

Uso del cultivo in vitro para la reproducción de plantas de bosque de interés en Andalucía

A. Troncoso, M. Cantos, J. Liñán, M.R. García y J. Troncoso.

La existencia del bosque es totalmente necesaria para el desarrollo normal de la vida humana, dada su influencia en la calidad del aire, regulación del clima, conservación de suelos, plantas, animales y paisaje, y dentro de una explotación racional, fuente de riqueza. No obstante, existen muchas especies vegetales y animales en clara regresión y a veces, en auténtico peligro de desaparecer. En el caso de los vegetales, las principales causas que originan esas situaciones de retroceso son: Talas indiscriminadas y abusivas, en especial de especies leñosas para la obtención de madera o materiales de combustión; Recolección excesiva de especies tipo "officialis" para la extracción de compuestos usados en farmacia, cosmética o alimentación; Incendios provocados o accidentales, que principalmente en verano devastan el bosque; Desarrollos urbanos (crecimientos de pueblos y ciudades, y nuevos núcleos de urbanizaciones) que eliminan gran cantidad de vegetación; Prácticas silvícolas mal realizadas como exceso de rozas o aclareos indiscriminados; Carga excesiva de ganado herbívoro silvestre o de pastoreo; Propagación difícil que impide una regeneración normal.

De acuerdo con sus objetivos, este trabajo se centra en la última de las causas indicadas.

Las especies vegetales superiores se pueden propagar de dos maneras: Por vía sexual o reproducción, o por vía vegetativa o multiplicación. En el primer caso, que es el que interesa en este trabajo, la nueva planta se obtiene por germinación de una semilla que se formó en la unión de una célula masculina con una femenina cada una de ellas con su dotación cromosómica propia. Significa esto, que la planta hija no reproducirá íntegros los caracteres genéticos del padre o de la madre, sino que, salvando la dominancia entre parentales, será una fusión de los caracteres de ambos. A veces, la flor de la que procede la semilla es hermafrodita, es decir que posee órgano femenino y masculino hábiles y que por tanto se puede producir autofecundación (fecundación del óvulo con polen de la misma flor). No obstante, y debido a

fenómenos de heterocigosis, la planta hija no suele ser idéntica al parental. En consecuencia, por propagación sexual (reproducción), se suele obtener una planta hija distinta a cada uno de los genitores, lo cual significa un aumento de la diversidad genética o biodiversidad. Esta variabilidad es una condición importante para la supervivencia de poblaciones forestales, ya que un exceso de individuos genéticamente semejantes es un riesgo elevado ante una situación de adversidad. Por ello, la reproducción es el sistema más conveniente en la propagación de plantas de bosque.

Ahora bien, existen bastantes plantas forestales cuyas semillas germinan muy mal o incluso no lo hacen. Esto puede ser debido a falta de fecundación, malformaciones, fenómenos de dormancia o desequilibrios entre la maduración del fruto, la semilla y el embrión. Frecuentemente, la cubierta seminal (testa o endocarpo) es la responsable de la mala respuesta, bien porque al ser excesivamente dura e impermeable constituye una barrera a la salida del embrión y al intercambio de gases y agua con el exterior, o porque en ella se acumulan inhibidores de tipo hormonal. Se utilizan distintos procedimientos para disminuir los efectos de esta dormición, como ingestión del fruto por animales, tratamientos con ácidos o bases, frío, tratamientos con auxinas o giberelinas etc., que no siempre producen los resultados deseados. Otras veces, la acumulación de inhibidores se produce en el endospermo que rodea al embrión, con lo que aún son mayores las dificultades para eliminarlos. Por otra parte, también se puede producir un desfase entre el grado de maduración del embrión y los tejidos que lo rodean, lo que retrasa mucho la germinación.

La eliminación de la cubierta seminal cuando es ese el foco de la dormición, o también del endospermo, si existe endodormancia, quedando entonces el embrión aislado, son las técnicas que evitan más drásticamente las dificultades de la germinación. No obstante, en estos casos se necesita utilizar métodos controlados para que la semilla desnuda o el embrión aislado resistan el proceso germinativo. Entre estos métodos se puede destacar el cultivo in vitro. El cultivo de tejidos vegetales in vitro consiste en el desarrollo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles y aisladas (dentro de un contenedor transparente), de células o tejidos vegetales. Se basa en los principios de autonomía (capacidad de vivir aislada) y totipotencia (capacidad de regenerar una planta) de la célula vegetal. En el proceso de cultivo in vitro se pueden distinguir las fases siguientes:

- Preparación del material madre.- La planta original, que condiciona todo el cultivo ulterior, debe presentar características genéticas y sanitarias idóneas, para disponer de un material de partida en las mejores condiciones. Bajo el punto de vista de posibles contaminaciones in vitro, se comportan mejor las plantas cultivadas en invernadero y tratadas, que las tomadas directa-

mente en campo. A partir de ese material, se prepara el que se pretende poner en cultivo in vitro (células, callo, ápice meristemático, yema, explanto, semilla, embrión, etc.).

- **Establecimiento del cultivo.**- El cultivo in vitro ha de hacerse en unas condiciones adecuadas de nutrición (medio nutritivo completo con elementos minerales, azúcares, hormonas, vitaminas, etc.), para que el material vegetal, generalmente débil, sea capaz de desarrollarse hasta regenerar una planta. Esas condiciones idóneas, lo son también para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos) con lo que se provocan infecciones en el interior del contenedor. En consecuencia, todos los elementos que intervienen en el proceso (material de vidrio, utensilios, medio de cultivo, material vegetal) han de ser debidamente esterilizados y todas las operaciones realizarse en ambiente aséptico (cámara de flujo). Una vez sembrado el material vegetal en el interior del contenedor en contacto con el medio de cultivo y protegido (cerrado) con un tapón, el conjunto se coloca en una cámara con temperatura, iluminación y fotoperíodo controlados, hasta la formación de la nueva planta.
- **Adaptación a condiciones externas.**- Existen posibilidades elevadas de deshidratación de la planta y con ello su muerte, al ser trasplantada desde in vitro a ex vitro. Este problema se suele solventar procurando un ambiente de humedad relativa muy elevada durante los primeros días del trasplante, hasta que la planta se adapta a las condiciones externas. Para ello, la planta se pasa desde in vitro a un contenedor de unos 300 cc de capacidad con un sustrato suelto (suele ir bien una mezcla de perlita y turba 2:1) que se satura de humedad. El conjunto se cubre con una bolsa de plástico transparente también impregnada de agua en su interior y se coloca en un lugar fresco y sin mucha luz. Tras varios días en esas condiciones, se comienzan a cortar pequeños trozos de la envuelta de plástico hasta que poco a poco, en el intervalo de días, se logra el contacto total planta ambiente. Así, la planta queda en condiciones de pasar a invernadero o vivero.

A título de ejemplo, se indican a continuación los resultados obtenidos en la germinación in vitro de algunas especies de interés forestal en Andalucía.

***Atropa baetica* (Wilk) (Belladona)**

Es una especie endémica de Andalucía donde está legalmente protegida (R.D. 3091/11982 y R.D. 439/1990). Desde 1992 está catalogada en

alto riesgo de extinción, ya que sólo existen poblaciones de muy reducido número de individuos en la Sierra de Cazorla (Herrera, 1987) y Grazalema (Aparicio, 1993).

Para el estudio de la germinación de esta especie se utilizaron frutos maduros de un único ejemplar de planta existente en el Parque Natural de Grazalema (Cádiz-Málaga). Una vez en el laboratorio, se abrieron las bayas de las que se extrajeron las semillas, que se almacenaron a 4°C.

Para la germinación en bandejas, se utilizó como sustrato suelo del lugar de procedencia de la semilla y turba (4:1 v/v), que se mantuvo siempre húmedo a capacidad de campo. Las condiciones ambientales de la cámara de cultivo fueron de 25°C, 16 h. de fotoperíodo y $111 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de iluminación.

Para las pruebas de cultivo in vitro, también se utilizaron semillas completas que se esterilizaron por inmersión en etanol 70% durante pocos segundos, seguida de otra inmersión en hipoclorito sódico 0.7% durante 15 minutos y varios lavados en agua destilada estéril. Después, trabajando siempre en las condiciones asépticas de la cámara de flujo, cada semilla se depositó en un tubo de ensayo con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 3% de sacarosa en agar 0.7% a pH 5.8. Una vez debidamente tapado, el tubo con la semilla se colocó en una cámara de cultivo a 25°C, 16 h. de fotoperíodo y $30 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de iluminación. Tras 30 días de incubación, las plántulas obtenidas (figura 1A) se trasplantaron a condiciones externas (figura 1B), siguiendo el método indicado antes (Cantos et al., 1993), con lo que se obtuvo un 95 % de supervivencias.

En las pruebas de bandejas se obtuvo 30% de plántulas a los 40 días de la siembra que no se modificó ulteriormente. En las pruebas de germinación in vitro se alcanzó un 100 % de plántulas a los 30 días de cultivo. Es decir, que aunque la germinación en condiciones normales no fue excesivamente baja, el cultivo in vitro mejoró notablemente los resultados en rendimiento y tiempo lo que se considera importante para una especie con tan pocos ejemplares y en grave peligro de extinción.



Figura 1. Cultivo in vitro y adaptación al exterior de atropa (A y B) y acebo (C y D).

Ilex aquifolium (L) acebo

En España se distribuye principalmente en Galicia, Cordillera Cantábrica, Pirineos, Sistema Ibérico y Sistema Central, en menor escala en los montes de Toledo, Sierras de Extremadura y Cadenas litorales de Levante y es muy escaso en el Sur con alguna representación en la Sierra de Cazorla, Sierra Nevada y Penibética.

El bajo número de individuos existentes, el crecimiento lento y la mala germinación hacen que esta planta se considere en Andalucía como especie vulnerable (Libro Rojo de la Flora Silvestre Amenazada de Andalucía, 2000).

Para los experimentos de germinación, se recolectaron frutos maduros en el Parque Natural Los Alcornocales (Cádiz-Málaga), que se guardaron en bolsas de papel y se almacenaron a 4°C.

Dado el mucho tiempo necesario para la germinación de la semilla por métodos convencionales (2-3 años), no se realizaron pruebas de germinación en bandejas.

In vitro, se ensayaron semillas completas, semillas sin cubierta, medias semillas sin cubierta conteniendo el embrión y embriones aislados. En el primer caso, las semillas se extrajeron del interior de los frutos y se seleccionaron por no presentar anomalías a simple vista. Para su desinfección, se utilizó una disolución de hipoclorito sódico 7% de cloro activo y ácido clorhídrico 35%. Las semillas se sumergieron en dicha disolución durante 20 min. y agitación continua y, posteriormente, se lavaron varias veces con agua destilada estéril. A continuación, trabajando en condiciones asépticas, se colocaron individualmente en tubos de ensayo con 10 cc de medio MS/3 (Murashige y Skoog, 1962), 20 g^l⁻¹ de sacarosa, 33 mg^l⁻¹ de mio-inositol y 1 mg^l⁻¹ de zeatina, sobre agar 0.7% a pH 5.8. Los tubos con las semillas, una vez tapados, se colocaron en una cámara de cultivo a 22°C y oscuridad.

Las semillas sin cubierta, se obtuvieron recortando los bordes de la misma con un cortañas y eliminando los restos con la ayuda de pinzas y la punta del bisturí. Los procedimientos de esterilización, siembra y cultivo fueron iguales a los indicados antes para la semilla completa.

La media semilla con embrión se obtuvo haciendo un corte transversal mediano a la semilla sin cubierta y eligiendo la mitad que contenía el embrión. El embrión se aisló haciendo cortes laterales en el endospermo con un bisturí, bajo lupa binocular, hasta dejarlo visible e intacto. Después, se sacó con la punta del bisturí y rápidamente se sembró. En estos dos casos también se utilizaron los mismos métodos de esterilización previa de la semilla, medio de cultivo e incubación indicados antes. Las plántulas germinadas se pasaron a condiciones de iluminación (30 μEm⁻²s⁻¹) con 16 h. de fotoperíodo y una vez logrado un desarrollo suficiente, se sacaron al exterior utilizando el método indicado por Cantos et al., (1993).

Semillas completas		Semillas sin cubierta		semilla sin cubierta		Embrión (inmaduro)	
Días de cultivo	% germinación	Días de cultivo	% germinación	Días de cultivo	% germinación	Días de cultivo	% germinación
300	0	300	0	150	25	150	66

Tabla 1. Resultados obtenidos en las diferentes pruebas de germinación in vitro de acebo.

De acuerdo con los datos de la tabla 1, no se logró germinación alguna cuando se utilizó la semilla completa ni la semilla entera sin cubierta tras 300 días de siembra. Existió en consecuencia un fuerte efecto de latencia en estas semillas, que no había roto ni el almacenamiento previo de frío (180 días a 4°C) ni las condiciones de cultivo in vitro, con la presencia de zeatina en el medio.

Cuando se eliminó la mitad del endospermo, se bajó el nivel de dormancia y se alcanzó un 25% de germinación. No obstante, el mayor tanto por ciento de germinación (66%) se logró con el cultivo in vitro de embriones aislados. En este caso, se eliminaron totalmente los efectos de dormancia seminal debidos a la cubierta y al endospermo, pero se descubrió otro debido al propio embrión, que fue su inmadurez. Es decir, se comprobó la existencia de un desfase entre el grado de maduración del fruto y del endospermo y del embrión. Por ello, antes de germinar el embrión tuvo que acelerar su maduración artificialmente in vitro.

Las plántulas germinadas se desarrollaron in vitro durante 60 días hasta alcanzar un tamaño adecuado (figura 1C), no existiendo problemas para ser trasplantadas a condiciones externas (figura 1D) con el método de Cantos et al., (1993).

Juniperus oxycedrus* (L.) subsp. *macrocarpa* y *oxycedrus

Los enebros tienen un gran valor ecológico previniendo la erosión por protección y formación de suelos y también presentan algunas aplicaciones comerciales. No obstante, es una especie declarada en peligro de extinción en Andalucía (Libro Rojo de la Flora Silvestre Amenazada de Andalucía, 2000), debido a la invasión de su hábitat por nuevas urbanizaciones, talas incontroladas, fuegos, enfermedades y una regeneración negativa dada su dificultad de propagación y desarrollo muy lento.

Para las pruebas de germinación se recolectaron gálbulos de la subsp. *oxycedrus* en las riberas del río Viar en Cazalla de la Sierra (Sevilla) y de la subsp. *macrocarpa* en las costas de Cabo Roche en Conil de la Frontera (Cádiz). En ambos casos la recolección se realizó a finales de Noviembre. Una vez en el laboratorio se abrieron los gálbulos y se sacaron y contaron

las semillas que se lavaron con xilol 98% para eliminarles los restos de resina y se almacenaron a 4°C.

Para la germinación en bandejas, las semillas se sembraron a una profundidad entre 0.5 – 1 cm en substrato de suelo donde vive la planta y turba (4:1 v/v).

Para el cultivo *in vitro*, se prepararon semillas sin cubierta rompiendo dicha envuelta (testa) por presión, dejando libre el endospermo que contenía el embrión. Para el aislamiento de éste, primero se incubó la semilla sin testa en agua destilada estéril durante 24 h., lo que provocó una hinchazón del endodermo que facilitó la realización de cortes laterales que dejaron visible el embrión sin dañarlo, el cual se extrajo con la punta de un bisturí. Todas estas operaciones se realizaron en condiciones asépticas (cámara de flujo) habiéndose previamente tratado las semillas sin cubierta con hipoclorito sódico (3.5 g l^{-1} de cloro activo) durante 5 minutos.

Las semillas sin cubierta y los embriones aislados, se sembraron individualmente (figura 2) en tubos de ensayo en medio MS/3 (Murashige y Skoog, 1962) con 3% de sacarosa y 0.5 g l^{-1} de GA_3 , en agar 0.8% a pH 5.7. Las condiciones de incubación fueron de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $30 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de iluminación y 16 h. de fotoperíodo. Tras 60 días de cultivo en esas condiciones, las plántulas obtenidas (figura 2) se trasplantaron a condiciones externas siguiendo el método indicado antes (Cantos et al., 1993).

Dado el comportamiento similar de las dos subespecies consideradas los resultados se tratan conjuntamente. Antes de realizar las pruebas de germinación se hizo un estudio sobre la viabilidad de la semilla. Se usaron 5989 semillas de las dos subespecies de enebro, de las cuales 2717 (45.4%) fueron normales y 3272 (54.6%) no viables (vanas o malformadas). Este hecho, explica parcialmente las bajas tasas de germinación del enebro.

En la tabla 2 se indican los resultados de las distintas pruebas de germinación.



Figura 2. Embrión y plántula *in vitro* de enebro, y planta adaptada.

Germinación en bandejas		Germinación in vitro					
Semillas con testa		Semillas con testa		Semillas sin testa		Embriones	
Días de cultivo	% germinación	Días de cultivo	% germinación	Días de cultivo	% germinación	Días de cultivo	% germinación
500	0 (0%)	300	0 (0%)	300	37 (12.3%)	200	100 (50%)

Tabla 2. Germinación de semillas y embriones de la especie *Juniperus oxycedrus*.

Tras un año desde la siembra, no se produjo germinación, ni en bandejas ni in vitro, con las semillas completas incluso cuando se trataron con, calor, GA₃, ácido, etc. Esto indica una fuerte latencia seminal.

La eliminación de la cubierta (testa) y el cultivo in vitro en presencia de GA₃ permitió la germinación de una proporción baja de semillas. es decir, la suma de ambos procesos disminuye la dormición, pero aun queda una latencia elevada que puede ser debida al endospermo.

Los mejores resultados se obtuvieron con la germinación in vitro de embriones aislados (50%) sin que fuese necesaria la adición de GA₃ al medio. No obstante, quedó otro 50% de embriones sin germinar, algunos de ellos por contaminación (8%) y el resto porque no llegaron a activarse. es decir, también pareció existir una latencia asociada al propio embrión.

Utilizando el método de Cantos et al., (1993) no existió dificultad en el trasplante in vitro – ex vitro de la plántula obtenida (figura 2).

En consecuencia, el cultivo in vitro del embrión de enebro, se demostró como un medio eficaz para su reproducción, no obstante la dificultad de germinación de esta especie que se asocia a fenómenos de dormición dependientes de la cubierta (testa), endospermo y del propio embrión.

***Olea europea sylvestris* (Miller) (acebuche)**

Los acebuches se reparten principalmente por los países mediterráneos, siendo una especie típica del dominio climático oleum-ceratonium. En Andalucía tiene una representación bastante amplia por lo que en conjunto no es una especie en grave peligro de desaparición. No obstante, hay que considerar, que su hábitat cada vez se reduce mas, que en él se encuentran pocas plantas jóvenes y en especial en determinados ecosistemas como áreas salinas (figura 3), áridas, zonas frías, etc, es decir, lugares con problemas de estrés ambiental, la regresión es manifiesta y el peligro de extinción real.

Para los experimentos de germinación de acebuches se eligieron plantas que vivían en condiciones de salinidad elevada. Se seleccionaron



Figura 3. Acebuche en medio salino, siembra de embrión y desarrollo de plántula in vitro.

dos zonas Raboconejo (Parque Natural, Marismas del Odiel) y esteros de San Fernando (Parque Natural Bahía de Cádiz). De las plantas mejor adaptadas a la situación de estrés salino (lo que se comprobó por análisis de suelo y planta, y aspecto general) se recolectaron frutos maduros, que se llevaron al laboratorio, se les eliminó la pulpa y las semillas se almacenaron a 4°C.

No se realizaron pruebas de germinación tradicional, ya que al ser el sistema utilizado en los viveros italianos, en los que se obtienen plántulas de olivo silvestre para ser injertadas en la variedad deseada, se conocen bien los resultados de esta técnica con la que se obtienen rendimientos medios próximos al 40% de germinación tras 2 años desde la siembra.

Para las pruebas in vitro las semillas sólo estuvieron pocos días en frío. Para la obtención de la semilla sin cubierta, se rompió el endocarpo leñoso con un cortatubos y se dejó la semilla desnuda.

Para el aislamiento del embrión se realizaron cortes laterales longitudinales en el endospermo que sin afectar al embrión lo dejaron visible y pudo ser extraído fácilmente con la punta del bisturí. Tanto la semilla sin endocarpo como el embrión aislado, se sembraron individualmente en tubos de ensayo con 10 cc de medio OM (Rugini 1984) en agar 0.7% a pH 5.6 (figura 3). Los tubos con el material vegetal, una vez convenientemente tapados, se colocaron en una cámara de cultivo a 25°C, 30 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de iluminación y 16 h. de fotoperíodo. Tras 60 días de cultivo en esas condiciones, las plántulas alcanzaron un desarrollo suficiente para ser trasplantadas a condiciones externas.

Las semillas sin endocarpo alcanzaron un 60% de germinación en 40 días, mientras que con el embrión aislado se logró un 100% de germinación en sólo 10 días desde la siembra. En ambos casos, se obtuvieron plántulas trasplantables al exterior en tan sólo 60 días de cultivo in vitro adicional (figura 3). Estas plántulas, utilizando el método de Cantos et al., (1993) tuvieron pocas pérdidas (4-5%) al trasplante y se adaptaron bien a condiciones externas. En consecuencia, el cultivo in vitro de embriones aislados, que fue mas interesante que el de semillas sin cubierta, representa una

avance importante en la germinación del acebuche ya que llega hasta un rendimiento del 100% y acorta muy significativamente el tiempo necesario para obtener una planta viable, e incluso elimina el período de almacenamiento en frío de la semilla.

***Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum* (Boiss & Reuter) (ojaranzo o azalea)**

En Andalucía, está presente en el Parque “Los Alcornocales”, principalmente en la Sierra del Aljibe especialmente en márgenes de ríos y arroyos encajonados (canutos) y en sierras litorales con nieblas. En sus poblaciones aparecen muy pocos individuos jóvenes, lo que indica las dificultades para su propagación. En efecto, la reproducción es muy compleja debido a la poca producción de semillas útiles y dificultades de tipo ambiental a la germinación. También la propagación agámica presenta grandes problemas.

Estas dificultades de propagación, junto con la influencia negativa de algunas perturbaciones ambientales y la desaparición de plantas por desmontes, rozas excesivas o muerte natural, implican una tasa de recuperación negativa que definen a esta subespecie como en peligro de extinción (Decreto 104/1994 Junta de Andalucía).

Para los experimentos de germinación se utilizaron semillas procedentes del Palancar (ventiladores) y Canuto de Enmedio en el Parque Natural “Los Alcornocales” y se conservaron a 4°C.

Para la germinación en bandejas se utilizaron 1650 semillas que habían estado en frío durante 22 meses, se sembraron en sustrato de turba y arena (3:1 v/v) y se mantuvieron a humedad constante de capacidad de campo, 23°C de temperatura y pH 5.2 .

Para la germinación in vitro se utilizaron semillas idénticas a las anteriores, procedentes del mismo lote, que se esterilizaron primero por inmersión durante 1 min. en etanol 90% y después por nueva inmersión en hipoclorito 3.5% durante 15 minutos, con posteriores lavados con agua destilada estéril. El material de vidrio, instrumental y medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 1 atm. de presión y 121°C de temperatura durante 20 minutos.

Las semillas se sembraron en tubos de ensayo sobre 8 cc de medio nutritivo VID (Troncoso et al., 1990) en agar 7% . Esta operación se realizó en cámara de flujo laminar estéril. Las condiciones de incubación fueron de 23±1°C de temperatura, 30 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de iluminación y 16 h. de fotoperíodo. Tras 4 meses de cultivo (foto 10) las plántulas se trasplantaron a condiciones externas (Cantos et al., 1993) (figura 4).

En las bandejas se obtuvo un máximo de un 2.5 % de plántulas útiles a los 90 días de la siembra mientras que en el cultivo in vitro se alcanzó el 90% de nuevas plántulas a los 10 días, que tras 120 días de cultivo se tras-



Figura 4. Diversas fases del cultivo in vitro de rododendron.

plantaron al exterior, lográndose un 63 % de supervivencia. Es decir, el cultivo in vitro de la semilla de rododendron mejoró espectacularmente el tanto por ciento de germinación y disminuyó el tiempo necesario para ello.

Dado los buenos resultados obtenidos con la semilla completa in vitro y la dificultad de manipulación por su pequeño tamaño no se hicieron pruebas con semillas sin cubierta o embriones.

Los resultados obtenidos con el uso de métodos de cultivo in vitro en la reproducción de las especies indicadas, definen el valor de estas técnicas en la reproducción de plantas de interés forestal que presenten dificultades de propagación por métodos tradicionales.

BIBLIOGRAFÍA

- APARICIO, A.; (1993). Planes de Recuperación de especies vegetales amenazadas en el Parque Natural de la Sierra de Grazalema (Cádiz-Málaga). *Acta Bot. Malacitana* 18: 199-221.
- CANTOS, M.; LIÑÁN, J.; PÉREZ-CAMACHO, F. TRONCOSO, A.; (1993) "Obtención de plantas selectas de vid, variedad Zalema, libres de la virosis "entrenudo corto»". *Actas de Horticultura*. 'II, 705-709.
- CONSEJERIA DE MEDIO AMBIENTE. JUNTA DE ANDALUCIA. (2000). Libro Rojo de la Flora Silvestre amenazada de Andalucía. Tomos I y II. ISBN 89650-75-6.
- MURASHIGE T. AND SKOOG F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.*, 15: 473-497.
- RUGINI E. (1984). In vitro propagation of some olive (*olea europea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae*, 24: 123-134.

TRONCOSO A., VILLEGASA., MAZUELOS C., CANTOS M. (1990). Growth and mineral composition of grapevine rootstock cultured «in vitro» with different levels of ammonium nitrate. Plant Nutrition, physiology and applications. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.