

# REVIGORIZACIÓN Y CLONACIÓN DE YEMAS ADULTAS DE ÁRBOLES DE OLIVO: ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE MICROINJERTOS

Leidy Rache-Cardenal<sup>1</sup>, Emilcen Rojas-Pinzón<sup>1</sup> y José Pacheco-Maldonado<sup>1</sup>

## RESUMEN

Las técnicas de injerto y microinjerto *in vitro* combinadas con la aplicación de reguladores de crecimiento, GA<sub>3</sub>, BA y 2-iP, fueron utilizadas para promover procesos de revigorigación de yemas adultas de olivo, *Olea europaea* L. Los procesos de adaptación de yemas adultas tomadas de árboles de campo se realizaron mediante injerto apical de cuña en condiciones de invernadero. Como púas se utilizaron porciones caulinares apicales, medias y basales tomadas de árboles adultos y como portainjertos plantas juveniles de dos años. Después de 30 días de realizados los injertos se asperjaron 45 púas con una solución de 300 mg·L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. Los porcentajes más elevados de injertos viables y yemas en desarrollo se cuantificaron en púas tomadas de ramas en crecimiento activo de árboles adultos productivos (aproximadamente 80 años de edad), y se observó mayor tendencia de injertos viables en púas procedentes de segmentos caulinares medios, y de yemas en desarrollo en púas procedentes de segmentos caulinares apicales. El GA<sub>3</sub> no aumentó la reactivación del crecimiento y desarrollo de yemas axilares injertadas. Después de 120 días, los ápices caulinares originados de yemas axilares y desarrollados en invernadero se microinjertaron sobre portainjertos clonales obtenidos a través de cultivo *in vitro* de segmentos caulinares nodales; además, se microinjertaron ápices caulinares tomados de árboles adultos sobre portainjertos clonales. Las púas tomadas de árboles adultos y microinjertadas directamente no fueron viables. Por su parte, los microinjertos de púas seleccionadas de injertos desarrollados en invernadero y cultivados en MS suplementado con 2 mg·L<sup>-1</sup> de 2-iP desarrollaron nuevos tallos y yemas axilares después de 60-90 días de cultivo, indicando por tanto, revigorigación parcial de las yemas adultas injertadas.

**Palabras clave adicionales:** Rejuvenecimiento, injerto, *Olea europaea*, reguladores de crecimiento

## ABSTRACT

### Reinvigoration and clonation of mature buds from olive trees: *in vitro* micrografts establishment

Grafting and *in vitro* micrografting techniques combined with the application of growth regulators, GA<sub>3</sub>, BA and 2-iP were used to promoting reinvigoration processes of olive (*Olea europaea* L.) adult buds. The adaptation process of adult buds taken from field trees was carried out through cleft-graft in greenhouse conditions. Apical, middle, and basal stem portions taken from mature trees were used as scions and two year old plants used as rootstocks. After 30 days of grafting, 45 scions were sprayed with 300 mg·L<sup>-1</sup>-GA<sub>3</sub> solution. The highest percentages of viable grafts were quantified in scions coming from middle stem portions and the largest quantity of developed buds were quantified in scions coming from apical stem portions, taken from branches in active growth of productive adult trees. The GA<sub>3</sub> did not promote the growth, reactivation and development of axillary buds. After 120 days, the shoot apexes originated from axillary buds and developed in greenhouse were micrografted on clonal rootstocks obtained through nodal shoots *in vitro* culture; besides, shoot apexes taken from adult trees were micrografted on clonal rootstocks. The scions taken from adult trees and directly micrografted were not viable. On the other hand, the micrografts of scions taken from developed grafts in greenhouse and cultured on MS supplemented with 2 mg·L<sup>-1</sup> of 2-iP developed new shoots and axillary buds after 60-90 culture days, thus indicating partial reinvigoration of the adult grafted buds.

**Additional key words:** Rejuvenation, graft, *Olea europaea*, growth regulators

## INTRODUCCIÓN

El olivo es una especie de gran importancia económica e interés comercial debido a la producción de madera y aceitunas que se utilizan

para consumo humano y para extracción de aceite de alta calidad. Además, el olivo juega un papel importante en la recuperación y conservación de suelos puesto que ayuda a evitar la erosión. Es una de las plantas cultivadas más antiguas que se

Recibido: Agosto 15, 2007

Aceptado: Febrero 25, 2008

<sup>1</sup> Escuela de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja, Colombia. e-mail: Leidyache@yahoo.com; Bioemiro@yahoo.com; Jocpach@hotmail.com

conoce; es originaria del Mediterráneo y fue introducida a Colombia durante la época de la conquista española; ha sido cultivada en el departamento de Boyacá (región del Alto Ricaurte) principalmente en los municipios de Villa de Leyva, Sáchica y Sutamarchán (Mesa y Valenzuela, 1958).

La selección de árboles con floración y abundante fructificación periódica sólo es posible cuando los árboles llegan a su madurez ontogénica, es decir, cuando alcanzan y mantienen su potencial reproductivo (McGowran et al., 1998). Sin embargo, la clonación de estos árboles que han alcanzado su estado adulto de desarrollo, requiere procesos de rejuvenecimiento durante los cuales es indispensable la manipulación de algunas capacidades morfogénicas de los tejidos, así como la alteración de la secuencia de los procesos genéticamente programados que controlan las diferentes fases del desarrollo. Dichos procesos de rejuvenecimiento deben permitir la recuperación de características específicas que acompañan al crecimiento vegetativo del estado juvenil, tales como la capacidad de división y proliferación celular y la capacidad rizogénica, características que se pierden una vez los árboles alcanzan su estado adulto e inician su desarrollo reproductivo. El rejuvenecimiento puede ser alcanzado injertando inicialmente yemas adultas y, posteriormente, realizando un número de injertos sucesivos de las nuevas yemas sobre portainjertos juveniles (Wendling y Xavier, 2001).

La propagación vegetativa (clonación) de especies leñosas, como el olivo, mediante técnicas convencionales tanto *in vitro* como *ex vitro* es difícil; el grado de dificultad está relacionado directamente con la edad fisiológica de los materiales a propagar. Sin embargo, actualmente la clonación de árboles adultos puede ser abordada mediante la aplicación de métodos *in vivo* que incluyen podas, injerto, aspersiones con citocininas y giberelinas, enraizamiento de esquejes y mediante la aplicación de metodologías *in vitro* tales como microinjerto multifásico sobre portainjertos juveniles (Pierik, 1990) y cultivo de meristemas, entre otros (McGowran et al., 1998; Wendling y Xavier, 2001; Giovannelli y Giannini, 2000).

El olivo ha sido propagado con éxito mediante injerto de cuña apical, yema y escudete, utilizando

como púas yemas procedentes de ramas florales tomadas de árboles productivos y sanos (Pérez, 2000). El injerto ha sido una técnica utilizada de manera efectiva en olivo para adaptar materiales adultos de campo a condiciones controladas con miras a obtener brotes para iniciar cultivos *in vitro* (García et al., 2001). Además, el injerto y el microinjerto han demostrado ser efectivos para inducir revigorización en varias especies leñosas: *Persea americana* (Pliego y Murashige, 1987), eucalyptus (Siniscalco y Pavolettoni, 1988), *Sequoia sempervirens* (Huang et al., 1992), *Quercus acutissima* (Moon y Yi, 1993), *Castanea sativa* (Giovannelli y Giannini, 2000), *Pinus radiata* (Fraga et al., 2002). El efecto de los reguladores de crecimiento sintéticos sobre la expresión de rasgos de juvenilidad en diferentes tejidos, demuestra como en general las giberelinas y las citocininas suelen promover o prolongar la fase juvenil, aunque en determinados casos unas y otras sean capaces de promover floración en material juvenil o de transición (Huang et al., 1992; Wendling y Xavier, 2001).

La aplicación de reguladores para inducir rejuvenecimiento *in vivo* también se ha reportado que las giberelinas promueven la recuperación de caracteres de tipo juvenil y tienen un efecto positivo como inductor de rejuvenecimiento en algunas angiospermas; además, en el olivo Rugini (1984) y Cañas et al. (1992) indican que la aplicación exógena de GA<sub>3</sub> elimina la dormancia y reactiva el crecimiento de las yemas.

El presente estudio tuvo como objeto evaluar la eficacia de la técnica de injerto y microinjerto, así como el efecto de algunos reguladores de crecimiento sobre la recuperación parcial de la capacidad de crecimiento y desarrollo de yemas adultas como indicador macromorfológico de revigorización en plantas olivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales-BIOPLASMA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia con sede en Tunja.

### Selección de materiales vegetales

Los árboles adultos utilizados como fuente de púas para realizar injertos en invernadero y

microinjerto *in vitro*, se encuentran ubicados en la zona urbana del municipio de Sáchica (región de Alto Ricaurte-Boyacá) a una altitud de 2200 msnm, de los cuales se seleccionaron: a) un árbol adulto (A1) de aproximadamente 80 años, caracterizado por su producción periódica permanente; presenta fuste de gran porte, ramificado desde la base y copa frondosa. Sus ramas productivas florecen y fructifican durante la mayor parte del año, produciendo la mayor cantidad de frutos en los meses de mayo y junio. b) Cuatro árboles adultos (A2), de 15 a 20 años de edad, ubicados en el parque principal de Sáchica. Poseen fuste delgado y ramificado desde la base; la producción de frutos de estos árboles es escasa, observándose, en algunas ramas, floración y fructificación durante los meses de junio y julio. De forma permanente, en los árboles A2 se observan ramas en crecimiento activo y en estado de reposo.

#### **Adaptación de material de campo a condiciones controladas: Injerto de yemas adultas en portainjertos juveniles**

- Obtención de púas. De las porciones terminales de ramas en crecimiento activo de los árboles A1 y A2, se tomaron estacas de 15 a 20 cm de longitud; estas estacas se fraccionaron en segmentos apicales, medios y basales, con tres pares de yemas axilares cada segmento. En la porción basal de cada segmento se realizaron dos cortes oblicuos convergentes para formar una cuña y se utilizaron como púas.

- Obtención de portainjertos. Como portainjertos se utilizaron plantas juveniles de 2 años de edad en crecimiento activo. A las plantas se les eliminó las hojas y ramas laterales del tallo, y posteriormente se decapitaron a 20-30 cm de altura; a partir de la superficie de corte se realizó una hendidura longitudinal de tamaño similar al de la cuña de la púa.

- Ensamblaje de injertos. Las púas, con su porción basal en forma de cuña, se insertaron en las hendiduras de los portainjertos y la zona de contacto púa-portainjerto se sujetó con cinta de teflón. Los injertos se cubrieron con bolsas plásticas transparentes y se ubicaron en invernadero, bajo sombra, a 75-85% de humedad relativa. Se realizaron los siguientes ensayos para evaluar:

a. Viabilidad de los injertos teniendo en cuenta la

procedencia (A1 y A2) de las púas. Se realizaron 111 y 115 injertos, respectivamente.

b. La reactivación del desarrollo de las yemas injertadas teniendo en cuenta el tipo de segmento caulinar utilizado como púa. Se injertaron diez segmentos apicales, diez medios y diez basales.

c. El efecto del GA<sub>3</sub> sobre la reactivación del desarrollo de las yemas de la púa. Se asperjaron 45 púas con una solución de 300 mg·L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>.

Durante el período de experimentación los injertos viables con yemas desarrolladas fueron asperjados semanalmente con una solución de 2 g·L<sup>-1</sup> de Benlate (WP Dupont. Benomil: Metil-1-(Butilcarbomil)-benzimidazol-2-il-carboxamida al 50 %) más 2 g·L<sup>-1</sup> de Antracol (WP 70: Propineb: [[(1-metil-1,2-etanodiil) bis [carbamoditioato]] (2)] homopolímero de zinc al 70 %).

Después de 120 días los injertos realizados desarrollados y mantenidos en invernadero se utilizaron como fuente de púas para microinjerto *in vitro*.

#### **Establecimiento *in vitro* de microinjertos de cuña apical**

De los injertos mantenidos en invernadero y con yemas axilares desarrolladas (Figura 1A), se tomaron ápices caulinares de 2 a 3 cm de longitud, con dos o tres pares de yemas axilares (Figura 1B) y de los árboles adultos (A1 y A2) se tomaron ápices caulinares con dos pares de yemas axilares. Los dos tipos de ápices se sometieron al siguiente procedimiento de asepsia superficial: un enjuague con agua destilada más Tween 20 (0,1 mL·100 mL<sup>-1</sup>) (v/v) durante 5 minutos, inmersión en etanol al 70 % durante 10 segundos, inmersión en una solución de 2 g·L<sup>-1</sup> de Benlate más 2 g·L<sup>-1</sup> de Antracol durante 10 minutos, y posteriormente se sumergieron en una solución de hipoclorito de calcio (CaOCl<sub>2</sub>) al 2 % (p/v) durante 10 minutos. Finalmente los ápices se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril durante 5 minutos cada vez y se colectaron en un recipiente con agua destilada estéril. Todo el procedimiento se realizó en cámara de flujo laminar.

Para la preparación de púas, a los ápices caulinares asépticos se les eliminó las hojas y, luego, en la porción basal de cada ápice se realizaron dos cortes oblicuos convergentes para formar una cuña. Como portainjertos se utilizaron microtallos clonales de 2,5 a 3,0 cm de longitud

(Figura 1B), procedentes de cadenas proliferativas *in vitro* (Figura 1C). A los microtallos se les eliminó las yemas axilares y el callo basal, se decapitaron y se les realizó un corte medio longitudinal acorde con el tamaño de la cuña de la púa. Para ensamblar el microinjerto (Figura 1D) se insertó la púa en la incisión longitudinal del portainjerto y la zona de contacto púa-portainjerto se sujetó con un anillo de silicona previamente esterilizado, acorde con lo descrito por Revilla et al. (1996) (Figura 1E).

Los microinjertos fueron cultivados y posteriormente subcultivados cada 30 días en medio Murashige y Skoog (MS) con 2,0 mg·L<sup>-1</sup> de glicina, 1,0 mg·L<sup>-1</sup> de tiamina-HCl, 1,0 mg·L<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,5 mg·L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 2 mg·L<sup>-1</sup> de BA (N<sup>o</sup>-Benciladenina) ó 2 mg·L<sup>-1</sup> de 2-iP (2-isopenteniladenina) hasta que se observó desarrollo de yemas. El medio se dosificó en tubos de ensayo de 25 x 150 mm con alícuotas de 10 mL, el pH se ajustó a 5,6 con KOH y/o HCl (0,5-1,0N) y se esterilizó en autoclave a 15 psi, 121 °C durante 20 minutos. Se realizaron dos repeticiones con 20 unidades experimentales cada una. Los cultivos fueron mantenidos en cuarto de incubación, con temperatura de 24 ± 1 °C y luz continua (70-80 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) suministrada por lámparas fluorescentes Sylvania de 75W.

Después de 90 días de cultivo se evaluó el efecto del BA y 2-iP sobre el desarrollo de las púas, cuantificándose la viabilidad de microinjertos, el desarrollo y neoformación de yemas de la púa, la incidencia de procesos necróticos y de contaminación. Finalmente, se evaluó la consolidación del microinjerto mediante observación macromorfológica del desarrollo

secuencial de las etapas de adhesión púa-portainjerto; proliferación celular; formación de callo interfásico y reactivación y desarrollo de yemas axilares de la púa.

Los datos cuantificados en los injertos y microinjertos realizados, fueron tabulados y registrados en forma de porcentajes y promedios con sus desviaciones estándar. Posteriormente se realizó análisis de varianza utilizando un diseño totalmente aleatorizado para los factores evaluados. Los datos fueron procesados con el paquete estadístico StatGraphic versión 2,0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Injerto de yemas adultas en portainjertos juveniles en invernadero

Teniendo en cuenta los árboles de los cuales proceden las púas, los resultados muestran que tanto los porcentajes de viabilidad (45,9 %) como las yemas en desarrollo (13,9 %) fueron mayores ( $P \leq 0,01$ ) cuando las púas se tomaron de ramas del árbol A1, en comparación a cuando las púas se tomaron de ramas de árboles A2 en que tanto el porcentaje de viabilidad como el de yemas en desarrollo fueron casi nulos (Cuadro 1). Esta disminución en los porcentajes de viabilidad de injertos y yemas en desarrollo puede estar asociada con el menor grado de floración de los árboles A2, ya que éstos se encontraban en el período de entrada en producción, durante el cual el olivo presenta producciones irregulares, mientras que el árbol A1 se encontraba en fase adulta, en plena producción. Se destaca que los mayores promedios de injertos viables y de yemas en desarrollo se obtienen cuando las púas provienen del árbol A1.

**Cuadro 1.** Efecto de la procedencia de la púa sobre la viabilidad de injertos

Procedencia de la púa	Injertos realizados (N°)	Yemas injertadas (N°)	$\bar{x}/P$	Injertos viables (%)	Yemas en desarrollo (%)	Injertos con necrosis (%)
A1	111	724	6,52	45,9*	13,9*	54,1
A2	115	674	5,86	0,86	0,74	99,1

$\bar{x}/P$ : Promedio de yemas injertadas por púa. \*: Diferencias estadísticamente significativas según la prueba de F ( $P \leq 0,01$ )

Durante todo el tiempo de experimentación (24 meses), el árbol A1 mostró una alta capacidad de floración; la mayoría de sus ramas presentaron flores durante la mayor parte del año. Estas características de floración y fructificación

periódicas favorecieron el prendimiento de injertos y la reactivación de las yemas de las púas, concordando con los resultados de Pérez (2000), quien sugiere que el éxito en el prendimiento de injertos y reactivación de las púas, requiere la

selección de púas de árboles productivos en floración.

Con relación al segmento caulinar utilizado como púa, se observó mayor tendencia de injertos viables en púas procedentes de segmentos caulinares medios, y de yemas en desarrollo en púas procedentes de segmentos caulinares apicales. (Cuadro 2). Los segmentos apicales de consistencia herbácea con yemas abiertas, después de injertados, presentaron procesos de deshidratación progresiva. Dada la facilidad que presentan durante su manipulación, parece que las púas más adecuadas para injertar son los segmentos caulinares medios, tomados de ramas en crecimiento activo. Esta indicación concuerda

con el trabajo de Pampa (1999), quien recomienda que para injertos en olivo, las púas deben ser elegidas de árboles productivos, tomando ramas de uno o dos años de edad. De éstas se selecciona la porción apical, pero eliminándoles dos o tres nudos superiores, y deben ser injertadas antes de que se acabe su período de reposo y se inicie el período de yemas abiertas.

La aspersión con GA<sub>3</sub> no logró la activación del desarrollo de las yemas (Cuadro 3). Por el contrario, se observó pardeamiento de yemas y una tendencia al aumento del número de púas necróticas, disminución de la viabilidad y disminución del porcentaje de yemas en desarrollo cuando se utilizó el regulador (Cuadro 3).

**Cuadro 2.** Respuesta de los diferentes segmentos caulinares utilizados como púas en injertos mantenidos en invernadero

Segmento caulinar (púa)	IR	Injertos viables		Yemas injertadas		Yemas en desarrollo			Injertos con necrosis	
		N°	%	N°	$\bar{x}/P$	N°	%	$\bar{x}/IV$	N°	%
Apical	10	6	60 ns	62	6,2 ± 0,99	20	32,25 ns	3,3 ± 0,76	4	40 ns
Medio	10	7	70	61	6,1 ± 1,34	11	18,03	1,5 ± 0,79	3	30
Basal	10	6	60	62	6,2 ± 0,63	8	12,90	1,3 ± 0,52	4	40

IR: Injertos realizados;  $\bar{x}/P$ : Promedio de yemas por púa;  $\bar{x}/IV$ : Promedio de yemas en desarrollo por injerto viable. ns: Sin diferencias estadísticas ( $P>0,05$ )

**Cuadro 3.** Efecto del GA<sub>3</sub> sobre la activación del desarrollo de yemas de púas tomadas del árbol A1

Aspersión con GA <sub>3</sub>	IR	Injertos viables		Yemas injertadas		Yemas en desarrollo			Injertos con necrosis	
		N°	%	N°	$\bar{x}/P$	N°	%	$\bar{x}/IV$	N°	%
Con	66	28	42,4 ns	431	6,53 ± 1,6	53	12,2 ns	1,89 ± 1,2	38	57,6 ns
Sin	45	23	51,1	293	6,51 ± 1,7	49	16,7	2,13 ± 1,2	22 <sup>1</sup>	48,9

<sup>1</sup> Necrosis, principalmente en la púa; IR: injertos realizados;  $\bar{x}/P$ : Promedio de yemas por púa;  $\bar{x}/IV$ : Promedio de yemas en desarrollo por injerto viable. ns: Sin diferencias estadísticas ( $P>0,05$ )

Las yemas que respondieron al pretratamiento con GA<sub>3</sub> podrían presentar un mayor grado de revigorización si se considera que la aplicación exógena del producto puede inducir procesos de rejuvenecimiento como resultado de un efecto secundario de la giberelina. Sin embargo, en los injertos de olivo no se observaron diferencias entre las características morfofisiológicas en las púas desarrolladas con y sin aspersión de GA<sub>3</sub>.

En invernadero, las púas provenientes de árboles adultos injertadas sobre portainjertos juveniles, presentaron desarrollo vigoroso de yemas axilares después de 90 días; el crecimiento y desarrollo caulogénico a partir de yemas adultas

podría considerarse como una recuperación de caracteres juveniles relacionados con división celular, crecimiento y desarrollo, tal como fue observado por Siniscalco y Pavollettoni (1988) en injertos de eucalipto. Aparentemente, la propagación vegetativa a través de injerto induce rejuvenecimiento parcial de la porción adulta injertada, evidenciado por la capacidad de proliferación celular que caracteriza el crecimiento vegetativo en la fase juvenil (Franlet, 1983; Hackett, 1987; Wendling y Xavier, 2001). Por otra parte, se reafirma la utilización de la técnica de injerto como método eficaz para clonar especies forestales, que se encuentran en edad

suficiente para permitir la evaluación de su potencial de crecimiento.

#### Establecimiento *in vitro* de microinjertos

Las púas tomadas de árboles adultos y microinjertadas directamente sobre portainjertos clonales no fueron viables. Las causas de inviabilidad de los microinjertos fueron procesos necróticos y contaminación fúngica en las púas (47 y 53 %, respectivamente). Los microinjertos de púas tomadas de injertos desarrollados en invernadero y cultivados en medio MS suplementado con 2-iP o BA mostraron una viabilidad variable con diferencias estadísticamente significativas.

El 2-iP fue el regulador más efectivo para el desarrollo de los microinjertos, cuantificándose los porcentajes más altos de injertos viables y de yemas axilares desarrolladas, así como de yemas axilares neoformadas en relación con la BA (Cuadro 4), indicando que los tejidos de olivo son más reactivos a la estimulación con 2-iP que con BA. Al utilizar estos mismos reguladores, Cañas et al. (1992) obtuvieron los mejores resultados estimulando yemas axilares de olivo

con 4 mg·L<sup>-1</sup> de 2-iP, mientras Revilla et al. (1996) utilizando BA combinado con AIB en el medio para cultivo de microinjertos y yemas revigorizadas obtuvieron altos porcentajes de microinjertos viables. En nuestro trabajo, al utilizar microinjertos cultivados en presencia de 2 mg·L<sup>-1</sup> de BA, se observaron procesos de hiperhidratación de portainjertos y necrosis gradual de púa-portainjerto; resultados similares fueron observados en cultivo *in vitro* de explantes juveniles de *Picea abies* (Bornman y Vogelmann, 1984) y de yemas revigorizadas de *Pinus nigra* (Pacheco, 1995).

El proceso de consolidación de microinjertos de cuña apical estuvo precedido por una secuencia de etapas con características macromorfológicas específicas: adhesión (Figuras 1A a la 1E), proliferación celular (Figuras 1F y 1G), formación de callo interfásico, fase durante la cual ocurrió abscisión de hojas (Figura 1H), y reactivación del crecimiento, etapas en las que hubo hinchamiento de las yemas (Figura 1I), apertura de las yemas e inició del desarrollo de tallos (Figura 1J), y formación de hojas y nuevas yemas axilares en los tallos en desarrollo (Figura 1K).

**Cuadro 4.** Efecto del BA y 2-iP sobre el desarrollo *in vitro* de púas microinjertadas

RC	MR N°	Yemas injertadas		MV (%)	Yemas desarrolladas			Yemas neoformadas	
		N°	$\bar{x}/P$		%	$\bar{x}/MV$	Longitud $\bar{x}$ (cm)	N°	$\bar{x}/YD$
BA	40	144	3,6	10*	4,86*	1,7 ± 0,5	0,87 ± 0,63	29*	4,14 ± 2,2
2-iP	40	165	4,1	47,5	16,9	1,4 ± 0,51	0,87 ± 0,63	124	4,42 ± 2,78
Total	80	309						153	

RC: Reguladores de crecimiento; MR: Microinjertos realizados;  $\bar{x}/P$ : Promedio de yemas microinjertadas por púa; MV: Microinjertos viables;  $\bar{x}/MV$ : Promedio de yemas en desarrollo por microinjerto viable;  $\bar{x}/YD$ : Promedio de yemas neoformadas por yema injertada y desarrollada. \*: Diferencias estadísticamente significativas según la prueba de F (P≤0,01)

La viabilidad de los microinjertos fue afectada negativamente por procesos necróticos y por contaminación fúngica. El factor que más afectó el prendimiento de microinjertos y la reactivación del crecimiento de las yemas fue la necrosis de las púas (Figura 2), cuantificándose un 41% de púas necróticas; además, se obtuvo un 14% de microinjertos con contaminación fúngica. Estas respuestas reafirman lo expuesto por Moor (1991), Estrada et al. (2002) y Onay et al. (2004), en el sentido que una de las causas de pérdida cuando se microinjerta es la oxidación y oscurecimiento de las superficies de corte. Los procesos

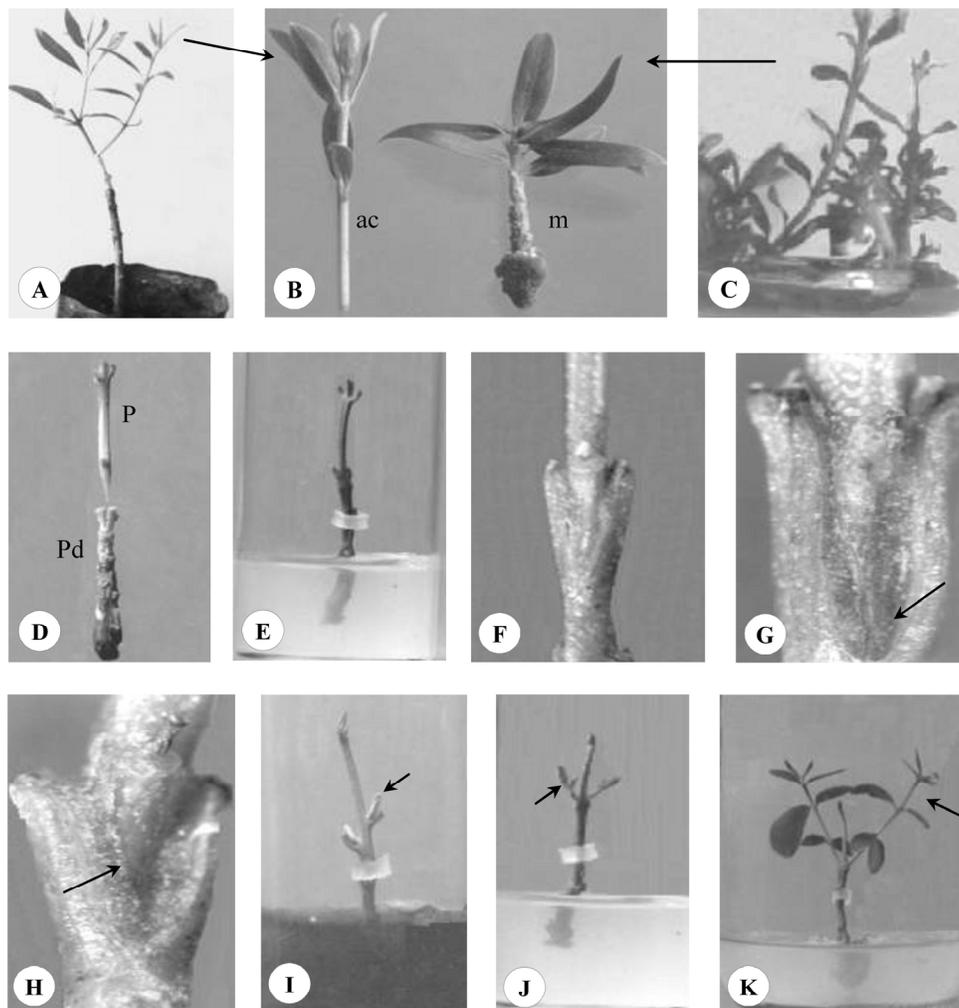
necróticos son causados, en parte, por la oxidación de tejidos durante el proceso de asepsia superficial, lo cual indica la sensibilidad de dichos tejidos a las sustancias esterilizantes, concordando con lo observado por Pacheco (1995) en microinjertos de *Pinus nigra*.

La excesiva manipulación de los tejidos durante la preparación de las púas también puede causar procesos de oxidación de tejidos, dando como resultado la necrosis de la púa (Villalobos y Thorpe, 1991). La limpieza y correcta realización de los cortes son factores críticos e imprescindibles para obtener buen contacto entre

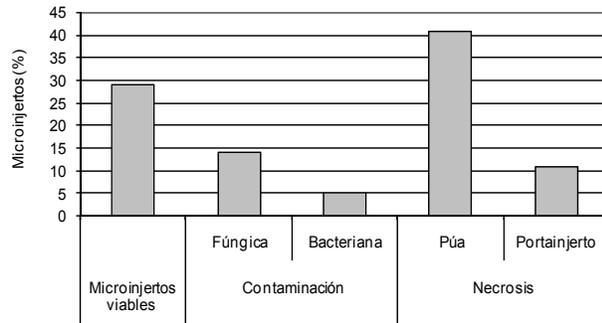
las superficies de corte de la púa con los del portainjerto (Estrada et al., 2002).

En algunos microinjertos, las púas aparentemente viables, no reactivaron su crecimiento y posteriormente murieron. Esta falta de reactividad de las púas podría explicarse, en parte, si se tiene en cuenta que el aislamiento de

un tejido o un órgano del resto de la planta puede provocar un estrés que altera su metabolismo celular y su balance hormonal; además, con frecuencia, los tejidos aislados y cultivados *in vitro* sufren un pardeamiento debido a la oxidación de los fenoles que secretan conduciendo a la muerte del tejido (Villalobos y Thorpe, 1991).



**Figura 1. Microinjerto de cuña apical.** A: Injerto de 120 días con tallos axilares desarrollados en invernadero; B: (ac) ápice caulinar utilizado como púa, (m) microtallo, utilizado como portainjerto; C: Microtallos utilizados como portainjertos clonales; D: Ensamblaje del microinjerto, (P) púa, con la porción basal en forma de cuña, (Pd) portainjerto decapitado, con una hendidura apical de aproximadamente 5 mm. E: Microinjerto, el contacto púa-portainjerto se mantiene con un anillo de silicona. **Desarrollo de microinjerto de cuña apical.** F: Proliferación celular en la zona de contacto, observada después de 15 días; G: Microinjerto después de 30 días, se observa una abundante y progresiva proliferación celular; H: Callo interfásico después de 40 días de cultivo; I: Microinjerto después de 45 días, presenta yemas hinchadas; J: Microinjerto de 60 días, presenta yemas en desarrollo; K: Microinjerto de 90 días, se observa la elongación caulinar.



**Figura 2.** Viabilidad e incidencia de procesos de contaminación y necrosis en microinjertos, después de 90 días de cultivo *in vitro*.

## CONCLUSIONES

El injerto de yemas adultas sobre portainjertos juveniles en invernadero promovió cierto grado de rejuvenecimiento, el cual se evidenció a través del desarrollo y neoformación de yemas en las púas injertadas.

El prendimiento de injertos guardó relación con la edad y el grado de madurez de la planta madre, siendo mayor la viabilidad cuando las púas se toman de árboles en floración. Asimismo, el injerto en invernadero parece que es una etapa previa indispensable para obtener púas adultas revigorizadas utilizables para establecer microinjertos *in vitro*.

Las púas tomadas de árboles adultos y microinjertadas directamente no fueron viables.

En las púas asperjadas con GA<sub>3</sub> no aumentó el número de yemas axilares desarrolladas.

El medio MS suplementado con 2,0 mg·L<sup>-1</sup> de 2-iP facilitó el prendimiento de los microinjertos, la reactivación y el desarrollo *in vitro* de yemas de la púa.

## AGRADECIMIENTO

A la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Dirección de Investigaciones (DIN) por el apoyo financiero, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Biológicas y Grupo de Investigación BIOPLASMA-UPTC.

## LITERATURA CITADA

- Bornman, C.H. y T.C. Vogelmann. 1984. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 61(3): 505-512.
- Cañas, L.A., J. Avila, M. Vicente y A. Benbadis. 1992. Micropropagation of Olive (*Olea europaea* L.). In: Y.P.S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 18. High-Tech and Micropropagation II. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. New York. pp. 493-505.
- Del Río, C. y M.D. García. 2001. Clasificación de variedades de olivo por precocidad de entrada en producción. Relación con el vigor de la planta. *Fruticultura Profesional* 120: 61-65.
- Estrada-Luna, A.A., C. Lopez-Peralta y E. Cardenas-Soriano. 2002. *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.). *Scientia Horticulturae* 92(3): 317-327.
- Fraga, M.F, M.J. Cañal, A. Aragonés y R. Rodríguez. 2002. Factors involved in *Pinus radiata* D. Don. micrografting. *Ann. For. Sci.* 59: 151-157.
- Franclet, A. 1983. Rejuvenation: theory and practical experiences in clonal silviculture. In: L. Zsuffa, R.M. Rauter y C.W. Yeatman (eds.). *Clonal forestry: Its Impact on Tree Improvement and Our Future Forests*. Proc. Can Tree Improv. Assoc, 19 th meet, Part II, pp. 96-134.
- García, L., A. Belaj, I. Trujillo, A. Marí, R. Ghorbel y M. Ybarra. 2001. Micropropagación de olivo a partir de material adulto. *Fruticultura Profesional* 120: 73-75.
- Giovannelli, A. y R. Giannini. 2000. Reinvigoration of mature chestnut (*Castanea sativa*) by repeated graftings and micropropagation. *Tree Physiology* 20: 1243-1248.
- Hackett, W.P. 1987. Juvenility and maturity. In: J.M. Bonga y Don J. Durzan (eds.). *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Martinus

- Nijhoff Publishers, Dordrecht pp. 216-231.
10. Huang, L.C., S. Lius, B.L. Huang, T. Murashige, El Fatih Mahdi y R. Van Gundy. 1992. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks *in vitro*. *Plant Physiol.* 98: 166-173.
  11. McGowan, E., G.C. Douglas y M. Parkinson. 1998. Morphological and physiological markers of juvenility and maturity in shoot cultures of oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*). *Tree Physiology* 18: 251-257.
  12. Mesa, B.D. y G. Valenzuela. 1958. El cultivo del olivo. *Agricultura tropical*. Bogotá-Colombia. 14(5): 285-294.
  13. Moon, H.K. y Yi JS. 1993. Cutting propagation of *Quercus acutissima* clones after rejuvenation through serial grafting. *Ann. Sci. For. Suppl.* 1(50): 314-318.
  14. Moor, R. 1991. Graft compatibilities *in vitro*. *In: Y.P.S. Bajaj, Biotechnology and Forestry 17, High-tech and Micropropagation 1.* Springer Verlag. Berlin. pp. 71-84.
  15. Onay, A., V. Pirinç, H. Yildirim y D. Basaran. 2004. *In vitro* micrografting of mature pistachio (*Pistacia vera* var. Siirt). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77(2): 215-219.
  16. Pacheco, J. 1995. Revigorización de material adulto de *Pinus nigra*, Arn.: Criterios Morfológicos y Moleculares. Oviedo-España. Ph.D. Tesis. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. Universidad de Oviedo. 244 p.
  17. Pampa, VA. 1999. Injerto en olivo. Principios de Propagación de Plantas. Universidad Nacional Agraria. La Molina. Perú.
  18. Pérez, J. 2000. Cultivos 1 (Cereales-Leguminosas y Oleaginosas). Editorial UNAD. Bogotá.
  19. Pierik, R.L.M. 1990. Rejuvenation and micropropagation. *In: H.J. Nijkamp, L.H. Van der Plas y J. Van Aartrijk (eds.). Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Proc. VII<sup>th</sup> Int. Congress on Plant Tissue and Organ Culture.* Kluwer Academic Publisher, Amsterdam. pp. 91-101.
  20. Pliego, A. y T. Murashige. 1987. Possible rejuvenation of adult avocado by graftage on to juvenile rootstocks *in vitro*. *Hort. Sci.* 22: 1321-1324.
  21. Revilla, M.A., J. Pacheco, A. Casares y R. Rodríguez. 1996. *In vitro* reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea* L.) through micrografting. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 32(4): 257-261.
  22. Rogler, C.E. y M.E. Dahmus. 1974. Gibberellic acid-induced phase change in *Hedera helix* as studied by deoxyribonucleic acid-ribonucleic acid hybridization. *Plant Physiol.* 54: 88-89.
  23. Rugini, E. 1984. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae* 24: 123-134.
  24. Siniscalco, C. y L. Pavolettoni. 1988. Rejuvenation of Eucalyptus x Trabutii by successive grafting. *Acta Horticulturae* 227: 6258-6260.
  25. Villalobos, V. y T. Thorpe. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *In: W.M. Roca y L.A. Mroginski (eds). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones.* Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT. Cali, Colombia. pp. 127-142.
  26. Wendling I. y A. Xavier. 2001. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. *Floresta e Ambiente* 8(1): 187-194.