

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural

Micropropagación del pistachero

Autor

María Elena García Martín

Directores

Juan Antonio Marín Velázquez
Arancha Arbeloa Matute
María Pilar Andreu Puyal

Escuela Politécnica Superior de Huesca

2015

A Rodrigo y Rebeca.

Todo lo que hago, lo hago por vosotros.

Agradecimientos

Más allá de toda la ayuda científica que he recibido en este trabajo, que ha sido mucha, quisiera centrarme con los agradecimientos en lo personal. Cada día me siento arropada por mi familia, por mis jefes y por mis compañeros. ¡Gracias a todos!

A mi marido Juan Antonio, el gran hombre que tengo siempre a mi lado, que me acompaña cada día con humor y paciencia. 'YOU MAKE THE FORCE BE WITH ME'. ¡Gracias!

A mi hermana Rebeca que, en la distancia, me escucha y me hace reír. ¡Eres un pilar fundamental en mi vida! Y a mi hermano Daniel, porque si te necesito, se que puedo contar contigo.

A Juan, Arancha y Pili, porque además de sabios, tienen una calidad humana excepcional. No me imagino un lugar mejor en el que trabajar y aprender cosas nuevas cada día. Sois los mejores jefes y compañeros y os agradezco enormemente la dirección de este proyecto.

A Pili Lorente, siempre sonriente por las mañanas y dispuesta a ayudar. Gracias porque con tu amistad lo haces todo mas fácil.

A D. Ramón Reiné, mi tutor en la Universidad Politécnica de Huesca, por su buen criterio y accesibilidad.

A María Elena Daorden que, aun en otro continente, sigue teniendo palabras de ánimo para mi.

A Pedro Lucía y Fernando. Cuando el trabajo se hace pesado en el edificio, salgo a respirar aire fresco y me encanta encontrarme con vosotros.

A Piluca Paniagua, mi melliza de oposiciones, a quien acudo en los momentos de crisis y siempre me dedica su tiempo. Juntas empezamos en esto y espero que acabemos juntas.

A Pedro Gracia, amigo y consejero en lo mundanal y espiritual. Cuando se pone todo negro tú me iluminas como la estrella mas brillante. Eres mi Sirius particular.

A mi yaya Carmen, que siempre ha querido que llegase mas allá. Y a mis yayos Pepe, María y Juan, que no les importaba hasta dónde llegase si me veían feliz.

Quiero darles especialmente las gracias a mis padres, que siguen cuidándome y preocupándose por mí cada día. Porque todo lo que he conseguido en esta vida ha sido gracias a vosotros.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 El género <i>Pistacia</i> . Clasificación taxonómica.....	13
1.2 Descripción botánica	14
1.2.1 <i>Pistacia terebinthus</i>	14
1.2.2 <i>Pistacia vera</i>	16
1.3 Importancia del pistachero a nivel mundial, europeo y nacional	18
1.3.1 El cultivo en España.....	19
1.4 <i>P. terebinthus</i> como portainjerto.....	21
1.5 El injerto del pistachero.....	22
1.6 Micropropagación.....	24
1.6.1 Principios básicos del cultivo de tejidos.....	25
1.6.2 Necesidad de la micropropagación de <i>Pistacia</i>	25
1.6.3 Principales problemas en la micropropagación de <i>Pistacia</i>	27
1.7 Mini-injertos.....	28
1.7.1 Mini-injertos in vivo	29
1.7.2 Mini-injertos in vitro	30
1.8 Justificación	30
1.9 Objetivos	31
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
2.1 Obtención del material para el establecimiento in vitro.....	35
2.1 Tratamiento del material.....	37
2.2 Desinfección del material	37

2.3	Siembra del material	39
2.4	Germinación in vitro de semillas de <i>P. terebinthus</i>	41
2.5	Multiplicación de material vegetal de <i>P. vera</i> y <i>P. terebinthus</i>	41
2.5.1	Medios de cultivo	42
2.5.2	Capacidad de multiplicación	44
2.6	Necrosis apical	44
2.7	Fase de enraizamiento	46
2.7.1	Enraizamiento de <i>P. vera</i>	46
2.7.2	Enraizamiento de <i>P. terebinthus</i>	49
2.8	Aclimatación	51
2.9	Injerto	53
2.9.1	Injerto in vivo	53
2.9.2	Injerto in vitro	54
3.	RESULTADOS	57
3.1	Desinfección del material	59
3.2	Brotación	60
3.2.1	Efecto de la especie en la brotación	61
3.2.2	Efecto de la variedad	62
3.2.3	Efecto del método de desinfección	63
3.3	Supervivencia de los brotes en cultivo de <i>P. vera</i> y <i>P. terebinthus</i>	65
3.4	Germinación in vitro de semillas de <i>P. terebinthus</i>	66
3.5	Multiplicación de material vegetal de <i>P. vera</i> y <i>P. terebinthus</i>	67
3.5.1	Factores que afectan la necrosis apical y calidad de brote	67
3.5.2	Efecto del medio de cultivo en la necrosis apical	68
3.5.3	Efecto de la adición de Calcio al medio de cultivo DKW	69
3.5.4	Efecto de la mayor ventilación	69

3.5.5	Efecto de los tratamientos en la calidad de los brotes en cultivo...	70
3.5.6	Calidad del brote.....	72
3.6	Optimización de la fase de multiplicación para los distintos clones.....	74
3.7	Fase de Enraizamiento.....	76
3.7.1	Enraizamiento de <i>P. vera</i>	76
3.7.2	Enraizamiento de <i>P. terebinthus</i>	81
3.8	Aclimatación.....	84
3.9	Mini-Injerto.....	86
3.9.1	Mini-Injerto in vivo	86
3.9.2	Mini-Injerto in vitro.....	88
4.	DISCUSIÓN.....	91
5.	CONCLUSIONES.....	105
6.	BIBLIOGRAFÍA	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Campo de plantas madre de <i>P. vera</i> en la Finca Experimental “El Chaparrillo”.	35
Figura 2. Ejemplar de <i>P. terebinthus</i> en la Finca Experimental “El Chaparrillo”.	36
Figura 3. Ejemplar de <i>P. vera</i> donde se observan las varetas que serán seleccionadas para su introducción in vitro.....	37
Figura 4. Planta de <i>P. vera</i> ‘AD15’ aclimatando.....	53
Figura 5. Injertos realizado con material de <i>P. vera</i> aclimatado mostrando el tipo de yema empleado (lateral (A) y apical (B)).....	54
Figura 6. Realización del injerto con material in vitro en condiciones asépticas. Planta de <i>P. terebinthus</i> utilizada como portainjerto (A), detalle de un injerto tipo inglés (B), injerto recién realizado y plantado en el medio de cultivo (C) y realización del injerto (D).	55
Figura 7. Miniestaquilla de <i>P. vera</i> contaminada por hongo.	59
Figura 8. Porcentaje de cultivos contaminados según el método de desinfección.....	59
Figura 9. Porcentaje de cultivos contaminados según la especie.....	60
Figura 10. Porcentaje de brotes contaminados según el método de desinfección en <i>P.</i> <i>vera</i> (A) y <i>P. terebinthus</i> (B).	60
Figura 11. Miniestaquilla con la yema brotada de <i>P. vera</i> ‘C-Especial’ (A) y yema no brotada de <i>P. terebinthus</i> ‘JH1’ (B).	61
Figura 12. Porcentaje de brotación de microestaquillas según la especie.....	61
Figura 13. Porcentaje de brotación de miniestaquillas según la variedad de <i>P. vera</i>	62
Figura 14. Porcentaje de brotación de miniestaquillas según la variedad de <i>P. terebinthus</i>	62
Figura 15. Yemas brotadas de <i>P. terebinthus</i> , cultivares SMM1(A) y VLLM1 (B).....	63
Figura 16. Porcentaje de brotación de miniestaquillas según el método de desinfección empleado.....	63

Figura 17. Porcentaje de brotación de microestaquillas atendiendo al método de desinfección, según la especie de <i>Pistacia</i>	64
Figura 18. Porcentaje de brotación según el método de desinfección y el cultivar en <i>P. vera</i>	64
Figura 19. Yemas brotadas de <i>P. vera</i> 'Larnaka' en medio de cultivo, previamente sometidas a diferentes métodos de desinfección: hipoclorito sódico (A), bromuro de mercurio (B) y PPM (C).....	65
Figura 20. Porcentaje de brotación según el método de desinfección y el clon en <i>P. terebinthus</i>	65
Figura 21. Porcentaje de supervivencia de los brotes en cultivo tras la brotación para todos los clones en estudio	66
Figura 22. Porcentaje de germinación in vitro de semillas de <i>P. terebinthus</i>	66
Figura 23. Diferentes problemas en la multiplicación de brotes: necrosis apical (A), escaso enraizamiento (B) y dificultad en la aclimatación respectivamente(C).....	67
Figura 24. Porcentajes de ápices necrosados según el medio de cultivo (letras diferentes indican diferencias significativas con $p<0.001$).	68
Figura 25. Porcentajes de ápices necrosados según el tipo de tratamiento (letras diferentes indican diferencias significativas con $p<0.001$).	69
Figura 26. Brotes necrosados de <i>P. vera</i> 'AD15' en el control.....	69
Figura 27. Tasa de multiplicación (número de brotes por brote) (A) y número de entrenudos por brote (B) para cada medio de cultivo en <i>P. vera</i> 'AD15' (letras diferentes indican diferencias significativas con $p<0.001$).	70
Figura 28. Tasa de multiplicación de <i>P. vera</i> 'AD15' para cada tipo de tratamiento.	71
Figura 29. Nº de entrenudos por planta de <i>P. vera</i> 'AD15' para cada tipo de tratamiento.....	71
Figura 30. Calidad del brote de <i>P. vera</i> 'AD15' para cada tipo de tratamiento (letras diferentes indican diferencias significativas con $p<0.001$).	72
Figura 31. Brotes de <i>P. vera</i> 'AD15' en los tratamientos de frio basal (A) y número de brotes (B).....	73

Figura 32. Brotes de <i>P. vera</i> 'AD15' en los tratamientos de jarra (A) y gluconato de calcio (B).....	73
Figura 33. Tasa de multiplicación según el cultivar de <i>P. vera</i>	74
Figura 34. Brotes multiplicando de <i>P. vera</i> 'Kerman' (A) y 'Larnaka' (B).....	75
Figura 35. Brotes multiplicando de <i>P. vera</i> 'Peters' (A) y 'AD15' (B).....	75
Figura 36. Brotes multiplicando de <i>P. terebinthus</i> 'VLLM1' (A) y 'SMM1' (B).	76
Figura 37. Resultados preliminares de porcentajes de enraizamiento de <i>P. vera</i> 'AD15' en los distintos tratamientos:.....	77
Figura 38. <i>P. vera</i> 'AD15' enraizado con el tratamiento n° 12 (EDW pH6.2 paclobutrazol).....	77
Figura 39. <i>P. vera</i> 'AD15' enraizado con el tratamiento n° 11 (EDW pH6.2 tocoferol).78	
Figura 40. <i>P. vera</i> 'AD15' enraizado con el tratamiento n° 6 (EDW pH7.0).....	78
Figura 41. <i>P. vera</i> 'AD15' enraizado con el tratamiento n° 10 (EDW pH6.2 phloroglucinol).....	78
Figura 42. Porcentaje de enraizamiento de los cultivares de <i>P. vera</i> 'AD15' (A), 'Peters' (B), 'Kerman' (C) y 'Larnaka' (D) según los tratamientos:	79
Figura 43. <i>P. vera</i> 'Kerman' (A) y 'Larnaka' (B) enraizados con el tratamiento n° 16 (EDW pH6.2 paclobutrazol (6.8 µM)).....	80
Figura 44. <i>P. vera</i> 'Peters' enraizado con el tratamiento n° 19 (EDW pH7.0 paclobutrazol (6.8 µM) + antiox.).....	80
Figura 45. Porcentaje de enraizamiento de <i>P. terebinthus</i> 'T6' con las pruebas preliminares:	81
Figura 46. Porcentaje de enraizamiento de <i>P. terebinthus</i> 'T6' (A) y 'T7' (B) según los tratamientos:	82
Figura 47. Detalle de raíces de <i>P. terebinthus</i> 'T6' obtenidas con el tratamiento n° 16 (EDW pH6.2 paclobutrazol (6.8 µM)).....	83
Figura 48. Porcentaje de enraizamiento de <i>P. terebinthus</i> 'VLLM1' según los tratamientos:	83

Figura 49. Planta de <i>P. vera</i> 'AD15' aclimatando en cámara de cultivo con éxito (A) y en el invernadero (B).	84
Figura 50. Planta de <i>P. vera</i> 'AD15' aclimatada en invernadero con éxito mostrando el ápice parado (A), el escaso crecimiento aéreo (B) y el excesivo crecimiento radicular respectivamente (C).	85
Figura 51. Planta de <i>P. vera</i> 'AD15' aclimatada en crecimiento y preparada para donar yemas para injertar.	85
Figura 52. Porcentaje de brotación de injertos según el tamaño de la yema.	86
Figura 53. Porcentaje de brotación de injertos según el tipo de yema (A), presencia de agarosa (B) y procedencia de la semilla (C).	87
Figura 54. Evolución de un injerto brotado a los 7 (A), 21 (B) y 35 (C) días.	87
Figura 55. Porcentaje de uniones y conexión vascular en los injertos in vitro de <i>P. vera</i> 'AD15' (A) y <i>P. vera</i> 'Peters' (B) sobre <i>P. terebinthus</i>	88
Figura 56. Injertos de <i>P. vera</i> 'AD15' sobre <i>P. terebinthus</i> 'T6' a bisel (A) e inglés (B), con formación de callo en las uniones.	89
Figura 57. Injertos seccionados, a bisel (A) e inglés (B) respectivamente, donde se observa una buena unión entre patrón (<i>P. terebinthus</i> 'T6') y variedad (<i>P. vera</i> 'AD15').	89
Figura 58. Injertos con prendimiento a bisel (A y B) e inglés (C), seccionados y teñidos con naranja de acridina, observados al microscopio con luz ultravioleta.	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Numero de yemas de cada cultivar y tratamiento de desinfección previo a la introducción del material vegetal in vitro obtenido en la Estación El Chaparrillo (Ciudad Real), tras 6 horas de tratamiento antioxidante en solución de ácido ascórbico y ácido cítrico.	38
Tabla 2. Número de miniestaquillas sembradas in vitro con una yema axilar.....	40
Tabla 3. Número de semillas de <i>P. Terebinthus</i> sembradas in vitro.....	41
Tabla 4. Composición de los medios de cultivo DKW, LP y WPM utilizados (g/l). El asterisco detrás de las iniciales del medio indica que éste ha sido modificado.....	43
Tabla 5. Composición del medio de cultivo DWE utilizado para enraizar (g/l).....	47
Tabla 6. Tratamientos previos utilizados para enraizar <i>P. vera</i> 'AD15'.	47
Tabla 7. Tratamientos utilizados para enraizar <i>P. vera</i> 'AD15'	48
Tabla 8. Tratamientos utilizados para enraizar <i>P. vera</i> 'Peters'	49
Tabla 9. Tratamientos utilizados para enraizar <i>P. vera</i> 'Kerman'	49
Tabla 10. Tratamientos utilizados para enraizar <i>P. vera</i> 'Larnaka'	49
Tabla 11. Tratamientos previos utilizados para enraizar <i>P. terebinthus</i> 'T6'.	50
Tabla 12. Tratamientos utilizados para enraizar <i>P. terebinthus</i> 'T6'.	50
Tabla 13. Tratamientos utilizados para enraizar <i>P. terebinthus</i> 'T7'.	51
Tabla 14. Tratamientos utilizados para enraizar <i>P. terebinthus</i> 'VLLM1'	51
Tabla 15. Injertos realizados en invernadero de <i>P. vera</i> aclimatado sobre cornicabra.	54
Tabla 16. Número de injertos <i>in vitro</i> realizados de <i>P. vera</i> 'AD15' y 'Peters'.	56
Tabla 17. Análisis de Devianza de los tratamientos analizados conjuntamente y de las diferencias entre los grupos Control y Ca, por un lado, y Frio basal, Jarra y nºbrotes por otro.	68
Tabla 18. Análisis de varianza de la tasa de multiplicación (número de brotes por brote inicial).	70



The Turpentine Tree.

Eliz. Blackwell delin. sculp. et Pinx.

- 1. Flower.
- 2. Flower separate.
- 3. Nut.
- 4. Nut open.
- 5. Seed.

Terebinthus.

1. INTRODUCCIÓN

Blackwell, Elizabeth; John Nourse.; Samuel Harding. A curious herbal, t. 478 (1737).

1 Introducción

1.1 El género *Pistacia*. Clasificación taxonómica

El género *Pistacia* pertenece a la familia Anacardiaceae. Dentro de la familia de las anacardiáceas se reconocen 77 géneros con más de 77 especies leñosas, de porte arbóreo, arbustivo y lianoide. La mayoría se encuentran en el clima tropical y subtropical, con algunos representantes en las zonas templadas.

Los caracteres diagnósticos más relevantes de la familia son árboles o arbustos con canales resiníferos, siempre verdes o caducifolios, normalmente de hojas alternas y con frecuencia pinnado-compuestas, aunque también se dan las hojas simples, sin estípulas. Panícula de flores regulares, típicamente pentámeras, bisexuales o en ocasiones unisexuales. El fruto es generalmente una drupa carnosa, pudiendo ser en ocasiones una nuez o una sámara.

Dentro de la familia destacan varios géneros, principalmente por su importancia económica como frutal o en jardinería, como son el género *Mangifera*, con *M. indica* (mango), el género *Anacardium*, con *A. occidentale* L. (anacardo) y el género *Pistacia* que se detalla a continuación.

El género *Pistacia* se cree que se originó en Asia Central hace 80 millones de años (Kafkas y Perl-Treves, 2001). Dentro de este género se considera un amplio número de especies y a su vez existe confusión entre las mismas, debido a la facilidad de hibridación interespecífica del género, y a la amplia distribución del mismo en muy diversos ecosistemas, lo que ha dado lugar a diferentes variedades y subespecies (Ozden-Tokatli *et al.*, 2005).

Linneo fue el primero en establecer el género. En su *Species Plantarum*, Linneo (1753) reconoce tres especies de *Pistacia*: *P. lentiscus*, *P. terebinthus* y *P. vera* (Guerrero, 2011).

En la actualidad, se consideran 8 especies admitidas, junto a las subespecies:

1. Especie: *Pistacia atlantica* Desf.

1.1. Subespecie: *P. atlantica* Desf. Subsp. *atlantica*

1.2. Subespecie: *P. atlantica* Desf. Subsp. *cabulica* (Stocks) Rech.

- 1.3. Subespecie: *P. atlantica* Desf. Subsp. *mutica* (Fischer y Meyer) Rech.
- 1.4. Subespecie: *P. atlantica* Desf. Subsp. *kurdica* (Zohary) Rech
2. Especie: *Pistacia chinensis* Bunge.
 - 2.1. Subespecie: *P. chinensis* Bunge Subsp. *chinensis*
 - 2.2. Subespecie: *P. chinensis* Bunge Subsp. *integerrima* (Stewart).
 - 2.3. Subespecie: *P. chinensis* Bunge Subsp. *falcata* (Bess. Ex Martinelli) Rech.
3. Especie: *Pistacia khinjuk* Stocks.
4. Especie: *Pistacia lentiscus* L.
 - 4.1. Subespecie: *P. lentiscus* L. subsp. *lentiscus*.
 - 4.2. Subespecie: *P. lentiscus* L. subsp. *emarginata* (Engl.).
5. Especie: *Pistacia mexicana* HBK.
6. Especie: *Pistacia terebinthus* L.
 - 6.1. Subespecie: *P. terebinthus* L. subsp. *palaestina* (Boiss) Engl.
7. Especie: *Pistacia vera* L.
8. Especie: *Pistacia weinmannifolia* Poisson.

Híbridos más referenciados:

Tsicodia: *P. terebinthus* x *P. palaestina*.

P. x saportae Burnat: *P. lentiscus* x *P. terebinthus* ó *P. lentiscus* x *P. palaestina*.

UCBI: *P. atlantica* x *P. integerrima* (polinización cerrada)

PGII: *P. atlantica* x *P. integerrima*

1.2 Descripción botánica

1.2.1 *Pistacia terebinthus*

P. terebinthus o cornicabra es una especie dioica de hoja caduca, cuyo porte puede ser tanto arbóreo como arbustivo. Lo más común es su aparición como gran arbusto de entre 2 y 3 m. de altura, con diámetros de troncos de 5 a 20 cm. Es de corteza lisa y grisácea cuando es joven y va agrietando y acercándose más al ocre con

el paso de los años. Su poderoso sistema radicular le brinda una eficaz sujeción y capacidad de penetración en enclaves rocosos. Las hojas son compuestas e imparipinnadas, con 2 a 5 pares de foliolos, de contorno oval o elíptico-lanceolado, obtusos y algo mucronados, poco correosos, son brillantes por el haz y mates y más claros por el envés; el peciolo y el raquis no presentan alas; su disposición es alterna en los tallos. Las flores sin pétalos son muy pequeñas, dispuestas en racimos compuestos con una coloración marcadamente rojiza. Los frutos son pequeñas drupas con una longitud de unos 6 a 9 mm por 5 a 8 mm de ancho. Uno de los rasgos más característicos de esta planta es la aparición frecuente de agallas entre sus ramas.

Esta especie crece de manera natural en toda la región mediterránea, extendiéndose por el sur de Europa, norte de África y el suroeste asiático. Dentro de la situación general mediterránea la especie muestra gran variabilidad, por lo que se la puede encontrar desde zonas muy térmicas y casi a nivel del mar, hasta localizaciones frías, en torno a los 1600 metros de altitud. Por tanto, desde un punto de vista bioclimático puede habitar de manera continuada en los pisos termomediterráneos (con heladas ausentes o muy raras 0 a 3000 m.s.n.m.), mediterráneos (con presencia de heladas invernales, 300 a 1.100 m.s.n.m.) y supramediterráneos (con heladas invernales recurrentes, 1.100 a 1.800 m.s.n.m.). No obstante en el caso de la península Ibérica, parece mostrar su adaptación óptima entre los 500 y los 1400 metros, es decir, principalmente en el piso mesomediterráneo y con una importante penetración en el piso supramediterráneo (Rivas-Martínez, 1987; Sánchez *et al.*, 2001).

En lo referente al suelo muestra una notable amplitud edáfica en cuanto a la naturaleza química de los sustratos, ocupando tanto suelos ácidos como básicos. Pero de cualquier modo parece preferir las zonas calizas. La especie requiere de una buena aireación radicular, razón por la que encuentra dificultades para asentarse sobre sustratos pesados y arcillosos claramente asfixiantes (Couceiro, 1997).

La cornicabra en el contexto de la vegetación mediterránea, es una especie que habitualmente se salpica en el seno de diferentes formaciones esclerófilas de bosque y matorral. Normalmente sus niveles de agregación son muy bajos de manera que difícilmente llega a comportarse como planta dominante. Así, la cornicabra en su comportamiento típico suele aparecer salteada en el seno de distintos tipos de

encinares (*Quercus rotundifolia*), alcornocales (*Quercus suber*), quejigares (*Quercus faginea*) y más raramente en ciertos robledales de roble melojo (*Quercus pirenaica*) (Sánchez *et al*, 2001). Lo encontramos especialmente abundante dentro de la serie mesomediterránea bética, en la serie mesomediterránea castellano-aragonesa y, en el caso de los territorios ácidos, en la serie mesomediterránea luso-extremeña (Rivas-Martínez, 1987; Sánchez *et al.*, 2001).

1.2.2 *Pistacia vera*

Es un árbol caducifolio, dioico, que puede llegar a alcanzar los 10 metros de altura. Posee una copa abierta con ramificación abundante que, inicialmente, tiende a inclinarse con el peso de ramas y frutos debido a su gran dominancia apical.

Su desarrollo es lento y suele ser una especie muy longeva (entre 150 y 300 años), habiendo casos en Irán y Siria que superan los 1000 años. En las plantaciones comerciales los árboles se dirigen sobre un solo pie, pero en aquellos países donde se cultiva formando setos o de forma natural, puede verse con varios pies en lo que se puede denominar formación arbustiva. El color de la corteza es gris claro y su madera es dura y de grano fino.

Las yemas florales se encuentran en las axilas de las hojas de los brotes del año anterior y su diferenciación tiene lugar desde el año anterior hasta la primavera siguiente, antes de iniciarse la floración.

Las hojas son caducas, alternas, compuestas trifoliadas imparipinnadas, con 3 ó 5 folíolos ovales y redondeados en el ápice, siendo el terminal de mayor tamaño. Su color es verde, más brillante en el haz que en el envés. Suelen ser de mayor tamaño en los cultivares masculinos. Durante el verano viran a un color rojo anaranjado antes de su caída.

Las flores nacen sobre ramas laterales de un año, antes de que broten las hojas. Son pequeñas, apétalas, de ovario súpero con 5 carpelos, generalmente unilocular y monospermo y con 1-3 estilos muy separados. Se encuentran agrupadas en inflorescencias axilares en forma de racimos, que poseen entre 150 a 260 flores en el caso de las flores femeninas y de 450 a 500 flores en el caso de flores masculinas. Estas inflorescencias se abren de forma escalonada, con una duración de floración que depende de cada cultivar.

El fruto es una drupa monosperma ovoide alargada, que puede ser dehiscente o indehiscente, según posea la cáscara abierta o cerrada, cualidad que afecta al valor económico final de la cosecha. La semilla es la parte comestible del fruto, compuesta por dos cotiledones voluminosos de coloración verde ó verde-amarillento y un peso aproximado de 1,40 gramos. Posee un elevado contenido de aceite y es muy aromática.

Generalmente las variedades de pistacho se clasifican de acuerdo con su lugar de origen o de cultivo y cada país tiene sus propias selecciones, cuyas diferencias radican fundamentalmente en el color y tamaño de la semilla, la época de recolección y su tendencia a dar frutos llenos; esto exige que tenga que asegurarse la fecundación de las flores con un número correcto de polinizadores adecuados (Parfitt *et al.*, 2005). Las variedades más frecuentemente cultivadas por los agricultores en nuestro país son las utilizadas en este trabajo.

Cultivares femeninos:

Kerman, es la preferida por los consumidores, productores y procesadores, debido a su excelente calidad, rendimiento, fácil desprendimiento del árbol durante la recolección, tamaño por encima de la media, gran calidad de sus frutos, superior a otros debido a su mayor cantidad de azúcares, menor amargor y mayor consistencia en su nuez. Variedad muy adaptada a la zona centro de la Península Ibérica por su floración tardía. Desprendimiento de la cáscara sin dificultad y fácil apertura; aunque está caracterizada por una pronunciada alternancia en la producción. Produce un alto porcentaje de frutos vacíos y un bajo porcentaje de frutos dehiscentes, sobre todo en secano. Fue desarrollada en Chico, California, a partir de semillas procedentes de la zona de Kerman (Irán) e introducida en 1957 para su uso comercial (Parfitt *et al.*, 2005). Requiere alrededor de 1.000 horas de frío invernal. El fruto es muy apreciado por sus cualidades organolépticas, con un tamaño de fruto grande, forma redonda y un rendimiento pistacho/cáscara alto. La fecha de recolección es la primera quincena de octubre.

Polinizador: variedad de macho Peters.

Larnaka, cultivar interesante para zonas no muy frías por su alta producción y porcentaje de frutos dehiscentes. Se trata de una variedad obtenida en Chipre, de vigor medio, con un periodo juvenil mediano aunque su entrada en producción es muy

precoz, una producción alta y una vecería media. Produce un bajo porcentaje de frutos vacíos y alta de frutos dehiscentes (Parfitt *et al.*, 2005). Es de floración temprana (estado D la 1ª semana de Abril), con un requerimiento de frío invernal de aproximadamente de 400-600 horas. El fruto es de un tamaño mediano, forma alargada y un rendimiento pistacho/cáscara medio. La fecha de recolección es la primera semana de octubre.

Polinizador: variedad de macho C-especial.

Cultivares masculinos:

Peters, se seleccionó en Fresno (California, EE.UU) alrededor del año 1.930 (Parfitt *et al.*, 2005). Es el cultivar masculino estándar más usado y recomendado, tanto en Australia como en California y ahora en España. Es un árbol vigoroso con una entrada en producción de polen precoz y muy buena producción del mismo. Considerada de floración tardía, sobre el 10-15 de Abril en Ciudad Real. Su floración suele durar de 13 a 24 días.

Variedades hembra a polinizar: Puede ser utilizado como polinizador para la variedad femenina Kerman.

C-Especial, su origen es Grecia (Parfitt *et al.*, 2005). Es una variedad masculina muy apreciada por su temprana floración y por la gran capacidad de producir polen que se puede recolectar para utilizarlo en polinización artificial. Se trata de un árbol vigoroso con una entrada en producción de polen precoz. Considerado de floración temprana, sobre el 5 de Abril (Ciudad Real). Su floración suele durar unos 23 días.

Variedades hembra a polinizar: Puede ser utilizado como polinizador para las variedades femeninas Larnaka y Mateur.

1.3 Importancia del pistachero a nivel mundial, europeo y nacional

Hasta hace poco tiempo, los principales países productores de pistachos por orden de importancia eran la República Islámica de Irán, Estados Unidos (California), Siria, Turquía, China, Grecia e Italia. Sin embargo, en los últimos tiempos, Estados Unidos se ha alzado con el primer puesto en producción mundial, superando a Irán, quien lo había ocupado de forma permanente. No obstante, Irán sigue siendo, con gran diferencia, la que ocupa la mayor superficie de cultivo (Couceiro *et al.*, 2013). La

producción de pistacho ha aumentado de forma sostenida en los últimos años y se prevé un aumento del consumo, debido a una mayor aceptación por parte de los consumidores de Estados Unidos, de la Unión Europea y de los países latinoamericanos, con la expansión del cultivar Kerman de alta calidad. Alemania es el mayor importador mundial; le siguen España y Francia y los países de Oriente Medio. Estados Unidos se autoabastece con la producción californiana.

La superficie regular del cultivo a nivel mundial supera las 600.000 ha. siendo Irán el país de mayor superficie cultivada, donde se contabilizan más de 300.000 ha. Le sigue Estados Unidos con 97.000 ha, Turquía con 55.000 ha y Siria con 40.000 ha. España se encuentra en el noveno puesto a nivel mundial en cuanto a superficie cultivada se refiere, con 5.000 ha, por detrás de Grecia, Italia, Túnez y Afganistán.

En la actualidad la producción de este fruto seco ya supera de manera holgada las 600.000 t. Estados Unidos se ha encaramado al primer puesto a nivel mundial con más de 280.000 t en 2012, por delante de Irán, con 200.000 t, gracias a una explotación superintensiva del cultivo. A estos dos países le siguen Turquía (125.000 t) y Siria (70.000 t). España en el año 2012 obtuvo una producción de 500t. (Couceiro *et al*, 2013).

Las importaciones a nivel mundial están encabezadas por China (100.000 t), Alemania (44.000 t), Bélgica, Rusia, Alemania y España con más de 13.000 t.

Las exportaciones han sido lideradas por Irán hasta el año 2010. En la actualidad Estados Unidos se ha colocado como principal país exportador, con 111.000 t, debido al elevado rendimiento por hectárea y a las miles de hectáreas que anualmente se plantan desde el año 2004. Le siguen Irán, China, Siria y Alemania. Las exportaciones españolas en la actualidad rondan las 1000 t, que en su mayor parte proceden de la manufacturación de las importaciones.

1.3.1 El cultivo en España

El desarrollo importante del cultivo se inicia alrededor de 1996. Circunstancias negativas tales como la novedad del cultivo, bajos prendimientos del injerto iniciales, diferencias en el éxito del injerto entre unas áreas y otras, desajustes en la técnica del injerto durante los primeros años, cornicabras sin seleccionar etc., provocaron que sólo un pequeño número de plantaciones, bien dirigidas, fueran interesando a otros

agricultores en el futuro del cultivo (Couceiro *et al.*, 2013). A estos problemas técnicos, hay que sumar los problemas agronómicos propios de la especie como son:

- el largo período que se requiere para la entrada en producción (empieza a dar sus primeros frutos en el quinto año de su plantación y no llega a la plena producción hasta el décimo año, siendo el rendimiento medio por árbol de 10 a 12 kilogramos),
- dificultad de arraigo de los árboles en las nuevas plantaciones y vecería de los adultos,
- empleo de tecnología de producción de alto nivel,

Por lo tanto, nos encontramos con que el pistachero es uno de los frutales menos explotados en el territorio nacional.

En cualquier caso, se ha demostrado la viabilidad y rentabilidad del pistachero como cultivo alternativo para muchas explotaciones agrícolas, debido por un lado a su adaptación a diferentes áreas ecológicas y por otro al aumento de la expansión comercial de su fruto.

En la actualidad la superficie cultivada en el territorio nacional asciende a unas 5000 ha, distribuidas de la siguiente manera (<http://www.magrama.gob.es>):

- Castilla-La Mancha.....4000 ha
- Cataluña.....400 ha
- Andalucía.....300 ha
- Extremadura.....200 ha
- Castilla y León.....100 ha

El área de cultivo se extiende principalmente por las provincias de Ciudad Real, Toledo y Albacete en Castilla la Mancha y en las de Jaén, Granada, Córdoba y Sevilla en Andalucía.

La mayoría de las plantaciones son superficies medias-pequeñas (5-10 ha), con un marco de plantación de 7 x 6 m.

En cuanto al portainjertos más utilizado, los agricultores se decantan principalmente por la cornicabra por su menor coste, carácter autóctono y, sobre todo,

por los excelentes resultados en cuanto a adaptabilidad y rendimientos productivos en relación a otros patrones como *P. atlantica*, *P. integerrima* y *P. vera*.

El principal cultivar es Kerman, aunque en los últimos años se están injertando cultivares más tempranos como Avdat, Larnaka y Mateur.

Actualmente el 100% de la producción española se destina a consumo directo. Los agricultores suelen entregarlas a las OPFHs (Organización de Productores de Frutas y Hortalizas) cercanas, empresas particulares, o venderla directamente a firmas especializadas en la comercialización de frutos secos.

Según los datos de la Subdirección General de Estructura de la Cadena Alimentaria del MAGRAMA el consumo per cápita en el año 2010 se situaba alrededor de los 187gr, de los que 130 correspondían al consumo de pistachos en cáscara, y el resto a industria, fundamentalmente a dulces y turrone. En los últimos años el precio pagado al agricultor por kilo de pistachos convencionales secos en cáscara se ha situado entre los 3€ y los 6€.

En España, la reciente implantación y su lenta expansión son determinantes de la escasa importancia económica que aún reviste. Sin embargo, puede considerarse como cultivo potencial para determinadas zonas áridas y semiáridas, donde las alternativas de cultivos de secano son escasas.

El cultivo del pistachero, en las áreas de la España peninsular que cumplan las condiciones para su cultivo, es muy esperanzador, sobretodo si observamos el comportamiento que el mercado ha tenido en países donde su introducción ha sido relativamente reciente, como es el caso de Estados Unidos.

La consecución de planta barata injertada sobre pies vigorosos de *P. terebinthus* será fundamental para que este cultivo pueda consolidarse en nuestro país en un corto periodo de tiempo

1.4 *P. terebinthus* como portainjerto

El cultivo del pistachero, al igual que la mayoría de especies frutales cultivadas se compone de dos partes, el portainjerto y la variedad. A diferencia de otros frutales el patrón es indispensable para la propagación vegetativa ya que la capacidad de enraizamiento de las variedades de pistacho es prácticamente nula.

Una interesante característica del pistachero es su buena adaptación sobre el portainjerto *Pistacia terebinthus* L. conocido comúnmente como cornicabra o terebinto (Couceiro *et al.*, 2000).

Esta especie espontánea y de gran rusticidad es empleada como pie del pistachero en países como Italia, Grecia, Turquía, Chipre, Australia y España. Crece de manera natural en toda la región mediterránea, donde muestra gran variabilidad. Aparece en la práctica totalidad de las regiones españolas, y con mucha frecuencia en las sierras manchegas y de Andalucía Oriental (Sánchez *et al.*, 2001). Entre las diferentes especies del género *Pistacia* que pueden ser utilizadas como portainjertos del pistachero, *P. terebinthus* es la que posee un área de aclimatación más amplia. Además, entre sus características más importantes se encuentran su gran rusticidad, permitiendo el cultivo del pistachero en terrenos pobres, rocosos y calizos, con escasa pluviometría y temperaturas extremas (Couceiro *et al.*, 2000; Guerrero *et al.*, 2002; Ferguson *et al.*, 2005).

Posee una buena afinidad con todos los cultivares, aunque en el punto de unión del injerto suele observarse un cambio de grosor, consecuencia de una diferencia de vigor entre las dos especies y que no tendrá ninguna repercusión en su comportamiento agronómico-productivo posterior (Couceiro *et al.*, 2013).

1.5 El injerto del pistachero.

El injerto es una práctica antigua que ha sido documentada numerosas veces a lo largo de la historia. Consiste en una técnica en la que dos partes de tejido genéticamente distintas son puestas en contacto y continúan creciendo como un único individuo. Aunque los motivos para injertar son muy numerosos, el principio fundamental es el mismo: un patrón proporciona una raíz libre de enfermedades a una variedad seleccionada que debido a su constitución genética y su estado adulto, generalmente no puede ser propagada de manera adecuada por otros métodos (Richardson *et al.*, 1996).

La mayoría de las investigaciones coinciden en la dificultad de la operación del injerto en *Pistacia*, siendo ésta una de las principales razones por la que esta especie no se ha introducido a una mayor velocidad en las regiones españolas donde el cultivo es viable (Couceiro y col., 2013). El porcentaje de prendimiento suele ser

relativamente bajo y muy variable dependiendo de condiciones externas como la climatología. Esto supone un encarecimiento de la implantación del cultivo, al ser la técnica del injerto uno de los mayores costes durante los primeros años. Por otra parte, da lugar a una heterogenización de la plantación, lo que dificulta el manejo del cultivo en un futuro y retrasa la entrada en producción de un porcentaje elevado de árboles, alargándose así el período de retorno de la inversión.

La compra de planta injertada en vivero supone un importante incremento de la inversión inicial, al ser su coste unas 40 veces superior al del portainjerto, por la misma razón de problemas en el prendimiento comentada anteriormente. Este problema se ve además acrecentado por la dificultad de encontrar viveros con un número suficiente de planta injertada para abastecer la demanda de los agricultores. Por tanto, un incremento en el porcentaje de prendimiento repercutiría en una reducción importante de costes para el agricultor, ya sea tanto de forma directa como a través de los viveros que comercializan la planta.

Como se ha comentado anteriormente, el injerto es una de las operaciones que más condicionan el cultivo en sus primeros años, debido a su coste y dificultad, existiendo gran variabilidad en el porcentaje de prendimiento de los injertos, tanto interanualmente como en el mismo año según zonas, y siendo el vigor del portainjerto uno de los factores clave en el éxito del injerto.

El injerto que mayoritariamente se viene realizando en las regiones del mundo donde el cultivo prospera, se realiza principalmente en campo (Beede y Ferguson, 1995), con la modalidad de escudete, durante los meses de verano, con material vegetal del mismo año, sobre un pie con un diámetro generalmente más pequeño que el de la vareta de donde se extrae la yema (Hobman y Bass, 1986).

El prendimiento del injerto está influenciado por multitud de factores entre los que destacan:

- las condiciones climáticas de cada zona: la temperatura y la humedad ambiental ejercen un efecto limitante en la producción del tejido nuevo entre la yema y el patrón (Hartman y Kester, 1975).
- el portainjerto: al proceder de semilla da lugar a un comportamiento vegetativo no uniforme (diferencias de vigor, fenologías, movimiento de savia, etc.)

dentro de los rangos de la especie, afectando a la uniformidad del prendimiento.

- la necesidad de diámetros relativamente grandes en el portainjerto para la sección del injerto. De aquí la importancia de un vigor adecuado durante las primeras etapas de desarrollo, ya que lo contrario ralentizaría el momento del injerto al tardar más en alcanzar el diámetro necesario.

- el material vegetal a injertar que debe tener unas condiciones adecuadas fitosanitarias, tipo de yema, lignificación, etc. (Guerrero *et al.* 2003; 2004).

Actualmente en España, los patrones de pistachero de *P. terebinthus* son producidos a partir de semillas. El crecimiento de estas plantas es extremadamente lento, no pudiendo ser injertadas hasta que alcanzan un tamaño similar a las yemas de *P. vera*, lo que suele ocurrir dos o tres años después de su plantación en campo. Si a esto añadimos que la producción no comienza hasta varios años después de realizar el injerto, nos encontramos con que puede llevarnos cerca de 10 años tener una plantación a pleno rendimiento.

Además, si consideramos que a veces hay que hacer varios injertos sucesivos, si se realizan en campo, generan plantaciones irregulares (García, *et al.*, 2010).

1.6 Micropropagación

La capacidad de hacer crecer tejidos de plantas (callos, células, protoplastos), órganos aislados (óvulos, raíces) y embriones en cultivos asépticos ha sido desarrollada por laboratorios científicos desde finales del siglo XIX. La aplicación de la propagación in vitro comenzó en los 60 y principios de los 70 (Gautheret, 1985). Actualmente el crecimiento de esta técnica está siendo posible gracias al progreso en la adaptación de procedimientos a condiciones industriales, a la reducción de los costes y a la producción coordinada de mercados.

El término de micropropagación se utiliza específicamente para referirse a la aplicación del cultivo de tejidos a la propagación de plantas con partes muy pequeñas de la planta creciendo asépticamente en un tubo de ensayo u otro recipiente de cultivo (Hartman *et al.*, 1990).

La micropropagación y el cultivo de tejidos comienzan con la escisión de una pequeña parte de la planta, liberándola de microorganismos y colocándola en un

medio aséptico.

1.6.1 Principios básicos del cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos vegetales está basado, en primer lugar, en el principio de la totipotencialidad celular, el concepto de que cada célula viva tienen la capacidad genética de reproducir el organismo completo. La elaboración de este principio biológico nos indica que tejidos, células y órganos podrían ser conservados en buen estado indefinidamente en un medio de cultivo. En segundo lugar está la regulación hormonal con la que se ha hecho posible la regeneración de brotes y raíces gracias al descubrimiento de las auxinas y las citoquininas. El cultivo de tejidos y los sistemas de micropropagación están basados en el control y manipulación de estos procesos. (Hartman *et al*, 1990).

El sistema del cultivo de tejidos difiere de los métodos tradicionales de propagación por el alto grado de control en cada aspecto de la regeneración y desarrollo del proceso. Cada paso de la secuencia puede ser manipulada (ó programada) por la selección de material vegetal y el control del ambiente *in vitro* (incluyendo el control de enfermedades) para maximizar los resultados de la producción en términos de número, tamaño y calidad.

1.6.2 Necesidad de la micropropagación de *Pistacia*.

La propagación de *P. vera* se realiza mediante el injerto de una yema de una variedad conocida, sobre un portainjerto obtenido de semilla, ya que el enraizamiento de estaquillas de árboles adultos de *Pistacia* es muy difícil (Tilkat *et al*, 2008). La falta de un método adecuado de propagación del portainjerto *P. terebinthus* limita la selección clonal de este patrón (García *et al*, 2010). Además, el uso de semillas en la propagación de patrones de *Pistacia* no es recomendable debido a la variabilidad genética y a un alto nivel de heterocigosis entre las semillas obtenidas de árboles de polinización abierta. Por lo tanto es necesario el desarrollo de nuevos métodos de propagación que hagan posible clonar y propagar portainjertos de pistachero y variedades comerciales de un modo efectivo y en gran número. (Barghchi *et al*, 1989; Chatibi *et al*, 1995; Parfit *et al*, 2012; Ghorbani *et al*, 2002; Moyo y Staden, 2013).

Hoy en día, la mayor limitación a la que se enfrenta la generalizada expansión de las plantaciones comerciales de pistachero es principalmente la escasez de plantas

debido a las dificultades de propagar esta especie usando el método tradicional de injerto.

El uso de técnicas del cultivo de tejidos *in vitro* para una rápida propagación clonal de pistachero fue citado por primera vez por Barghchi, a principios de los 80. Aunque el proceso ha sido lento (Hansman, 1986), se han obtenido varias mejoras en el establecimiento y la iniciación de explantos procedente de plantas adultas (Onay, 1996; Onay, 2000), pero no ha habido éxito propagando *P. terebinthus* a partir de material de árboles adultos a niveles comerciales.

La mayoría de los trabajos relacionados con la propagación *in vitro* de variedades seleccionadas de *P. vera* usan principalmente tres métodos de propagación (Onay *et al.*, 2011):

1. Cultivo de yemas apicales o nodales, basado en la formación de plántulas enraizadas a partir de explantos regenerados *in vitro* (Barghchi y Alderson, 1985; Ozden-Tokalti *et al.*, 2005, 2006).
2. Embriogénesis somática, con la cual se obtienen embriones o formaciones embrionarias (Onay *et al.*, 1995, 1996)
3. Organogénesis adventicia, a través de la cual se obtienen yemas y estructuras caulinares (Tilkat y Onay, 2009).

Entre los métodos de propagación *in vitro*, la estimulación del crecimiento de yemas, tales como el cultivo de brotes apicales, tiene un bajo riesgo de sufrir variaciones y por tanto el uso de estas técnicas es el más apropiado para la propagación clonal (Chelli *et al.*, 2011).

Las técnicas del cultivo de tejidos son valiosas herramientas para la rápida multiplicación de variedades de pistachero de difícil propagación, ya sea para una producción comercial, o para la conservación de germoplasma de genotipos interesantes (Onay *et al.*, 2001). Sin embargo, la aplicación de estas técnicas a las especies de *Pistacia*, presentan problemas, sobre todo cuando se habla de material adulto (Chelli *et al.*, 2011). A pesar de los recientes artículos alentadores de la micropropagación de *P. vera* procedente de material adulto (Onay, 2000), esta técnica no ha sido adoptada industrialmente (Chelli *et al.*, 2011).

En cuanto a la micropropagación de genotipos adultos, hay contribuciones

significativas que presentan una gran importancia, ya que en algunos casos pueden ser viables para la práctica habitual de la propagación de pistachero en un futuro próximo. Sin embargo, en la mayoría de los artículos publicados, se presenta una información muy limitada sobre los efectos en la variación de las condiciones ambientales en la proliferación de brotes de pistachero. En este sentido, una variación en las condiciones ambientales, incluyendo el tipo de medio, la concentración de auxinas y citoquininas, la temperatura de cultivo, la intensidad lumínica y unos métodos apropiados de esterilización influyen enormemente en mejorar el éxito de la micropropagación, permitiendo de esta manera una producción de pistachero económicamente viable a una escala masiva (Onay *et al*, 2001)

Por lo tanto, sería deseable el desarrollo de un sistema de propagación in vitro más adecuado, para el desarrollo de cultivares clonales y para una propagación comercial (Tilkat *et al*, 2008). Pero el cultivo de *P. vera* sobre sus propias raíces no es aconsejable en nuestras condiciones por la sensibilidad a enfermedades de suelo (Ferguson *et al*. 2005). Sin embargo, sí que tiene gran interés el disponer de protocolos eficaces de micropropagación desde el punto de vista de la mejora de las técnicas de propagación.

1.6.3 Principales problemas en la micropropagación de *Pistacia*

1.6.3.1 Establecimiento

El establecimiento in vitro de las especies de *Pistacia* todavía es problemático, siendo una de las principales razones el rápido pardeamiento y/o necrosis de los explantos. Estos problemas son, al menos parcialmente, causados por la oxidación de polifenoles, muy abundantes en las especies del género *Pistacia*. Además, limita enormemente su multiplicación y conservación, obligando a subcultivos frecuentes, por lo que la búsqueda de condiciones que limiten o controlen su aparición es de gran interés.

1.6.3.2 Multiplicación y enraizamiento

La micropropagación podría ser usada como uno de los métodos más efectivos para la clonación y propagación en masa del pistachero. Sin embargo, aparecen diversos problemas en la propagación in vitro del material vegetal, como una baja tasa de multiplicación y un rápido necrosamiento apical de los brotes. Además, las

investigaciones muestran que la eficiencia del enraizamiento de los brotes micropropagados de pistachero no es muy elevada, llegando en ocasiones a ser muy complicada (Barghchi *et al.*, 1989; Chatibi *et al.*, 1995; Parfitt *et al.*, 1994; Ghorbani *et al.*, 2002).

1.6.3.3 Necrosis apical

La necrosis apical aparece de forma habitual durante el cultivo in vitro de plantas leñosas (Bairu *et al.*, 2009) y ha sido descrita en *Pistacia vera* desde 1985 (Barghchi y Alderson, 1985). A pesar de existir diferentes hipótesis sobre las causas que provocan la necrosis apical, no se ha podido determinar su origen de forma definitiva (Bairu *et al.*, 2009), lo que indica la complejidad del problema. En pistachero, la necrosis apical limita enormemente su cultivo in vitro y sus aplicaciones para su multiplicación y conservación, obligando a subcultivos frecuentes, por lo que la búsqueda de condiciones que limiten o controlen su aparición es de gran interés.

1.6.3.4 Aclimatación

Uno de los principales problemas al que se enfrenta la micropropagación de *Pistacia* es la aclimatación, el paso de las plantas ya enraizadas a tierra por medio de un sistema progresivo de aclimatación, en el que las plantas pasan de crecer en un ambiente con un 100% de humedad a un ambiente de un 60% o menor. Esto se debe a que son plantas que no muestran síntomas de marchitez en sus hojas, hasta el momento en el cual se aprecia que la planta ya está irremediablemente dañada.

1.7 Mini-injertos

La técnica del mini-injerto, utiliza patrones y yemas de reducido tamaño, y está siendo cada vez más utilizada en frutales y especies de frutos secos con diferentes propósitos, como la producción de variedades libres de enfermedades, el rejuvenecimiento o vigorización de brotes de material adulto, aumentar el potencial de clonación de plantas adultas y el estudio de la unión 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 pistachero 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 sobretudo en las iniciales (García, *et al.*, 2010).

La aplicación de los injertos de taller (también llamados microinjertos), usados en otras especies frutales que utilizan patrones y yemas de reducido tamaño, será posible en pistachero cuando se desarrolle la tecnología que permita reducir el tamaño de las yemas a injertar. Esto es posible mediante el cultivo *in vitro* que provoca la miniaturización temporal de las plantas obtenidas en maceta y proporciona yemas de calibre similar al de los patrones jóvenes. Además de posibilitar un injerto más eficaz, permite realizarlo en condiciones de taller, con más rapidez y en condiciones controladas, alargando el periodo de injerto y acelerando el desarrollo de la planta injertada.

Respecto a la mejora de las técnicas de propagación vegetativa, el mini-injerto de taller (o microinjerto) en frutales se aplica habitualmente con gran eficacia y ventajas considerables sobre el injerto en vivero o campo. Para realizarlo se utilizan plantas muy jóvenes, de la variedad, obtenidas gracias al desarrollo de tecnologías capaces de proporcionar yemas de tamaño reducido de las variedades de interés, adecuadas al injerto sobre patrones recién propagados, bien por semilla o micropropagados, y cuyo calibre apenas alcanza unos milímetros de diámetro. Mientras en las especies de hueso la reducción del tamaño de las yemas de la variedad se consigue en los anticipados y brotes jóvenes convenientemente mantenidos y conservados en condiciones óptimas, en pistachero, con un desarrollo muy diferente, proponemos reducir el tamaño de las yemas mediante la micropropagación de variedades de interés, ya que la planta micropropagada y aclimatada al exterior posee un tamaño muy inferior a la de campo, que la hace adecuada para el mini-injerto de taller (Marín *et al.*, 2015).

1.7.1 Mini-injertos in vivo

El microinjerto in vivo se realiza en el estado de plántula de ambas especies. En la planta recién germinada de semilla del portainjerto se inserta en forma de cuña una yema extraída del cultivar. Su ejecución resulta muy laboriosa ya que, para conseguir el prendimiento, es necesario una perfecta unión entre sus tejidos de la zona del cambium (Couceiro *et al.*, 2013).

1.7.2 **Mini-injertos in vitro**

El micro-injerto in vitro de brotes apicales constituye una importante contribución a la mejora de los cultivos. Esta técnica es especialmente difícil en especies leñosas cuando los ápices se cultivan directamente en un medio nutritivo (Jonard *et al.*, 1983; García *et al.*, 2010).

Esta técnica se está comenzando a usar en pistachero y consiste en colocar, en condiciones asépticas, una porción minúscula de la variedad sobre un patrón en crecimiento in vitro (Abousalim *et al.*, 1992; Onay *et al.*, 2003) y ha tenido éxito tanto in vitro como in vivo (Onay y Tilkat, 2004). El establecimiento de un protocolo de microinjerto para la propagación clonal de genotipos adultos de *P. vera* puede llegar a ser una técnica eficiente para vencer los problemas convencionales de la propagación del pistachero (Onay *et al.*, 2007). El microinjerto también tiene el potencial de recuperar la proliferación y la capacidad de enraizar en brotes adultos (Ozden-Tokatli *et al.*, 2010) al transmitir caracteres juveniles por injertar sobre plántulas recién germinadas.

Además, el estudio del injerto en pistachero mediante técnicas de cultivo in vitro proporciona un modelo experimental adecuado y flexible, más fácil de controlar y de estudiar. Los injertos de ápices de brotes de pistachero (*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. Estos estudios permiten incidir en las condiciones tanto ambientales como fisiológicas que favorecen el injerto en una especie recalcitrante como el pistachero (García *et al.*, 2010).

1.8 Justificación

Como hemos visto, el pistachero es una especie que se enfrenta al reto de mejorar su cultivo en varios aspectos para hacerlo más eficaz y competitivo. Por una parte, reducir el periodo de retorno y la amortización de la plantación; por otra, aumentar la disponibilidad de la planta y abaratar su coste.

En este proyecto se plantea 1) mejorar el método de propagación, tanto del patrón autóctono cornicabra para poder propagar clonalmente individuos seleccionados, como de la variedad, para obtener plantas con yemas de reducido

tamaño; y 2) mejorar la técnica de injerto con el mini-injerto de taller utilizando yemas de variedades micropropagadas.

A pesar del gran interés que posee el pistachero, sigue propagándose por técnicas convencionales que presentan una gran limitación: los patrones de semilla presentan un reducido tamaño inicial lo que obliga a injertar las variedades tras su crecimiento en vivero retrasando la formación de los plantones. Como consecuencia aumentan los fallos en el trasplante a campo y se obtienen plantaciones irregulares con reducción de la cosecha potencial.

En este proyecto se propone la aplicación de una nueva tecnología utilizada en otras especies frutales: los injertos de taller, que utilizan patrones y yemas de reducido tamaño (mini-injerto) que no es posible en pistachero porque falta desarrollar la tecnología que permita reducir el tamaño de las yemas a injertar debido a su diferente patrón de crecimiento. Este desarrollo se basa en el cultivo *in vitro* de variedades de pistachero, que provoca la miniaturización temporal de las plantas obtenidas, en maceta y con yemas de calibre similar al de los patrones jóvenes. Además de posibilitar un injerto más eficaz, permite realizarlo en condiciones de taller, con más rapidez y en condiciones controladas, alargando el periodo de injerto y acelerando el desarrollo de la planta injertada.

1.9 Objetivos

Objetivo general

Obtener un método de micropropagación eficaz para las variedades utilizadas en el cultivo de *P. vera* en España y para el patrón *P. terebinthus*, con el fin de conseguir material uniforme y de tamaño adecuado para facilitar la aptitud al injerto de estos materiales.

Objetivos específicos:

- Micropropagación de *P. vera*
- Micropropagación de *P. terebinthus*
- Evaluación del mini-injerto *in vitro* y *ex vitro* de las variedades micropropagadas.



Pistacia Tree.
Pistacia vera.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Michaux, F.A., The North American sylvia, vol. 3: t. 103 (1819)

2 Material y métodos

2.1 Obtención del material para el establecimiento in vitro.

El material vegetal elegido para su introducción in vitro se obtuvo en la Finca Experimental “El Chaparrillo” de la Junta de Castilla La Mancha, en una visita realizada el 16 de mayo de 2011 por el equipo de cultivo in vitro de frutales de la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC). En este centro se mantiene una extensa colección de pies madres de variedades (Figura1) y portainjertos del género *Pistacia* (Figura2) suministrando material vegetal a los viveristas y agricultores interesados.

- *Pistacia vera*: se seleccionaron cuatro variedades, Kerman y Larnaka, como cultivares hembra, y Peters y C-Especial como cultivares macho. Kerman se seleccionó en base a que es una de las mejores variedades disponibles por tamaño de fruto, características organolépticas y floración tardía. Larnaka se seleccionó porque tiene un comportamiento en secano más interesante que Kerman y, al menos inicialmente, posee menos problemas de plagas. Se escogieron por lo tanto dos variedades muy diferentes entre sí, siendo las dos muy cultivadas en el territorio nacional. Los cultivares macho se eligieron por ser adecuados como polinizadores de los cultivares hembra seleccionados. Además, se utilizó material de la preselección AD15 localizada en el Campus de Aula Dei (Zaragoza).



Figura 1. Campo de plantas madre de *P. vera* en la Finca Experimental “El Chaparrillo”.

- *Pistacia terebinthus*: se seleccionaron 4 clones, VLLM1 y SMM1 como selecciones macho y JH1 y SMH1 como selecciones hembra. Las hembras fueron seleccionadas por su buen comportamiento en la producción de semillas que posteriormente se utilizan para la obtención de planta para injertar, dando lugar a portainjertos vigorosos. Los machos fueron seleccionados por su porte vigoroso. SMM1 y SMH1 proceden de Sierra Mágina, situada en la Cordillera Subbética. VLLM1 procede de Sierra de Perabad, situada en el Campo de Calatrava. Además se ha utilizado material procedente de semillas recolectadas en plantas silvestres en la localidad de Riglos (Huesca), puestas a germinar in vitro, *P. terebinthus* 'T6' y 'T7'.



Figura 2. Ejemplar de *P. terebinthus* en la Finca Experimental “El Chaparrillo”.

Para la introducción in vitro de el material de “El Chaparrillo” se seleccionó el material vegetal brotado ese mismo año, que se encontraba en crecimiento activo (Figura3) en el momento de la recolección, y se pusieron en cultivo las yemas vegetativas y se desecharon las yemas de flor.



Figura 3. Ejemplar de *P. vera* donde se observan las varetas que serán seleccionadas para su introducción in vitro.

Los árboles seleccionados para su introducción in vitro eran árboles adultos, lo que dificulta su clonación debido a que las especies leñosas tienen una capacidad regenerativa menor que las especies herbáceas.

2.1 Tratamiento del material

El material de *Pistacia* se sumergió en antioxidante inmediatamente después de ser seccionado. El antioxidante está compuesto por una solución acuosa que contiene:

- Ácido ascórbico 1mM: 0,18 gr/l
- Ácido cítrico 1mM: 0,19gr/l

Todo el material se trasladó a la Estación Experimental de Aula Dei, donde ese mismo día, transcurridas 6 horas desde su obtención en campo, se procedió a su introducción in vitro.

2.2 Desinfección del material

Se realizaron diferentes tratamientos previos a la siembra de material vegetal para evitar la contaminación del medio de cultivo y la pérdida del material y de este

modo evaluar el mejor método de esterilización en condiciones adversas. Hay que observar que en el momento de la recogida del material estaba lloviendo, lo que aumenta las probabilidades de crecimiento de hongos y bacterias en la superficie del material vegetal.

Los tratamientos seguidos fueron los siguientes (Tabla1):

- 1 - Lejía: solución acuosa con 10 g de Cloro activo/l.
- 2 - Mercurio: solución acuosa de 0,5 g/l de Cl_2Hg .
- 3 - PPM: 2 g/l de PPM. PPM son las siglas de “Preservative Plant Mixture for Plant Tissue Culture Medium”. Se trata de un producto comercial biocida compuesto por:
 - 5- Chloro-2-methyl-3(2H)-isothiazolone.....0,1350%
 - 2-methyl-3(2H)-isothiazolone.....0,0412%
 - Ingredientes inertes.....99,8238%
- 4 - Ferúlico + lejía: 1mg/l de ácido ferúlico + 10 g/l de Cloro activo. El ácido ferúlico es un compuesto fenólico con propiedades antioxidantes.
- 5 - Ferúlico + mercurio: 1mg/l de ácido ferúlico + 0,5 g/l de Cl_2Hg .
- 6 - Ferúlico + PPM: 1mg/l de ácido ferúlico + 2 g/l PPM.

El número de yemas desinfectadas e introducidas in vitro del material vegetal obtenido en la Estación “El Chaparrillo” se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Numero de yemas de cada cultivar y tratamiento de desinfección previo a la introducción del material vegetal in vitro obtenido en la Estación El Chaparrillo (Ciudad Real), tras 6 horas de tratamiento antioxidante en solución de ácido ascórbico y ácido cítrico.

Tratamiento desinfección	Cultivar y nº de yemas sembradas								
	Kerman	Larnaka	Peters	C-Especial	VLLM1	JH1	SMH1	SMM1	Total
Lejía	21	24	24	24	24	24	24	36	201
Mercurio	24	24	24	24	24	24	24	24	192
PPM		36			24	24			84
Ferúlico + lejía	24	24	24	23					95
Ferúlico + mercurio	24	24	24	23					95
Ferúlico + PPM	38		24	24					86

Después de los diferentes tratamientos de desinfección y ya en la cabina de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad, el material se aclaró tres veces con agua destilada estéril para eliminar los diferentes restos de material de desinfección empleados que pudieran quedar en las microestaquillas, perjudicando e impidiendo la brotación posterior de las yemas.

2.3 Siembra del material

La introducción de material in vitro se realizó mediante el cultivo de segmentos nodales que consiste en el aislamiento de una yema, junto con una porción de tallo, para obtener un vástago a partir de la yema. Para el cultivo de segmentos nodales se empleó un solo medio de cultivo por ser el que mejores resultados había dado en cultivos anteriores de *Pistacia* (García et al., 2010). El medio de cultivo es el DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) modificado y su composición es la siguiente:

Componentes inorgánicos

Macronutrientes (g/l):

NH ₄ NO ₃	1,42
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O.....	1,96
CaCl ₂ ·2H ₂ O.....	0,15
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,74
KH ₂ PO ₄	0,26
K ₂ SO ₄	2,82
FeNaEDTA.....	0,044

Micronutrientes (g/l):

MnSO ₄ ·H ₂ O.....	3,38 x 10 ⁻²
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O.....	1,7 x 10 ⁻²
H ₃ BO ₃	4,8 x 10 ⁻³
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O.....	0,39 x 10 ⁻³
CuSO ₄ ·5H ₂ O.....	0,25 x 10 ⁻³
NiCl ₂ ·6H ₂ O.....	0,5 x 10 ⁻³

Componentes orgánicos (g/l):

Myo-inositol.....	0,1
Thiamina-HCl.....	$0,68 \times 10^{-6}$
Ácido nicotínico.....	$0,12 \times 10^{-6}$
Glycina.....	$0,15 \times 10^{-6}$
Ácido ascórbico.....	10^{-2}

Reguladores de crecimiento(g/l):

BAP.....	$1,3 \times 10^{-6}$
IBA.....	$0,12 \times 10^{-6}$

Además se añade al medio de cultivo 30 gr/l de sacarosa y 7 gr/l de agar. El pH se ajusta a 5.7 antes de añadir el agar y esterilizar el medio de cultivo en un autoclave a 121 °C (0.1 MPa).

Se cortaron segmentos nodales (mini-estaquillas) por los entrenudos y se puso cada una de las yemas en tubos de vidrio de 24 mm de diámetro con tapones de polipropileno blanco que contenían 10 ml de medio de cultivo solidificado.

El número de yemas sembradas de cada variedad se puede ver en la Tabla 2.

Tabla 2. Número de miniestaquillas sembradas in vitro con una yema axilar.

Nº de yemas sembradas								
<i>Pistacia vera</i>				<i>Pistacia terebinthus</i>				
Kerman	Larnaka	Peters	C-Especial	VLLM1	JH1	SMH1	SMM1	Total
131	132	120	118	72	72	48	60	753

Los primeros días tras la siembra, las mini-estaquillas desprendieron gran cantidad de exudados oscuros al medio de cultivo, lo que obligó a un cambio diario del material a tubos con medio de cultivo nuevo para evitar que los exudados dañasen o inhibiesen el crecimiento de las yemas.

2.4 Germinación in vitro de semillas de *P. terebinthus*

Se sembraron in vitro 24 semillas de cornicabra (*P. terebinthus*) (Tabla 3) 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 (Loid y McCown, 1980), MS (Murashige y Skoog, 1962) y C2D (Cheé y Pool, 1987) (Arbeloa *et al.*, 2006). Transcurridas 6 semanas las semillas se pasaron a la cámara de cultivo con iluminación (fotoperiodo de 16h 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 (García *et al.*, 2010).

Tabla 3. Número de semillas de *P. Terebinthus* sembradas in vitro.

Medio de cultivo	Nº de semillas
WPM	12
MS	6
C2D	6

Los ápices de las plántulas obtenidas a partir de los embriones germinados fueron subcultivados eliminando previamente los cotiledones y las raíces y se sometieron a los mismos tratamientos que *P. vera* para su multiplicación. La composición de los medios de cultivo utilizados puede verse en la tabla 4.

2.5 Multiplicación de material vegetal de *P. vera* y *P. terebinthus*

A las tres semanas de la introducción del material vegetal se comenzaron a subcultivar (separación y cambio de medio de los nuevos brotes) las mini-estaquillas que habían evolucionado favorablemente, es decir, se encontraban en buen estado sanitario y vegetativo y habían comenzado a emitir brotes nuevos, o habían alargado la yema inicial lo suficiente como para ser dividida y obtener así nuevos brotes.

Al cabo de cinco meses se seleccionó una sola yema de cada una de las variedades de *Pistacia* que se habían introducido *in vitro*.

Para la proliferación del material vegetal se utilizaron diversos medios de cultivo, que fueron adaptados con frecuencia, para solucionar los problemas que

fueron surgiendo, como necrosamiento de ápices, paradas vegetativas y escasa o nula multiplicación de brotes, entre otros.

Los brotes se mantuvieron en la cámara de cultivo a una temperatura de 24°C, una intensidad lumínica de 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionada por tubos fluorescentes “cool-white” y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

La mayoría de cultivos leñosos necesitan ser subcultivados para mantenerse en condiciones óptimas cada 4 semanas. En el caso de *Pistacia vera*, el tiempo entre subcultivos se estableció en 3 semanas, para mantener el estado general de la planta, y especialmente los ápices. Esto no fue necesario en *Pistacia terebinthus*, donde el tiempo de subcultivos fue de 4 semanas.

El objetivo fundamental de estos subcultivos iniciales es multiplicar el material y así obtener un número suficiente de brotes clonales que nos permita realizar distintas pruebas para optimizar el medio de multiplicación y el de enraizamiento.

2.5.1 Medios de cultivo

Las necesidades del material vegetal en cuanto al medio de cultivo son muy diferentes, y prácticamente se tuvo que adaptar cada medio a cada clon en cultivo.

En general se utilizaron dos medios de base modificados, el medio DKW (Driver y Kuniyuki, 1984), en el que habían sido puestas inicialmente las mini-estaquillas para su brotación, y el medio de Long y Preece, LP (Long *et al.*, 1995), probando posteriormente con diferentes citoquininas. La composición de los medios, en gr/l, se puede ver en la Tabla 4.

Los cultivares de *P. vera* ‘Kerman’, ‘Peters’ y ‘AD15’ y de *P. terebinthus* ‘SMM1’ se multiplicaron en el medio LP modificado. Los cultivares de *P. vera* ‘Larnaka’ y de *P. terebinthus* ‘VLLM1’ se multiplicaron en el medio DKW modificado.

Tabla 4. Composición de los medios de cultivo DKW, LP y WPM utilizados (g/l). El asterisco detrás de las iniciales del medio indica que éste ha sido modificado.

	DKW *	LP*	WPM	MS
Componentes inorgánicos				
Macronutrientes:				
NH ₄ NO ₃	1,42	0,91	0,4	1,65
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1,96	0,88	0,56	
KNO ₃				1,9
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,15	0,09	0,1	0,44
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,74	0,27	0,37	0,37
KH ₂ PO ₄	0,26	0,22	0,17	0,17
K ₂ SO ₄	2,82	1,28	1,79	
FeNaEDTA	0,044		0,037	
Sequestrene		0,11		0,1
Micronutrientes:				
MnSO ₄ ·H ₂ O	3,38 x 10 ⁻²	2,54 x 10 ⁻²	1,69 x 10 ⁻²	1,69 x 10 ⁻²
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	1,7 x 10 ⁻²	8,5 x 10 ⁻³		
H ₃ BO ₃	4,8 x 10 ⁻³	5,5 x 10 ⁻³	6,2 x 10 ⁻³	6,2 x 10 ⁻³
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,39 x 10 ⁻³	0,32 x 10 ⁻³	0,25 x 10 ⁻³	0,25 x 10 ⁻³
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25 x 10 ⁻³	0,25 x 10 ⁻³	0,25 x 10 ⁻³	0,025 x 10 ⁻³
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,5 x 10 ⁻³	0,25 x 10 ⁻³		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O		4,3 x 10 ⁻³	8,6 x 10 ⁻³	8,6 x 10 ⁻³
KI				0,83 x 10 ⁻³
CoCl ₂ ·6H ₂ O				0,025 x 10 ⁻³
Componentes orgánicos:				
Myo-inositol	0,1	0,1	0,1	0,1
Sacarosa	30	30	30	30
Thiamina-HCl	0,68 x 10 ⁻⁶	0,68 x 10 ⁻⁶	0,17 x 10 ⁻⁶	0,17 x 10 ⁻⁶
Ácido nicotínico	0,12 x 10 ⁻⁶	0,12 x 10 ⁻⁶	0,06 x 10 ⁻⁶	0,06 x 10 ⁻⁶
Glycina	0,15 x 10 ⁻⁶	0,15 x 10 ⁻⁶	0,15 x 10 ⁻⁶	0,15 x 10 ⁻⁶
Ácido ascórbico	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²
Piridoxina-HCl		0,21 x 10 ⁻⁶	0,1 x 10 ⁻⁶	0,1 x 10 ⁻⁶
Reguladores de crecimiento:				
IBA	0,12 x 10 ⁻⁶	0,12 x 10 ⁻⁶	0,12 x 10 ⁻⁶	0,12 x 10 ⁻⁶
Meta-topolin	0,24 x 10 ⁻⁶	0,24 x 10 ⁻⁶		
Kinetina	0,22 x 10 ⁻⁶	0,22 x 10 ⁻⁶		
BAP-HCl			1,3 x 10 ⁻⁶	1,3 x 10 ⁻⁶

2.5.2 Capacidad de multiplicación

Para determinar la tasa de multiplicación de cada cultivar en los distintos medios de cultivo se tomaron los datos del número de brotes iniciales y el número de brotes total a las tres semanas de subcultivo. Los datos se analizaron por medio de un análisis de varianza asumiendo normalidad y se confirmaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

El pistachero tiene la peculiaridad de que en general no desarrolla las yemas axilares para su multiplicación, sino que es a partir del callo basal de dónde se obtienen los nuevos brotes, por lo que para determinar su multiplicación ha sido necesario dejar al brote con un pequeño tallo basal.

2.6 Necrosis apical

Se estudió el efecto de diferentes factores en la necrosis apical de brotes de pistachero *in vitro*.

Por una parte se ha estudiado el efecto de tres medios de cultivo diferentes, DKW, MS y WP en la necrosis. Se analizaron 56 brotes por tratamiento y se realizaron dos repeticiones. Los resultados se analizaron mediante el test de la Chi cuadrado en las tablas de contingencia formadas por los valores absolutos de los brotes con necrosis apical y sin necrosis apical.

Se han utilizado brotes de la selección 'AD15' (*P. vera*) cultivados *in vitro* durante más de dos años. Los brotes se multiplicaron en una cámara de cultivo en condiciones similares a las descritas anteriormente. Los brotes se subcultivaron cada 3 semanas en el medio DKW* con 0.01 g l⁻¹ de ácido ascórbico (antioxidante). Para la determinación de la incidencia de la necrosis apical con los distintos factores estudiados se incrementó la duración entre subcultivos a 6 semanas, ya que a partir de la tercera semana aumenta la aparición de necrosis apical.

Se estudiaron 4 tratamientos y un control, en el que se utilizaron frascos de cultivo de vidrio de 100 ml de volumen (Sigma, St. Louis, MO, USA) con tapas Magenta B-cap (Sigma) en los que se colocaron 7 brotes por frasco y 30 ml de medio de cultivo DKW modificado como se ha descrito anteriormente. Los factores estudiados fueron:

1. Efecto del calcio. Para evaluar el posible efecto del aumento de la concentración de calcio se añadió al medio gluconato de calcio (3 mM) .

2. Efecto del enfriamiento basal. Se creó un gradiente de temperatura creciente entre el medio de cultivo y el ambiente, lo que favorece la transpiración y el transporte de nutrientes. Los frascos de cultivo se colocaron en una superficie refrigerada, a 6°C por debajo de la temperatura ambiente de la cámara de cultivo.

3. Efecto del tipo de frasco de cultivo y la ventilación. Para ver este efecto se utilizaron frascos de polipropileno (Sigma) de mayor volumen (700 ml) con tapas provistas de una membrana de 0.22 μm de diámetro de poro que permite el intercambio de gases, pero no la entrada de microorganismos. A estos frascos se añadieron 100 ml de medio de cultivo y se colocaron 12 brotes por frasco.

4. Efecto del número de brotes por frasco. Se estudió el efecto de la reducción del número de brotes por frasco: 5 brotes en lugar de los 7 brotes del control, de manera que cada brote tuviera una mayor cantidad de medio de cultivo y de aire disponible.

Se realizaron 5 repeticiones por tratamiento, excepto en el frasco de mayor volumen, que se realizaron 3, siendo el número inicial de brotes 35 (control, gluconato de calcio, enfriamiento basal), 36 (frasco de cultivo) o 25 (número de brotes). Se evaluaron diferentes parámetros en un número variable de brotes que dependió de la tasa de multiplicación durante el periodo de cultivo en cada tratamiento: control (88 brotes); gluconato de calcio (70 brotes); enfriamiento basal (75 brotes); frasco de cultivo (120 brotes) y número de brotes (59 brotes).

Después de 6 semanas de cultivo los parámetros evaluados fueron:

1) la aparición de necrosis apical;

2) el porte del brote, asignando a cada brote una categoría: “Malo”, si la planta presentaba necrosis apical y además presentaba un aspecto muy deteriorado, “Regular”, si la planta presentaba los ápices amarillentos y “Bueno”, si la planta presentaba crecimiento activo y sin síntomas de necrosis;

3) el número de entrenudos por brote y

4) la tasa de multiplicación durante el periodo de cultivo (número de brotes, al final del periodo de cultivo, por brote inicial).

Los datos se analizaron según su distribución: el efecto de los diferentes tratamientos sobre la necrosis apical se analizó mediante el test de las proporciones (prop.test) en el caso de la comparación de medios, o mediante una regresión logística, según un modelo lineal generalizado con errores binomiales, para obtener tablas de 'devianza' que son análogas a las del análisis de varianza, utilizando la transformación "logit link function" a las probabilidades de los datos ($\text{logit } p = \ln[p/(1-p)]$). El porte del brote se estudió mediante el análisis de tablas de contingencia utilizando el test de la Chi cuadrado. El número de entrenudos y la tasa de multiplicación se analizaron mediante un análisis de la varianza de una vía.

Para realizar los análisis descritos se utilizó el paquete estadístico R (R Development Core Team, 2008).

2.7 Fase de enraizamiento

2.7.1 Enraizamiento de *P. vera*

Dado que la selección AD15 (*Pistacia vera*) no enraíza usando los medios de cultivo habituales en otras especies de frutales, que consisten en una reducción de sales a la mitad, la eliminación de citoquininas del medio y un aumento de hasta 10 veces la concentración de auxina (IBA) respecto al medio de multiplicación, se realizaron pruebas con diferentes tratamientos, en ocasiones aumentando únicamente el pH, poniendo aireación en las jarras de cultivo o añadiendo al medio vitaminas (tocoferol, o floroglucinol), antioxidantes (ácido ascórbico) u otras hormonas (paclobutrazol, 2-4 D o kinetina). Se partió de un medio base de DKW, ya que es el medio en el que habitualmente se subcultiva 'AD15', modificado para enraizar, al que se llamó DWE (Tabla 5) y se consideró el medio control.

En total se realizaron 14 tratamientos diferentes de tres repeticiones (Tabla 6). Cada repetición consistió en una jarra con 10 plántulas.

Tabla 5. Composición del medio de cultivo DWE utilizado para enraizar (g/l).

	DWE
Componentes inorgánicos	
Macronutrientes:	
NH ₄ NO ₃	0,71
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,98
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,075
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,37
KH ₂ PO ₄	0,13
K ₂ SO ₄	1,42
FeNaEDTA	0,022
Micronutrientes:	
MnSO ₄ ·H ₂ O	3,38 x 10 ⁻²
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	1,7 x 10 ⁻²
H ₃ BO ₃	4,8 x 10 ⁻³
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,39 x 10 ⁻³
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25 x 10 ⁻³
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,5 x 10 ⁻³
Componentes orgánicos:	
Myo-inositol	0,1
Sacarosa	30
Thiamina-HCl	0,68 x 10 ⁻⁶
Ácido nicotínico	0,12 x 10 ⁻⁶
Glycina	0,15 x 10 ⁻⁶
Reguladores de crecimiento:	
IBA	0,6 x 10 ⁻⁶

Tabla 6. Tratamientos previos utilizados para enraizar *P. vera* 'AD15'.

Nº de tratamiento	Tratamiento
1	DWE pH 5.7 + ácido áscorbico (10 ⁻² g/l)
2	DWE pH 6.0
3	DWE pH 6.2
4	DWE pH 6.2 + ácido áscorbico (10 ⁻² g/l)
5	DWE pH 6.5
6	DWE pH 7.0
7	DWE pH 6.2 + aireación
8	DWE pH 6.2 + aireación + ácido áscorbico (10 ⁻² g/l)
9	DWE pH 6.2 + kinetina (0,22 g/l)
10	DWE pH 6.2 + fluoroglucinol (0,1g/l)
11	DWE pH 6.2 + α - tocoferol (1g/l)
12	DWE pH 6.2 + paclobutrazol (1g/l)
13	DWE pH 6.2 + 2-4D (1,1g/l)
14	DWE pH 7.0 + 2-4D (1,1g/l)

Los brotes que se pasaron a medio de enraizamiento cumplían una serie de requisitos de calidad, que consistían en un tamaño mínimo de 2 cm y un ápice en crecimiento activo, sin síntomas de necrosis o de parada vegetativa.

Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo en las mismas condiciones descritas anteriormente y, pasadas 4-8 semanas en medio de enraizamiento, se analizaron el número de brotes enraizados.

A partir de los resultados obtenidos en el primer ensayo, se realizaron nuevos tratamientos, no sólo con el clon 'AD15', sino también con el resto de variedades de *P. vera* que habían sido introducidas *in vitro* y que proporcionaron un número suficiente de brotes.

El número de tratamientos y de repeticiones fue diferente para cada variedad, ya que no todas se comportaron igual y la cantidad de planta disponible no fue siempre la misma. Para cada cultivar se realizaron los siguientes tratamientos:

- *P. vera* 'AD15': 7 tratamientos y 63 repeticiones
- *P. vera* 'Peters': 6 tratamientos y 23 repeticiones
- *P. vera* 'Kerman': 4 tratamientos y 2 repeticiones
- *P. vera* 'Larnaka': 6 tratamientos y 5 repeticiones

Los tratamientos que se hicieron para cada cultivar vienen detallados en las Tablas 7, 8, 9 y 10.

Tabla 7. Tratamientos utilizados para enraizar *P. vera* 'AD15'

Nº de tratamiento	Tratamiento
4	DWE pH 6.2 + antioxidante
15	DWE pH 5.7 + paclobutrazol + antioxidante
12	DWE pH 6.2 + paclobutrazol
16	DWE pH 6.2 + 2paclobutrazol (2g/l)
17	DWE pH 6.2 + 2paclobutrazol + antioxidante
18	DWE pH 7.0 + 2paclobutrazol
19	DWE pH 7.0 + 2paclobutrazol + antioxidante

Tabla 8. Tratamientos utilizados para enraizar *P. vera* 'Peters'

Nº de tratamiento	Tratamiento
4	DWE pH 6.2 + antioxidante
12	DWE pH 6.2 + paclobutrazol
16	DWE pH 6.2 + 2paclobutrazol
17	DWE pH 6.2 + 2paclobutrazol + antioxidante
18	DWE pH 7.0 + 2paclobutrazol
19	DWE pH 7.0 + 2paclobutrazol + antioxidante

Tabla 9. Tratamientos utilizados para enraizar *P. vera* 'Kerman'

Nº de tratamiento	Tratamiento
4	DWE pH 6.2 + antioxidante
12	DWE pH 6.2 + paclobutrazol
16	DWE pH 6.2 + 2paclobutrazol
18	DWE pH 7.0 + 2paclobutrazol

Tabla 10. Tratamientos utilizados para enraizar *P. vera* 'Larnaka'

Nº de tratamiento	Tratamiento
4	DWE pH 6.2 + antioxidante
12	DWE pH 6.2 + paclobutrazol
16	DWE pH 6.2 + 2paclobutrazol
17	DWE pH 6.2 + 2paclobutrazol + antioxidante
18	DWE pH 7.0 + 2paclobutrazol
19	DWE pH 7.0 + 2paclobutrazol + antioxidante

2.7.2 Enraizamiento de *P. terebinthus*

Se hicieron pruebas de enraizamiento con material de *P. terebinthus* procedente de semilla que se mantiene en la colección de cultivo *in vitro* de material vegetal del Departamento de Pomología en la Estación Experimental de Aula Dei.

Al igual que se hizo con el clon de *P. vera* 'AD15', se realizó un ensayo previo con material proveniente de semilla germinada *in vitro* (T6), consistente en 4 tratamientos y tres repeticiones, basados en el medio DWE descrito anteriormente en el que modificaron el pH, la presencia de antioxidante (ácido ascórbico), antibiótico (cefotaxima) o del regulador de crecimiento paclobutrazol. 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. Las plántulas que se pasaron a medio de enraizamiento debían cumplir los

misimos requisitos de calidad que los cultivares de *P. vera*, es decir, un tamaño mínimo de 2 cm y un ápice en crecimiento carente de necrosis o parada vegetativa. Igualmente, a las plántulas puestas a enraizar se les eliminaba el callo basal y las hojas inferiores del tallo. Los tratamientos realizados pueden verse en la Tabla 11.

Tabla 11. Tratamientos previos utilizados para enraizar *P. terebinthus* 'T6'.

Nº de tratamiento	Tratamiento
1	EDW pH 5.7 + antioxidante
5	EDW pH 6.5
6	EDW pH 7.0
12	EDW pH 6.2 + paclobutrazol

A partir de los resultados obtenidos en el primer ensayo, se realizaron nuevos tratamientos con planta de semilla mantenida en la colección de cultivo in vitro, *P. terebinthus* 'T6' y 'T7', y con el clon *P. terebinthus* 'VLLM1'. El clon SMM1 no se pudo poner a enraizar ya que no había material suficiente.

El número de tratamientos y de repeticiones fue muy variable para cada clon.

Para cada cultivar se realizaron los siguientes tratamientos y repeticiones:

- *P. terebinthus* 'T6': 5 tratamientos y 15 repeticiones
- *P. terebinthus* 'T7': 5 tratamientos y 6 repeticiones
- *P. vera* 'VLLM1': 6 tratamientos y 12 repeticiones

Los tratamientos que se hicieron para cada cultivar vienen detallados en las tablas 12, 13 y 14.

Tabla 12. Tratamientos utilizados para enraizar *P. terebinthus* 'T6'.

Nº de tratamiento	Tratamiento
12	DWE pH 6.2 + paclobutrazol
16	DWE pH 6.2 + 2paclobutrazol
17	DWE pH 6.2 + 2paclobutrazol + antioxidante
18	DWE pH 7.0 + 2paclobutrazol
19	DWE pH 7.0 + 2paclobutrazol + antioxidante
20	DWE pH 7.0 + 2paclobutrazol + antioxidante + cefotaxima

Tabla 13. Tratamientos utilizados para enraizar *P. terebinthus* 'T7'.

Nº de tratamiento	Tratamiento
12	EDW pH 6.2 + paclobutrazol
16	EDW pH 6.2 + 2paclobutrazol
17	EDW pH 6.2 + 2paclobutrazol + antioxidante
18	EDW pH 7.0 + 2paclobutrazol
19	EDW pH 7.0 + 2paclobutrazol + antioxidante

Tabla 14. Tratamientos utilizados para enraizar *P. terebinthus* 'VLLM1'.

Nº de tratamiento	Tratamiento
4	EDW pH 6.2 + antioxidante
12	EDW pH 6.2 + paclobutrazol
16	EDW pH 6.2 + 2paclobutrazol
17	EDW pH 6.2 + 2paclobutrazol + antioxidante
18	EDW pH 7.0 + 2paclobutrazol
19	EDW pH 7.0 + 2paclobutrazol + antioxidante

Cuando los datos lo permitieron, ya que era frecuente la ausencia de enraizamiento, se analizaron mediante regresión logística, según un modelo lineal generalizado con errores binomiales, para obtener tablas de 'devianza' que son análogas a las del análisis de varianza, utilizando la transformación "logit link function" a las probabilidades de los datos ($\text{logit } p = [p/(1-p)]$).

2.8 Aclimatación

Únicamente pudieron ser llevados a aclimatar el clon de *P. vera* 'AD15' y los clones de *P. terebinthus* 'T6' y 'T7', debido a que en el momento de su trasplante a tierra eran los únicos que tenían ápices en buenas condiciones para su aclimatación. A pesar de ser estos los únicos clones que pudieron llevarse a aclimatar, mucha planta que sí dio raíces, tuvo que ser desechada por su mala calidad. Además de echar raíces, la planta seleccionada para aclimatar también habrá crecido en longitud, por lo que ya tendrá un tamaño adecuado para su correcta manipulación.

Las raíces de los brotes sanos enraizados fueron lavados con agua destilada para desprender los posibles restos de medio de cultivo que hayan quedado pegados y se introducen en unas macetas de turba prensada, denominadas jiffy-pots con un substrato compuesto por turba y perlita y un abono sólido de liberación lenta

(Osmocote mini; Sierra Chemical Europe, Heerlen, Holanda) en una cantidad de 1,50 Kg/m³.

Al sacar la planta del frasco de cultivo hay que tener cuidado de no dañar las raíces, ya que en este periodo se muestran fácilmente quebradizas.

Una vez tenemos las plantas en los jiffy-pots y a su vez en unas bandejas con agujeros que no permitan que se produzcan encharcamientos, daremos un riego abundante de agua con insecticida (CHAS 48; CHEMINOVA AGRO, S.A. Madrid) y fungicida (PREVICUR; Bayer CropScience AG Monheim, Alemania) para prevenir posibles ataques de insectos o de hongos que se encuentran en la tierra.

Las plantas son introducidas dentro de un túnel de plástico transparente dentro del invernadero, donde la humedad relativa del aire ha de ser aproximadamente del 90%. Para ello se pone una esponja húmeda en la base del túnel y se cierra el plástico lo más herméticamente posible. Además el invernadero dispone de luz y calefacción para los periodos invernales, y de un sistema de refrigeración, cooling-system, para el periodo estival, de manera que las temperaturas nunca suben por encima de los 37°C y no bajan de los 16°C.

Para la aclimatación de plantas se utilizó también una cámara de cultivo dónde se obtuvo un control más preciso del ambiente, con 400 µE de intensidad de luz, fotoperiodo de 16 horas, 25°C y un 70% de humedad relativa.

A partir del segundo día comienza la aclimatación de nuestras plantas. Para ello, sacaremos las plantas del túnel al invernadero (Figura4), donde la humedad relativa es del 50-60%, en periodos de 5 minutos que irán aumentando progresivamente cada día hasta llegar a los 90 minutos fuera del túnel. Esto se logra aproximadamente en un mes, momento en el cual, si nuestras plantas se han aclimatado correctamente, ya dispondrán de hojas nuevas perfectamente adaptadas al exterior.

Una vez aclimatadas las plantas, han de trasplantarse a macetas más grandes para facilitar el crecimiento radicular.



Figura 4. Planta de *P. vera* 'AD15' aclimatando.

2.9 Injerto

2.9.1 Injerto in vivo

Para el estudio del injerto se utilizaron como patrón plántulas de terebinto provenientes de semilla. Para su germinación se pusieron las semillas de *P. terebinthus* previamente a remojo en agua durante 24 horas, y posteriormente en bandejas húmedas con una mezcla de turba y perlita en invernadero (Pindstrup Mosebrug S.A.E. substrato profesional). Al cabo de 3 semanas las semillas comenzaron a germinar, y cuando tuvieron un tamaño de 2 cm se trasplantaron individualmente a recipientes forestales con un tamaño de 21 cm de alto y 7 cm de lado con turba, perlita y abono granulado. Las semillas tenían dos procedencias: Sierra Mágina, un macizo montañoso integrado en el sistema subbético, proporcionadas por la Dra. Araceli Barceló, o la provincia de Huesca, proporcionadas por el Servicio Forestal del INIA, y fueron puestas a germinar por separado para controlar durante todo el proceso su origen.

Al cabo de 1 ó 3 meses desde su trasplante las plantas de *P. terebinthus* se injertaron con material de *P. vera* 'AD15' ya aclimatado procedente de cultivo *in vitro*. Este material tenía la ventaja de que era de pequeño tamaño y podía ser injertado en material joven de *P. terebinthus*.

Antes de realizar el injerto, se quitaron todas las yemas axilares del portainjerto así como las hojas.

El injerto que se realizó en todos los casos fue de hendidura, sin embargo se estudió el efecto de distintas variables como el tipo de yema que fue lateral (Figura 5-A) o apical (Figura 5-B), el tamaño de la yema injertada (2mm, 3mm, 4mm ó 5mm), la inclusión o no de agarosa en el punto de injerto y la procedencia de la semilla (Sierra Mágina ó Prepirineo). Dependiendo del tamaño del portainjerto, para el atado se utilizó parafilm (>4mm) (Figura 5-A) ó un tubo de silicona (<3mm) (Figura 5-B).



Figura 5. Injertos realizado con material de *P. vera* aclimatado mostrando el tipo de yema empleado (lateral (A) y apical (B)).

En total se realizaron 55 injertos (Tabla 15). Se observó la evolución y el prendimiento del injerto diariamente anotando la fecha de la muerte o de brotación del mismo. Cada 4 días se quitaron los rebrotes del patrón cuando fue necesario.

Tabla 15. Injertos realizados en invernadero de *P. vera* aclimatado sobre cornicabra.

Tipo de yema		Agarosa		Diámetro de la yema (mm)				Procedencia semilla	
Lateral	Apical	Si	No	2	3	4	5	Sierra Mágina	Prepirineo
46	9	9	46	9	23	18	5	40	15

2.9.2 Injerto in vitro

Para la realización y estudio del injerto in vitro se seleccionaron brotes cultivados in vitro de *P. terebinthus* (Figura 6-A) procedentes de semilla germinada y multiplicada in vitro, de unos 4 cm de longitud y se realizó el injerto con yemas de *P. vera* 'AD15' y Peters' de 1-2 cm provenientes de cultivos in vitro.

Se estudiaron diferentes tipos de yemas: apical o nodal y diferentes tipos de injerto: bisel o inglés (Figura 6-B) según el corte en la unión. Para el injerto inglés, en se realizó una hendidura en el patrón después de decapitarlo en la que 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 la unión en el injerto se introdujo previamente en el portainjerto decapitado un tubo de silicona de 0.8mm de diámetro, que ayudó a mantener la presión y forzar la unión de patrón y variedad (Figura 6-C). Además se 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 (Figura 6-D) en la cabina de flujo laminar. El número de injertos evaluado fue variable dependiendo del material disponible (Tabla 16).

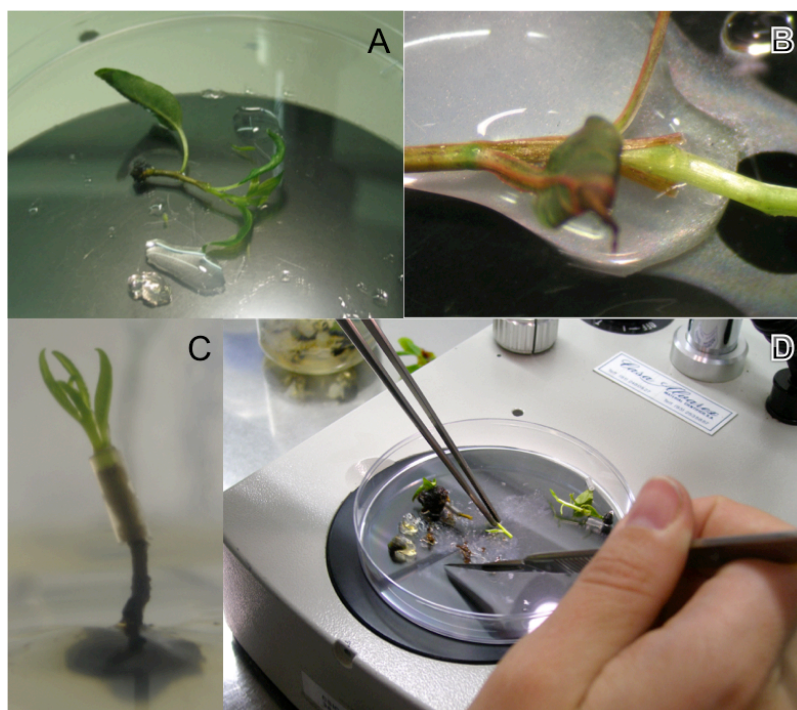


Figura 6. Realización del injerto con material in vitro en condiciones asépticas. Planta de *P. terebinthus* utilizada como portainjerto (A), detalle de un injerto tipo inglés (B), injerto recién realizado y plantado en el medio de cultivo (C) y realización del injerto (D).

Los brotes injertados se cultivaron en la cámara de cultivo durante un tiempo variable entre 1 y 2 meses sin subcultivar en un medio de cultivo de multiplicación (DKW). Se evaluó el prendimiento y desarrollo del brote injertado a lo largo del cultivo. Tras ese tiempo algunas plantas injertadas se trasladaron al invernadero y se procedió a su aclimatación.

Tabla 16. Número de injertos *in vitro* realizados de *P. vera* 'AD15' y 'Peters'.

Variedad injertada	Tipo de Unión	N° de Uniones	Total Uniones
<i>P. vera</i> 'AD15'	Bisel Nodal	52	63
	Bisel Apical	11	
<i>P. vera</i> 'Peters'	Bisel Nodal	8	27
	Inglés Nodal	19	

Durante el tiempo de crecimiento del injerto se realizó un estudio histológico para observar el desarrollo del injerto y las incidencias que se producen en el mismo. El estudio histológico de la unión 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 con la ayuda de una cuchilla de afeitar para su observación con un microscopio de fluorescencia (Olympus AX60) equipado con cámara fotográfica Olympus C7070WZ. Se observó la unión de los injertos, la proliferación celular del parénquima en la zona de unión, así como la comunicación vascular entre patrón y variedad en la zona del injerto tras la tinción de los cortes con naranja de acridina al 0.01% en agua (Pearse, 1968).



3. RESULTADOS

Köhler, F.E., Medizinal Pflanzen, vol. 2: t. 130 (1890)

3 Resultados

3.1 Desinfección del material

A pesar de los tratamientos de desinfección del material empleados, parte de los cultivos desarrollaron contaminaciones, producidas por hongos (Figura 7) y bacterias, que dependieron del tratamiento empleado y del genotipo.

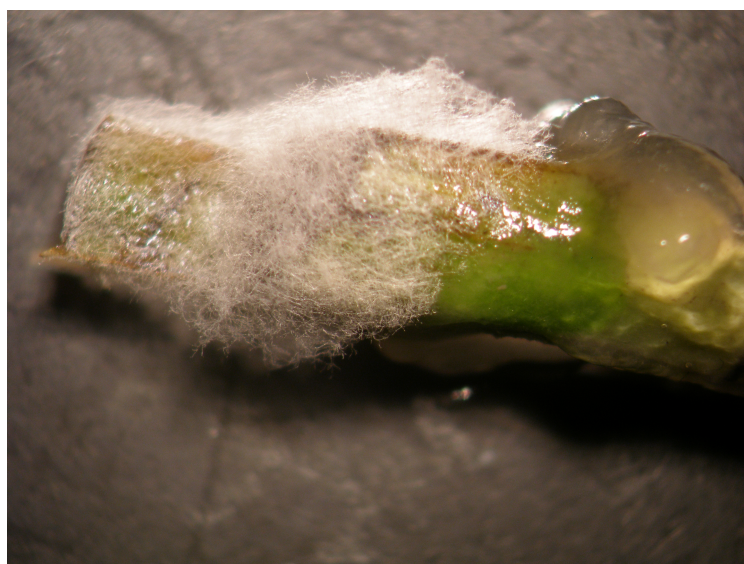


Figura 7. Miniestaca de *P. vera* contaminada por hongo.

- Atendiendo al método empleado de desinfección, es decir, diferenciando entre los tratamientos con hipoclorito sódico, bromuro de mercurio o PPM, obtenemos unos porcentajes globales que fueron desde un 17% de contaminaciones con mercurio, hasta un 27% de contaminaciones con PPM (Figura 8).

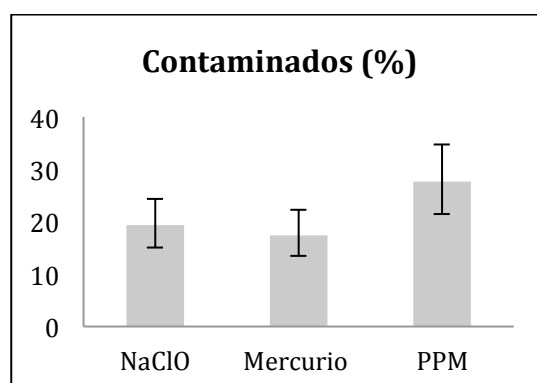


Figura 8. Porcentaje de cultivos contaminados según el método de desinfección (las barras indican el Intervalo de Confianza al 95%).

- Atendiendo a la especie se obtuvieron diferencias mayores, ya que en *P. terebinthus* hubo un porcentaje de contaminaciones de hasta un 37% en el conjunto de los métodos de desinfección empleados, oscilando entre un 31 para la desinfección con hipoclorito sódico y un 58% en el caso de la desinfección con PPM (Figura 9 y 10-B). En *P. vera*, sin embargo, el porcentaje de contaminaciones del conjunto de métodos utilizados, apenas llegó al 12% (Figura 9), oscilando entre ellos entre un 10% y un 16%, siendo de nuevo la desinfección con PPM la que dio peores resultados (Figura 10-A).

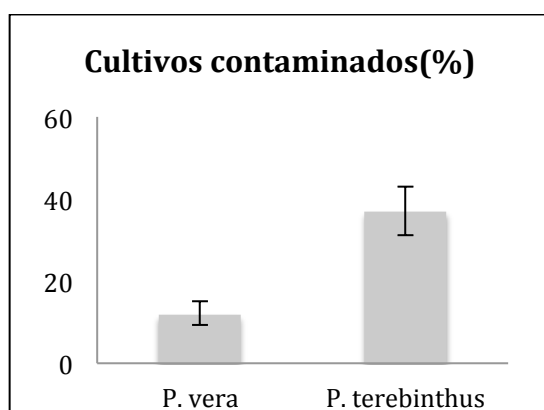


Figura 9. Porcentaje de cultivos contaminados según la especie (las barras indican el Intervalo de Confianza al 95%).

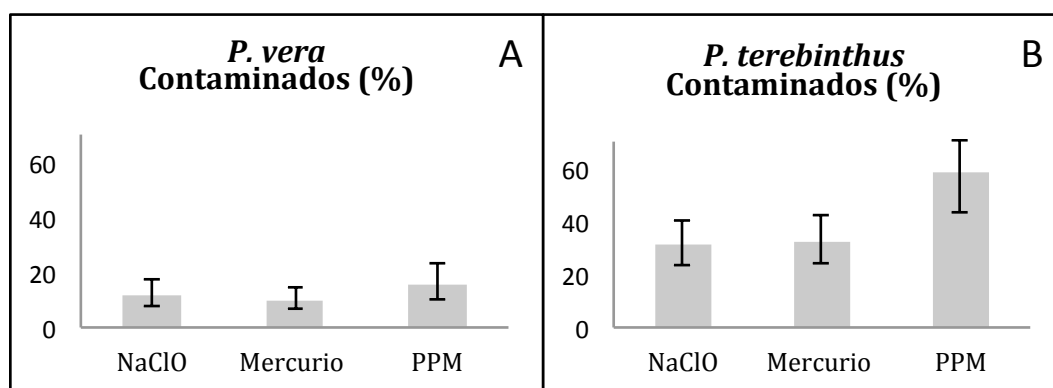


Figura 10. Porcentaje de brotes contaminados según el método de desinfección en *P. vera* (A) y *P. terebinthus* (B); (las barras indican el Intervalo de Confianza al 95%).

3.2 Brotación

El porcentaje de brotación de las yemas sembradas, se calculó sin tener en cuenta las yemas contaminadas. Consideramos que una yema ha brotado cuando se produce una elongación del tallo con hojas y nuevas yemas laterales (Figura 11-A). En ocasiones las yemas sacaron hojas pero no se produjo un alargamiento del tallo (Figura 11-B), por lo que estas yemas fueron consideradas como no brotadas.

Se evaluó la brotación de las yemas de las microestaquillas atendiendo a varios parámetros:

- la especie
- la variedad o el clon
- el método de desinfección

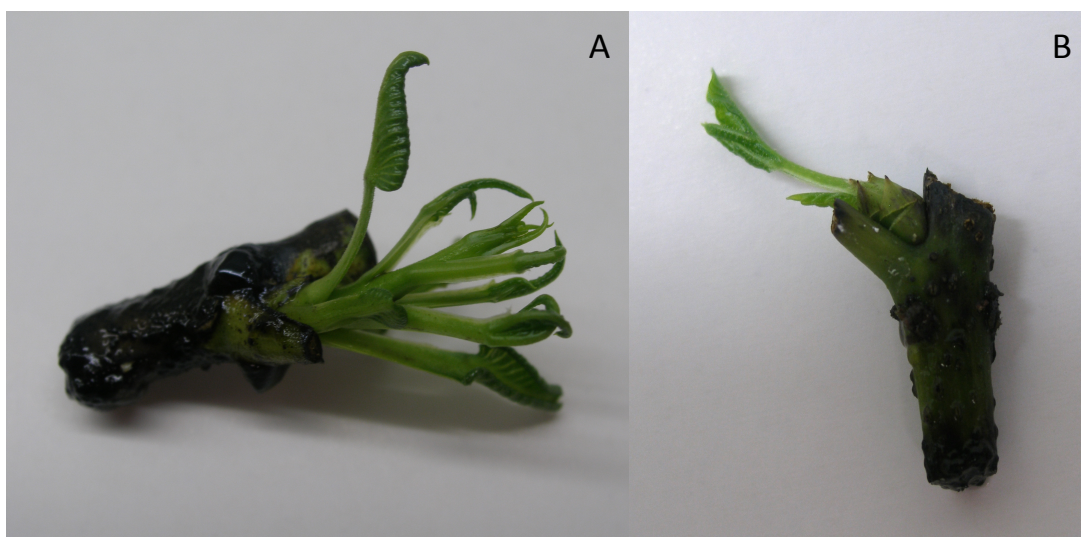


Figura 11. Miniestaquilla con la yema brotada de *P. vera* 'C-Especial' (A) y yema no brotada de *P. terebinthus* 'JH1' (B).

3.2.1 Efecto de la especie en la brotación

La brotación tuvo lugar en una mayor proporción en las yemas de las variedades de la especie *P. vera* en comparación con los clones de *P. terebinthus*. El porcentaje de brotación de *P. vera* fue de un poco más del 19%, frente a un 12% en el caso de *P. terebinthus* (Figura 12).

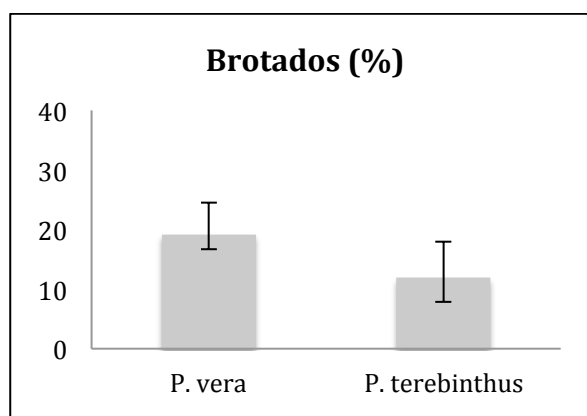


Figura 12. Porcentaje de brotación de microestaquillas según la especie (las barras indican el Intervalo de Confianza al 95%).

3.2.2 Efecto de la variedad

Entre las diferentes variedades que se instalaron de *P. vera* hubo una notable diferencia en el porcentaje de brotación que varió desde el 9% en el caso del cultivar ‘Peters’ hasta un 33% en el caso del cultivar ‘Larnaka’ (Figura 13).

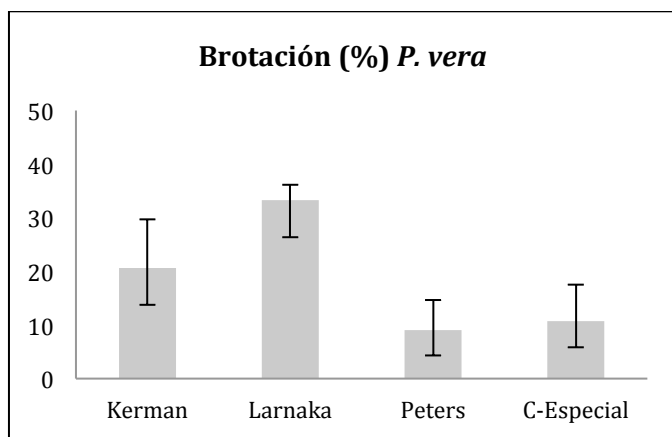


Figura 13. Porcentaje de brotación de miniestaquillas según la variedad de *P. vera* (las barras indican el Intervalo de Confianza al 95%).

En el caso de *P. terebinthus* (Figura 14), las diferencias en el porcentaje de brotación entre los diferentes clones son aún mayores, ya que varió entre un 0% en el caso del cultivar hembra ‘JH1’, frente a casi un 31% en el caso del cultivar macho ‘VLLM1’.

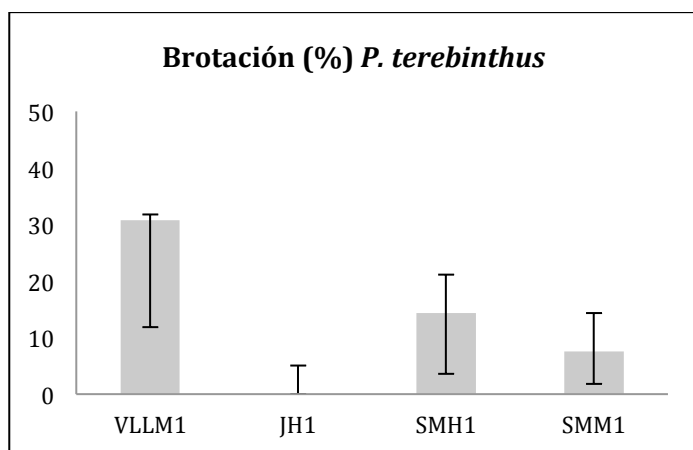


Figura 14. Porcentaje de brotación de miniestaquillas según la variedad de *P. terebinthus* (las barras indican el Intervalo de Confianza al 95%).

Se puede observar, como ya se ha mencionado para *P. vera*, que siendo todos de la misma especie, tienen comportamientos muy diferentes (Figura 15).

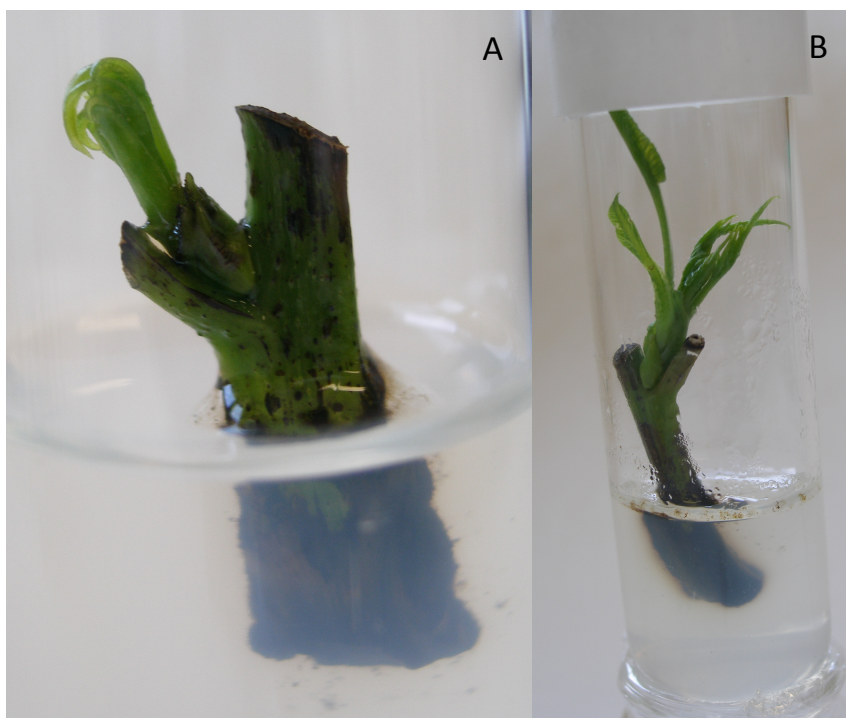


Figura 15. Yemas brotadas de *P. terebinthus*, cultivares SMM1(A) y VLLM1 (B).

3.2.3 Efecto del método de desinfección

Atendiendo únicamente al método de desinfección empleado, observamos que, si bien el método de desinfección en cuanto a número de contaminaciones fue similar para el hipoclorito sódico y para el cloruro de mercurio, en la evolución de las yemas que han sobrevivido vemos que brotaron más las que fueron desinfectadas con hipoclorito sódico (Figura 16), siendo el PPM el que ha dado peores resultados, tanto en número de contaminaciones como en número de yemas brotadas, apenas un 6%.

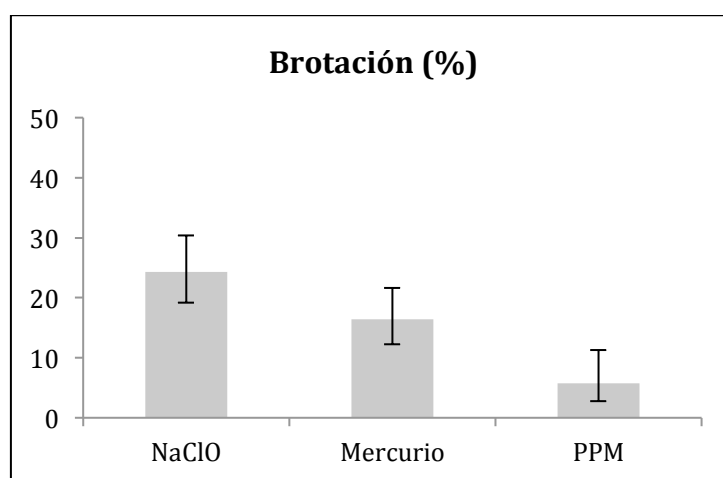


Figura 16. Porcentaje de brotación de miniestaquillas según el método de desinfección empleado (las barras indican el Intervalo de Confianza al 95%).

Si separamos las dos especies con las que trabajamos vemos que los resultados no dependen del genotipo, y sigue siendo el método de desinfección con hipoclorito sódico el que da mejores resultados (Figura 17).

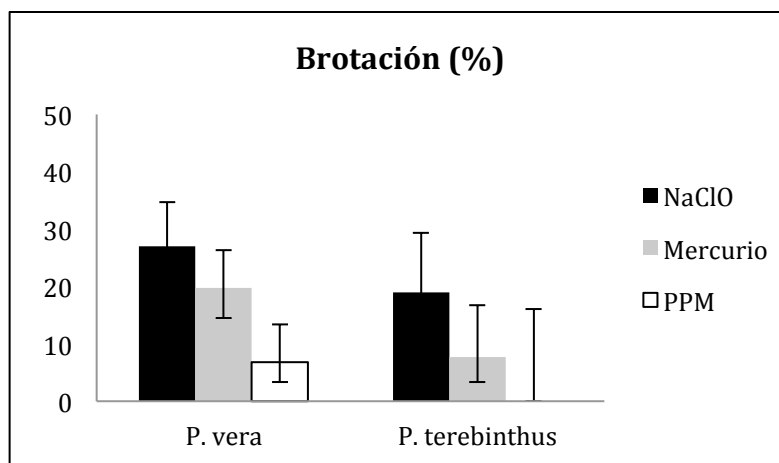


Figura 17. Porcentaje de brotación de microestaquillas atendiendo al método de desinfección, según la especie de *Pistacia* (las barras indican el Intervalo de Confianza al 95%).

En cuanto a cómo ha afectado el método de desinfección, atendiendo a cada cultivar, tanto en *P. vera* como en *P. terebinthus*, vemos que sigue el mismo patrón, es decir, el hipoclorito sódico es el método de desinfección con el que más yemas han brotado, con la excepción del cultivar 'Kerman', dónde el método con cloruro de mercurio, supera en más de 15 puntos al tratamiento con cloruro sódico en el porcentaje de brotación (Figuras 18 y 20). Sin embargo, en el caso de las yemas brotadas, la calidad del brote ha sido similar para los tres tratamientos (Figura 19-A, B y C).

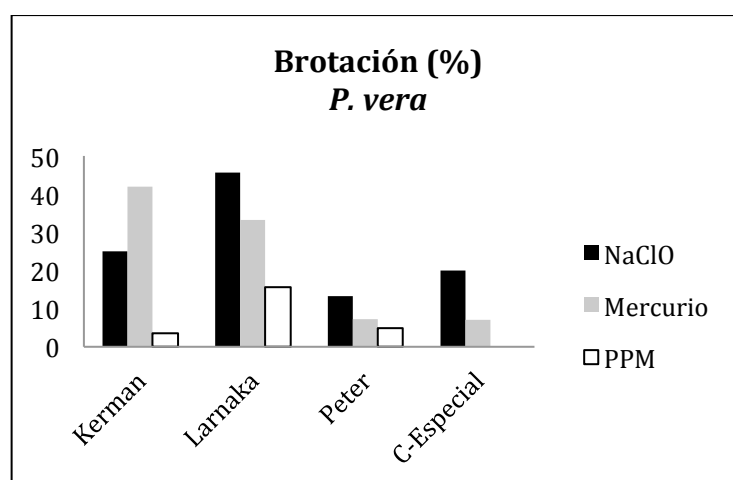


Figura 18. Porcentaje de brotación según el método de desinfección y el cultivar en *P. vera*

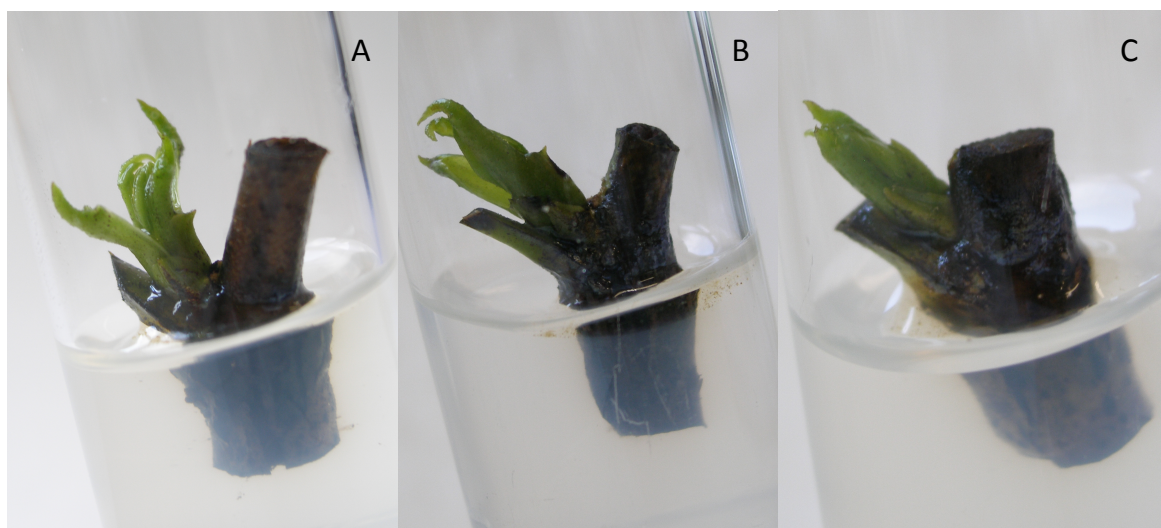


Figura 19. Yemas brotadas de *P. vera* 'Larnaka' en medio de cultivo, previamente sometidas a diferentes métodos de desinfección: hipoclorito sódico (A), bromuro de mercurio (B) y PPM (C).

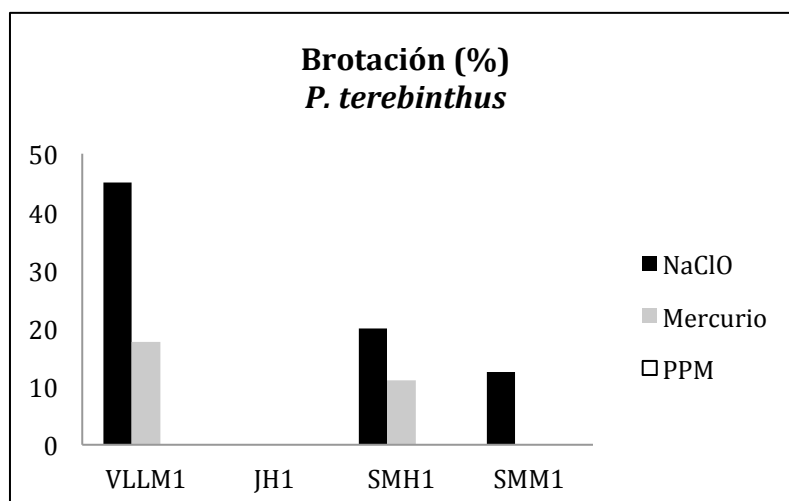


Figura 20. Porcentaje de brotación según el método de desinfección y el clon en *P. terebinthus*.

3.3 Supervivencia de los brotes en cultivo de *P. vera* y *P. terebinthus*

Hay que señalar que no todas las yemas que brotaron llegaron a buen término. Algunas yemas, a pesar de ser contabilizadas como brotadas, morían a las semanas o pocos meses después, haciendo imposible su multiplicación. Por ello se contabilizaron las yemas que continuaron *in vitro*, en proceso de multiplicación, 5 meses después de su introducción, de manera que ya habían pasado por 6 subcultivos y tenían garantía de continuidad, y a este dato se denominó: supervivencia de los brotes en cultivo. (Figura 21).

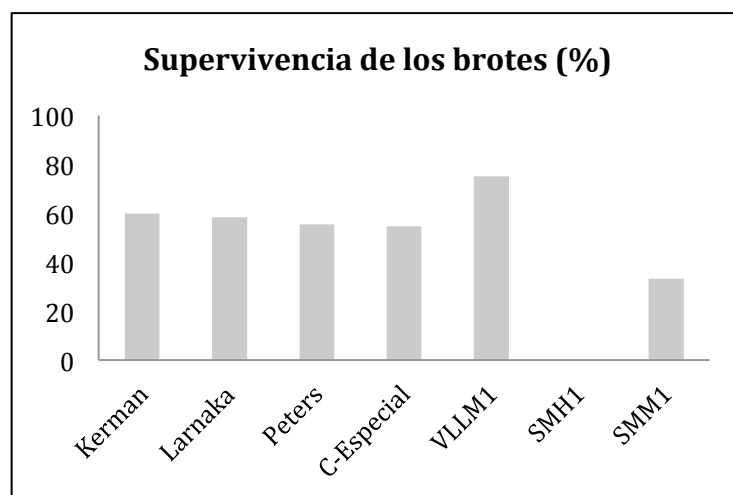


Figura 21. Porcentaje de supervivencia de los brotes en cultivo tras la brotación para todos los clones en estudio

El cultivar hembra de *P. terebinthus* 'JH1', no se incluye en esta grafica dado que no brotó ninguna yema, su brotación fue 0. Así mismo se observa que en el otro cultivar hembra de *P. terebinthus* 'SMH1', de las 4 yemas brotadas, de 48 sembradas, ninguna de ellas logró sobrevivir.

En *P. vera* se observó una supervivencia similar en todas las variedades, rondando el 60%, mientras que en *P. terebinthus*, la supervivencia osciló entre un 0 y un 75% y únicamente se conservan cultivares macho.

3.4 Germinación in vitro de semillas 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 (Figura 22).

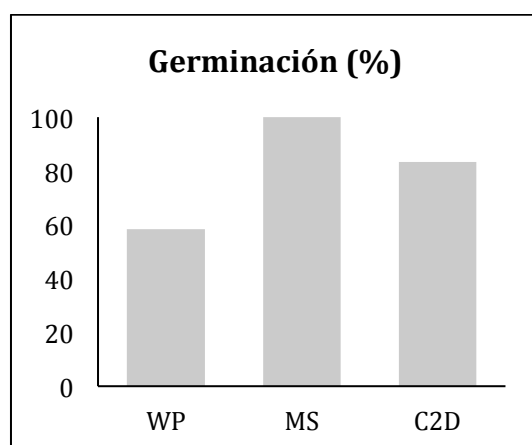


Figura 22. Porcentaje de germinación in vitro de semillas de *P. terebinthus*.

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.

3.5 Multiplicación de material vegetal de *P. vera* y *P. terebinthus*

Los cultivos iniciados con éxito formaron nuevos brotes, principalmente de las bases engrosadas de los brotes. Sólo ocasionalmente se observaron ramificaciones axilares.

Durante esta fase se apreciaron diferentes problemas, como la emisión de sustancias al medio de cultivo que adquiriría un color oscuro y con un efecto tóxico; la necrosis apical de los brotes en mayor o menor medida (Figura 23-A); la parada del crecimiento vegetativo o la aparición de contaminaciones endógenas que permanecían en estado latente en el interior de los brotes. Por otra parte, los brotes carecían de la capacidad de formar raíces o lo hacían con mucho retardo, a la vez que el brote decaía (Figura 23-B). Aquellos que enraizaban también mostraron dificultades durante la aclimatación (Figura 23-C), bien por la falta de vigor, bien por no mostrar signos precoces de marchitez al exponerse a baja humedad relativa.



Figura 23. Diferentes problemas en la multiplicación de brotes: necrosis apical (A), escaso enraizamiento (B) y dificultad en la aclimatación respectivamente(C).

3.5.1 Factores que afectan la necrosis apical y calidad de brote

La calidad del brote en cultivo se ve afectada principalmente por la necrosis apical, que es uno de los principales problemas de la fase de multiplicación en pistachero. Para su control en la selección AD15 se han evaluado diferentes

tratamientos, como el efecto del medio de cultivo, la adición de calcio o la mayor ventilación de los brotes, observándose un claro efecto positivo tanto con el medio de cultivo como con la mayor ventilación (Figuras 24 y 25).

3.5.2 Efecto del medio de cultivo en la necrosis apical

La necrosis apical de brotes de *P. vera* 'AD15' ha estado influida significativamente ($\chi^2 = 30.2832$, $df = 2$, $p\text{-value} = 2.655e-07$) por el medio de cultivo utilizado (Figura 24).

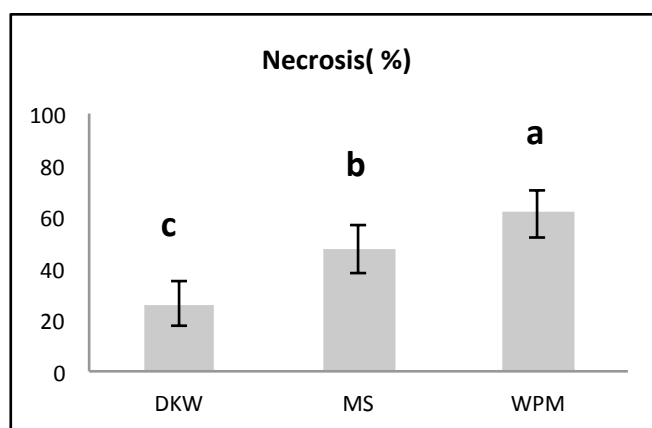


Figura 24. Porcentajes de ápices necrosados según el medio de cultivo (letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0.001$; las barras indican el Intervalo de Confianza al 95%).

El medio DKW ha mostrado la menor incidencia de necrosis apical, ya que únicamente un 25% de los brotes mostraron esta fisiopatía, frente a más de un 60% de brotes necrosados en el medio WPM. El medio MS mostró unos resultados intermedios.

Los tratamientos afectaron a la necrosis excepto la adición de calcio, diferenciándose dos grupos que mostraron diferencias altamente significativas, según el análisis de devianza (Tabla 17).

Tabla 17. Análisis de Devianza de los tratamientos analizados conjuntamente y de las diferencias entre los grupos Control y Ca, por un lado, y Frio basal, Jarra y nº brotes por otro.

	<i>Df</i>	<i>Deviance</i>	<i>Resid. Df</i>	<i>Resid. Dev</i>	<i>P(> Chi)</i>
Tratamientos	1	23.364	410	516.96	1.341e-06 ***
Control & Ca	1	0.33945	156	166.77	0.560 n.s.
Frio basal, Jarra & nº brotes	2	0.71175	251	349.14	0.7006 n.s.

3.5.3 Efecto de la adición de Calcio al medio de cultivo DKW

La adición del gluconato de calcio a este medio no mostró una reducción apreciable en la necrosis apical (Figura 25).

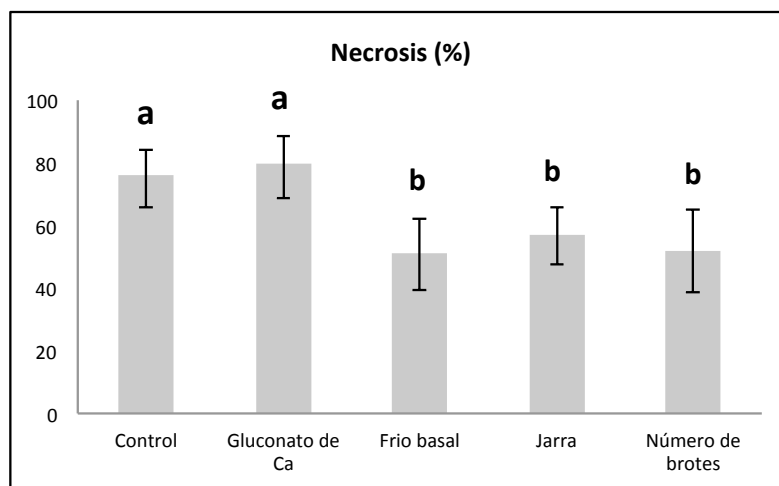


Figura 25. Porcentajes de ápices necrosados según el tipo de tratamiento (letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0.001$; las barras indican el Intervalo de Confianza al 95%).

3.5.4 Efecto de la mayor ventilación

La mayor ventilación en los brotes se ha evaluado mediante tres tratamientos diferentes. Tanto usando frascos de cultivo de mayor tamaño, como mediante la aplicación de frío basal o cultivando un menor número de brotes por frasco de cultivo. Estos tres tratamientos provocaron un descenso en el porcentaje de ápices necrosados (Figura 25) que disminuyó desde un 80 % en control (Figura 26) hasta un 51 % mediante la disminución del frío basal.



Figura 26. Brotes necrosados de *P. vera* 'AD15' en el control.

3.5.5 Efecto de los tratamientos en la calidad de los brotes en cultivo

Durante la fase de multiplicación de los cultivos se estudiaron las condiciones más adecuadas de cultivo que produjeran el menor número de brotes necrosados, pero manteniendo una adecuada calidad de los mismos y una elevada tasa de multiplicación. La calidad del cultivo se ha estudiado atendiendo a la tasa de multiplicación, así como al número de entrenudos del brote producido y al estado de los mismos.

Los diferentes medios de cultivo estudiados han mostrado diferencias altamente significativas en la tasa de multiplicación según ANOVA (Tabla 18).

Tabla 18. Análisis de varianza de la tasa de multiplicación (número de brotes por brote inicial).

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
medio	2	110.57	55.28	30.112	9.602e-13 ***
Residuals	332	609.52	1.84		

El medio DKW ha presentado un número de entrenudos superior a 6 de media y manteniendo una tasa de multiplicación de 2.5 brotes por brote en cada subcultivo. Aunque es inferior a la tasa del medio WPM (3.5 brotes por brote), el medio WPM presenta una proporción de brotes con necrosis apical superior al doble que el DKW (60%) y un menor número de entrenudos por brote (5), siendo estas diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) (Figura 27-A y B).

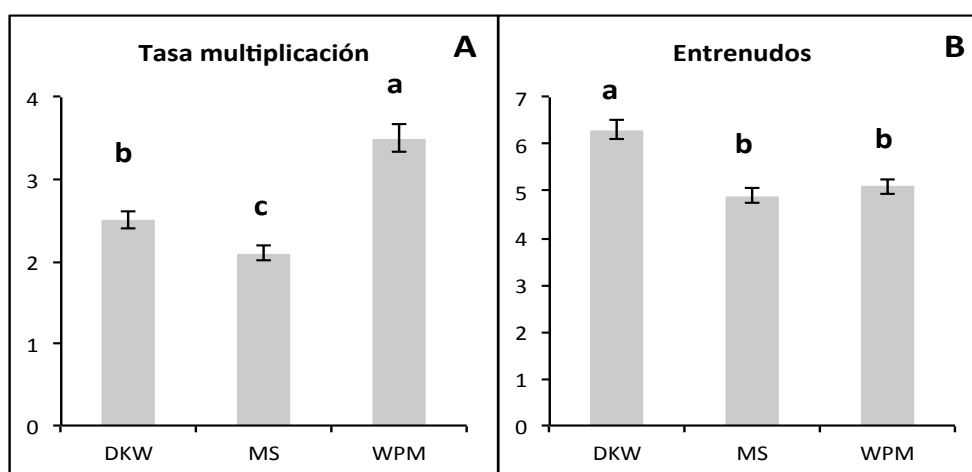


Figura 27. Tasa de multiplicación (número de brotes por brote) (A) y número de entrenudos por brote (B) para cada medio de cultivo en *P. vera* 'AD15' (letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0.001$; las barras indican el error estándar de la media).

La tasa de multiplicación, después de las 6 semanas de cultivo bajo los diferentes tratamientos, mostró que el cultivo en frascos con un menor número de brotes presentaba la mayor tasa de multiplicación, obteniéndose un número de brotes final notablemente superior a los demás tratamientos, siendo además éstos de mayor calidad (Figura 28). Sin embargo el análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre los tratamientos (p -value=0.554).

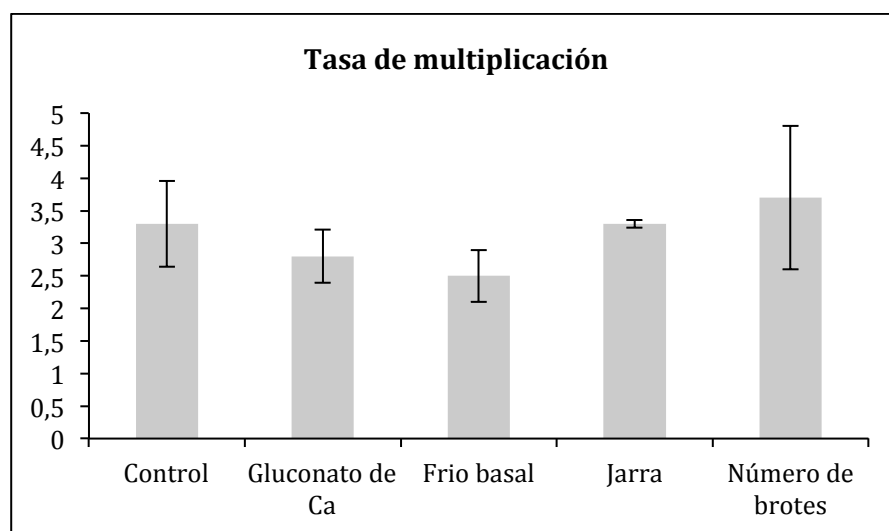


Figura 28. Tasa de multiplicación de *P. vera* 'AD15' para cada tipo de tratamiento (las barras indican el error estándar de la media).

El tratamiento del cultivar en frasco con mayor aireación mostró una tasa de multiplicación igual al control y un número de entrenudos por brote similar, no mostrando diferencias significativas (p -value=0.05705) en conjunto (Figura 29).

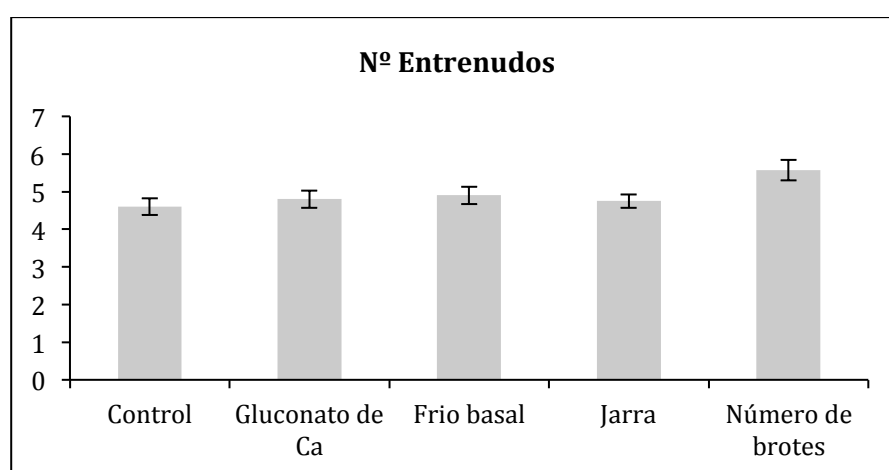


Figura 29. Nº de entrenudos por planta de *P. vera* 'AD15' para cada tipo de tratamiento (las barras indican el error estándar de la media).

3.5.6 Calidad del brote

La calidad de los brotes obtenidos tras el cultivo durante 6 semanas en los diferentes tratamientos se valoró evaluando diferentes caracteres visuales del brote además de la necrosis apical (Figura 30) y se distinguieron dos grupos de tratamientos que mostraron diferencias significativas entre sí, según el test de la Chi-cuadrado (Pearson's Chi-squared test, $\chi^2 = 28$, $df = 2$, $p\text{-value} = 8.315e-07$). Así los tratamientos Control y Ca-gluconato no mostraron diferencias entre sí, pero produjeron brotes de una calidad significativamente peor que los tratamientos Frio basal, Jarra y Número de brotes, que tampoco mostraron diferencias entre ellos.

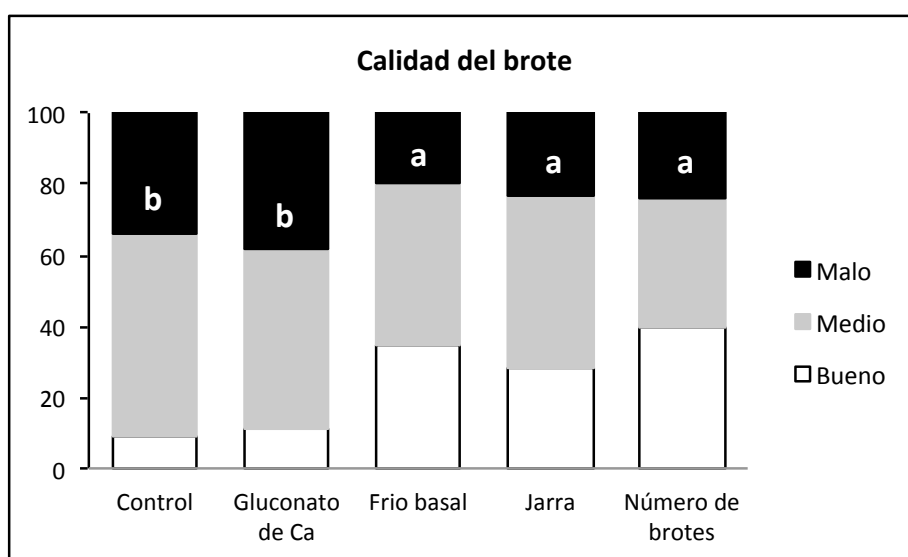


Figura 30. Calidad del brote de *P. vera* 'AD15' para cada tipo de tratamiento (letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0.001$).

El porte de los brotes obtenidos con los distintos tratamientos fue significativamente mejor en los tratamientos en los que también se redujo la necrosis apical: enfriamiento basal (Figura 31-A) o número de brotes por frasco (Figura 31-B). Sin embargo, en el tratamiento del frasco de cultivo de mayor volumen y aireado (Figura 32-A), muchos de estos brotes presentaban un porte "regular", inferior a los tratamientos anteriores. En el tratamiento con gluconato de calcio la necrosis no mejoró nada (Figura 32-B)



Figura 31. Brotes de *P. vera* 'AD15' en los tratamientos de frio basal (A) y número de brotes (B).

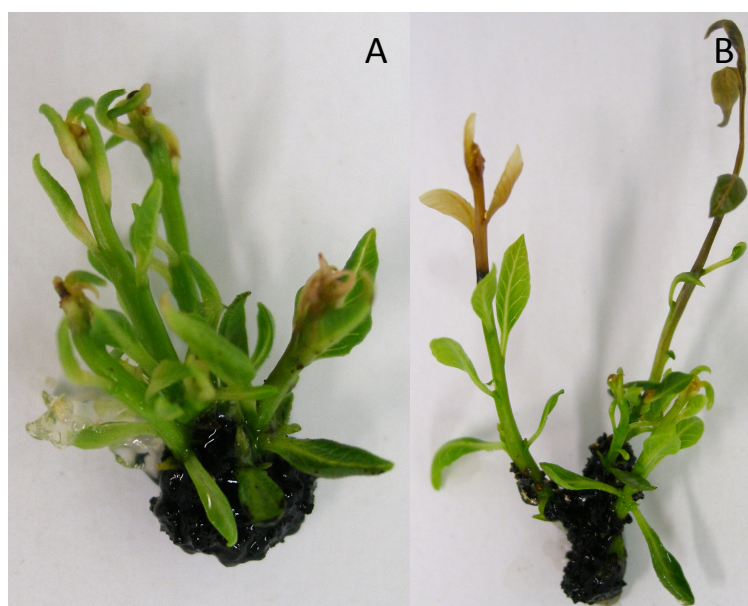


Figura 32. Brotes de *P. vera* 'AD15' en los tratamientos de jarra (A) y gluconato de calcio (B).

Analizando todos estos resultados obtenemos que las condiciones de cultivo más adecuadas para el cultivo de *P. vera* 'AD15' fueron el uso del medio de cultivo DKW y la reducción del número de brotes por frasco, ya que estas dos condiciones redujeron la necrosis apical, aumentaron el número de entrenudos por brote y mejoraron notablemente la calidad del mismo con respecto al control y a otros medios

de cultivo. No obstante, para mantener el cultivo en excelentes condiciones, lo que mejores resultados dio fueron los subcultivos cada tres semanas.

3.6 Optimización de la fase de multiplicación para los distintos clones

Una vez establecidas las condiciones óptimas para AD15 se trató de optimizarlas para cada uno de los clones en cultivo, ya que en observaciones previas se vio que cada clon necesitaba unas condiciones de cultivo.

Para encontrar el medio de cultivo adecuado para cada uno de los clones en cultivo además de la observación del estado general de los brotes, se calculó la capacidad de multiplicación de los brotes para cada clon en los distintos medios de cultivo experimentados (Figura 33). Esto nos permitió establecer un protocolo de multiplicación adecuado para cada cultivar.

Los cultivares de *P. vera* 'Peters', 'Larnaka' y 'AD15' se multiplicaron adecuadamente en el medio DKW* mientras que el cultivar 'Kerman' se multiplicó en el medio LP*. El clon de *P. terebinthus* 'VLLM1' se multiplicó en el medio DKW* y el clon 'SMM1' se multiplicó en el medio LP*

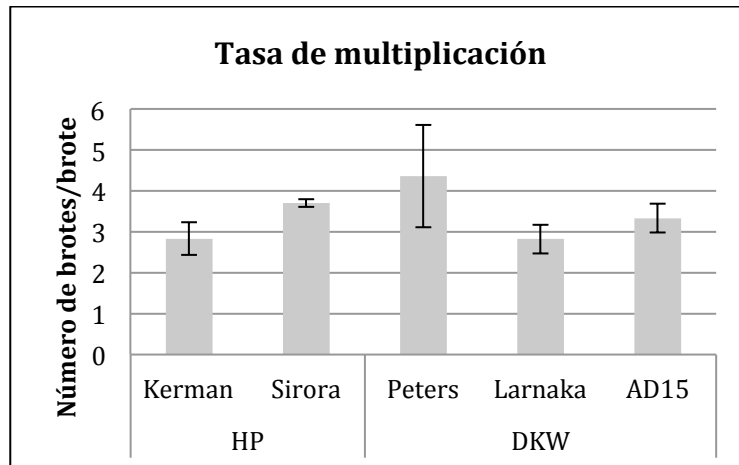


Figura 33. Tasa de multiplicación según el cultivar de *P. vera* (las barras indican el error estándar de la media).

Además, cada cultivar mostró diferencias con respecto a la forma de propagación:

- 'Kerman': le costó aproximadamente 1 año desde el inicio del cultivo *in vitro* comenzar a multiplicar bien. Para la multiplicación hubo que conservar siempre el callo basal entre repicados, ya que como se ha comentado, los nuevos brotes salen del

callo basal (Figura 34-A). Fue necesario, además, subcultivarlo cada tres semanas para mantener el material en buen estado.

- 'Larnaka': similar al cultivar 'Kerman', le costó 1 año comenzar a multiplicar adecuadamente y también se ha visto que es recomendable conservar el callo basal y realizar los subcultivos cada 3 semanas (Figura 34-B).

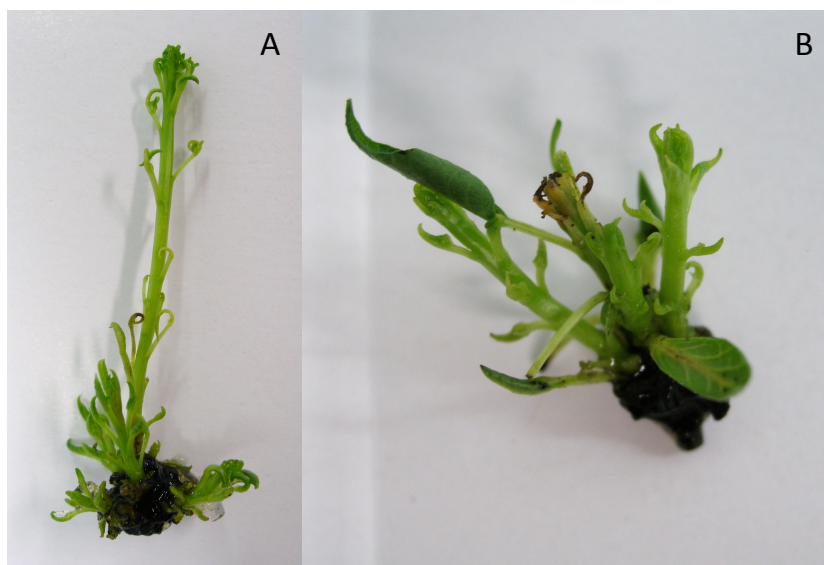


Figura 34. Brotes multiplicando de *P. vera* 'Kerman' (A) y 'Larnaka' (B).

- 'Peters': este cultivar propagó muy bien desde el inicio del cultivo (Figura 35-A), no siendo necesario mantener el callo basal para su multiplicación y el periodo entre subcultivos puede alargarse hasta 4 semanas.

- 'AD15': le llevó más de un año comenzar a multiplicar adecuadamente. Hubo que mantener el callo basal para una buena propagación y cuando no se subcultivó cada tres semanas, comenzaron a necrosarse los ápices rápidamente (Figura 35-B).

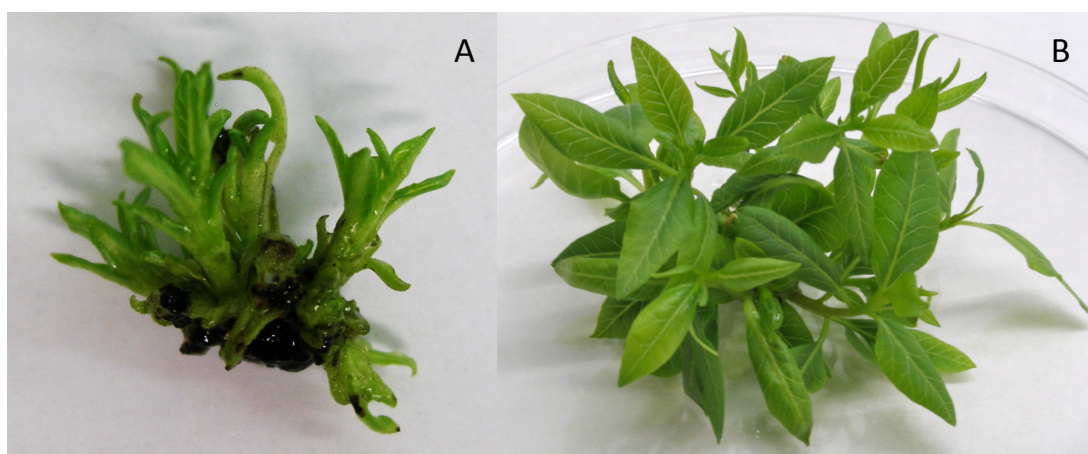


Figura 35. Brotes multiplicando de *P. vera* 'Peters' (A) y 'AD15' (B).

- 'VLLM1': este clon propagó bien desde el inicio del cultivo (Figura 36-A), no siendo necesario conservar el callo basal para su multiplicación y el periodo entre subcultivos pudo ser de hasta 4 semanas.

- 'SMM1': A este cultivar le ha costó propagar en buenas condiciones hasta 2 años y medio después de su introducción in vitro; a partir de este tiempo multiplicó muy bien. Requirió la conservación del callo basal (Figura 36-B) y hubo que subcultivarlo cada 3 semanas.

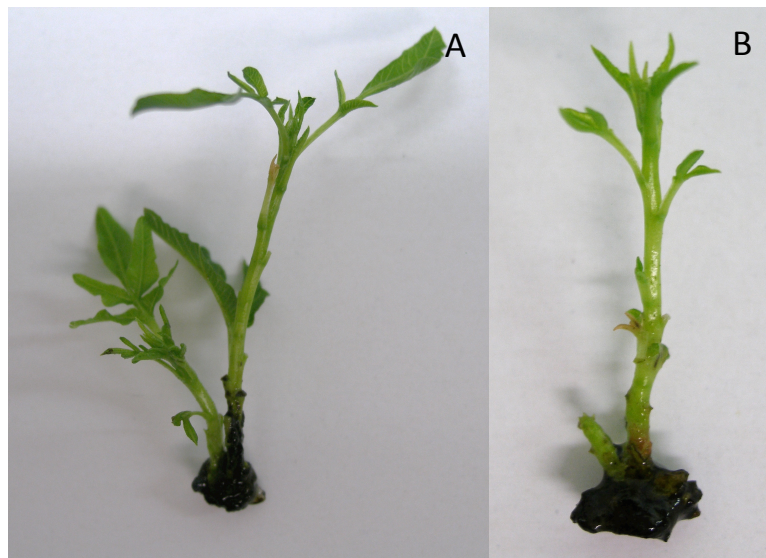


Figura 36. Brotes multiplicando de *P. terebinthus* 'VLLM1' (A) y 'SMM1' (B).

3.7 Fase de Enraizamiento

3.7.1 Enraizamiento de *P. vera*

A partir del material multiplicado in vitro de la selección AD15, que fue la primera con la que se obtuvo suficiente número de brotes, se estudió el efecto de distintos tratamientos, o combinaciones de los mismos, en el enraizamiento. La figura 37 muestra los tratamientos aplicados y el porcentaje de enraizamiento obtenido.

En la Figura 37 se observa que el tratamiento con paclobutrazol (tratamiento 12) (Figura 38) sobresale entre todos los demás sobrepasando un 80% de enraizamiento. Sin embargo, hay otros tratamientos con unos buenos resultados, como el tocoferol (tratamiento 11) (Figura 39), que alcanza casi un 50%, y en menor medida el pH 7.0 (tratamiento 6) (Figura 40), el phloroglucinol (tratamiento 10)

(Figura 41), y el pH 5,7 con antioxidante (tratamiento 1), sobrepasando el 30% de enraizamiento.

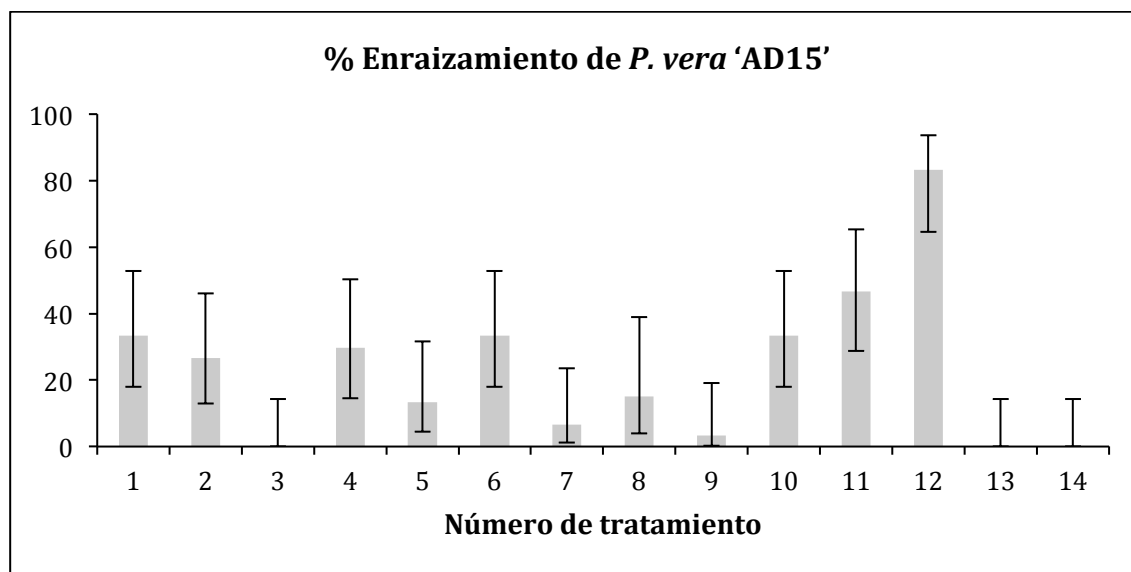


Figura 37. Resultados preliminares de porcentajes de enraizamiento de *P. vera* 'AD15' en los distintos tratamientos (las barras indican el Intervalo de Confianza al 95%):

1 -EDW pH5.7 + antiox	6 -EDW pH7.0	11 -EDW pH6.2 tocoferol (2.3 μ M)
2 -EDW pH6.0	7 -EDW pH6.2 aireación	12 -EDW pH6.2 paclobutrazol (3.4 μ M)
3 -EDW pH6.2	8 -EDW pH6.2 aireación + antiox	13 -EDW pH6.2 2-4D
4 -EDWpPH6.2+antiox	9 -EDW pH6.2 kinetina (2 μ M)	14 -EDW pH7.0 2-4D
5 -EDW pH6.5	10 -EDW pH6.2 phloroglucinol (0.79 μ M)	



Figura 38. *P. vera* 'AD15' enraizado con el tratamiento nº 12 (EDW pH6.2 paclobutrazol).



Figura 39. *P. vera* 'AD15' enraizado con el tratamiento n° 11 (EDW pH6.2 tocoferol).



Figura 40. *P. vera* 'AD15' enraizado con el tratamiento n° 6 (EDW pH7.0).



Figura 41. *P. vera* 'AD15' enraizado con el tratamiento n° 10 (EDW pH6.2 phloroglucinol).

En los ensayos posteriores con los demás clones en cultivo se decidió seguir trabajando con el tratamiento con paclobutrazol porque, además de ser el tratamiento con el que se obtuvo mayor porcentaje de enraizamiento, fue el que produjo más calidad de planta, así como el que mostró mayor sincronía a la hora de producir raíces.

En la figura 42 se muestran los resultados obtenidos en los diferentes cultivares, siempre con paclobutrazol, estudiando el efecto en enraizamiento de otros factores como el pH o la aplicación de antioxidantes. El control se consideró con pH6,2 con antioxidante.

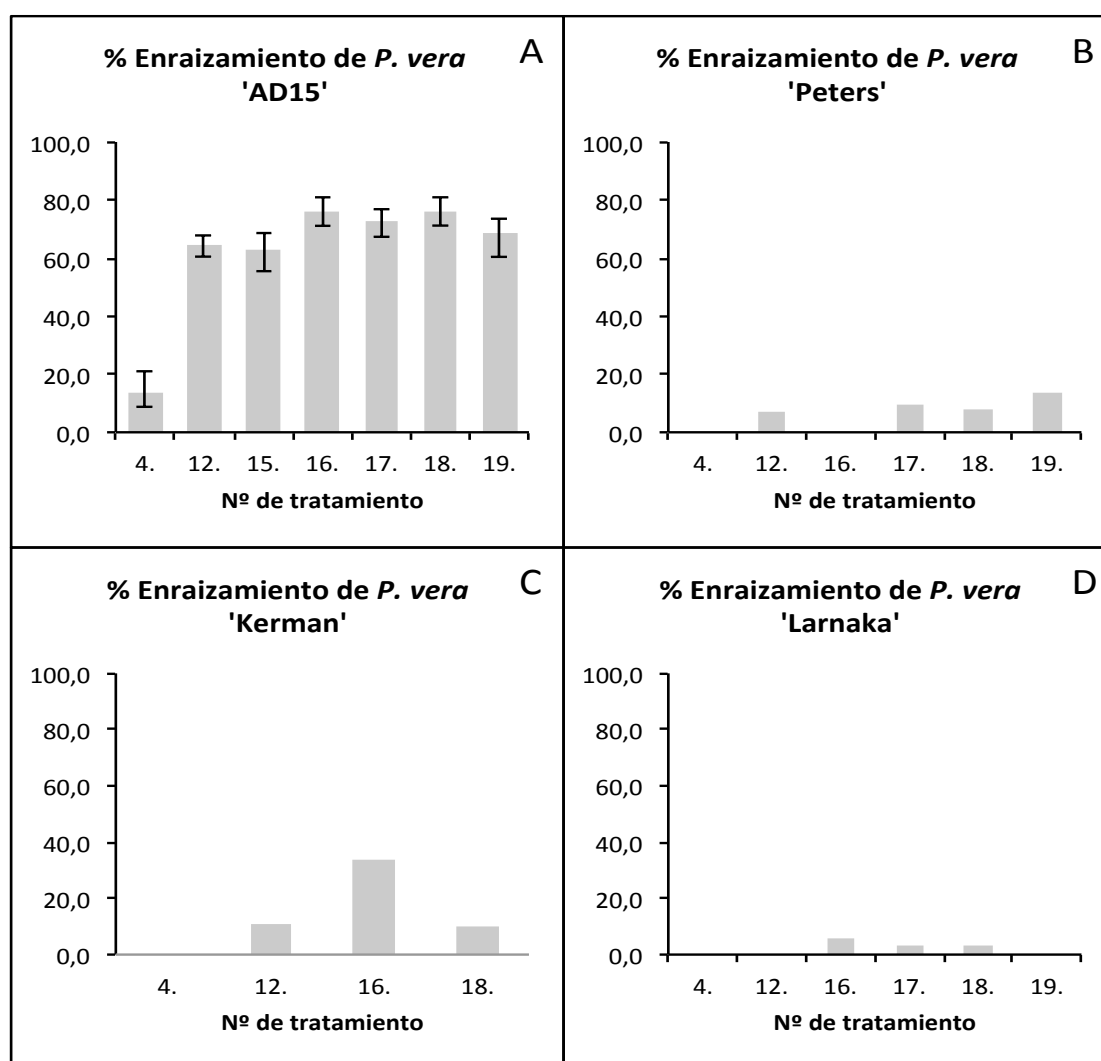


Figura 42. Porcentaje de enraizamiento de los cultivares de *P. vera* 'AD15' (A), 'Peters' (B), 'Kerman' (C) y 'Larnaka' (D) según los tratamientos (las barras indican el Intervalo de Confianza al 95%):

4-EDW pH6.2 + antiox	17-EDW pH6.2 paclobutrazol (6.8 µM)+ antiox.
12-EDW pH6.2 paclobutrazol (3.4 µM)	18-EDW pH7.0 paclobutrazol (6.8 µM)
15-EDW pH5.7 paclobutrazol (3.4 µM) + antiox.	19-EDW pH7.0 paclobutrazol (6.8 µM) + antiox.
16-EDW pH6.2 paclobutrazol (6.8 µM)	

Resultados

En esta figura se observa que en todos los tratamientos con paclobutrazol se obtuvo un alto porcentaje de plantas con raíces para la selección 'AD15', superando en todos los casos el 60%, y superando el 70% cuando se dobló la concentración a $6.8 \mu\text{M}$. El tratamiento sin paclobutrazol en cambio, no supero el 15% de enraizamiento.

Sin embargo, otros cultivares, dieron unos resultados muy variables en porcentaje de enraizamiento (Figura 42). La variedad 'Kerman' (Figura 43-A) alcanzó un 35% de enraizamiento con el tratamiento 16, con paclobutrazol y sin antioxidante. 'Peters' (Figura 44) alcanzó un 15 % de plantas con raíz mientras que en 'Larnaka' (Figura 43-B) apenas se llegó a un 7%. En ningún caso, el control sin paclobutrazol (tratamiento 4), dio raíces.



Figura 43. *P. vera* 'Kerman' (A) y 'Larnaka' (B) enraizados con el tratamiento nº 16 (EDW pH6.2 paclobutrazol ($6.8 \mu\text{M}$))



Figura 44. *P. vera* 'Peters' enraizado con el tratamiento nº 19 (EDW pH7.0 paclobutrazol ($6.8 \mu\text{M}$) + antiox.).

A estos resultados de porcentaje de enraizamiento hay que añadir la mala calidad de brote enraizado obtenido, ya que cuando el brote enraíza, el ápice está completamente necrosado o parado, lo que imposibilita la aclimatación en invernadero.

Así, el enraizamiento de los brotes in vitro para *P. vera* fue muy variable y genotipo-dependiente. La selección AD15 llegó a enraizar con unos niveles altos sin embargo en el resto de los clones no se llegó a un enraizamiento del 50% de los brotes. Se puede concluir que para todos ellos la aplicación de paclobutrazol en elevadas dosis ($-6,8 \mu\text{M}$), además de IBA en el medio de cultivo, aumentó considerablemente el enraizamiento y este proceso también se vio favorecido con un pH (6,2) más elevado que el habitual (5,7).

3.7.2 Enraizamiento de *P. terebinthus*

Se realizaron pruebas preliminares con *P. terebinthus* procedente de semilla, línea 'T6', para la determinación de condiciones para el enraizamiento obteniéndose unos porcentajes elevados de enraizamiento cercanos al 100% con las condiciones adecuadas (Figura 45). Estos resultados satisfactorios fueron la base para seguir trabajando en el enraizamiento del resto de clones.

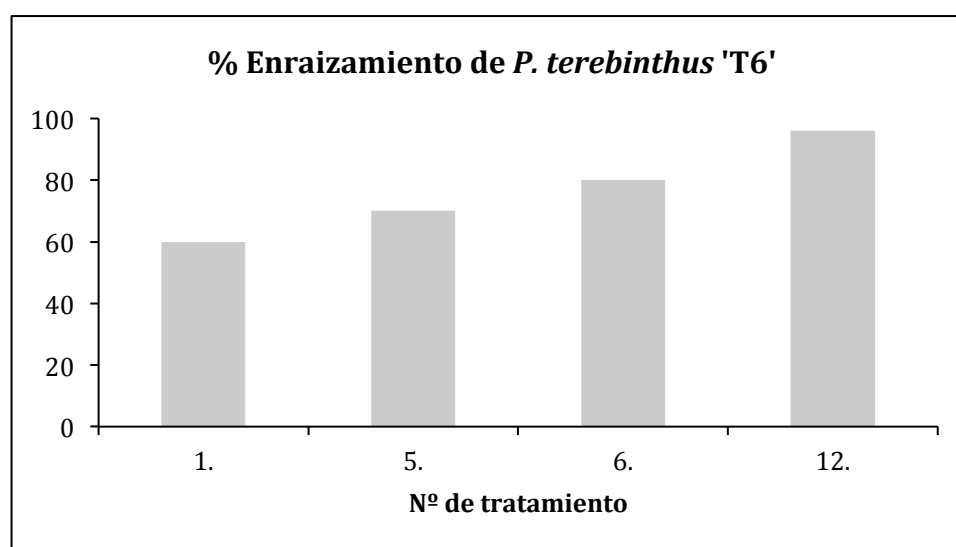


Figura 45. Porcentaje de enraizamiento de *P. terebinthus* 'T6' con las pruebas preliminares:

1-EDW pH5.7 + antiox	6-EDW pH7.0
5-EDW pH6.5	12-EDW pH6.2 paclobutrazol ($3.4 \mu\text{M}$)

En la Figura 45 se observa que en general todos los tratamientos produjeron un alto porcentaje de enraizamiento. Sin embargo, es el tratamiento 12 con paclobutrazol el que da mayor porcentaje, un 96%, por lo que en los tratamientos sucesivos, al igual que en el caso de *P. vera*, seguimos aplicando paclobutrazol combinado con diferentes factores.

Se probaron 5 tratamientos con distintas dosis de paclobutrazol combinados con distinto pH y presencia de antioxidantes en el medio. Tanto el clon 'T6' como el 'T7' procedentes de semilla presentaron muy buenos resultados, llegando en algunos casos al 100% (Figuras 46 y 47-A y B). Sin embargo, en el enraizamiento del clon 'VLLM1', los resultados no fueron tan buenos, alcanzando, en el mejor de los casos, un 23% de brotes enraizados (Figura 48). El tratamiento 4, con antioxidante y sin paclobutrazol no dio ninguna planta con raíz, mientras que los tratamientos 17 y 19, ambos con antioxidante y paclobutrazol en altas concentraciones (6.8 μM), produjeron más de un 20% de plantas con raíz, confirmando el efecto positivo del paclobutrazol en enraizamiento.

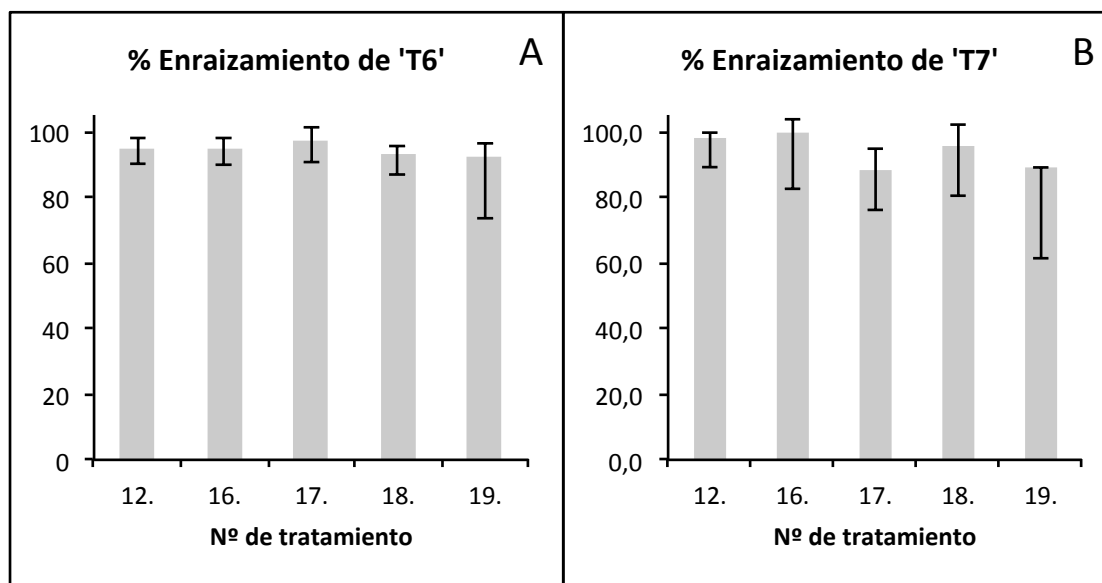


Figura 46. Porcentaje de enraizamiento de *P. terebinthus* 'T6' (A) y 'T7' (B) según los tratamientos (las barras indican el Intervalo de Confianza al 95%):

12-EDW pH6.2 paclobutrazol (3.4 μM)	18-EDW pH7.0 paclobutrazol (6.8 μM)
16-EDW pH6.2 paclobutrazol (6.8 μM)	19-EDW pH7.0 paclobutrazol (6.8 μM)+antiox.
17-EDW pH6.2 paclobutrazol (6.8 μM)+antiox.	

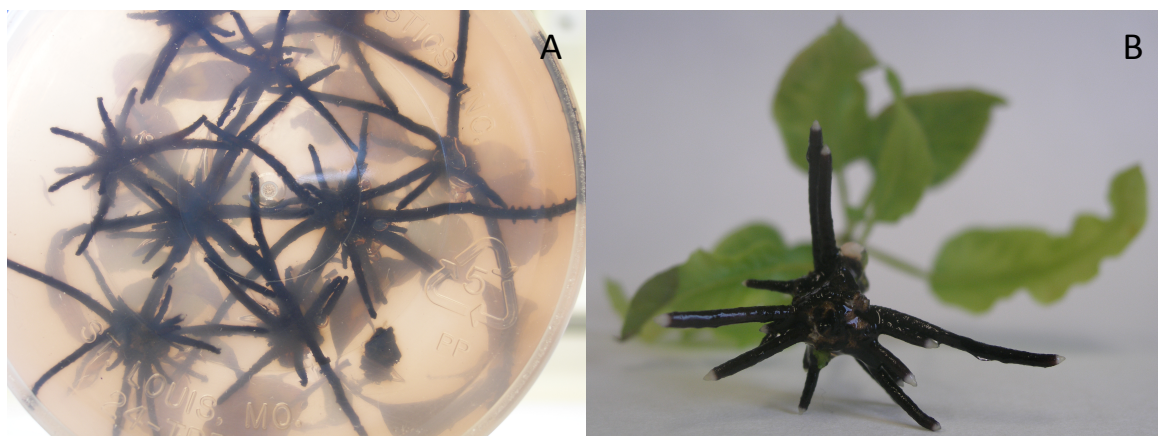


Figura 47. Detalle de raíces de *P. terebinthus* 'T6' obtenidas con el tratamiento nº 16 (EDW pH6.2 paclobutrazol (6.8 μ M)).

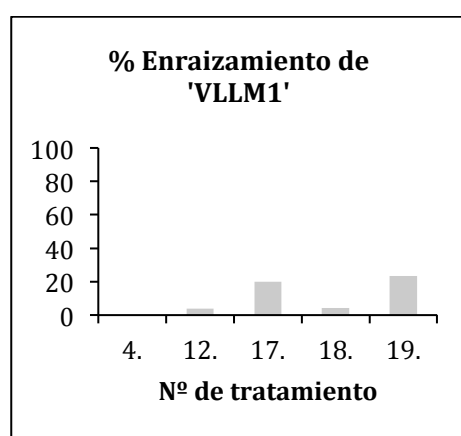


Figura 48. Porcentaje de enraizamiento de *P. terebinthus* 'VLLM1' según los tratamientos:

4-EDWpPH6.2 + antiox	18-EDW pH7.0 paclobutrazol (6.8 μ M)
12-EDW pH6.2 paclobutrazol (3.4 μ M)	19-EDW pH7.0 paclobutrazol (6.8 μ M) + antiox.
17-EDW pH6.2 paclobutrazol (6.8 μ M) + antiox.	

El enraizamiento de clones de *P. terebinthus* fue también genotipo-dependiente como en el caso de *P. vera* pero, además, para los clones testados en este trabajo, el enraizamiento resultó ser muy dependiente del tipo de material: ya sea material juvenil, procedente de semilla, o material introducido a partir de árboles adultos, donde el enraizamiento presentó mayores dificultades. Por otra parte, se ha constatado también que la presencia de paclobutrazol en el medio de cultivo fue imprescindible y se observó un efecto beneficioso de la presencia de antioxidante.

3.8 Aclimatación

En el caso de *P. vera* 'AD15', se obtuvieron unos ratios de aclimatación cercanos al 80%, siempre y cuando la aclimatación se realizó en una cámara de cultivo con los parámetros de temperatura, luz y humedad perfectamente controlados (Figura 49-A). Sin embargo, en invernadero, donde las condiciones son mas variables, apenas un 10% del total de planta trasplantada a tierra pudo ser aclimatada (Figura 49-B). Esto es debido a que las hojas no mostraron signos de marchitez durante el proceso de aclimatación, sólo al día siguiente mostró síntomas de decaimiento, lo que hizo difícil definir el momento en el que había que volver a meter la planta en el túnel con alta humedad relativa para evitar su desecación.

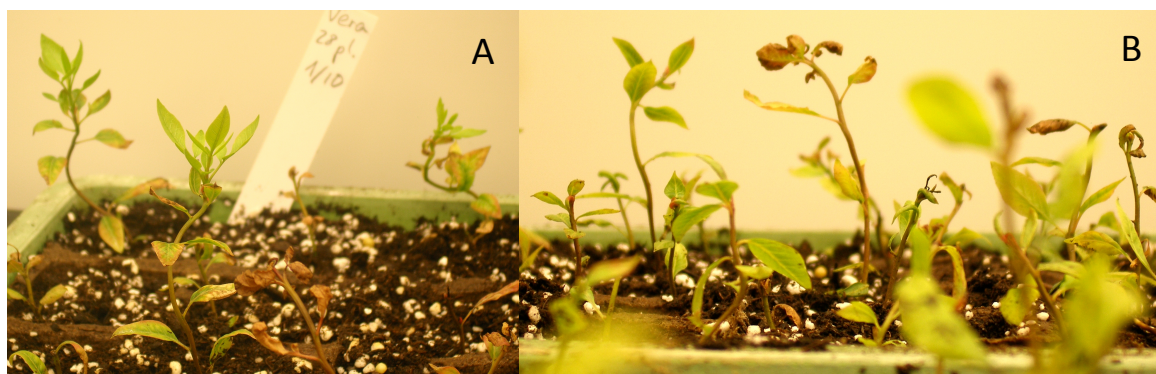


Figura 49. Planta de *P. vera* 'AD15' aclimatando en cámara de cultivo con éxito (A) y en el invernadero (B).

Además, las plantas aclimatadas tuvieron muy poco desarrollo aéreo (Figura 50-A y B), sorprendiendo en todos los casos con un importante sistema radicular (Figura 50-B y C), que hacia indispensable su trasplante a macetas más grandes, y, por lo general, el ápice de la planta se encontraba en parada vegetativa (Figura 50-A).

A pesar de la dificultad en la aclimatación, el clon de *P. vera* 'AD15' quedó disponible para utilizar sus yemas de pequeño tamaño (Figura 51) en la realización de injertos de taller sobre planta juvenil de semilla de *P. terebinthus*.



Figura 50. Planta de *P. vera* 'AD15' aclimatada en invernadero con éxito mostrando el ápice parado (A), el escaso crecimiento aéreo (B) y el excesivo crecimiento radicular respectivamente (C).



Figura 51. Planta de *P. vera* 'AD15' aclimatada en crecimiento y preparada para donar yemas para injertar.

3.9 Mini-Injerto

3.9.1 Mini-Injerto in vivo

Se realizaron un total de 55 injertos en invernadero con yemas de 'AD15' de brotes aclimatados, de los que brotaron 33, lo que supone un 60% de éxito de injerto .

El porcentaje de brotación o éxito de los injertos realizados in vivo fue, no obstante, variable y osciló entre un 44% y un 100% de las yemas injertadas, dependiendo principalmente del tamaño de la yema empleada en el injerto (Figura 52), no presentando diferencias tan notables entre los otros parámetros estudiados: tipo de yema (Figura 53-A), presencia de agarosa (Figura 53-B) o procedencia de la semilla (Figura 53-C)

Las mayores diferencias en la brotación o éxito del injerto, entre 44 y 100%, las encontramos de esta forma en el tamaño de la yema injertada. Estos datos nos indican que cuanto mayor es el tamaño de la yema y del portainjerto, mayor es el porcentaje de brotación (Figura 52).

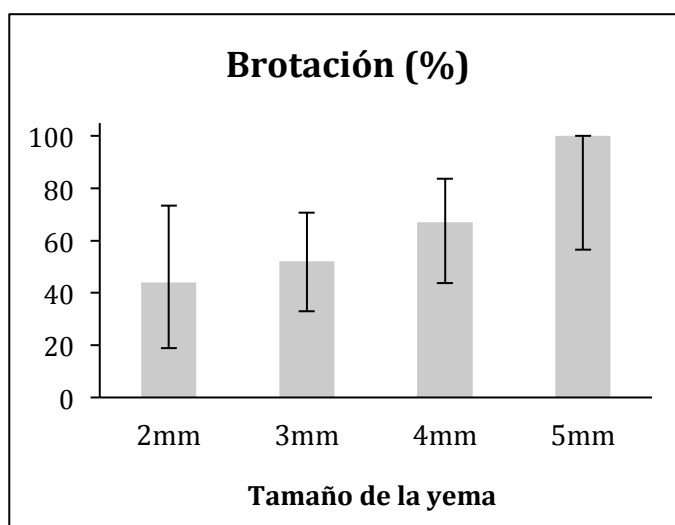


Figura 52. Porcentaje de brotación de injertos según el tamaño de la yema (las barras indican el Intervalo de Confianza al 95%).

En cuanto al tipo de yema, a la aplicación o no de agarosa en la unión, y la procedencia de la semilla, apenas mostró diferencias entre ellas, manteniéndose el porcentaje de brotación en todos los casos entre el 50% y el 65% de los injertos (Figura 53).

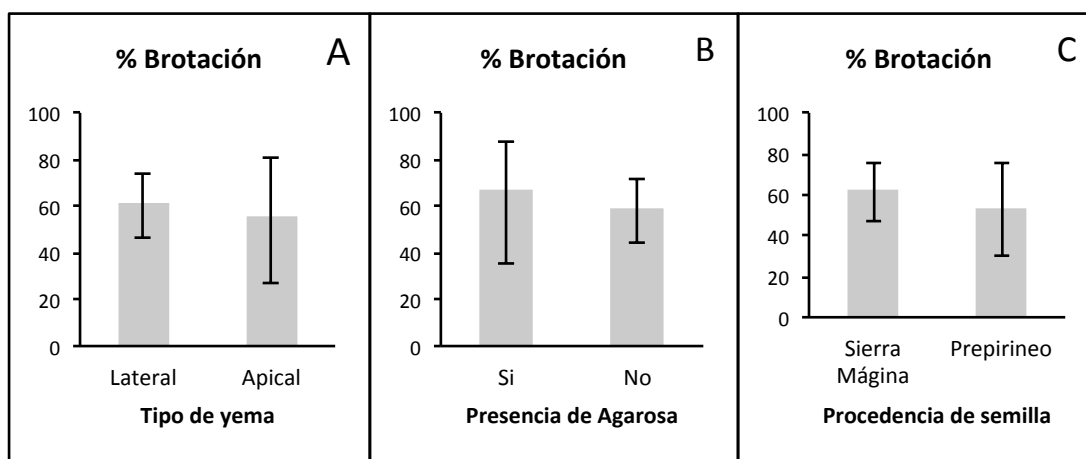


Figura 53. Porcentaje de brotación de injertos según el tipo de yema (A), presencia de agarosa (B) y procedencia de la semilla (C) (las barras indican el Intervalo de Confianza al 95%).

A los 7 días, en caso de unión en el injerto, la yema ya comenzaba a brotar (Figura 54-A), produciéndose un rápido crecimiento del nuevo brote en tres semanas (Figura 54-B) que estaría listo para su trasplante a campo en 5 semanas (Figura 54-C), para continuar con su crecimiento.



Figura 54. Evolución de un injerto brotado a los 7 (A), 21 (B) y 35 (C) días.

3.9.2 Mini-Injerto in vitro

El mini-injerto se realizó con yemas de distintas variedades de *P. vera* de brotes creciendo in vitro sobre plántulas provenientes de semillas de *P. terebinthus* germinadas in vitro. Los microinjertos realizados con *P. vera* 'AD15' y 'Peters' presentaron un elevado porcentaje de prendimiento de injerto, que va de un 71% en el caso del injerto realizado a bisel con una yema lateral de 'AD15', hasta un 100% de uniones en el caso de las yemas apicales de 'AD15' y yemas laterales de 'Peters' en el mismo tipo de injerto (Figura 55).

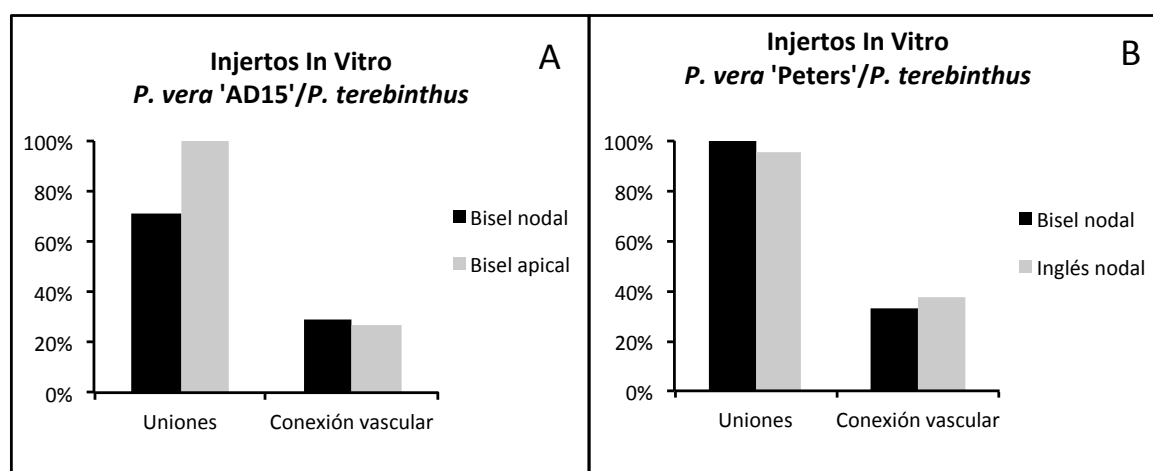


Figura 55. Porcentaje de uniones y conexión vascular en los injertos in vitro de *P. vera* 'AD15' (A) y *P. vera* 'Peters' (B) sobre *P. terebinthus*.

En estos injertos, tanto el patrón como la variedad se encontraban fuertemente unidos y se formó un callo a lo largo de toda la unión (Figura 56-A y B), visible con un microscopio estereoscópico. Sin embargo, aunque el brote injertado no llegó a desarrollarse, éste se mantuvo vivo, permaneciendo verde y turgente. Sin embargo, los injertos en los que no se produjo unión estaban marrones y secos a los 3 días.



Figura 56. Injertos de *P. vera* 'AD15' sobre *P. terebinthus* 'T6' a bisel (A) e inglés (B), con formación de callo en las uniones.

3.9.2.1 Estudio microscópico

Se realizaron cortes histológicos del injerto a las 4 semanas (Figura 57-A y B) en los que se hicieron diversas observaciones (Figura 58-A, B y C) para valorar el grado de unión, mediante la observación de la proliferación celular, la formación de callo, la presencia de áreas con necrosis, la diferenciación celular y la presencia de conexión vascular entre patrón y variedad.



Figura 57. Injertos seccionados, a bisel (A) e inglés (B) respectivamente, donde se observa una buena unión entre patrón (*P. terebinthus* 'T6') y variedad (*P. vera* 'AD15').

No en todos los injertos con uniones con prendimiento se encontró presencia de conexión vascular. El mejor resultado alcanzó hasta un 38% de las uniones con conexiones vasculares, utilizando un injerto inglés con yema lateral del cultivar 'Peters'. La presencia de conexión vascular fue del 33% de los injertos en bisel para esta misma variedad. Para la selección 'AD15' la presencia de conexión vascular fue algo menor siendo del 29% para el injerto en bisel y del 27% para el inglés. No se observó una relación entre el porcentaje de uniones prendidas con la presencia de conexión vascular. Sin embargo, tanto en las dos variedades que se injertaron, como en las tres combinaciones diferentes de injerto que se realizaron, se encontraron conexiones vasculares (Figura 55).

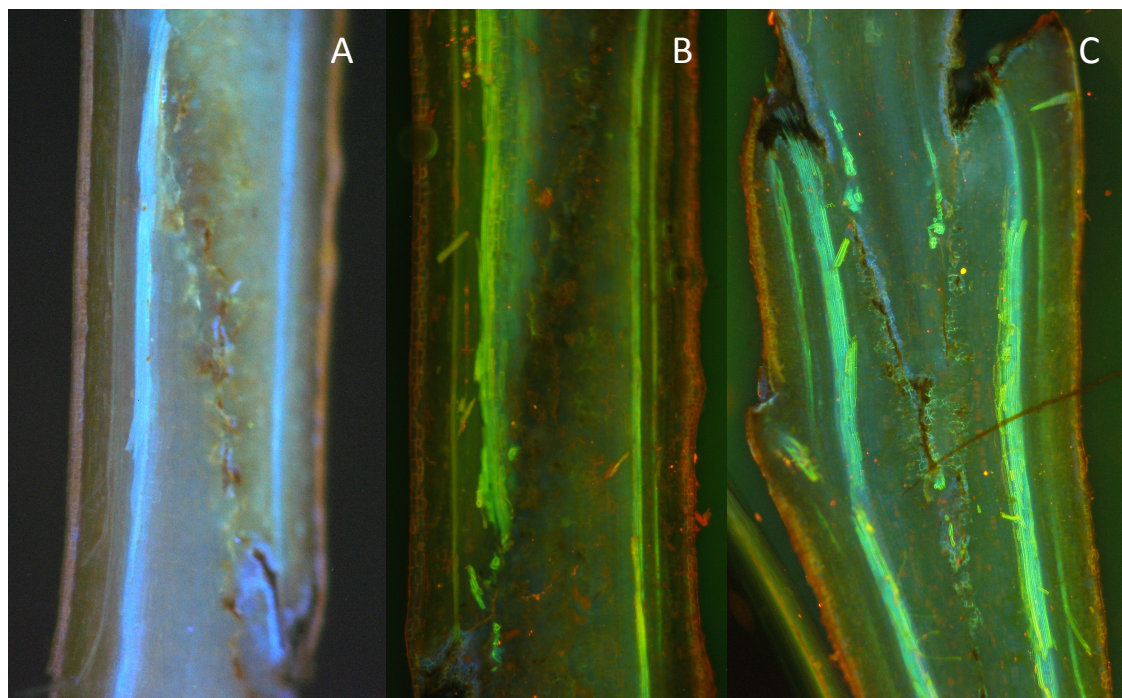


Figura 58. Injertos con prendimiento a bisel (A y B) e inglés (C), seccionados y teñidos con naranja de acridina, observados al microscopio con luz ultravioleta.



PISTACHIER.

a. l.

4. DISCUSIÓN

4 Discusión

En este trabajo se han desarrollado una serie de protocolos que han permitido establecer y multiplicar in vitro variedades y patrones de las especies *P. vera* y *P. terebinthus*, lo que ha permitido obtener material vegetal de tamaño reducido y lograr así un injerto de taller para mejorar en un futuro los problemas de propagación que sufre este cultivo.

Establecimiento de material vegetal de *P. vera* y *P. terebinthus*

Se han establecido 5 variedades de *P. vera* y 2 clones de *P. terebinthus* a partir de material adulto. Además se establecieron 2 líneas a partir de semilla de *P. terebinthus*. En pistachero, el establecimiento de cultivos in vitro se ha venido realizando en general a partir de semillas germinadas de diferentes variedades ya que es una especie difícil de cultivar in vitro y únicamente algunas variedades de *P. vera* han sido introducidas a partir de material adulto (Aboussalin y Mantell, 1992; Tilkat y Onay, 2009). Sin embargo, los protocolos descritos en estos casos no funcionaron en nuestras variedades y condiciones.

En el establecimiento de material in vitro uno de los retos es la eliminación de las contaminaciones que de otra forma crecen en el medio de cultivo impidiendo el desarrollo del material introducido. Los métodos de eliminación son diversos y su elección depende del material vegetal y las condiciones ambientales en las que se desarrolla (Pierik, 1990).

En nuestras condiciones se testaron 6 tratamientos de desinfección y apenas hubo diferencias en el porcentaje de contaminación entre los métodos de esterilización basados en mercurio (HgCl_2) o hipoclorito sódico (NaClO), manteniéndose los brotes libres de contaminación por encima del 80% en ambos casos. Este porcentaje fue muy superior al obtenido con la variedad 'Mateur' a partir de árboles injertados de tres años, donde los porcentajes de brotes libres de contaminación fueron del 10% (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1995). La diferencia tan alta entre un trabajo y otro puede ser debida a la mayor concentración de cloro activo utilizada en nuestro caso (10g/l) frente a la utilizada por Dolcet-San Juan (5 g/l). Se ha mostrado así la necesidad de usar dosis altas para reducir eficazmente las contaminaciones y aumentar así las posibilidades de éxito en del establecimiento.

Con caña de azúcar (Tiwari, 2012) y comparando los mismos tratamientos e idénticas concentraciones que en este trabajo, obtienen mejores resultados con NaClO, con un 96% de brotes sin contaminación, frente a un 61% en el caso de HgCl₂. Con unos resultados tan similares, se podría descartar el HgCl₂ para posteriores instalaciones de cultivo debido a su gran toxicidad, tanto para las plantas como para los animales y el hombre (Pierik, 1990).

El método de desinfección basado en PPM presentó una eficacia menor en eliminación de las contaminaciones ya que se obtuvo un 70% de los brotes sin contaminar. Esto hace que resulte más efectivo y práctico el método de esterilización con lejía. Otros autores que han utilizado PPM como método de desinfección de semillas de algodón (Barampuram, 2014), concluyen que el uso de PPM no mejora la eficacia de la esterilización ni la ratio de germinación y supone un coste adicional.

Además las condiciones de recogida de material fueron altamente propicias para la proliferación de contaminaciones en el establecimiento del material vegetal, ya que, como se ha mencionado anteriormente, estaba lloviendo y la humedad, según nuestra experiencia previa, aumenta la proliferación de contaminantes superficiales, por lo que podemos considerar la instalación de material, en cuanto a contaminaciones se refiere, como un éxito.

Las diferencias en el número de contaminaciones entre especies ha sido elevada, ya que varían entre un 12% de contaminaciones en *P. vera* hasta un 37% en el caso de *P. terebinthus*. Dado que con las dos especies el protocolo seguido fue exactamente el mismo y no hubo ninguna diferencia ni en el espacio ni en el tiempo, no hay una explicación clara, y únicamente se pueden hacer conjeturas como que la propia estructura de la yema favorece la acumulación de bacterias y esporas en su interior, de difícil acceso para su eliminación, y que se desarrollan una vez establecidas las yemas en el medio de cultivo.

Brotación y supervivencia de los brotes

A pesar de que los porcentajes de brotación considerados en conjunto, son bajos, de un 19% en *P. vera* y un 12% en *P. terebinthus*, comparados con otras especies de fácil introducción, como *Prunus insitita*, con un porcentaje de establecimiento del cultivo de un 64% (Andreu y Marín, 2005), hay que tener en cuenta que la micropropagación de pistachero a partir material de árboles adultos es muy difícil

(Tilkat *et al.*, 2008). De hecho, a pesar de que hay autores que han logrado micropropagar cultivares adultos de pistachero, concretamente el cultivar 'Mateur' (Tilkat *et al.*, 2008; Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1995), no dan datos del porcentaje de brotación inicial. Otros autores (Benmahiou, 2012; Akdemir, 2014), en trabajos de micropropagación y enraizamiento de *Pistacia vera*, únicamente utilizan planta de semilla, lo que es difícilmente comparable con yemas in vitro procedentes de árboles adultos.

El principal problema durante el establecimiento de cultivos asépticos de pistachero, como de otras plantas leñosas, es el exudado de fenoles al medio que produce su pardeamiento y la muerte prematura de los explantos (Abousalim and Mantell, 1994; Barghchi and Alderson, 1996; Bairu *et al.*, 2009a, 2009b; Onay *et al.*, 2007; Tabiyeh *et al.*, 2006). A pesar de ser un problema muy extendido no se ha conseguido una explicación conclusiva. En bambú se ha relacionado con la actividad de la enzima polifenol oxidasa (Huang *et al.*, 2002) y Leng *et al.*, (2009) encontraron en plántulas de semilla de *P. vera* una correlación positiva entre el pardeamiento de los tejidos y el contenido de fenoles endógenos. Los antioxidantes como el ácido ascórbico o cítrico pueden prevenir el pardeamiento y en nuestro caso se usaron sistemáticamente tanto en el lavado del material como en el medio de cultivo (García *et al.*, 2010) consiguiendo la brotación y establecimiento de todo el material procedente de árboles adultos tanto de *P. vera* como de *P. terebinthus*.

En esta primera etapa de la brotación de yemas de nueva introducción se aprecia la enorme importancia que va a tener el genotipo en todo el proceso de la micropropagación, ya que hay especies de *P. vera* que alcanzan porcentajes de brotación de casi el 35% como el cultivar 'Larnaka' y otros como 'Peters' que apenas llegan a un 10%. Otros trabajos de introducción de yemas de *P. vera* a partir de explantos nodales de árboles adultos, hablan de una supervivencia del 40% de los brotes (García *et al.*, 2010).

Esto nos da una idea de la variabilidad que presenta el pistachero, y en el caso de terebinto podría ser debido a proceder de selecciones propagadas por medio de semillas, lo que causa también bastante heterogeneidad a la hora de usar estas semillas como origen de portainjertos.

Multiplicación de material vegetal de *P. vera* y *P. terebinthus*

Una vez establecido el material, éste se multiplicó adaptando los protocolos para cada uno de los clones. Las variedades 'AD15', 'Lanarka', 'Kerman' y 'Peters' y los clones de terebinto 'T6', 'T7', 'VLLM1' y 'SMMM1' se multiplicaron subcultivando el material cada 3 semanas y todavía se mantienen en cultivo con adecuadas tasas de multiplicación y reducida tasa de necrosis apical.

La multiplicación de cultivares de *P. vera* y *P. terebinthus* no ha estado exenta de problemas y hemos tenido que hacer frente a varias dificultades como:

- Emisión de sustancias tóxicas en los medios nutritivos. En la siembra de los segmentos nodales ya se observaba cómo, en cuestión de horas, aparecían unos exudados de color marrón oscuro o/y negros alrededor de la mini-estacilla, acompañados del decaimiento del cultivo y de su muerte, lo que obligó a cambiar de medio con mucha frecuencia los primeros días. Los exudados han continuado a lo largo de la multiplicación, aunque no en igual medida que en la introducción, y repercuten en la calidad de la planta, lo que ha obligado a hacer modificaciones en el medio de cultivo.

- Necrosis apical del material. Este problema es una constante en todas las especies de *Pistacia*, independientemente de la especie y de la variedad, y que se ha solucionado parcialmente acortando los tiempos de subcultivo con respecto a otras especies del género *Prunus*. Además se han estudiado modificaciones en el medio, cambiando y añadiendo citoquininas para minimizar este problema.

- Paradas vegetativas. Ha sido especialmente importante en el clon de *P. terebinthus* 'VLLM1'. La planta no se muere pero tampoco produce nuevos brotes. Este problema se ha solucionado combinando distintas concentraciones y tipos de citoquininas.

- Contaminaciones endógenas. Estas contaminaciones, se hicieron visibles en los cultivares 'Peters' y 'VLLM1' al año y medio y tres años de estar en cultivo in vitro cuando se encontraba en pleno rendimiento. Para combatir este problema se han añadido antibióticos al medio de cultivo lo que en ocasiones ha provocado fenómenos fitotóxicos en los cultivares.

- Enraizamiento del material vegetal. Ha sido sin duda el mayor problema al que se ha tenido que hacer frente. Se ha solucionado en algunos cultivares, pero en otros es necesario encontrar un método adecuado de inducción de raíces.

- Aclimatación del material vegetal. Una planta que se ha originado *in vitro* difiere en muchos aspectos de las que se originan *in vivo*. Las hojas tienen la cutícula escasamente desarrollada debido a la alta humedad relativa del ambiente de cultivo y las raíces que se han originado *in vitro* no son funcionales y han de adaptarse al nuevo ambiente. Todo esto dificulta enormemente la transición de las condiciones *in vitro* a *in vivo*.

Los problemas en la multiplicación que se han observado en este trabajo son una constante a lo largo de todos los trabajos de cultivo *in vitro* de pistachero de otros autores. Mederos-Molina (1999) en un trabajo con el cultivar 'Mateur' afirma que los primeros signos de pardeamiento del brote y del medio de cultivo se hacen visibles tan solo 1 hora después del inicio del cultivo. Dolcet-Sanjuan (1995) ya describe en este cultivar que retrasando el subcultivo a cuatro semanas no se estimula la multiplicación y aumenta la secreción de compuestos fenólicos al medio y Tilkat (2008) afirma que en el cultivar macho 'Atli' la necrosis apical fue resuelta con periodos de subcultivo cortos.

En el caso de *Pistacia terebinthus*, Chelli-Chaabouni y Drira (2002) constatan que la capacidad de proliferación de los brotes mejora después de varios subcultivos, lo que coincide con nuestro material, al que, como se ha comentado, le cuesta aproximadamente 1 año comenzar a multiplicar adecuadamente. De nuevo Chelli-Chaabouni *et al.*, (2011), después de trabajar con tres especies diferentes de *Pistacia*, *P. lentiscus*, *P. terebinthus* y *P. atlántica*, confirma la complejidad de los factores que determinan el crecimiento de las yemas apicales *in vitro*, donde influyen el genotipo, la edad de los árboles e incluso la fecha de la obtención del material *in vivo*.

Los resultados de multiplicación con una tasa de entre 2, 8 y 4, 3 brotes por brote muestran una adaptación adecuada al cultivo *in vitro* una vez que se añadieron antioxidantes al medio de cultivo para eliminar los abundantes exudados que producen los brotes en el propio medio, considerado como uno de los principales problemas en el cultivo *in vitro* del pistachero (Tabiyeh *et al.*, 2006). Otros autores

obtienen una tasa de multiplicación de 2-4 brotes por explanto con la variedad 'Antep' (Onay, 2000), añadiendo también ácido ascórbico al medio de cultivo o, en el caso de la variedad 'Mateur', obtienen unos ratios de multiplicación ligeramente superiores a 2 brotes por explanto (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1995).

Factores que afectan a la necrosis apical de brotes de *P. vera* cultivados in vitro

En la fase de multiplicación los brotes de pistachero muestran a menudo ápices necrosados (Barghchi y Alderson, 1996; Bairu y Stirk, 2009b). La incidencia de la necrosis se ha visto que puede ser menor con el uso de un medio de cultivo adecuado u otras condiciones de cultivo como aumento de la ventilación o una combinación hormonal adecuada. El uso de unas condiciones adaptadas a los cultivos permitió en este trabajo reducir la incidencia de necrosis apical desde un 80% hasta el 47 %.

Los medios de cultivo comparados difieren notablemente en su composición mineral. Dentro de los elementos minerales que más se relacionan con la presencia de necrosis apical se encuentran el boro y el calcio (Barghchi y Alderson, 1989). El ión Ca^{2+} está involucrado en la morfogénesis in vitro y se requiere para muchas de las respuestas inducidas en las plantas por los reguladores de crecimiento (George, 1993). Una de las diferencias más notables entre los diferentes medios de cultivo testados es la concentración de calcio, así, el medio DKW triplica su concentración respecto a MS y a WPM, sin embargo, el boro tiene una concentración similar. Los resultados indicaron una menor incidencia de la necrosis en el medio con mayor concentración de Ca, el DKW, frente a los otros dos medios de cultivo. La deficiencia de calcio en las plantas ha sido asociada con necrosis apical y un pobre crecimiento de las raíces en diversas especies cultivadas in vitro, como el pistachero (Barghchi y Alderson, 1989 y 1996) y otras plantas leñosas (Singha *et al.*, 1990; Piagnani *et al.*, 1996; Bairu *et al.*, 2009; Thakur y Kanwar, 2011). En *P. vera* la adición de calcio al medio de cultivo produjo una reducción en la incidencia de necrosis cuando los brotes se multiplicaron en medio MS, sin afectar a la multiplicación de brotes, y no así la adición de boro (Abousalim y Mantell, 1994; Barghchi y Alderson, 1996). Sin embargo, la adición de Ca a nuestro medio de cultivo DKW no redujo la incidencia de necrosis probablemente debido a la alta concentración ya incluida en la formulación del medio.

Otra forma de controlar la necrosis apical, ha sido por la aplicación de distintos tratamientos que favorecen la transpiración dentro del frasco de cultivo, como el

enfriamiento basal, el uso de un frasco ventilado de mayor volumen o la reducción del número de brotes, en los que las diferencias en el porcentaje de brotes con ápices necrosados fueron estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.001$).

Entre los factores estudiados, el menor número de brotes por frasco de cultivo (5 brotes frente a 7 en el control) ha tenido un efecto importante en la reducción de la necrosis apical, siendo el tratamiento que presentó el menor porcentaje de brotes con necrosis, con una diferencia muy significativa ($p < 0,001$) respecto al control y al tratamiento con gluconato de calcio, aunque las diferencias no son significativas respecto a los tratamientos de enfriamiento basal y al frasco de cultivo de mayor volumen, quizá por el tamaño de la muestra.

La mayor aireación y disponibilidad de medio de cultivo por brote cultivado, aumentada en el tratamiento con menor número de brotes (un 40%) y en el cultivo en frascos de gran volumen (50%) parece tener un efecto beneficioso en la necrosis apical, similar al aumento de la transpiración debido al enfriamiento basal. La creación de un gradiente de humedad relativa dentro del frasco, que disminuye desde la superficie del medio de cultivo hasta la tapa del frasco, favorece una mayor transpiración y mejora el transporte de nutrientes hasta la parte superior del brote. El gradiente se ha realizado, por una parte, mediante el enfriamiento basal del frasco de cultivo, creando un gradiente térmico al colocar los frascos en una superficie refrigerada a 6°C por debajo del ambiente de la cámara de cultivo, y por otra, mediante la utilización de frascos de cultivo con tapas con membranas porosas de 0.22 μm de diámetro de poro, que permiten el intercambio de gases pero no la entrada de microorganismos.

En otros trabajos la reducción de la humedad relativa o el aumento de la aireación en los frascos no produjeron ningún efecto sobre la necrosis apical en pistachero (Barghchi y Alderson, 1996), aunque se sabe que el volumen del contenedor usado y el número de brotes cultivados puede afectar al crecimiento y morfogénesis *in vitro*, probablemente debido a que produce cambios en la concentración de oxígeno, dióxido de carbono, etileno u otros volátiles (George, 1993).

La mayor aireación y disponibilidad de medio de cultivo no parece tener, sin embargo, una relación directa con el número de entrenudos, que parecen depender de otros factores como los reguladores de crecimiento (Sghir *et al.*, 2005), pero sí guarda

relación la tasa de multiplicación que fue máxima en el frasco de mayor volumen. En general, las condiciones óptimas tanto de la forma como del tamaño del frasco de cultivo son muy diferentes entre especies y varían también al variar otros factores como el tipo del material del recipiente, tipo de cierre o volumen del medio de cultivo (George, 1993).

Tanto la mejora en la transpiración de los brotes, como la mayor disponibilidad de medio de cultivo por brote cultivado, son beneficiosas para el cultivo de pistachero *in vitro*, reduciendo la aparición de ápices necrosados y mejorando la calidad del brote, con un color más verde y mayor turgencia

Enraizamiento

El enraizamiento de los cultivares de pistachero ha sido un factor crítico en la micropropagación del género *Pistacia*, tanto del *Pistacia vera* como del *Pistacia terebinthus*. La ausencia de enraizamiento, la falta de sincronía en la aparición de raíces o el escaso número de raíces por brote son frecuentes en la propagación del pistachero (Onay, 2000; Tilkat *et al.*, 2009; García *et al.*, 2010), así como el decaimiento del brote y la necrosis apical (Benmahiou *et al.*, 2012; Chatibi *et al.*, 1997). El enraizamiento ha destacado por ser una de las fases mas genotipo dependientes resultando, al final de los trabajos de optimización de protocolos, que unos clones han conseguido enraizar con un elevado porcentaje de éxito ('AD15'), mientras encontramos otros clones recalcitrantes en los que el enraizamiento es escaso y lento, lo que produce brotes enraizados de poca calidad para poder proceder a su aclimatación (caso de 'Larnaka' o 'Peters').

Para mejorar el enraizamiento y la calidad del brote enraizado se han probado diferentes tratamientos en distintas especies: el aumento en la aireación y transpiración (García *et al.*, 2011), la reducción de la oxidación de la auxina con antioxidantes o con floroglucinol (Lis-Balchin, 1989; De Klerk *et al.*, 2011), o el uso de antigiberelinas como el paclobutrazol (Davis *et al.*, 1985).

Tanto el pH, como los cambios en los reguladores de crecimiento o antioxidantes en el medio de cultivo han sido estudiados en este trabajo para mejorar el bajo enraizamiento inicial de la variedades de pistachero establecidas en cultivo *in vitro*. Únicamente en el clon 'AD15' se alcanzaron buenas ratios de enraizamiento, superando el 80%. Esto se consiguió añadiendo paclobutrazol al medio de

enraizamiento. El paclobutrazol, además de incrementar los porcentajes de enraizamiento enormemente, logró que las raíces apareciesen de forma sincronizada, a la vez que los brotes se mantenían en buenas condiciones para ser aclimatados. Sin embargo, con el resto de cultivares, 'Peters', 'Kerman' y 'Larnaka' se obtuvieron tasas de enraizamiento más bajas, a pesar de utilizar el paclobutrazol, aunque también logró mejorar el enraizamiento con respecto al control que fue nulo en los tres casos.

En las plantas de *P. terebinthus* procedentes de semilla se han obtenido muy buenos porcentajes de enraizamiento, mejorando incluso con la adición de paclobutrazol al medio, pasando de un 80% hasta casi un 100% de brotes con raíces. Aunque el porcentaje de enraizamiento sin la adición de paclobutrazol al medio ya es elevado, hay que señalar que, al igual que ha sucedido con *P. vera*, con paclobutrazol se logró una sincronía en la aparición de raíces y se mejoró enormemente la calidad de los brotes.

Estos buenos resultados con plantas procedentes de semilla, no pudieron ser repetidos en el caso de brotes obtenidos a partir de árboles adultos, como fue el caso del clon 'VLLM1', cuyo porcentaje de enraizamiento con paclobutrazol en el medio de cultivo apenas superó un 20%, y la calidad de los brotes obtenidos tampoco fue la deseada para pasar a la siguiente fase de aclimatación. Es notable que el porcentaje de enraizamiento de este mismo clon en ausencia de paclobutrazol fue del 0%, de manera similar a los resultados obtenidos por otros autores con plantas procedentes de árboles adultos (Gannoun *et al.*, 1995).

El efecto del paclobutrazol en el enraizamiento, citado por primera vez en esquejes de *Plectranthus australis* e hipocotilos de *Phaseolus vulgaris* (Davis *et al.*, 1985) fue pronto probado en árboles frutales con diferentes resultados (Marino, 1988), ya que mejoró el enraizamiento en algunos cultivares de peral y patrones híbridos seleccionados de *Prunus*, pero no en el patrón de guindo CAB (*Prunus cerasus* L.).

El paclobutrazol, actuando como inhibidor de la giberelina, parece ser el responsable de promover el enraizamiento, ya que la giberelina reduce la inducción de primordios radiculares (Haissig, 1972). Además, la adición de giberelinas inhibe el enraizamiento en *Populus* y *Arabidopsis thaliana* afectando al transporte de auxinas (Mauriat *et al.*, 2014). En este trabajo hemos visto un efecto positivo en el

enraizamiento de cultivares de pistachero con un componente genotípico, ya que AD15 y Kerman enraizaron mejor que Peters o Larnaka en presencia de paclobutrazol.

El antioxidante de la auxina phloroglucinol tuvo en este trabajo un efecto moderado en el enraizamiento del cultivar 'AD15', alcanzando un 33% de brotes enraizados, sin embargo las raíces aparecen con retraso y los brotes apicales se volvieron necróticos. Además, el antioxidante α -tocoferol (vitamina E), también incrementó el enraizamiento, superando el 45% de los brotes enraizados, pero las raíces aparecen también con retraso y los brotes apicales se vuelven igualmente necróticos. De Klerk *et al.* (2011) encontraron un efecto promotor del phloroglucinol en el enraizamiento. Además, este efecto se encontró también, en presencia o no de auxinas, en cerezo (Hammatt, 1994). El efecto de promover el enraizamiento por el phloroglucinol se ha observado en numerosas especies, sin embargo, no es universal, habiendo sido publicados numerosos ejemplos, recogidos en una reciente revisión (Teixeira da Siva *et al.*, 2013).

Mini-Injerto

La importancia del vigor del portainjerto en el injerto del pistachero ha sido ampliamente estudiada (Opitz y Ross, 1976; Stockton *et al.*, 1991). Guerrero *et al.* (2007), en estudios más recientes de campo, observaron que el diámetro de las plantas injertadas era un factor clave en el aumento del porcentaje del prendimiento del injerto.

Onay *et al.* (2003) observaron la diferencia de diámetros entre patrones y vieron que *P. Vera* proporcionaba tallos con mayor diámetro que los portainjertos de *P. terebinthus* y *P. khinjuk*, que mostraron un diámetro de tallo más reducido.

En nuestros injertos realizados in vivo con plántulas de semillas de hasta 4 meses, se ha encontrado un efecto positivo entre el diámetro del tallo y la brotación de las yemas injertadas. El éxito del injerto aumenta cuanto mayor es el diámetro del tallo, hasta un máximo a 5 mm, con un éxito del 100%. No ha sido posible evaluar el injerto con brotes de mayor diámetro ya que los patrones no alcanzaron mayores diámetros en ese periodo de tiempo.

El microinjerto in vitro en pistachero ha sido realizado con éxito muy pocas veces utilizando brotes en crecimiento de *P. vera*, tanto como potainjerto, como

variedad (Onay *et al.*, 2004; 2007). Otros estudios histológicos de uniones de microinjerto en pistachero (Abousalim *et al.*, 1992) mostraron que a los 21 días se establecieron conexiones vasculares entre el patrón y la variedad, lo que proporcionó una evidencia de la producción de uniones viables.

Los injertos in vitro permitieron monitorizar con métodos histológicos la evolución del injerto desde las etapas iniciales. Usando microscopía de fluorescencia se pudo identificar la proliferación celular, la diferenciación celular y las conexiones vasculares entre injerto y patrón, tan sólo dos semanas después del injerto.

A pesar de que el microinjerto obtuvo un éxito notable de prendimiento, mayor que el injerto in vivo, el desarrollo posterior de la yema se vio interrumpido. Nuevas condiciones deberán ser testadas con el fin de avanzar en la propagación de la especie, de manera que este crecimiento posterior no se detenga y permita la obtención de planta injertada. Estos injertos permitieron, sin embargo, un estudio microscópico precoz, describiendo las fases de desarrollo que se producen en el inicio por el contacto entre patrón y variedad.



1. *Pistacia terebinthus*, L. 2. *Pistacia lentiscus*, L.

J. Salinas pinh.

LIT. DE J. M. MATEU, BARCELONA. N.º 5, MADRID.

5. CONCLUSIONES

Laguna y Villanueva, M., Avílla y Zumarán, P. de, Flora forestal española, Atlas, vol. 2: t. 58, fig. 1, fig. 2 (1890)

5 Conclusiones

Se han introducido en cultivo in vitro con éxito 4 cultivares de *P. vera* y 2 cultivares de *P. terebinthus*, quedando patente durante todo el proceso que incluye el establecimiento, la multiplicación y el enraizamiento, la enorme importancia que tiene el genotipo en estas dos especies, que va a condicionar el éxito en la micropropagación.

La desinfección de material vegetal con hipoclorito de sodio se presenta como un método eficaz para la instalación de cultivos in vitro de *P. vera* y *P. terebinthus*, por encima del cloruro de mercurio y el PPM, dada su alta eficacia y su baja toxicidad, aumentando el éxito de la brotación en 6 de los 7 genotipos introducidos.

El éxito en la brotación de yemas de *P. vera* y *P. terebinthus* no garantiza la instalación del cultivo in vitro, ya que al cabo de pocos meses el 50% de las yemas brotadas acabó muriendo por no adaptarse a las condiciones de cultivo in vitro.

La germinación in vitro de semillas de terebinto fue un éxito, igualando casi a la germinación en sustrato en invernadero, lo que lo convierte en un método eficaz para la introducción in vitro de material juvenil dada la extraordinaria dificultad que supone introducir in vitro árboles adultos.

La necrosis apical constituye el principal problema en la fase de multiplicación del pistachero, la incidencia fue disminuida con un medio de cultivo adaptado a cada cultivar, aumentando la ventilación en el frasco de cultivo, con una disminución del número de brotes por recipiente y acortando los tiempos de subcultivo.

El enraizamiento in vitro de los distintos cultivares de *P. vera* ha destacado por ser una de las fases más genotipo-dependientes observando cultivares con un elevado porcentaje de éxito y otros cultivares recalcitrantes en los que el enraizamiento es escaso y lento, lo que produce brotes enraizados de poca calidad para poder proceder a su aclimatación.

El enraizamiento de clones de *P. terebinthus* se ha mostrado también genotipo-dependiente, y para los clones testados en este trabajo, el enraizamiento resultó ser muy dependiente del tipo de material: ya sea material juvenil, procedente de semilla, o material introducido a partir de árboles adultos, donde el enraizamiento presenta mayores dificultades.

El paclobutrazol incrementa los porcentajes de enraizamiento enormemente en la selección de *P. vera* 'AD15' y en plantas de *P. terebinthus* procedentes de semilla y logra que las raíces aparezcan de forma sincronizada, a la vez que los brotes se mantienen en buenas condiciones para ser aclimatados. Entre los clones de *P. terebinthus* resulta también imprescindible la presencia de este regulador de crecimiento para inducir el enraizamiento.

El phloroglucinol y el α -tocoferol tienen en este trabajo un efecto moderado en el enraizamiento del cultivar 'AD15', sin embargo las raíces aparecen con retraso y los brotes apicales se vuelven necróticos. En *P. terebinthus* se ha observado el efecto beneficioso de la presencia de antioxidantes.

Cada clon de *P. vera* y *P. terebinthus* requiere de un protocolo independiente para su establecimiento, multiplicación y enraizamiento in vitro, haciendo extremadamente laborioso el desarrollo de un protocolo para su cultivo in vitro.

La aclimatación de los brotes enraizados del cultivar 'AD15', ha permitido obtener planta en invernadero miniaturizada y probar así el injerto sobre planta de semilla de *P. terebinthus* en una etapa temprana.

El injerto in vivo con planta miniaturizada se muestra como un método de injerto muy eficaz, aumentando el éxito del injerto cuanto mayor es el diámetro del tallo, hasta un máximo de 5 mm, con un éxito del 100%.

A pesar de que el microinjerto obtuvo un éxito notable de prendimiento, mayor que el del injerto in vivo, el desarrollo posterior de la yema se vio interrumpido. Estos injertos permitieron, sin embargo, el estudio microscópico precoz, describiendo las fases de desarrollo que se producen durante el inicio del injerto por el contacto entre patrón y variedad.

Se ha logrado con éxito el establecimiento y multiplicación in vitro de variedades y patrones de las especies *P. vera* y *P. terebinthus*, desarrollando protocolos que permitirán su propagación con el objetivo de obtener material de reducido tamaño para establecer un injerto de taller que ayude a superar los graves problemas de abastecimiento de planta injertada que sufre este cultivo. Este injerto ha sido factible tanto in vivo como in vitro abriendo de esta forma otras fronteras para la obtención de planta de pistachero mas allá de la propagación tradicional.



PISTACCIA vera .

P. J. Redouté pinx.

PISTACHIER cultivé.

M^{re} Janinet Sculp.

6. BIBLIOGRAFÍA

Duhamel du Monceau, H.L., Traité des arbres et arbustes, Nouvelle édition [Nouveau Duhamel], vol. 4: t. 17 (1809) [P.J. Redouté]

6 Bibliografía

- Abousalim, A. y Mantell, S.H., 1992. Micrografting of pistachio (*Pistacia vera* L. cv mateur). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 29(3): 231-234.
- Abousalim, A. y Mantell, S.H., 1994. A practical method for alleviating shoot-tip necrosis symptoms in in-vitro shoot cultures of *Pistacia vera* cv Mateur. Journal of Horticultural Science 69(2): 357-365.
- Akdemir, H.; Suzerer, V. y Onay, A., 2014. Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. Plant Cell Tissue and Organ Culture 117(1): 65-76.
- Andreu, P. y Marín, J.A., 2005. In vitro culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock 'Adesoto 101' (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. Scientia Horticulturae 106 (2): 258-267.
- Arbeloa, A.; Daorden, M.E.; García, E.; Wünsch, A.; Hormaza, J.I. y Marín, J.A., 2006. Significant effect of accidental pollinations on the progeny of low setting *Prunus* interspecific crosses. Euphytica 113:163-185.
- Bairu, MW.; Jain, N.; Stirk, WA.; Doležal, K. y Van Staden, J., 2009 (a) Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. S. Afr. J. Bot. 75:122-127.
- Bairu, M.W. y Stirk, W.A., 2009 (b). Factors contributing to in vitro shoot-tip necrosis and their physiological interactions. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 98: 239-248.
- Barampuram, S.; Allen, G. y Krasnyanski, S., 2014. Effect of various sterilization procedures on the in vitro germination of cotton seeds. Plant cell tissue and organ culture 118(1): 179-185.
- Barghchi M. y Alderson P.G., 1985. In vitro propagation of *P. vera* L. and commercial varieties of Ohaidi and Kalleghochi. J. Hort. Sci. 60: 423-440.
- Barghchi M. y Alderson P.G., 1989. Pistachio (*Pistacia vera* L.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 5, Trees II. Berlin. Bajaj YPS, Ed. 68-98.

- Barghchi M. y Alderson P.G., 1996. The control of shoot tip necrosis in *Pistacia vera* L. in vitro. *Plant growth regulation* 20(1): 31-35
- Beede, R.H.; Ferguson, L.; Wylie, Ch. y Fanucchi, C., 2005. Planting and training Young trees. Dans: *Pistachio Production Manual*, Ferguson, L. (ed.). University of California: 57-59.
- Benmahioul, B.; Dorion, N.; Kaid-Harche, M. y Daguin, F., 2012. Micropropagation and ex vitro rooting of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 108 (2) 353-358.
- Chatibi, A.; Kchouk, M.E.; Abdallah, F.B.; Zemni, H. Y Ghorbel, A., 1995. Rooting improvement of *Pistacia vera* L. cv. Mateur by in vitro culture of apices and cuttings. *Acta Horticulturae* 455: 213-219.
- Chatibi, A.; Kchouk, M.L.; Mliki, A.; Zemmi, H. y Ghorbel, A., 1997. Use of growth regulators for adventitious shoot regeneration and plant propagation from mature cotyledon of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Acta Horti* 441:263-269
- Cheé, R. y Pool, R.M., 1987. Improved inorganic media constituents for in vitro shoot multiplication of *Vitis*. *Sci. Hort.* 32: 85-95.
- Chelli-Chaabouni, A. y Drira, N., 2002. Culture media and hormone effects on the micropropagation of two pistachio species. *Acta Horticulturae ISHS* 591: 395-398.
- Chelli-Chaabouni, A.; Gargouri, R. y Drira, N., 2011. Micropropagation of pistachio species by shoot apex culture. *Acta Horticulturae ISHS* 912: 529-537.
- Couceiro, J.F., 1997. La adaptación ecológica del pistachero (*Pistacia vera* L.) en la provincia de Ciudad Real. Tesis Doctoral. ETSIA. Madrid. 463 pp.
- Couceiro, J.F.; Coronado, J.M.; Menchén, M.T. y Mendiola, M.A., 2000. El cultivo del pistachero. Agrolatino, S.L. (Ed.). 112 pp.
- Couceiro, J.F. y Guerrero, J., 2002. Current situation of pistachio cultivation in the Castilla La Mancha region (Spain). *Acta Horticulturae ISHS* 591: 175-176.
- Couceiro, J.F.; Guerrero, J.; Gijón, M.C.; Moriana, A.; Pérez-López, D. y Rodríguez, M., 2013. El cultivo del pistacho. Ediciones Mundi-Prensa. 726pp.

- De Klerk, G.J.; Guan, H.; Huisman, P. y Marinova, S., 2011. Effect of phenolic compounds on adventitious root formation and oxidative decarboxylation of applied indoleacetic acid in *Malus* 'Jork 9'. *Plant Growth Reg* 63(1): 175–185.
- Davis, T.D.; Sankhla, N.; Walser, R.H. y Upadhyaya, A., 1985. Promotion of adventitious root-formation on cuttings by paclobutrazol. *Hort Science* 20:883–884
- Dolcet-Sanjuan, R. y Claveria, E., 1995. Improved shoot-tip micropropagation of *Pistacia vera* L. and the beneficial-effects of methyl jasmonate. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 120(6): 938-942.
- Driver, J.A. y Kuniyuki, A.H., 1984. In vitro propagation of paradox walnut rootstock. *HortScience* 19: 507-509.
- Ferguson, L.; Reyes, H.; Sanden, B.L.; Grattan, S.R.; Epstein, L. y Krueger, W.H., 2005. Pistachio rootstocks. In *Pistachio Production Manual: Fourth Edition 2005*. Ed. L. Ferguson. 62-65.
- Ferguson, L.; Sanden, B.; Grattan, S.; Epstein, L. y Krueger, B., 2005. Pistachio rootstocks. In: Ferguson L, Beede RH, Freeman MW, Haviland DR, Holtz BA, Kallsen CE (eds) *Pistachio production manual*. Fruit and Nut Research and Information Center, 4th edn. University of California, Davis, pp 67–73.
- Gannoun, S.; Lionakis, S.M. y Gerasopoulos, D., 1995. Aspects of in vitro culture of *Pistacia terebinthus* and *Pistacia vera*. *Acta Horticulturae* 419: 201-206.
- García, E.; Lorente, P.; Marín, J.A.; Arbeloa, A. y Andreu, P., 2010. Micropropagación e injerto in vitro de pistacho. *ITEA*, 106(4): 294-302.
- García, E.; Lorente, P.; Marín, J.A.; Andreu, P. y Arbeloa, A., 2011. Factores que afectan a la necrosis apical de brotes de *Pistacia vera* L. cultivados in vitro. *ITEA*, 107(4): 315-323.
- George, E.F., 1993. *Plant propagation by tissue culture. Part 1 The Technology*. Exegetics Ltd. England. 555pp.
- Gautheret, R.J., 1985. History of land tissue and cell culture: A personal account. In *cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol 2. I.K. Vasil Ed. New York Academic Press, 1-59.

- Ghorbani, A.M.; Azghandi, A.; Sheibani, A. y Esmailpour, A., 2002. Effects of altering culture médium on rooting of pistachio micro shoots (*Pistacia vera* cv 'Badami-Zarand'). Acta Horticulturae ISHS, 591: 327-331.
- Guerrero, J.; Couceiro, J.F. y Moriana, A., 2002. Selection of Terebinth (*Pistacia terebinthus* L.) tres as seed producers for pistachio (*Pistacia vera* L.) rootstocks in the Castilla-La Mancha (Spain). FAO-Nucis-Newsletter, 13: 41-45.
- Guerrero, J.; Moriana, , A.; Couceiro, J.L.; Ribas, F.; Cabello, M.J. y Pérez, D., 2003. El pistachero. La alternativa de cultivo en Castilla La Mancha. Fruticultura Profesional, 134: 40-44.
- Guerrero, J.; Moriana, A. y Couceiro, J.F., 2004. La operación de injerto en pistachero (*Pistacia vera* L.). Condicionantes en Castilla La Mancha. Fruticultura profesional, 140: 41-53.
- Guerrero, J.; Couceiro, J.F.; Gijón, M.C.; Moriana, A. y Rivero, A., 2007. El injerto de yema en *Pistacia terebinthus* L. como portainjerto del pistachero. La influencia del vigor y la procedencia. Fruticultura profesional, 169: 48-54.
- Guerrero, J., 2011. Comportamiento varietal del pistachero (*Pistacia vera* L.) y respuesta agronómica del portainjerto autóctono *Pistacia terebinthus* L. en Castilla-La Mancha. Tesis Doctoral Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. 215 pp.
- Haissig, B.E., 1972. Meristematic activity during adventitious root primordium development: influences of endogenous auxin and applied gibberellic acid. Plant Physiol 49: 886-892
- Hammat, N., 1994. Promotion by phloroglucinol of adventitious root-formation in micropropagated shoots of adult wild cherry (*Prunus avium* L). Plant Growth Regulation 14(2): 17-132.
- Hansman, D. Y Owens, C., 1986. Micropropagation of temperatura nut tres. Horticultural Abstracts, 6: 403-416.
- Hartman, H.T. y Kester, D.E., 1975. Theorical aspects of grafting and budding. En: Plant Propagation. Principles and Pratices. 4ª Ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., 662 pp.

- Hartman, H.T.; Kester, D.E. y Davies, F.T., 1990. Plant propagation. Principles and practices. Prentice-Hall International Editions. 647 pp.
- Hobman, F.R. y Bass, A.W., 1986. Pistachio growing in Australia. Primary Production of Pistachios-South Australian Department of Agriculture-Section 1: 19 pp.
- Huang, L.C.; Lee, Y.L. y Huang, B.L., 2002. Polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 38:358–366.
- Jonard, R.; Hugard, J. y Macheix, J.J., 1983. Invitro micrografting and its applications to fruit science. *Scientia Horticulturae*, 20(2): 147-159.
- Kafkas, S. y Perl-Treves, R., 2001. Morphological and molecular phylogeny of *Pistacia* species in Turkey. *Theoretical and Applied Genetics* 102:908-915.
- Leng, P.; Su, S.; Wei, F.; Yu, F. y Duan, Y., 2009. Correlation between browning, total phenolic content, polyphenol oxidase and several antioxidation enzymes during pistachio tissueculture. *Acta Horti* 829:127–131
- Lis-Balchin, M., 1989. The use of antioxidants as rooting enhancers in the Geraniceae. *J Horti Sci* 64:617–623
- Lloyd, G. y McCown, B., 1980. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. *HortScience* 15: 416.
- Long, M.N.; Preece, J.E. y Van Sambeek, W., 1995. Adventitious regeneration of *Juglans nigra* L. (Eastern black walnut). *Lynn M. Plant Cell Rep*, 14: 799-803.
- MAGRAMA,2015.http://www.magrama.gob.es/estadística/pags/anuario/2015/ae_2015_completo.pdf
- Marín, J.A.; García, E.; Lorente, P.; Andreu, A. y Arbeloa, A., 2015. A novel approach for propagation of recalcitrant pistachio cultivars that sidesteps rooting by ex vitro grafting of tissue cultured shoot tips. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. DOI: 10.1007/s11240-015-0871-7.
- Marino, G., 1988. The effect of paclobutrazol on in vitro rooting, transplant establishment and growth of fruit plants. *Plant Growth Regul* 7: 237–247.

- Mauriat, M.; Petterle, A.; Bellini, C. y Moritz, T., 2014. Gibberellins inhibit adventitious rooting in hybrid aspen and Arabidopsis by affecting auxin transport. *Plant Journal* 78(3): 372-384.
- Mederos-Molina, S. y Trujillo, M.I., 1999. Elimination of browning exudate and in vitro development of shoots in *Pistacia vera* L. cv. mateur and *Pistacia atlantica* Desf. culture. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 68 (1): 21-24.
- Moyo, M. y Staden, J., 2013. Micropropagation of Anacardiaceae species of economic importance: advances and future prospects. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 49: 85-96.
- Murashige, T. y Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Onay, A.; Jeffree, C.E. y Yeoman, M.M., 1995. Somatic embryogenesis in cultured immature kernels of pistachio, *Pistacia vera* L. *Plant Cell Rep.* 15: 192-195.
- Onay, A.; Jeffree, C.E. y Yeoman, M.M., 1996. Plant regeneration from encapsulated embryoids and a embryogenic mass of Pistachio. *Plant Cell Report*, 15: 723-726.
- Onay, A., 2000. Micropropagation of Pistachio from mature trees. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 60: 159-162.
- Onay, A.; Piriñ, V.; Adiyaman, F.; Isikalan, C.; Tilkat, E. y Basaran, D., 2003. In Vivo and in Vitro Micrografting of Pistachio, *Pistacia vera* L. cv. "Siirt". *Turkish Journal Biology*, 27: 95-100.
- Onay, A.; Piriñ, V.; Yildirim, H. y Basaran, D., 2004. In vitro micrografting of pistachio (*Pistacia vera* L. var. Siirt). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 77: 215-219.
- Onay, A.; Tilkat, E.; Isikalan, C. y Namli, S., 2007. Micrografting of pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Siirt). In *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Mohan Hain, S. y Häggman, H. editors. p. 289-298.
- Onay, A.; Süzerer, V.; Yildirim, H.; Tilkat, E.; Akdemir, H. y Ozden-Tokalti, Y., 2011. Micropropagation of Pistachio: "The Wave of the Future"? *Acta Horticulturae ISHS*, 912: 553-559.
- Opitz, K.W. y Ross, N.W., 1976. Training Young pistachio trees. University of California Division of Agricultural Sciences Leaflet. 2916: 1-4.

- Ozden-Tokalti, Y; Ozudogru, E.A. y Akcin, A., 2005. In vitro response of pistachio nodal explants to silver nitrate. *Sci. Hort.* 106: 415-426.
- Ozden-Tokalti, Y; Ozudogru, E.A. y Akcin, A., 2006. Optimization of an efficient micropropagation protocol and assessment of plant genetic fidelity by RAPD markers in pistachio (*Pistacia vera* L.). *Adv. Hort. Sci.* 20(2): 162-169.
- Ozden-Tokatli, Y; Akdemir, H.; Tilkat, E. y Onay, A., 2010. Current status and conservation of *Pistacia* germplasm. *Biotechnology Advances* 28: 130-141.
- Parfitt, D.E. y Almehdi, A.A., 1994. Use of high CO₂ atmosphere and medium modifications for the successful micropropagation of pistachio. *Scientia Horticulturae*, 56(4): 321-329.
- Parfitt, D.E.; Kallsen, C.E. y Maranto, J., 2005. Pistachio Cultivars. In *Pistachio Production Manual: Fourth Edition 2005*. Ed. L. Ferguson: 62-66.
- Parfitt, D.E.; Kafkas, S.; Battle, I. Y Vargas, F.J., 2012. Fruit Breeding, *Handbook of Plant Breeding* 8. Chapter 21. Pistachio. Badenes, M.L. y Byrne, D.H. Eds. 803-826.
- Pearse, A.E.G., 1968. *Histochemistry: theoretical and applied*. 3rd edition. Vol. 1. Churchill Livingstone: London.
- Piagnani, C.; Zocchi, G. y Mignani, I., 1996. Influence of Ca²⁺ and 6-benzyladenine on chestnut (*Castanea sativa* Mill) in vitro shoot tip necrosis. *Plant Science* 118(1): 89-95.
- Pierik, R.L.M., 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Ediciones Mundi-Prensa. 326pp.
- Richardson, F.; tSaoir, S. y Harvey, B. 1996. A study of the graft union in in vitro micrografted Apple. *Plant Growth Regulation*. 20(1):17-23.
- Rivas-Martínez, S., 1987. Memoria del mapa de series de vegetación de España. Serie Técnica. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación; I.C.O.N.A. Madrid. 270 pp.
- Sánchez, A.; Mesa, S.; Delgado, A. y Costa, M., 2001. *Nuestros Árboles*. La Cornicabra. Exlibris Ediciones. 182 pp.
- Sghir, S.; Chatelet, P.; Quazzani, N.; Dosba, F.O. y Belkoura, H., 2005. Micropropagation of eight Moroccan and French olive cultivars. *Hortscience* 40(1): 193-196.

- Singha, S.; Townsend, E.C. y Oberly, G.H., 1990. Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill) shoots invitro. Plant cell tissue and organ culture 23(2): 135-142.
- Stockton, A.; Helmers, S.; Picchioni, G. y Ray, G., 1991. Pistachio potencial in West Texas. Yearbook_West Australian Nut and Tree Crops Association, 16: 66-71.
- Tabiyeh, D.T.; Bernard, F. y Shacker, H., 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. Acta Horti 726: 201-204.
- Teixeira da Silva, J.A.; Dobranszki, J. y Ross, S., 2013. Phloroglucinol in plant tissue culture. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant 49(1): 1-16.
- Thakur, A. y Kanwar, J.S., 2011. Effect of phase of medium, growth regulators and nutrient supplementations on in vitro shoot-tip necrosis in pear. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 39(2): 131-140.
- Thimmanappaiah, P. y Raichal, S., 2002. In vitro grafting of cashew (*Anacardium occidentale* L.) Scientia Horticulturae, 92: 177-182.
- Tilkat, E.; Onay, A.; Yildirim, H. Y Ozen, H.C., 2008. Micropropagation of mature male pistachio *Pistacia vera* L. Journal of horticultural science & biotechnology. 83(3): 328-333.
- Tilkat, E. y Onay, A., 2009. Direct shoots organogenesis from in vitro derived mature leaf explants of pistachio, In Vitro Cellular and Development Biology-Plant. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant. 45(1):92-98.
- Tiwari, A.K.; Tripathi, S. y Lal, S., 2012. Screening of some chemical disinfectants for media sterilization during in vitro micropropagation of sugarcane. Sugar Tech. 14(4): 364-369.