, la necesidad de oxigenación de los tejidos en cicatrización, la hiperactividad o hipoactividad del patrón que determina el flujo de savia y que no debe ser excesivo o reducido. Todos estos factores pueden ser la causa de la variabilidad en los resultados del injerto en el tiempo, ya que los factores ambientales se escapan a nuestro control. Además, debemos considerar que al injertar yemas de una variedad sobre un patrón poco vigoroso, como el cornicabra, hay que esperar hasta que el diámetro del patrón permita la operación del injerto, lo que ocasiona que éste se realice a veces en campo, generando plantaciones irregulares. En este trabajo planteamos, además, el

cultivo in vitro de *P.vera* para poder avanzar igualmente en el estudio del prendimiento del injerto. *P. vera* ha sido propagado in vitro tanto a partir de material juvenil (Benmahioul et al., 2009) como adulto (Onay, 2000; Tilkat et al., 2009). Los protocolos deberán ajustarse igualmente a nuestras variedades y condiciones de cultivo. El pistachero es un cultivo que presenta problemas de propagación de las variedades de interés por injerto, ya que los resultados son irregulares debido a los problemas de prendimiento del injerto.

A diferencia de otros frutales, en los que los problemas de injerto se centran en la incompatibilidad y en la búsqueda y selección de patrones compatibles, en pistacho los problemas parecen ser debidos a la capacidad de respuesta de la variedad y el patrón frente a un determinado estado fisiológico, lo que hace que su estudio exija un mayor conocimiento de los procesos que tienen lugar durante las diferentes fases, pero sobretodo en las iniciales. En este trabajo proponemos una aproximación diferente al estudio del injerto en pistacho mediante técnicas de cultivo in vitro, que proporcionan un modelo experimental adecuado y flexible, más fácil de controlar y de estudiar. Los injertos de ápices de brotes de pistacho (*P. vera*) realizados sobre brotes descabezados de cornicabra, ambos micropropagados in vitro, permiten el seguimiento de los sucesos que tienen lugar a nivel celular e histológico, así como a nivel macroscópico y su evolución en invernadero. La obtención de una técnica de injerto in vitro eficaz y contrastada se ve facilitada en este trabajo por la disponibilidad de homoinjertos del patrón consigo mismo que, ejerciendo de control experimental, permitirán detectar los aspectos técnicos que deben ser mejorados y así detectar precozmente los síntomas de falta de afinidad del injerto y sus posibles causas.

Materiales y Métodos

Se han utilizado para este trabajo cultivos in vitro de cornicabra (*Pistacia terebinthus* L.) originados a partir de semillas recolectadas en plantas silvestres de porte arbustivo en la localidad de Riglos (Huesca), y de nudos con una yema axilar procedentes de un árbol adulto crecido en el Campus de Aula Dei (Zaragoza). El establecimiento in vitro se llevó a cabo en los años 2009 y 2008 respectivamente.

Establecimiento in vitro

Los explantos nodales de *P. vera* se recolectaron en primavera, se lavaron con agua corriente y se esterilizaron con HgCl₂ al 0,05 % durante 15 minutos, aclarándose en agua estéril tres veces. Se cultivaron un total de 33 explantos nodales en medio DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) modificado con antioxidante (0.01g l⁻¹ de ácido ascórbico) y se dejaron crecer dos meses hasta ser trasplantados a medio de multiplicación.

Por otra parte, se sembraron in vitro 24 semillas de cornicabra (*P. terebinthus*) que se esterilizaron con lejía al 10% durante 30 min y se aclararon con agua destilada estéril 3 veces. En condiciones asépticas se eliminaron los tegumentos y se pusieron a germinar en medio de cultivo en oscuridad a 5°C durante 6 semanas. Se emplearon tres medios diferentes de germinación: WP (Lloyd y McCown, 1980), MS (Murashige y Skoog, 1962) y C2D (Cheé y Pool, 1987). Transcurridas 6 semanas las semillas se pasaron a la cámara de cultivo con iluminación (fotoperiodo de 16 h con luz blanca proporcionada por fluorescentes "cool-white" y una

intensidad de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y una temperatura de 24°C , tomándose el dato de germinación semanalmente.

Multiplicación in vitro

Una vez brotadas la yemas de *P. vera*, los brotes obtenidos se subcultivaron en distintos medios para su propagación. Se ensayaron tres medios diferentes para la multiplicación basados en el medio DKW, MS y WP, añadiendo $0.5 \mu\text{M}$ IBA, $5 \mu\text{M}$ BA, 30 g l^{-1} de sacarosa, y 7 g l^{-1} de agar (Bacto-agar, Difco, Fisher Scientific). Los cultivos se mantuvieron en una cámara de cultivo en las mismas condiciones descritas anteriormente y se subcultivaron cada tres semanas. Se compararon los diferentes medios de cultivo atendiendo a: necrosis apical (%), tamaño medio del brote (mm), número de entrenudos por brote y tasa de multiplicación (número de brotes a partir de un brote), a las 3 semanas del subcultivo. Se analizaron 56 brotes por tratamiento y se realizaron dos repeticiones.

Los ápices de las plántulas obtenidas a partir de los embriones germinados de *P. terebinthus* fueron subcultivados eliminando previamente los cotiledones y las raíces y se sometieron a los mismos tratamientos que *P. vera* para su multiplicación.

Enraizamiento in vitro

Brotes de *P. terebinthus* se subcultivaron en medio de enraizamiento para inducir el crecimiento de raíces. Se ensayaron dos medios de enraizamiento basados en los medios MS y WP descritos anteriormente y modificados, reduciendo las sales minerales a la mitad, sin BAP y aumentando las concentración de IBA a $5 \mu\text{M}$. Los cultivos se mantuvieron en cámara de cultivo en las mismas condiciones descritas anteriormente y pasadas 4-8 semanas en medio de enraizamiento, se analizó el número de brotes enraizados de un total de 78 brotes en medio WP y 24 brotes en MS.

Injerto in vitro

Se seleccionaron brotes cultivados in vitro de *P. terebinthus* de unos 4 cm de longitud y se realizó el injerto con ápices de *P. vera* de 1-2 cm cultivados in vitro. El injerto se realizó decapitando el ápice del portainjerto (enraizado o no) y realizando una hendidura en el tallo donde se encajó el brote de la variedad, cuya base había sido recortada en forma de V (Onay et al 2004; Thimmappaiah et al 2002). Para ayudar a mantener el injerto se le aplicó una gota de agarosa líquida al 4% que se dejó solidificar (Jonard et al. 1983). Los injertos se realizaron en condiciones asépticas con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Los brotes injertados se cultivaron en la cámara de cultivo durante un tiempo variable entre 1 y 2 meses, cuando algunas plantas injertadas se trasladaron al invernadero. Asimismo se han realizado homoinjertos de *P. terebinthus* sobre *P. terebinthus* para comprobar la idoneidad de la técnica en condiciones de compatibilidad total (control).

Se realizaron 50 injertos in vitro, de los que 34 correspondieron a *P. vera/P. terebinthus* y 16 a *P. terebinthus/P. terebinthus*.

El estudio histológico del injerto se realizó entre 4 y 8 semanas después del injerto. Los brotes injertados se observaron con el microscopio estereoscópico y posteriormente se cortaron

longitudinalmente a mano alzada para su observación con un microscopio de fluorescencia (Olympus AX60) equipado con cámara fotográfica Olympus C7070WZ. La proliferación y diferenciación celular en la zona del injerto, así como la comunicación vascular entre patrón y variedad fue observada tras la tinción de los cortes con naranja de acridina 0.01% en agua (Pearse, 1968)

Análisis de los datos

Los datos fueron analizados, según su distribución, con diferentes pruebas estadísticas: ANOVA (longitud de los brotes), test de Kruskal-Wallis (número de entrenudos por brote y número de brotes por brote o tasa de multiplicación) y el test de proporciones "prop.test" (necrosis apical). Se utilizó el paquete estadístico R (R Development Core Team, 2008)

Resultados y Discusión

Germinación in vitro de embriones de *P. terebinthus*

La germinación tuvo lugar alrededor de 40 días después de su siembra in vitro. Se obtuvo una germinación muy alta en los diferentes medios, llegando al 100% en el medio MS y un 75 % de promedio en el conjunto de los medios (Tabla 1). El crecimiento de las plántulas fue vigoroso en la mayoría de los casos hasta el trasplante del ápice caulinar a los medios de multiplicación. La aparición de exudados fue muy baja y el medio no se oscureció.

Multiplicación y enraizamiento de brotes de *P. terebinthus*

Los ápices trasplantados se multiplicaron en los tres medios ensayados con tasas cercanas a 2 brotes por brote cada 3 semanas (Tabla 2, Figura 1A), sin embargo, el medio DKW ha mostrado brotes de mayor calidad: más largos, con mayor número de entrenudos y con menor necrosis apical que el MS o el WP. Se han encontrado diferencias significativas en el número de entrenudos, la longitud del brote o en el porcentaje de necrosis apical. Los trabajos en curso deberán confirmar estos resultados, pero el hecho de que el medio de cultivo basado en las sales DKW se comporte también mejor en *P. vera* refuerza la bondad de estos resultados. Trabajos previos han utilizado medios similares. Chelli y Drira, (2002) ensayaron los medios MS y OM (Rugini, 1984) con distintas concentraciones de macronutrientes, observando que el medio MS favorece la formación de callo basal mientras que el medio OM estimula el vigor de los brotes. Nuestro trabajo señala la adecuación de éste medio para la multiplicación.

Los brotes micropropagados fueron enraizados con éxito en el medio WP modificado donde enraizaron un 82 % de los brotes (Figura 1C), mientras que solamente un 42 % enraizaron en el medio MS. Sin embargo el enraizamiento no fue sincrónico, apareciendo las raíces escalonadamente a lo largo de 4-8 semanas. Las plantas fueron trasplantadas con éxito en el invernadero.

Micropropagación de *P. vera*

Inicio de los cultivos a partir de explantos nodales

Los cultivos fueron iniciados a partir de explantos nodales con una supervivencia del 40% de los explantos a las 12 semanas de cultivo (Figura 1B). El oscurecimiento del medio por los exudados fue controlado eficazmente con la adición de ácido ascórbico al medio durante los primeros subcultivos. Este oscurecimiento cesó tras varios subcultivos incluso en el medio sin antioxidante. De las líneas de cultivo iniciadas con los explantos supervivientes se eligió una para los estudios posteriores, de manera que el material fuera homogéneo.

Multiplicación de brotes

Se realizó una comparación de medios de cultivo de forma similar a la realizada con *P. terebinthus* y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. Los brotes desarrollaron entre 2.1 y 3.3 nuevos brotes de promedio cada 3 semanas, según el medio de cultivo. Las diferencias fueron estadísticamente significativas, siendo mayor la multiplicación en el medio WP, sin embargo, este medio mostró el mayor porcentaje de necrosis apical, por lo que el medio más adecuado para la multiplicación de *P. vera* fue el DKW que mostró significativamente brotes con mayor calidad: más largos, con más entrenudos y con menor necrosis apical (Figura 1D). Otros autores utilizaron el medio MS con algunas modificaciones, tanto en los reguladores de crecimiento como utilizando las vitaminas de otro medio de cultivo (Onay, 2000; Tilkat et al. 2009).

Injerto in vitro de *P. vera* sobre *P. terebinthus* y homoinjertos de *P. terebinthus*

Los injertos realizados en condiciones asépticas mostraron una supervivencia muy alta siendo del 73% en el homoinjerto y del 44% en el *P. vera*/*P. terebinthus* a las 3-5 semanas de cultivo. Algunas de las plantas trasplantadas en invernadero continuaron su crecimiento (Figura 1E,F).

En los injertos de *P. vera* / *P. terebinthus* la apariencia externa de los injertos mostró una notable variabilidad: de los 23 injertos observados, el 4 % mostró un aspecto bueno (Figura 1 H), el 8% no prendió y estaba suelto, el 26 % mostró un engrosamiento en la zona del injerto debido a una excesiva proliferación de callo y el 61 % tenía un color oscuro en la zona del injerto . Sin embargo, el examen histológico de la zona de unión permitió ver que el aspecto externo no se correspondía siempre con la evolución interna, ya que el porcentaje de injertos que mostraron una zona de contacto entre variedad y patrón era del 75% y hasta el 93% mostró diferenciación de células del xilema en la zona de contacto (Tabla 3, Figura 1 ,J). A pesar de que la mayoría mostró una evolución positiva y que la proliferación de células de callo fue del 87 %, un porcentaje similar (81%) mostró alguna zona con células necróticas que creaban una discontinuidad. Dado que estos datos fueron tomados entre la tercera y la quinta semana tras realizar el injerto y que el estudio era destructivo, sería muy probable que muchos injertos hubieran evolucionado hacia mayores conexiones vasculares y a un buen prendimiento . Se están realizando nuevos estudios para conocer la evolución de los injertos en etapas más tardías.

Los homoinjertos del patrón *P. terebinthus* han mostrado en general una buena evolución. La apariencia externa ha sido buena, sin apenas coloración oscura (Figura 1 G). La zona de injerto mostró en el estudio histológico, a las 11 semanas, proliferación celular y diferenciación de células del xilema en la totalidad de los injertos estudiados (Figura 1 I). Sin embargo, un 80 % de los injertos mostró una zona de contacto reducida frente al 20 % en los que la zona era

extensa y el 60 % mostró alguna zona con necrosis celular. Estos aspectos negativos en los homoinjertos indican que algunos aspectos de la técnica de injerto deben modificarse de manera que se asegure un contacto íntimo entre variedad y patrón evitando la separación física entre ambos que impediría que tras la proliferación celular y la diferenciación de células del xilema se establezcan conexiones que aseguren el aporte de agua y nutrientes a la variedad y permitan el prendimiento del injerto. Disponer de un injerto control nos ha permitido distinguir problemas técnicos de posibles problemas de afinidad entre variedad y patrón. Para mejorar la fijación del injerto que garantice un firme contacto entre los tejidos de la variedad y del patrón hemos añadido agarosa a la zona de contacto, pero dados los síntomas de falta de afinidad en los homoinjertos, habrá que estudiar el efecto de sistemas mecánicos de fijación en próximos trabajos. Jonard et al. (1983) añadieron agar, pero con el fin de mejorar la nutrición de la yema y Gebhardt et al (1988) utilizaron trozos de tubo de silicona estéril para asegurar la fijación entre patrón y variedad. En este trabajo, hemos observado buenas conexiones en injertos que han crecido en condiciones de invernadero, tanto de *P. vera* / *P. terebinthus* (Figura 1J) como en los homoinjertos (Figura 1 I), pero sólo a unos pocos injertos se les ha permitido crecer por periodos prolongados de tiempo debido a los estudios realizados.

La técnica empleada aquí ha mostrado unos resultados muy positivos, ya que nos ha permitido observar diferentes etapas de proliferación y diferenciación celular en la zona del injerto que podrán ser relacionadas con la evolución posterior, de manera que se pueda hacer una determinación precoz del prendimiento. Por otra parte, la aparición de síntomas de mal prendimiento, como una zona de contacto reducida o la presencia de necrosis celular puede ayudarnos a comprender las causas de la irregularidad del prendimiento y su variabilidad, de manera que puedan determinarse las condiciones que favorezcan el éxito.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto RTA2010-00053-C03-03 y por la ayuda recibida del Gobierno de Aragón como Grupo de Excelencia A-43.

Referencias bibliográficas

Benmahioul B, Kaid-Harche M, Dorion N, Daguin F. (2009) In vitro embryo germination and proliferation of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Scientia Horticulturae* 122:479-483

Chee R, Pool, R. 1988. Sucrose and NAA influence growth of subcultured shoots and invitro production of roots in *Vitis*. *HortScience*, 23: 776

Chelli A, Drira N. 2002. Culture media and hormone effects on the micropropagation of two Pistacho species. *Acta Horticulturae* 591: 395-398

Driver JA, Kuniyuki AH. 1984. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience* 19: 507-509

Gannoun S, Lionakis N, Gerasopolulos D, Kaska N, Kuden S, Ferguson L, MichailidesT. Aspects of in vitro culture of *Pistacia terebinthus* and *P. vera*. *Acta Horticulturae*, 419: 201-206

- Gebhardt K, Goldbach H. 1988. Establishment , graft union characteristics and growth of *Prunus* micrografts. *Physiol. Plantarum*. 72: 153-159
- Gijón MC, Gimenez C, Perez-Lopez D, Guerrero J, Couceiro J F, Moriana A. 2010. Rootstock influences the response of pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Kerman) to water stress and rehydration. *Scientia Horticulturae* 125: 666-671
- Guerrero J, Moriana A, Couceiro JF. 2004. La operación de injerto en pistachero (*Pistacia vera* L.). Condicionantes en Castilla La Mancha. *Fruticultura Profesional* 140:41-53
- Guerrero J, Couceiro JF, Moriana A. 2002. Selection of Terebinth (*Pistacia terebinthus* L.) trees as seed producers for pistachio (*Pistacia vera* L) rootstocks in the Castilla La Mancha (Spain). *FAO-Nucis-Newsletter* 11: 25-29
- Jonard R, Hugard J, Macheix JJ, Martinez J, Mosella-Chancel L, Poessel JL, Villemur, P. 1983. In vitro micrografting and its applications to fruit science. *Scientia Horticulturae*, 20: 147-159
- Lloyd G, McCown B. 1980. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. *HortScience* 15: 416
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Onay A. (2000) Micropropagation of Pistachio from mature trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60: 159-163.
- Onay A, Pirinc V, Yildirim H, Basaran D. 2004. In vitro micrografting of mature pistachio (*Pistacia vera* var. Siirt)
- Pearse AEG. 1968 *Histochemistry: theoretical and applied*. 3rd edition Vol.I Churchill Livingstone : London
- R Development Core Team. 2008. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 1 June 2009. <<http://www.R-project.org>>
- Tabiyeh DT, Bernard F, Shacker H. 2006. Investigation of Glutathione, Salicylic acid and GA3 Effects on Browning in *Pistacia vera* Shoot Tips Culture. *Acta Hort*. 726: 201-203.
- Tilkat, E. , Onay, A. , Yildirim, H. , Ayaz, E. (2009). Direct plant regeneration from mature leaf explants of pistachio, *Pistacia Vera* L. *Scientia Horticulturae*. 121: 361-365
- Thimmappaiah, Puthra GT, Raichal S. 2002. In vitro grafting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Scientia Horticulturae*, 92: 177-182

Tabla 1. Germinación in vitro de *Pistacia terebinthus*

Table 1. In vitro germination of *Pistacia terebinthus*

Medio	n	Germinación (%)
WP	12	58.33
MS	6	100.00
C2D	6	83.33

Tabla 2. Comparación de medios de cultivo en la multiplicación in vitro de *Pistacia vera* y de *P. terebinthus*. Valores promedio (\pm error estándar) de la longitud de los brotes, el número de entrenudos, la tasa de multiplicación (número de brotes por brote) y el porcentaje de necrosis apical (*,***,n.s.: $P < 0.05$, $P < 0.001$, no significativo, respectivamente)n: número de brotes analizados

Table 2. Comparison of different culture media in the multiplication stage of *Pistacia vera* and *P. terebinthus*. Mean values (\pm s.e.m.) of shoot length, number of internodes, multiplication rate (number of shoots per shoot) and the percentage of apical necrosis (*,***,n.s.: $P < 0.05$, $P < 0.001$, not significant, respectively)n: number of analyzed shoots

	n	longitud (mm)	número de entrenudos	tasa de multiplicación	necrosis apical (%)
<i>P. vera</i>					
DKW	111	23.68 \pm 1.00a	6.3 \pm 0.20a	2.5 \pm 0.11b	25.22c
MS	112	17.46 \pm 0.61c	4.9 \pm 0.15b	2.1 \pm 0.09c	47.32b
WP	112	20.64 \pm 0.75b	5.1 \pm 0.16b	3.5 \pm 0.17a	61.61a
	significación	***	***	***	***
<i>P. terebinthus</i>					
DKW	30	30.9 \pm 3.25a	6.1 \pm 0.36a	1.8 \pm 0.13	10.0b
MS	30	19.8 \pm 1.45b	4.9 \pm 0.28b	1.8 \pm 0.19	36.7a
WP	30	20.5 \pm 1.48b	4.1 \pm 0.28b	1.9 \pm 0.15	26.7ab
	significación	***	***	n.s.	*

Tabla 3. Porcentajes de injertos in vitro de pistacho: *P.vera* / *P.terebinthus* y *P.terebinthus* / *P.terebinthus* con proliferación celular, diferenciación de células de xilema y zona de contacto y necrosis.

Table 3. In vitro-grafts percentages of *P.vera* / *P.terebinthus* and *P.terebinthus* / *P.terebinthus* showing cellular proliferation, xylem cell differentiation, contact area between partners and necrotic cells.

	n	Proliferación celular	Diferenciación células xilema	Zona de contacto variedad/patrón	Necrosis
<i>P. vera/P.terebinthus</i>	16	87 %	93%	75%	81%
<i>P.terebinthus/P.terebinthus</i>	5	100%	100%	20% extensa 80% reducida	60%

Figura 1. Micropropagación e injerto de pistacho. *Pistacia terebhintus* :A) Brotes micropropagados; C) Brotes enraizados; E) Injerto terebinto/terebinto en maceta. La flecha indica la posición del injerto; G) Aspecto externo del injerto; I) Imagen del corte longitudinal del injerto con microscopía de fluorescencia. *Pistacia vera*: B) Instalación del cultivo; D) Brotes micropropagados; F) Injerto vera/terebinto en maceta. La flecha indica la posición del injerto; H) Aspecto externo del injerto; J) Imagen del corte longitudinal del injerto con microscopía de fluorescencia

Figure 1. Micropropagation and in vitro culture of pistachio. *Pistacia terebhintus* :A) Micropropagated shoots; C) Rooted shoots; E) Self-grafted *P.terebinthus* growing in the greenhouse. Arrow indicates graft position; G) Graft external appearance ; I) Graft longitudinal section under fluorescence microscopy. *Pistacia vera*: B) Culture initiation; D) Micropropagated shoots; F) *P. vera/P. terebinthus* plant growing in the greenhouse. Arrow indicates graft position; H) Graft external appearance; J) Graft longitudinal section under fluorescence microscopy