
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



TRABAJO FIN DE GRADO

**Propagación de variedades recalcitrantes
de *Olea europaea* y *Argania spinosa***

José David Celdrán López

Directores: José Manuel Pérez-Pérez

María Salud Justamante Clemente

Departamento de Biología Aplicada

Área de Genética

Curso 2015-16



Instituto de Bioingeniería

Universidad Miguel Hernández

JOSÉ MANUEL PÉREZ-PÉREZ, Profesor Titular de Universidad en el área de conocimiento de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y

MARÍA SALUD JUSTAMANTE CLEMENTE, Titulado Superior del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR

que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por el alumno José David Celdrán López. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.



José Manuel Pérez-Pérez



María Salud Justamante Clemente

Elche, 27 de junio de 2016

RESUMEN

El presente Trabajo Fin de Grado pretende contribuir a la optimización del protocolo de micropropagación de las especies oleaginosas del argán (*Argania spinosa* (L.) Skeels) y el olivo (*Olea europea* L.) con el fin de propagar variedades que puedan resistir el futuro incremento de temperaturas y déficit hídrico a causa del cambio climático, el cual tendrá un gran impacto en la Península Ibérica en los próximos años. Hemos utilizado diferentes tratamientos con auxinas, tanto *in vitro* como *in vivo*, de esquejes de estas especies oleaginosas para estudiar la formación de callo y de raíces adventicias en 22 esquejes de argán *in vitro*, 115 esquejes de argán *in vivo* y 1248 esquejes de olivo *in vivo*. Con los parámetros morfológicos recopilados durante este trabajo (formación del callo, número de raíces adventicias, número de hojas y longitud de los esquejes), hemos llevado a cabo diversos estudios estadísticos basados en análisis de varianzas para identificar qué tratamientos y qué parámetros influyen en mayor manera en la formación de callo y aparición de raíces adventicias en dichos esquejes.

Nuestros resultados indican que existen asociaciones estadísticamente significativas en la formación de callo entre los tratamientos con auxinas y sin auxinas en los esquejes de argán *in vitro*. Nuestros tratamientos con auxinas para los esquejes de argán y olivo *in vivo* nos han permitido obtener raíces adventicias en esquejes de ambas especies con una alta eficacia, y hemos observado diferencias estadísticamente significativas en la obtención de callos y raíces adventicias y los diferentes tratamientos con auxinas. Además, hemos encontrado correlaciones positivas entre número de raíces y la formación de callo en los esquejes de argán *in vivo* y entre formación de callo y número de hojas en esquejes de olivo *in vivo*. Nuestros procedimientos permitirán aumentar la eficacia de la propagación vegetativa del olivo y el argán.

PALABRAS CLAVE: formación de raíces adventicias, auxinas, esquejes, análisis de varianzas, argán, olivo.

ABSTRACT

This project aims to contribute to the optimization of micropropagation protocol of the oleaginous species argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) and olive (*Olea europaea* L.) in order to propagate varieties that can withstand the future rising temperatures and rising shortages due to climate change, which will have a major impact on the Iberian peninsula in the coming years. We have used different treatments with auxin, both *in vitro* and *in vivo*, cuttings of these oleaginous species to study the formation of callus and adventitious roots in 22 cuttings of argan *in vitro*, 115 cuttings of argan *in vivo* and 1248 cuttings of olive *in vivo*. With the morphological parameters collected during this work (callus formation, adventitious root number, leaf number and length of cuttings), we have carried out several statistical studies based on analysis of variance to identify which treatments and what parameters have a major influence in callus formation and development of adventitious roots in these cuttings.

Our results indicate that there are statistically significant associations in callus formation between treatments with auxin and without auxin in the cuttings of argan *in vitro*. Our treatments with auxins for argan and olive cuttings *in vivo* have allowed us to obtain adventitious roots in cuttings of both species with high efficiency, and we have observed statistically significant differences in obtaining callus and adventitious roots and the different treatments with auxin. In addition, we have found positive correlations between the number of roots and callus formation in cuttings of argan *in vivo* and between callus formation and leaf number in cuttings of olive *in vivo*. Our procedures will increase the effectiveness of vegetative propagation of olive and argan.

KEYWORDS: adventitious root formation, auxin, cuttings, analysis of variance, argan, olive.



ÍNDICES

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	1
1.1 OBJETO DE ESTUDIO.....	1
1.2 CAMBIO CLIMÁTICO EN LA CUENCA MEDITERRÁNEA Y SUS EFECTOS EN EL OLIVO.....	2
1.3 FORMACIÓN E INDUCCIÓN HORMONAL DE RAÍCES ADVENTICIAS.....	3
1.4 PROPAGACIÓN VEGETATIVA Y MICROPROPAGACIÓN.....	5
1.5 EL OLIVO Y SU PROPAGACIÓN.....	7
1.6 EL ARGÁN Y SU PROPAGACIÓN.....	10
1.7 PERSPECTIVAS.....	12
2. OBJETIVOS.....	13
3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	14
3.1 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	14
3.2 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	17
3.3 ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS Y RESCATE DE EMBRIONES.....	18
3.4 INDUCCIÓN DE BROTES Y FORMACIÓN DE RAÍCES <i>IN VITRO</i>	18
3.5 INDUCCIÓN DE LA FORMACIÓN DE RAÍCES A PARTIR DE ESQUEJES.....	20
3.6 OBTENCIÓN DE IMÁGENES.....	23
3.7 ANÁLISIS DE IMÁGENES.....	24
3.8 PRUEBAS ESTADÍSTICAS.....	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1 RESCATE DE EMBRIONES Y GERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE ARGÁN.....	26
4.2 FORMACIÓN DE CALLO Y ENRAIZAMIENTO DE ESQUEJES DE ARGÁN <i>IN</i> <i>VITRO</i>	27

4.3 FORMACIÓN DE CALLO Y ENRAIZAMIENTO DE ESQUEJES DE ARGÁN <i>IN VIVO</i>	30
4.4 ENRAIZAMIENTO DE ESQUEJES DE OLIVO.....	32
4.4.1 FORMACIÓN DE CALLO.....	34
4.4.2 NÚMERO DE RAÍCES ADVENTICIAS.....	36
4.4.3 NÚMERO DE HOJAS.....	37
5. CONCLUSIONES.....	38
6. BIBLIOGRAFÍA.....	39
7. ANEXO I.....	43
8. ANEXO II.....	46



ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1	Tratamientos utilizados para la formación de raíces a partir de esquejes en olivo.....	22
Tabla 2	Parámetros que se han estudiado en este trabajo.....	24
Tabla 3	Prueba de rango múltiple para la formación de callo en esquejes de argán <i>in vitro</i>	29
Tabla 4	Prueba de rango múltiple para la formación de callo en esquejes de argán enraizados <i>in vivo</i>	30
Tabla 5	Prueba de rango múltiple para el número de raíces en esquejes de argán enraizados <i>in vivo</i>	31
Tabla 6	Prueba de rango múltiple para el número de hojas en esquejes de argán enraizados <i>in vivo</i>	31
Tabla 7	Matriz de correlaciones entre parámetros del enraizamiento de esquejes de argán.....	32
Tabla 8	Matriz de correlaciones entre parámetros del enraizamiento de esquejes de olivo.....	34
Tabla 9	Prueba de rango múltiple para el estadio de callo en esquejes de olivo.....	35
Tabla 10	Prueba de rango múltiple para el número de hojas en esquejes de olivo...	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1	Proyecciones de cambio climático en España.....	3
Figura 2	Raíces adventicias en <i>Argania spinosa</i> y <i>Olea europaea</i>	4
Figura 3	Esquema general del proceso de micropropagación.....	7
Figura 4	Imagen de un árbol de olivo <i>Olea europea</i> L. var. Alfafarenca.....	9
Figura 5	Imágenes de un árbol de argán (<i>Argania spinosa</i> L. Skeels).....	10
Figura 6	Muestra representativa de semillas y esquejes de argán recolectados.....	14
Figura 7	Ramas de olivo para la obtención de esquejes.....	15
Figura 8	Condiciones climáticas del crecimiento <i>in vitro</i> de argán.....	15
Figura 9	Condiciones climáticas del crecimiento de los esquejes de argán y olivo.	16
Figura 10	Esquema de las etapas de germinación, elongación y obtención de esquejes <i>in vitro</i> en el argán	19
Figura 11	Esquema de los distintos estadios de formación de callo en los esquejes de olivo.....	21
Figura 12	Sistema preparado para la toma de fotografías de los esquejes.....	23
Figura 13	Distintos resultados obtenidos de los embriones de argán <i>in vitro</i>	27
Figura 14	Aparición de raíces adventicias en plántulas de argán.....	28
Figura 15	Esquejes de argán en cultivo <i>in vitro</i>	29
Figura 16	Enraizamiento de esquejes de argán.....	31
Figura 17	Distribución de frecuencias para la longitud del esqueje.....	33
Figura 18	Estadio del callo y tratamientos en esquejes de olivo.....	35
Figura 19	Formación de callo en distintos tratamientos.....	35
Figura 20	Una imagen representativa de esquejes de olivo tratados con la mezcla comercial de auxinas en polvo (T6).....	36



INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 Objeto de estudio

El laboratorio del Prof. José Manuel Pérez está interesado en el estudio de los mecanismos genéticos implicados en la regeneración de órganos vegetales y su regulación hormonal, siendo el enraizamiento adventicio uno de los principales temas de investigación en su laboratorio (www.arolab.es). La caracterización a nivel histológico, genético y funcional de la formación de raíces adventicias –raíces desarrolladas a partir de tejido no radicular– que se está llevando a cabo en especies modelo, permitirá transferir estos conocimientos a otras especies vegetales para la mejora de los protocolos empleados durante la micropropagación de variedades élite en especies de interés agrícola.

Tanto el olivo, *Olea europea* L., como el argán *Argania spinosa* (L.) Skeels, son dos especies oleaginosas capaces de soportar las duras condiciones climáticas que caracterizan a la región mediterránea. Debido a los efectos del cambio climático, se prevé para los próximos años un aumento considerable de la temperatura media a nivel global, exacerbándose los efectos del déficit hídrico que caracteriza a la región mediterránea (Muñoz 2002). Esta variación climática, que afecta tanto al desarrollo normal de los ciclos de reproducción de las especies vegetales como a su tasa de supervivencia, amenaza con disminuir considerablemente la producción de aceite de oliva, entre otros cultivos (Rapoport *et al.*, 2012).

Aunque se ha tratado de propagar de forma vegetativa algunas variedades recalcitrantes de olivo y argán, los resultados que se han obtenido hasta la fecha son limitados (Hedayati *et al.*, 2015; Bellefontaine *et al.*, 2011). Por tanto, resulta de interés fundamental en agricultura optimizar la propagación vegetativa de variedades muy productivas que, a la vez, sean capaces de resistir condiciones climáticas adversas.

Este Trabajo de Fin de Grado pretende contribuir al proyecto “*Optimización del enraizamiento de esquejes en olivo y argán*” que está financiado, en parte, a través de un contrato de apoyo tecnológico con la empresa *Momcor Esquejados S.L.*

1.2 Cambio climático en la cuenca mediterránea y sus efectos en el olivo

La cuenca mediterránea se halla en una zona de transición entre el clima árido del norte de África y el clima lluvioso del centro de Europa, que está afectada por interacciones entre latitudes medias y procesos tropicales (Giorgi y Lionello 2008). Esta localización ha sido identificada como una de las zonas que son y serán más afectadas en el futuro próximo debido al cambio climático, pues en ellas ya se está produciendo un incremento tanto de las temperaturas como de la evapotranspiración de las comunidades vegetales, así como un descenso en las lluvias que hará que la producción de olivo disminuya (Oteros *et al.*, 2014).

En estudios previos se ha demostrado que el déficit hídrico en el olivo provoca una reducción en el número de inflorescencias y de flores, además de un menor desarrollo de los ovarios y óvulos, con lo que se produce finalmente un menor rendimiento en la producción de olivas (Rapoport *et al.*, 2012). Además, se ha comprobado que el estrés hídrico puede causar alteraciones morfológicas en las hojas de olivo (Bosabalidis y Kofidis 2002) y afecta negativamente a la capacidad fotosintética del olivo (Angelopoulos *et al.*, 1996).

Durante el siglo XX, y particularmente desde la década de los 70 en este siglo, las temperaturas en España han aumentado de forma general con una magnitud algo superior a la media global, y las precipitaciones han tendido a la baja sobre todo en la parte meridional y la región de Canarias (Moreno 2005). Las proyecciones climáticas desarrolladas en varios estudios muestran que a lo largo del siglo XXI las temperaturas se irán incrementando y las precipitaciones irán disminuyendo (Moreno 2005). Por medio de dichas proyecciones (Figura 1), se puede predecir que España será uno de los países más afectados de la cuenca mediterránea a causa del cambio climático, por lo que es de esperar que las distintas comunidades vegetales autóctonas que residen en nuestro país desarrollen una variación en su ciclo anual de desarrollo o incluso en su tasa de supervivencia, debido a la alteración de procesos fisiológicos importantes como las tasas fotosintéticas, el intercambio gaseoso o la floración (Llorens *et al.*, 2002). Del mismo modo, es altamente probable que las áreas destinadas de forma tradicional a la producción de cultivos puedan quedar en gran medida limitadas por las

nuevas características ambientales, donde predominará el estrés por elevadas temperaturas y la falta de agua.

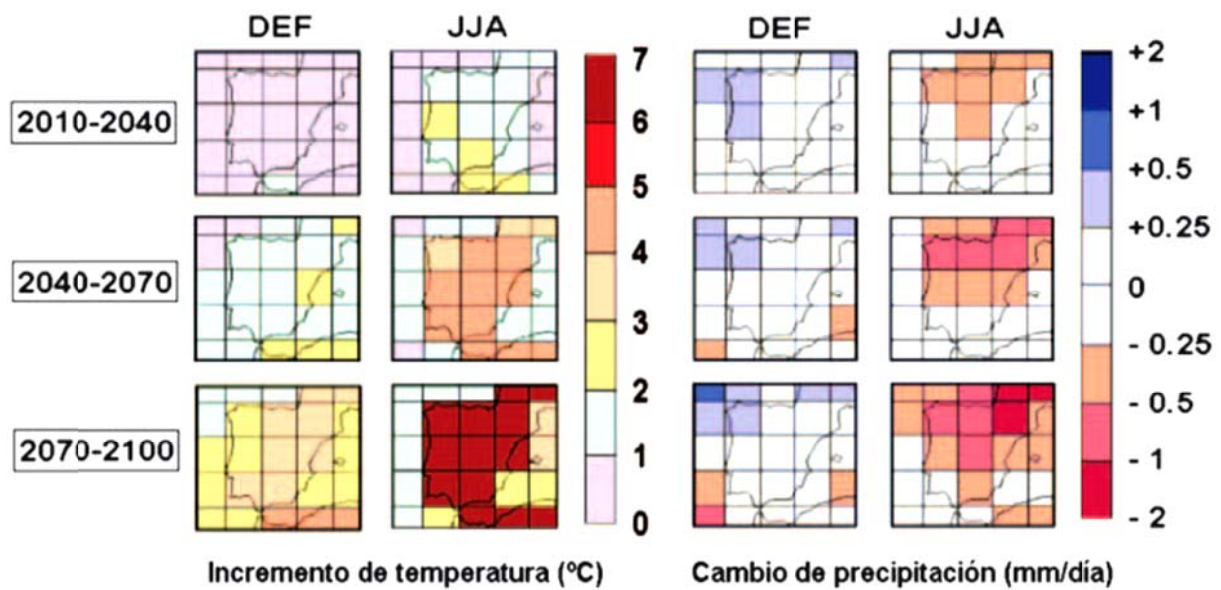


Figura 1.- Proyecciones de cambio climático en España. Estas proyecciones muestran las previsiones sobre el incremento de temperatura (°C) y los cambios en las precipitaciones (mm/día), mostrándose el promedio en dos estaciones del año diferentes (DEF= invierno y JJA= verano), correspondientes a tres periodos del siglo XXI: 2010-2040, 2040-2070 y 2070-2100. Figura adaptada a partir del *Intergovernmental Panel on Climate Change Data Distribution Centre* (IPCC-DCC).

1.3 Formación e inducción hormonal de raíces adventicias

El sistema radicular de las angiospermas está constituido por una raíz principal a partir de la cual se desarrollan las raíces secundarias o laterales. Además, existe otro tipo de raíces denominadas raíces adventicias (Figura 2), las cuales se caracterizan por crecer en tejidos diferenciados no radiculares, como en el hipocótilo o las hojas, en respuesta a diferentes tipos de estrés. Tanto las raíces laterales como las adventicias se desarrollan de forma post-embrionaria, pudiendo derivar, dependiendo de la especie, de células del periciclo adyacentes a las del xilema (como sucede en el girasol o el rábano) o de células adyacentes a las del floema (como en maíz y zanahoria) (Bellini *et al.*, 2014).

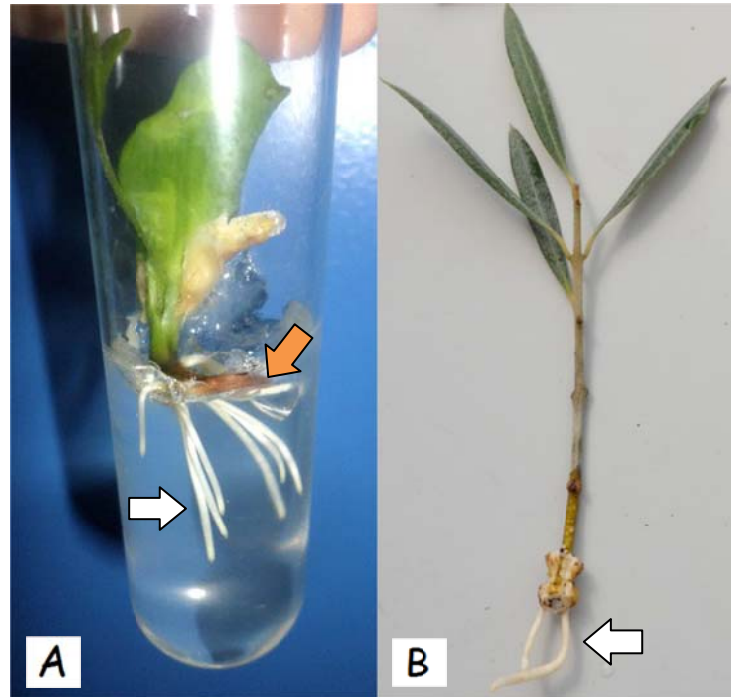


Figura 2.- Raíces adventicias en *Argania spinosa* y *Olea europaea*. (A) Una plántula de argán crecida *in vitro* a la que se le eliminó parte de su raíz principal (flecha naranja) y que produjo raíces adventicias (flecha blanca) asegurando su supervivencia. (B) Esqueje de olivo cultivado en maceta y que, tras los tratamientos hormonales adecuados, es capaz de regenerar raíces adventicias *de novo* en base del tallo (flecha blanca), lo que posibilita su propagación vegetativa.

La formación de raíces adventicias es un proceso complejo determinado por factores endógenos y ambientales, en el cual las auxinas desempeñan un papel fundamental (Bellini *et al.*, 2014) y cuya formación se divide en tres etapas, las cuales son: inducción, iniciación y expresión (de Klerk *et al.*, 1999). En multitud de especies, las raíces adventicias provienen de la dediferenciación de una población de células vasculares, como las células del periciclo del hipocótilo (Sukumar *et al.*, 2013) o el cambium vascular en el tallo (Ahkami *et al.*, 2013; Agulló-Antón *et al.*, 2013; Verstraeten *et al.*, 2013), ya que las células precursoras de las raíces adventicias no se encuentran preformadas.

En la fase de inducción, las células dediferenciadas sufren reprogramación celular para convertirse en células que puedan iniciar nuevos órganos, activándose a continuación su proliferación celular y la formación de primordios en la fase de

iniciación. Por último, en la fase de expresión, crecen los primordios y se produce una conexión vascular con el tallo, surgiendo nuevas raíces funcionales (Cano *et al.*, 2014).

Para estudiar la regulación hormonal de la formación de raíces adventicias se ha comprobado, en estudios previos, que la aplicación exógena de auxinas promueve la formación de raíces adventicias en diferentes tejidos (Bellini *et al.*, 2014). En lo referente a propagación vegetativa, se ha demostrado en esquejes de distintas especies que es necesario el transporte polar de auxinas desde las hojas hasta la base del tallo para que estos esquejes puedan formar raíces adventicias (Ahkami *et al.*, 2013; Acosta *et al.*, 2009).

1.4 Propagación vegetativa y micropropagación

En plantas, la propagación vegetativa consiste en la reproducción a partir de una célula, tejido u órgano diferenciado. Muchas de las células de tejidos vegetales maduros pueden multiplicarse y diferenciarse para dar lugar a estructuras como tallos y raíces, encontrándose dichas células en meristemos primarios y secundarios. Estas células meristemáticas no diferenciadas tienen suficiente información genética y propiedades fisiológicas como para producir una nueva planta idéntica a la planta madre, lo cual se conoce como totipotencia (Rojas *et al.*, 2004). Es por ello por lo que la propagación vegetativa tiene como objetivo la reproducción idéntica de plantas con unas características deseadas, con el fin de preservar determinados rasgos de una generación a la siguiente (Rojas *et al.*, 2004).

Existen tres métodos de propagación vegetativa muy empleados de forma frecuente, que pueden ser por esquejes, por acodos o por injertos (Rojas *et al.*, 2004). La propagación a través de esquejes consiste en separar una parte de una planta (ya sea un fragmento de raíz, de tallo o de hoja) para originar una nueva planta mediante la inducción de nuevas raíces. La propagación por acodos consiste en promover la formación de raíces en un tallo que está unido a la planta madre, siendo separado de ésta una vez haya enraizado. Por otra parte, en la propagación por injertos se conectan dos partes de tejido de dos plantas vivientes que, al unirse, formarán una nueva planta funcional. No obstante, existen especies que son capaces de propagarse de forma

natural por división (tubérculos, rizomas, bulbos, cormos, etc.), lo que facilita los procesos de multiplicación de dichas especies (Rojas *et al.*, 2004).

La técnica de propagación vegetativa ha adquirido gran importancia en ámbitos como la multiplicación y conservación de especies en peligro, la fijación de genes deseables y en la búsqueda de homocigosis en las poblaciones vegetales, presentando ventajas tales como: preservación de genotipos y complejos genéticos en bancos clonales y jardines botánicos, acortamiento del ciclo reproductivo para poder acelerar procesos de cruzamiento, obtención de poblaciones uniformes, y propagación de especies cuyas semillas presentan problemas de germinación, de almacenamiento o que son de ciclo reproductivo largo (Rojas *et al.*, 2004). Sin embargo, también presentan desventajas como dispersión de enfermedades virales y bacterianas, así como nula combinación genética que pueda favorecer la evolución de dichas especies (Rojas *et al.*, 2004).

Otra técnica empleada en la actualidad para la propagación de especies vegetales es la micropropagación, en la cual se cultivan plantas dentro de un recipiente estéril donde se genera un ambiente artificial, y que busca dos características fundamentales: la asepsia o ausencia de microorganismos y el control de los factores que afectan al crecimiento (Castillo 2004). A través de la micropropagación, es posible obtener una descendencia uniforme a partir de un fragmento (explante) de la planta madre, formada por plantas genéticamente idénticas denominadas clones.

La micropropagación es un proceso cuya mayor parte se realiza fundamentalmente dentro del laboratorio, y que consta de las siguientes fases: 1) selección y preparación de la planta madre, 2) desinfección del material vegetal, 3) introducción del material seleccionado *in vitro*, 4) multiplicación de brotes, 5) enraizamiento y 6) aclimatación (Castillo 2004).

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, es necesario obtener explantes con un grado de desarrollo adecuado, habiendo mantenido previamente la planta madre en un invernadero bajo condiciones controladas (fase 1); una vez elegida la planta madre, se extraen los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes (que pueden ser yemas, trozos de hojas, raíces, etc.), siendo necesaria una desinfección de dichos fragmentos antes de obtener los explantes (fase

2) y colocar dichos explantes en un recipiente con medio de cultivo estéril (fase 3). Cuando los explantes son depositados en medio de cultivo y sobreviven en ausencia de contaminación, son capaces de desarrollar brotes, los cuales hacen necesaria la realización de subcultivos en nuevos medios para su desarrollo (fase 4), utilizándose después un medio rico en auxinas que permita su enraizamiento (fase 5). Finalmente, los explantes enraizados son sacados del medio de enraizamiento y llevados a condiciones naturales en un invernadero para llevar a cabo su aclimatación (fase 6). En la Figura 3 se muestra un esquema general del proceso de micropropagación.

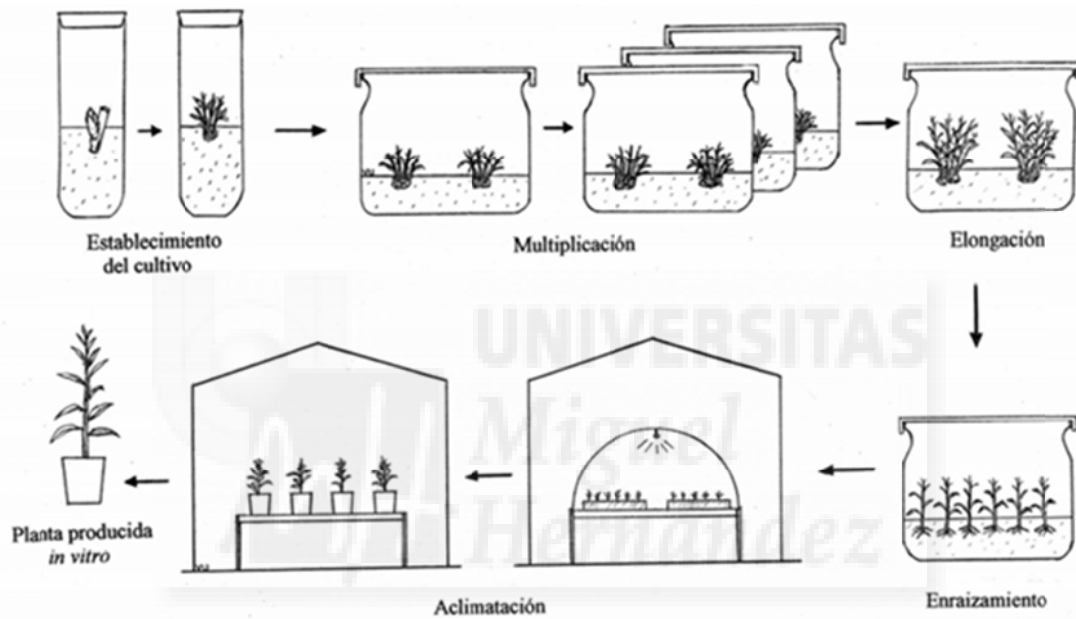


Figura 3.- Esquema general del proceso de micropropagación. Etapas que siguen los explantes desde el establecimiento del cultivo *in vitro* hasta su enraizamiento y aclimatación *ex vitro* en maceta. Imagen tomada de <http://ocw.udl.cat/engineyeria-i-arquitectura/fructicultura/continguts-1/l-7/monografia-no-7-cap.-6.-microprop.-y-otros-metodos>

1.5 El olivo y su propagación

El olivo (*Olea europea* L.), perteneciente a la familia *Oleaceae*, es un árbol diploide ($2n = 46$) perennifolio de copa ancha, tronco grueso y hasta 15 m de altura, el cual es actualmente uno de los árboles más cultivados de la cuenca mediterránea (Oteros *et al.*, 2014). Dentro de la especie del olivo existen multitud de variedades diferentes, de las cuales podemos encontrar en España hasta 262, las cuales se caracterizan por su antigüedad, su localización, su homogeneidad genética

(consecuencia del sistema de propagación vegetativa utilizado) y la escasa incidencia de mutaciones (Barranco 2004). Dentro del territorio de nuestro país, existen 24 variedades consideradas como principales, es decir, que presentan una elevada superficie cultivada y son dominantes de una determinada comarca (Barranco 2004).

El olivo es muy importante económicamente en la cuenca mediterránea, no sólo por su beneficioso aceite (Zamora *et al.*, 2004), sino también por el consumo de olivas (Hedayati *et al.*, 2015). En lo que se refiere a comercio, España es el primer país oleícola del mundo, siendo además el primer exportador del mundo de aceituna de mesa (FAOSTAT, 2014). Un informe del Consejo Oleícola Internacional (COI) señala que, además de la importancia socioeconómica de los productos oleícolas, los esfuerzos realizados en las últimas décadas sitúan a España en los primeros puestos en cuanto a investigación y desarrollo tecnológico en este sector (informe COI, 2012).

El olivo normalmente se propaga mediante el enraizamiento de esquejes, siendo una de las técnicas más empleadas desde los años 50 para esta planta, pero que presenta aún problemas importantes, tales como el enraizamiento de esquejes - dependiente de la época del año en que fueron tomados- o la baja capacidad de formación de raíces (Lambardi *et al.*, 2013). Estos problemas de propagación fueron también comprobados en el estudio de Hedayati, mostrando que muchas de las más importantes variedades de olivo tienen una baja capacidad de enraizamiento y que la incapacidad de formar raíces adventicias a partir de los tallos leñosos afecta seriamente al proceso de propagación clonal (Hedayati *et al.*, 2015).

Además del empleo de la técnica de esquejado para la propagación del olivo, también se ha intentado realizar el proceso de micropropagación *in vitro*, a pesar de haberse visto dificultado por factores como la oxidación de explantes y los problemas en la desinfección del material vegetal (Lambardi *et al.*, 2013). En la micropropagación de olivo también se han intentado técnicas no convencionales como la tecnología de protoplastos y el cultivo haploide para obtener mejoras genéticas a través de la variación somaclonal (Mangal *et al.*, 2014). Del mismo modo, se han realizado previamente experimentos de micropropagación utilizando fragmentos de tallo sin hojas de uno o varios nudos provenientes de una planta madre (segmentos nodales) (Lambardi *et al.*, 2013; Mangal *et al.*, 2014) y esquejes provenientes de plántulas

germinadas *in vitro* (Chiappetta *et al.*, 2014), consiguiéndose una buena eficiencia en la formación de raíces con diferentes concentraciones de auxinas.

A pesar del elevado porcentaje de enraizamiento que se ha llegado a conseguir en algunos casos, la micropropagación comercial de olivo no está muy extendida debido a que determinados cultivares de gran importancia son difíciles de establecer *in vitro* (Zuccherelli y Zuccherelli 2002), aunque la homogeneidad del material obtenido, las elevadas tasas de multiplicación y la obtención de plantas en buen estado sanitario hacen que este sistema de propagación esté resultando competitivo en algunos cultivares (García-Férriz e Ibarra-Huesa 2005).

La variedad de olivo “Alfafarenca” (nombre derivado de la localidad de Alfafara, Alicante) (Figura 4) es autóctona de la montaña alicantina, presentando su máxima extensión de cultivares en los alrededores de la Sierra de Mariola. Esta zona, que abarca desde el territorio de Alfafara hasta Benejama, tiene una altitud próxima a los 700 metros sobre el nivel del mar y un clima típicamente mediterráneo, con veranos calurosos y secos e inviernos fríos con alguna helada. Investigaciones recientes de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) han demostrado que esta variedad fue introducida en nuestro país por los fenicios desde las montañas del Líbano, hace unos 2500 años, procedente de una región con unas condiciones climáticas muy similares a las de la sierra alicantina.



Figura 4.- Imagen de un árbol de olivo *Olea europaea* L. var. *Alfafarenca*. Imagen tomada de <http://elrebstdelham.blogspot.com.es/>

El olivo de la Alfafarenca es un árbol vigoroso, resistente a las heladas, de producción constante y abundante, que da un fruto de maduración tardía que se recolecta entre finales de noviembre y enero (Gómez-Escalonilla y Vidal 2006). Una vez maduro, tiene un característico color morado oscuro, y produce un aceite intenso y aromático rico en polifenoles, que aportan al aceite sus propiedades antioxidantes. Además, el porcentaje de ácido oleico en esta variedad es elevado –cerca del 80%-, lo que la sitúa entre las variedades más apreciadas. Aunque los estudios científicos con esta variedad son muy limitados, se ha reportado que el porcentaje de enraizamiento de esquejes en esta variedad es muy bajo, en torno al 20-30%.

1.6 El argán y su propagación

El argán, *Argania spinosa* (L.) Skeels, perteneciente a la familia *Sapotaceae*, es un árbol fundamental de la cultura bereber y norteafricana, endémico de Marruecos y del cual se obtienen unas semillas con un aceite muy valioso por sus propiedades medicinales, cosméticas y nutricionales (Figura 5). El aceite de argán posee una mayor cantidad de ácido linoleico y una menor cantidad de ácido oleico, lo que lo hace más beneficioso desde el punto de vista nutricional (Prendergast y Walker 1992). Debido a los múltiples usos de este aceite y a la resistencia de esta planta a la sequía, el argán es un buen candidato para ser domesticado y establecido en zonas áridas como productor de aceite (Ait Abd *et al.*, 2011).



Figura 5.- Imágenes de un árbol de argán (*Argania spinosa* L. Skeels).

Por estas características, su cultivo en España podría llevarse a cabo en zonas secas y cálidas del sureste de la península, en las cuales se dan condiciones similares a su lugar de origen. Debido a que su cultivo no ha arraigado mucho, a diferencia de otras especies introducidas en la época de dominación árabe en la Península Ibérica, sólo se han encontrado algunos árboles aislados de argán de hasta 3 m de altura en la Región de Murcia y en la provincia de Alicante.

En anteriores estudios sobre el argán, se han realizado ensayos de multiplicación vegetativa para acelerar su producción en masa y así poder conservar la especie. Cabe destacar que muchos de ellos han resultado ineficaces debido a la dificultad de enraizamiento en el argán (Mokhtari y Zakri 1998), y a que sus semillas son muy heterogéneas debido a la reproducción alógama del propio argán (Msanda 1993). La propagación del argán mediante la germinación de semillas resulta un proceso complicado, debido a los gruesos tegumentos de la propia semilla (Miloudi y Belkhodja 2009), los cuales dificultan enormemente la regeneración de una plántula completa. La germinación y las primeras etapas de desarrollo de la semilla son críticas para el establecimiento de la especie, y los pocos ensayos para producir semillas en vivero han dado resultados muy heterogéneos (Alouani y Bani-Aameur 1999, 2004).

La viabilidad y la dormancia de las semillas son también otros dos importantes factores limitantes en la propagación del argán (Alouani y Bani-Aameur 2004, Al-Menaie *et al.*, 2007). Se estima que la dormancia afecta a un 30% de las semillas (Al-Menaie *et al.*, 2008), y la germinación del argán requiere condiciones particulares como, por ejemplo, temperaturas de germinación superiores a 10 °C (Zahidi y Bani-Aameur 1997). Además, se han realizado diferentes ensayos y se ha observado que factores como el almacenamiento en frío antes de la germinación, la escarificación de la semilla o el remojo en agua a diversas temperaturas pueden reducir la dormancia e incrementar la tasa de germinación, dependiendo del genotipo materno (Alouani y Bani-Aameur 1999; Nouaim *et al.*, 2002; Alouani y Bani-Aameur 2004; Miloudi y Belkhodja 2009). De igual forma, se ha podido ver este mismo efecto al utilizar un medio de cultivo a base de turba y humus, así como con la aplicación de fungicidas, con el control del pH y con pre-tratamientos a base de ácido giberélico o nitrato potásico (Nouaim *et al.*, 2002; Alouani y Bani-Aameur 2004). Otro factor a que hay que

tener en cuenta son los frutos de argán, los cuales tienen un largo periodo de maduración tras la etapa de floración, que suele durar entre 9 y 16 meses (Bani-Aameur 2000; 2002), y que supone una adaptación propia de ambientes mediterráneos (Msanda *et al.*, 2005), pero al mismo tiempo supone un obstáculo para una producción fructífera organizada (Nerd *et al.*, 1998).

Las técnicas para cultivar el argán *in vitro* son las que mayor potencial de micropropagación tienen, pues minimizan la influencia tegumentaria de la semilla y la influencia medioambiental, haciendo más fácil su enraizamiento (Bousselmane *et al.*, 2001; Nouaim *et al.*, 2002; Majourhat *et al.*, 2007). En este aspecto, se ha ensayado el cultivo *in vitro* de la semilla por medio de la utilización de medios basados en el medio de Murashige y Skoog junto con hormonas de tipo auxina como el ácido 1-naftalenacético o el ácido indolbutírico (Bousselmame *et al.*, 2001). Cabe añadir que se realizaron cultivos *in vitro* de tallos de argán, aunque demostraron tener baja capacidad de enraizamiento; no obstante, este proceso se podía optimizar utilizando explantos de tejido tierno en lugar de cortes muy lignificados, empleando además condiciones totalmente asépticas (Nouaim *et al.*, 2002).

1.7 Perspectivas

Debido al fuerte impacto que podrá tener el cambio climático en España, y los efectos que éste pueda causar sobre muchas de las poblaciones vegetales autóctonas como el olivo, es más que posible que se pueda producir una gran pérdida de la producción de aceite de oliva en nuestro país a largo plazo. A pesar de los métodos de propagación existentes, no se ha conseguido hasta ahora desarrollar un protocolo eficaz para la formación de raíces adventicias en algunas variedades recalcitrantes de olivo, como la variedad Alfafarenca, que le permita una mayor tasa de supervivencia y resistencia a la sequía, existiendo, por otro lado, el mismo problema de enraizamiento adventicio a la hora de propagar un árbol resistente a la sequía y productor de aceite comercial como es el argán. Dentro de este contexto se enmarca el presente Trabajo de Fin de Grado.



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Mejorar la formación de raíces adventicias a partir de tejidos adultos en especies vegetales como el olivo o el argán es fundamental para su agricultura en suelo español, ya que permitiría incrementar considerablemente la tasa de éxito a la hora de propagar dichas especies, evitándose así una futura pérdida de aceites comerciales a causa del cambio climático. A pesar de la importancia de las raíces adventicias, los distintos métodos de propagación aplicados hasta la fecha demuestran escasos resultados en el enraizamiento de olivo y argán (Hedayati *et al.*, 2015; Nouaim *et al.*, 2000), de modo que es necesario encontrar protocolos de propagación que faciliten el desarrollo del enraizamiento adventicio a través de la micropropagación o del esquejado para estas dos especies de interés.

El presente Trabajo de Fin de Grado contribuye con en el proyecto “Optimización del enraizamiento de esquejes en olivo y argán”, en el que participa el grupo del Prof. José Manuel Pérez como investigador principal; además de participar en los objetivos globales del grupo de investigación del laboratorio a través del desarrollo de nuevas técnicas de cultivo *in vitro* de distintas especies vegetales.

Los objetivos específicos que se buscan en este trabajo son los siguientes:

- Desarrollar un protocolo de micropropagación *in vitro* adecuado para el argán (*Argania spinosa* (L.) Skeels) que permita mejorar su enraizamiento adventicio y, de esta manera, obtener una multiplicación *in vitro* eficaz para esta especie.
- Desarrollar un protocolo que permita el enraizamiento adventicio eficaz durante la aclimatación de esquejes de olivo (*Olea europea* (L.) var. Alfafarenca).
- Desarrollar un protocolo que permita el enraizamiento adventicio eficaz durante la aclimatación de esquejes de *Argania Spinosa*.

Los resultados de este trabajo nos permitirán ampliar nuestro conocimiento sobre las metodologías de propagación de olivo y argán, además de analizar si los procedimientos realizados en este trabajo contribuyen significativamente a la formación de raíces adventicias en estas especies.



PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

En este Trabajo de Fin de Grado se han utilizado 150 frutos de argán, *Argania spinosa* (L.) Skeels, obtenidos de tres árboles distintos de unos 150 años de edad localizados en el término municipal de San Vicente del Raspeig (Alicante). Los frutos recolectados presentaban heterogeneidad en su forma y tamaño (Figura 6A). A continuación, se extrajeron las semillas de los frutos utilizando un bisturí y se dejaron secar durante, al menos, 7 días a 45°C en una estufa Selecta©. También se recolectaron varias ramas jóvenes, de unos 60 cm de longitud, para la obtención de esquejes (Figura 6B).



Figura 6.- Muestra representativa de semillas y esquejes de argán recolectados. (A) En la imagen se observa un grupo de semillas de argán seleccionadas al azar de entre todas las recolectadas para realizar una de las siembras en el ensayo de germinación. (B) Esqueje de argán.

Para la propagación de esquejes de olivo, *Olea europea* (L.), se utilizaron ramas recién cortadas de un año de edad y de unos 90 cm de longitud de la variedad Alfarenca (Figura 7), las cuales fueron proporcionadas por la empresa *Momcor Esquejados S.L.* Tanto para la germinación en vertical como el desarrollo y enraizamiento *in vitro* de las plántulas de argán, se utilizó una cámara climática de cultivo Comersa BioClim© con una temperatura de 22±2°C (Figura 8) y un 45±10% de humedad relativa exterior (HR) durante el período de luz, programada con un

fotoperiodo de 16/8 horas. Por otra parte, para la aclimatación y el enraizamiento de los esquejes *in vivo* –tanto de olivo como de argán- se dispuso de unas condiciones climáticas de $20\pm 10^{\circ}\text{C}$ y $70\pm 20\%$ de HR en el invernadero de la UMH, entre los meses de marzo y mayo (Figura 9).



Figura 7.- Ramas de olivo para la obtención de esquejes. (A) En la imagen se muestra uno de los conjuntos de ramas de olivo variedad Alfafarenca proporcionados por la empresa *Momcor Esquejados S.L.* (B) Esqueje de olivo estándar obtenido a partir de las ramas.

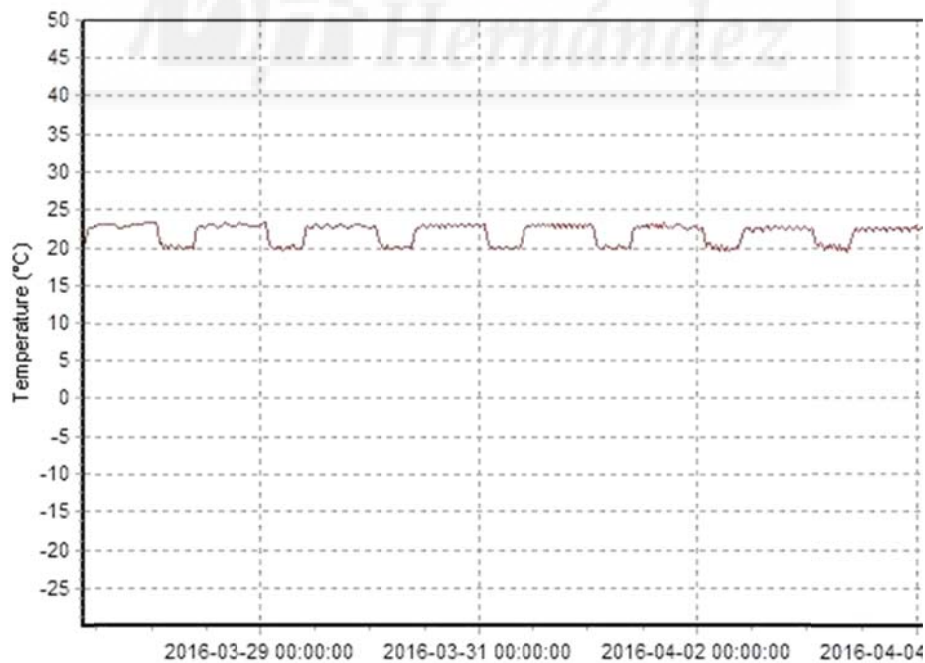


Figura 8.- Condiciones climáticas del crecimiento *in vitro* de argán. En la gráfica se reflejan las condiciones de temperatura dentro de la cámara de cultivo, mostrando oscilaciones debido a la configuración del fotoperiodo 16/8 horas.

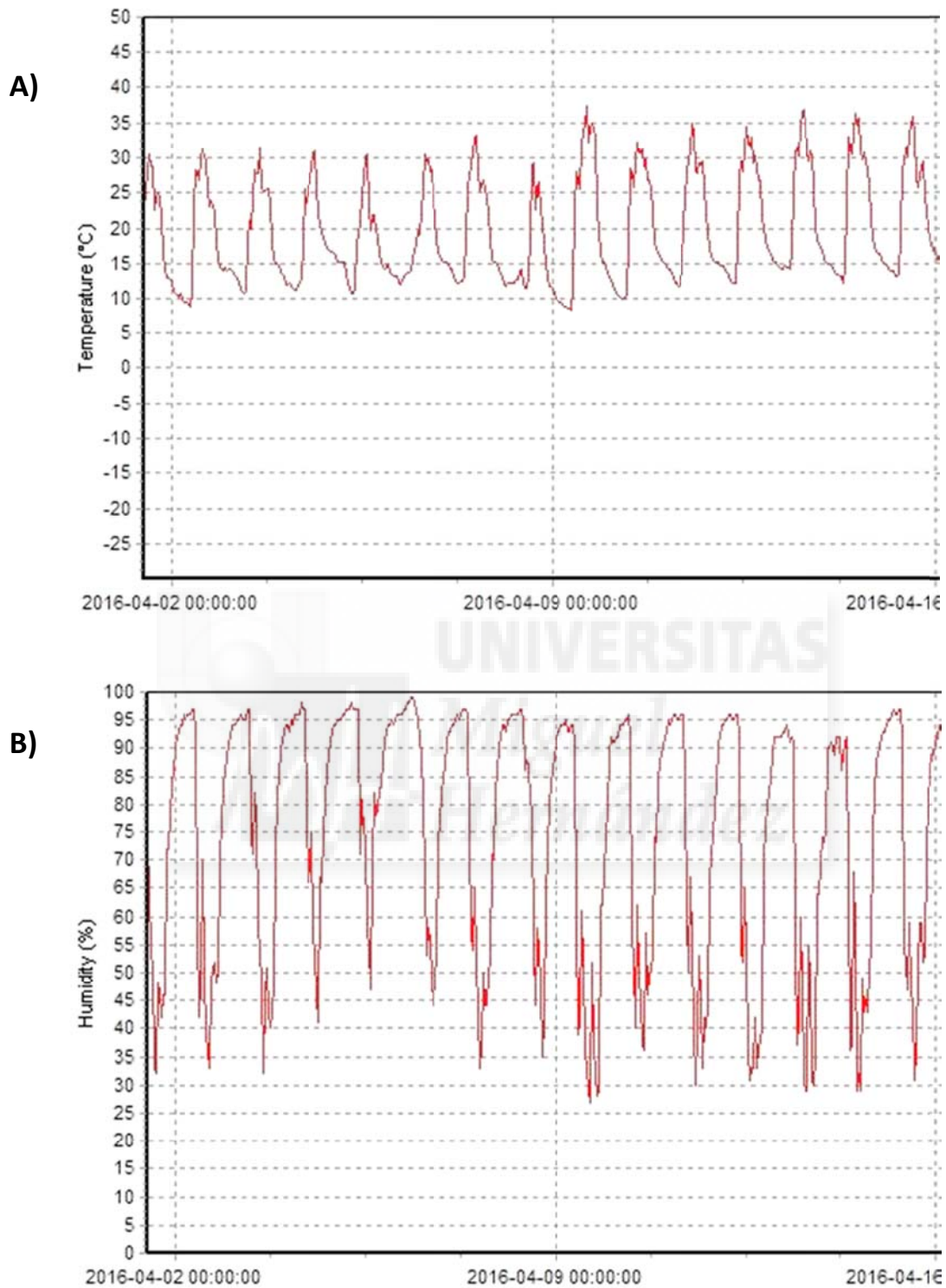


Figura 9.- Condiciones climáticas de crecimiento de los esquejes de argán y olivo. (A) En la gráfica se indica el parámetro de temperatura en el invernadero, el cual muestra una importante oscilación en el transcurso de los ciclos día-noche. (B) En la gráfica se indica el parámetro de humedad en el invernadero, también con importantes oscilaciones según el momento del día.

3.2 Preparación de los medios de cultivo

Para preparar 1 litro de **medio de germinación** para las semillas de argán se añadieron a 900 mL de agua destilada los siguientes componentes: 2,15 g de sales Murashige y Skoog (Duchefa, ref. M0221), 30 g de sacarosa (*PhytoTechnology Laboratories*, ref. S391), 2 mL de mezcla de vitaminas Gamborg B5 500X (*Gamborg B5 Vitamin Mixture*, Duchefa, ref. G0415) y 0,5 g de MES (ácido 2-[N-morpholino]jetanosulfónico, Duchefa, ref. M1503). A continuación, se ajustó el pH a 5,8 con KOH 1 M y se enrasó el volumen hasta 1 L con agua destilada. Se repartió el medio de cultivo en dos botellas de 500 mL y se añadieron 2 g de agente gelificante (Gelrite, Duchefa, ref. G1101) en cada una. Los medios de cultivo se esterilizaron en el autoclave a 121°C durante 20 minutos. El medio se atemperó en un baño termostatzado a 60°C y se llevó a una cabina de flujo laminar horizontal (Telstar AH100) para añadir, a continuación, 144 µL de una disolución madre de ácido giberélico (Duchefa, ref. G0907) y 250 µL de una disolución madre de ampicilina (Duchefa, ref. A0104) por cada medio litro de medio. Unos 50 ml de este medio de cultivo se dispensaron en tubos de ensayo, de 20 cm de longitud y 2,3 cm de diámetro, los cuales habían sido esterilizados previamente en el autoclave. Tras la solidificación del medio de cultivo, se taparon los tubos con un algodón estéril y se guardaron en la nevera (4°C) hasta su uso.

Para preparar los **medios de inducción de yemas** para el argán, se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente, suplementando el medio con 144 µL de la misma disolución madre de ácido giberélico y 250 µL de la disolución madre de ampicilina para evitar el crecimiento bacteriano; y además, se añadieron 37,8 µL de una nueva disolución madre de citoquininas (Duchefa, ref. T0916). Unos 90 ml del medio de inducción de yemas se dispensaron en frascos de vidrio estériles con tapa de plástico de rosca, los cuales se guardaron en la nevera (4°C) hasta su uso.

Para preparar los **medios de enraizamiento** para el argán, se siguió el mismo protocolo inicial, pero en este caso el medio se suplementó con 250 µL de una disolución madre de auxinas (Duchefa, ref. I0902, N0903) además de con otros 250 µL de la disolución madre de ampicilina. Unos 90 ml del medio de enraizamiento se dispensaron

en frascos de vidrio estériles con tapa de plástico, los cuales se conservaron en la nevera a 4°C hasta su posterior uso.

3.3 Esterilización de semillas y rescate de embriones

Para la esterilización de las semillas de argán aún en el interior del pericarpio se realizaron tres lavados con agua caliente y detergente comercial para platos, y posteriormente se sumergieron en 150 mL de etanol absoluto durante 2 minutos. A continuación y en la cabina de flujo laminar horizontal, se pasaron las semillas a un vaso de precipitados con 150 ml de lejía comercial diluida al 50% en agua estéril. Las semillas se dejaron en esta solución durante 20 minutos con agitación ocasional. A continuación, se realizaron 3 lavados consecutivos con agua destilada estéril de 10 minutos cada uno, desechando el agua de cada lavado. Finalmente, las semillas se dejaron secar sobre un papel de filtro estéril.

Utilizando un martillo desinfectado con etanol, se separó el pericarpio y se transfirieron los embriones no dañados a un tubo falcon estéril de 50 mL para realizar un tratamiento adicional de desinfección, dado que alguno de los embriones presentaba contaminación fúngica en el tegumento. Dicho tratamiento consistió en un lavado con lejía diluida al 30% durante 8 minutos, seguido de cuatro lavados con agua destilada estéril de 30 segundos cada uno. Por otra parte, los embriones contaminados fueron desinfectados en otro tubo falcon estéril con lejía al 50% durante 8 minutos, seguido de cuatro lavados con agua destilada estéril de 30 segundos cada lavado. A continuación, los embriones desinfectados se colocaron con ayuda de unas pinzas estériles en el centro de un tubo de ensayo con medio de germinación y se incubaron en la cámara de cultivo para su crecimiento *in vitro*.

3.4 Inducción de brotes y formación de raíces *in vitro*

En trabajos recientes utilizando la crucífera *Arabidopsis thaliana*, se ha descrito que la eliminación del meristemo radicular actúa como un estímulo para activar la formación de raíces, tanto laterales a partir de la raíz principal, como adventicias a partir del hipocótilo (Van Norman *et al.*, 2014), por lo que se escogió este procedimiento para inducir la formación de raíces en plántulas jóvenes de argán germinadas *in vitro*.

A los 21 días después de la germinación de los embriones de argán, se indujo la formación de raíces mediante la escisión de unos 10 mm de la región apical de la raíz principal, que contiene el meristemo apical y la zona de elongación. Las plántulas con el ápice radicular cortado fueron transferidas a los frascos de vidrio con el medio de inducción de yemas, para comprobar si el corte realizado promovía la formación de raíces también en esta especie y en ausencia de auxina exógena (Figura 10).

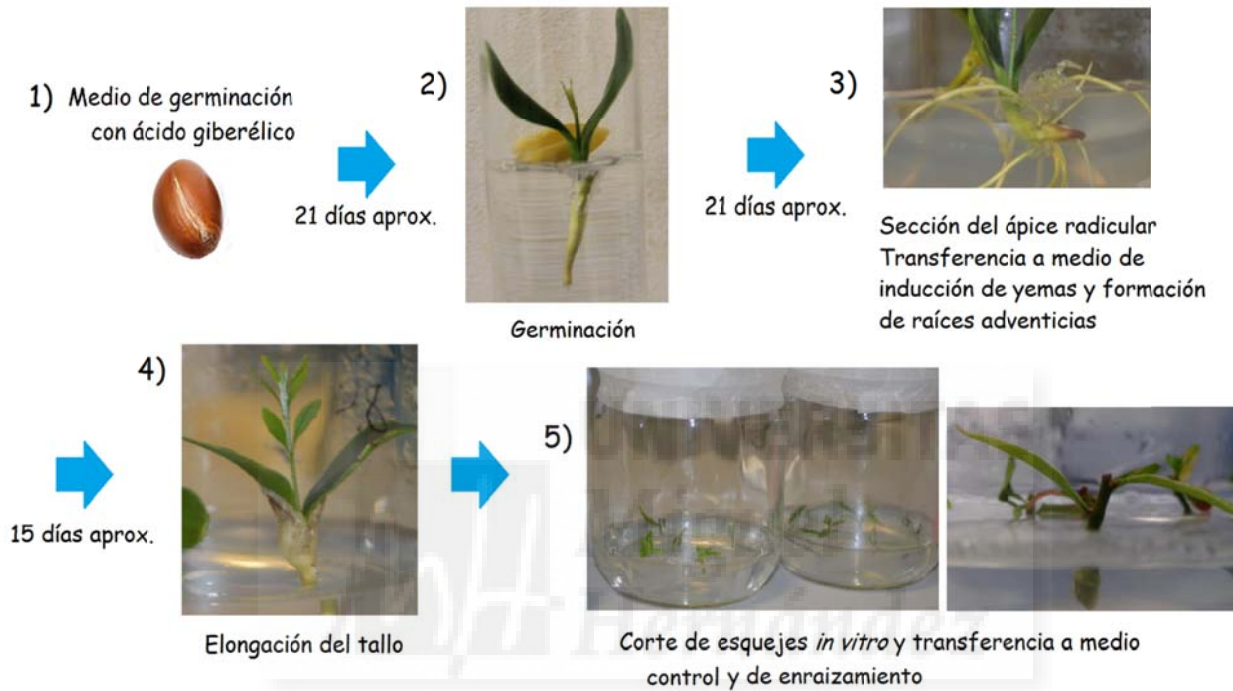


Figura 10.- Esquema de las etapas de germinación, elongación y obtención de esquejes *in vitro* en el argán. En el esquema se indican los distintos pasos realizados a lo largo del cultivo *in vitro* del argán, desde la puesta de las semillas en medio de germinación hasta la obtención de esquejes y su posterior transferencia a medio de enraizamiento.

Tras 15 días en este medio de cultivo, los brotes que habían elongado se utilizaron para la obtención de esquejes. Para ello, se seccionaron fragmentos de unos 2,5 cm de longitud y con un par de hojas como mínimo. Los fragmentos se seccionaron en la cabina de flujo laminar horizontal utilizando material quirúrgico estéril para su manipulación y corte (bisturí, tijeras y pinzas).

Los fragmentos obtenidos fueron transferidos a frascos de vidrio con medio control (medio descrito en el apartado 3.2, sin hormonas) o medio de enraizamiento, y

se mantuvieron durante 25 días en la cámara de cultivo en condiciones controladas (Figura 10). Pasado este tiempo, se determinaría el número de esquejes que formarían callo y que acabarían desarrollando raíces adventicias.

3.5 Inducción de la formación de raíces a partir de esquejes

A partir de las ramas de olivo proporcionadas por la empresa, se obtuvieron 624 esquejes de unos 7-9 cm de longitud para cada réplica del experimento (2 réplicas, 1250 esquejes en total). Para seleccionar los fragmentos adecuados para su uso como esquejes, se tuvo en cuenta la presencia de yemas axilares en la base de las hojas y que éstos tuvieran un mínimo de cuatro hojas. Los esquejes de olivo fueron cortados en bisel por la base y en plano por el ápice, y se les eliminaron manualmente las dos hojas basales. De manera similar se obtuvieron 118 esquejes a partir de las ramas de argán obtenidas previamente.

Para la inducción del enraizamiento en los esquejes de argán, se introdujeron unos 2-3 cm de la base de los esquejes en una disolución de medio líquido MS (2,15 g/L de sales de Murashige & Skoog, 2 ml/L de vitaminas Gamborg B5 500X y 0,5 g/L de tampón MES; pH a 5,7-5,8), en ausencia de auxina exógena (tratamiento control) y en presencia de una concentración moderada de auxinas, y se mantuvieron a 12°C y en oscuridad durante 18 horas.

Una vez en el invernadero, los esquejes de cada tratamiento (control, C; y auxina; A) se separaron en dos lotes (1 y 2). El primer lote de esquejes (n = 34 esquejes) se trasplantó directamente a bandejas de 42 alveolos circulares (5 cm de diámetro × 4 cm de profundidad) conteniendo un sustrato formado por una mezcla equivolúmetrica de perlita y turba. En el segundo lote (n = 84 esquejes), la base de los esquejes se trató con una mezcla comercial de auxinas en polvo antes de su trasplante a las bandejas de sustrato. Los esquejes se mantuvieron en condiciones de invernadero, desde el 11/03/2016 hasta el 13/06/2016, y con riego periódico (5 minutos de riego por aspersión cada 4 horas). Al finalizar el experimento, se determinó el porcentaje de esquejes de argán que mostraron algún tipo de respuesta (enraizamiento o formación de callo) en cada uno de los cuatro tratamientos (C1, C2, A1, A2).

Para la inducción del enraizamiento en los esquejes de olivo, se introdujeron unos 2-3 cm de la base de los esquejes en una disolución de medio líquido MS en ausencia de auxina exógena (T1, T4, T5 y T6) y en presencia de distintas concentraciones de auxinas (T2 y T3) y se mantuvieron a 12°C y en oscuridad durante 18 h. A continuación, se transfirieron las muestras al invernadero, donde se llevaron a cabo los tratamientos con distintas concentraciones de reguladores hormonales auxínicos, según se indica en la Tabla 1. Para cada uno de los tratamientos realizados se utilizaron dos réplicas experimentales, iniciadas el 03/03/2016 y el 05/03/2016, respectivamente, con 104 esquejes cada una. Al finalizar los tratamientos, los esquejes se trasplantaron a bandejas de 104 alveolos circulares (3,5 cm de diámetro × 3,5 cm de profundidad) con distinto tipo de sustrato según el tratamiento. Los esquejes se mantuvieron en condiciones de invernadero, desde las fechas mencionadas anteriormente hasta el 23/05/2016, y con riego periódico (6 minutos de riego por aspersión cada 4 horas). Al finalizar el experimento, se determinó el porcentaje de esquejes que mostraron distinto tipo de respuesta en cada uno de los doce tratamientos. Puesto que la principal respuesta observada al finalizar el experimento fue la formación de callo en la base, se estableció una escala de códigos numéricos para definir las distintas fases o estadios dentro del proceso de formación de callo. Esta escala de códigos se define con los siguientes valores: 0) Ausencia de callo en el esqueje; 1) Presencia de grietas en el tejido externo de la base del esqueje; 2) Presencia de callo incipiente en la base del esqueje; 3) Presencia de callo bien formado en la base del esqueje; 4) Presencia de callo de gran tamaño con engrosamiento basal (Figura 11):



Figura 11.- Esquema de los distintos estadios de formación de callo en los esquejes de olivo.

Tabla 1.- Tratamientos utilizados para la formación de raíces a partir de esquejes en olivo

Tratamiento	Hormona exógena	Sustrato	Réplicas
T1A	–	Sustrato comercial	R1, R2
T1B	–	50% sustrato comercial y 50% perlita	R1, R2
T2A	Auxina 1, concentración baja, 18 h	Sustrato comercial	R1, R2
T2B	Auxina 1, concentración baja, 18 h	50% sustrato comercial y 50% perlita	R1, R2
T3A	Auxinas 1 + 2, concentración baja, 18 h	Sustrato comercial	R1, R2
T3B	Auxinas 1 + 2, concentración baja, 18 h	50% sustrato comercial y 50% perlita	R1, R2
T4A	Auxina 1, concentración alta, 30 min	Sustrato comercial	R1, R2
T4B	Auxina 1, concentración alta, 30 min	50% sustrato comercial y 50% perlita	R1, R2
T5A	Auxina 2, concentración alta, 30 min	Sustrato comercial	R1, R2
T5B	Auxina 2, concentración alta, 30 min	50% sustrato comercial y 50% perlita	R1, R2
T6A	Mezcla comercial de auxinas en polvo	Sustrato comercial	R1, R2
T6B	Mezcla comercial de auxinas en polvo	50% sustrato comercial y 50% perlita	R1, R2

3.6 Obtención de imágenes

Los esquejes fueron fotografiados a distintos tiempos tras su trasplante a condiciones de cultivo en el invernadero utilizando una cámara digital réflex Nikon D3200 de 24,2 megapíxeles y con lente AF-S DX NIKKOR 18-55 mm. Para estandarizar la toma de imágenes y minimizar el efecto indeseable de las sombras, hemos utilizado una caja de fotografía con fondo negro no reflectante (Figura 12A). Los esquejes se dispusieron sobre una plantilla predefinida con etiquetas en las que se indicaba la especie fotografiada y la fecha de la imagen, la réplica experimental, el tratamiento hormonal y el tipo de sustrato que se había utilizado en cada caso (Figura 12C). Se obtuvieron un total de 209 imágenes de alta resolución para olivo y argán, de entre 4 y 6 MB, incluyendo, cada una de ellas, 7 individuos escogidos al azar en los distintos tiempos analizados (Figura 12B).

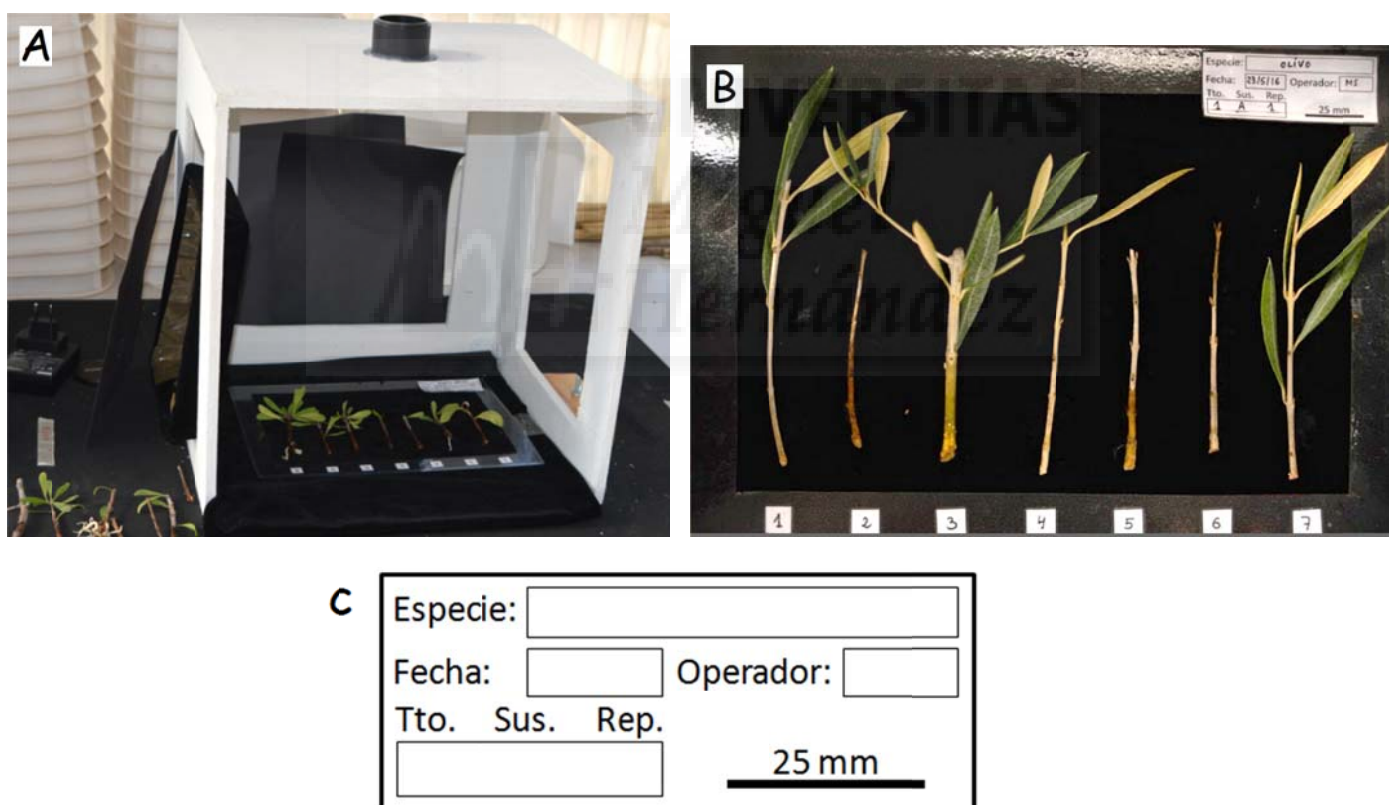


Figura 12. Sistema preparado para la toma de fotografías de los esquejes. (A) Caja de fotografía con fondo negro no reflectante para la colocación y fotografiado de las muestras sobre la plantilla de su interior. (B) Ejemplo representativo de una de las 192 imágenes tomadas para los esquejes de olivo. (C) Etiqueta utilizada en cada fotografía indicando la réplica experimental, el tipo de tratamiento y el tipo de sustrato correspondiente a los esquejes de la imagen.

3.7 Análisis de imágenes

Los parámetros que se han analizado en este trabajo se indican en la Tabla 2. El número de hojas por esqueje, el estadio del callo y el número de raíces se determinó de forma visual a partir de las imágenes obtenidas. El porcentaje de formación de callo se determinó como el número de esquejes que poseían callo (estadio ≥ 1) respecto al total de esquejes correspondientes a un determinado tratamiento, sustrato y réplica, así como para los distintos tiempos analizados.

Tabla 2.- Parámetros que se han estudiado en este trabajo.

Parámetro, unidad	Especie
Porcentaje de germinación o viabilidad	Argán
Porcentaje de semillas contaminadas	Argán
Días hasta la germinación o dormancia	Argán
Porcentaje de formación de callos en esquejes	Argán y olivo
Porcentaje de enraizamiento de esquejes	Argán y olivo
Número de raíces adventicias por esqueje	Argán y olivo
Número de hojas en los esquejes	Argán y olivo
Longitud de los esquejes (mm)	Argán y olivo

Para el análisis de las imágenes se ha utilizado el programa de dominio público ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), que está escrito en Java, es de código abierto y permite la compilación de *plug-ins* y macros personalizados. Para determinar la longitud de los esquejes a través de este programa, se utilizó como referencia la escala de 25 mm indicada mediante una barra en las etiquetas de las imágenes. Con objeto de establecer esta escala como referencia, se seleccionó la barra utilizando la opción “*Straight Line*” en cada imagen abierta con ImageJ, y una vez seleccionada se estableció su valor en milímetros (25 mm) mediante la opción “*Set Scale*”. Tras definir la escala, se utilizó la opción “*Segmented Line*” o “*Straight Line*” para ir seleccionando los esquejes de las imágenes desde el ápice hasta la base, presionando Ctrl+M al finalizar la selección de cada uno de ellos para generar el valor de longitud correspondiente en milímetros.

3.8 Pruebas estadísticas

Los distintos parámetros estadísticos analizados en el trabajo se han calculado mediante el programa Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies Inc., USA), utilizando además sus funciones gráficas para la representación de los histogramas de frecuencias que se presentan en este trabajo.

Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI para establecer el grado de ajuste de los datos obtenidos a una distribución (normal, logística, etc.) y su representación gráfica. Mediante la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov hemos establecido el grado de ajuste de las distribuciones de datos obtenidas (Kolmogorov 1933; Smirnov 1936; citados en Chakravarti *et al.*, 1976). Para comparar los distintos tratamientos entre sí se ha utilizado la prueba de medianas de Mood y la prueba de rango múltiple de Student-Newman-Keuls (Student, 1927; Newman, 1939; Keuls, 1952; citados en Muth, 2006). Los valores críticos que hemos utilizado para contrastar nuestras hipótesis, correspondientes a un nivel de significación del 5 %, fueron los proporcionados por este programa para cada uno de los estadísticos utilizados.

Para determinar la relación existente entre las variables estudiadas en el análisis de los distintos parámetros, hemos calculado el ajuste de nuestros datos a un modelo lineal, o recta de regresión, cuya fórmula general es la siguiente: $Y = \gamma + \beta X$, siendo los parámetros γ y β y sus errores respectivos calculados con el programa Statgraphics Centurion XVI, aplicando el método de los mínimos cuadrados.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Rescate de embriones y germinación *in vitro* de argán

A partir de las semillas de argán recolectadas previamente y que permanecieron almacenadas a 4°C durante varias semanas en el laboratorio, se procedió a su limpieza y esterilización para el posterior rescate de embriones siguiendo el protocolo que se detalla en la sección anterior (véase el apartado 3.3 de Procedimientos experimentales). Hemos observado que, en algunos casos, la cubierta de las semillas presentaba fisuras y aparecía contaminación fúngica en el endocarpo de los embriones. Por ello, se decidió tratar los embriones recolectados y que mostraron signos de contaminación con un protocolo de esterilización más agresivo que el que se usó en los embriones en los que no se observó contaminación alguna. Se aislaron un total de 80 embriones de argán que se sembraron, de manera individual, en tubos de ensayo con medio de germinación (véase el apartado 3.4 de Procedimientos experimentales) y se mantuvieron en la cámara de cultivo con temperatura de 20/25°C y fotoperiodo 16 h luz / 8 h oscuridad.

A lo largo de dos meses, se realizaron varias siembras sucesivas, de entre 15 y 20 semillas de argán cada una, desde el 12/02/2016 hasta el 18/03/2016. A distintos tiempos después de la siembra, se contabilizó el **porcentaje de germinación de embriones rescatados** (% de embriones germinados / total embriones rescatados, y % de embriones germinados / total embriones no contaminados) y el **porcentaje de embriones contaminados** (% de embriones contaminados / total embriones rescatados). Al finalizar el experimento de germinación de argán (25/04/16), se obtuvieron 43 embriones germinados, 30 contaminados y 7 no germinados, lo que supone un porcentaje de germinación del 53,8% sobre el total de embriones rescatados y del 86,0% sobre el total de embriones no contaminados. El porcentaje de embriones contaminados fue del 37,5% y, en muchos de estos casos se trataba de aquellos embriones en los que, previamente, se había observado contaminación fúngica en el endocarpo (Figura 13). A la vista de los resultados podemos concluir que nuestro procedimiento de rescate de embriones y germinación *in vitro* presenta una gran eficacia en comparación con resultados previos de otros grupos de investigación (Nouaim *et al.*, 2002; Alouani y Bani-Aameur 2004; Al-Menaie *et al.*, 2007, Allach 2012).

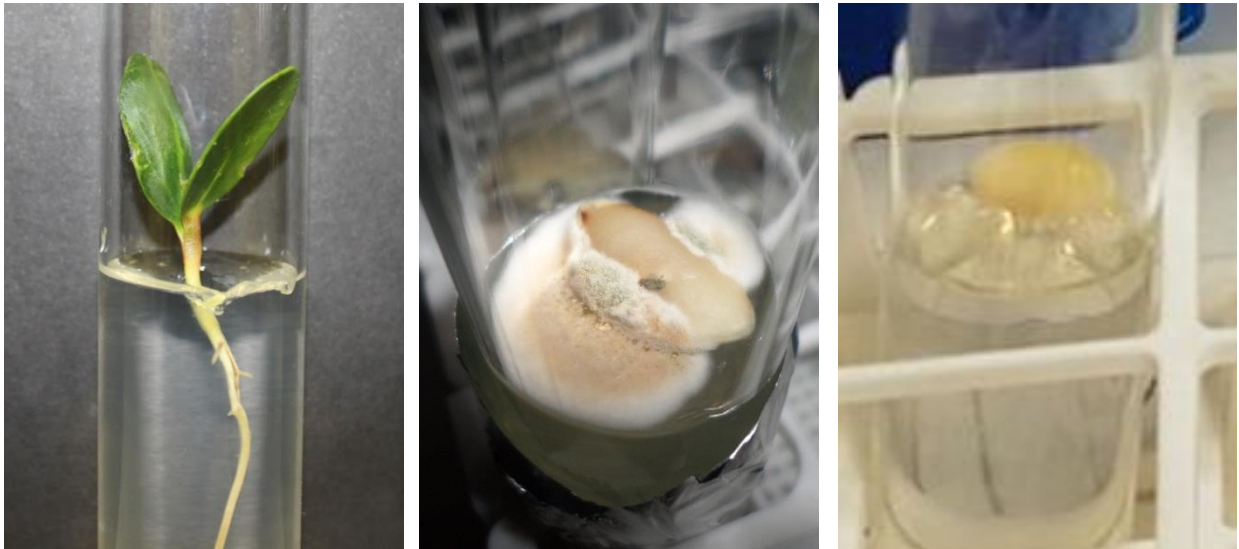


Figura 13.- Distintos resultados obtenidos de los embriones de argán *in vitro*. Embrión de argán germinado (izquierda), uno contaminado (centro) y otro no germinado (derecha).

Para cada uno de los embriones se determinó el número de días que transcurrieron desde la siembra hasta que la radícula se hizo visible (> 3 mm de longitud). A partir de estos datos se estimó el tiempo promedio que tardaron los embriones de argán en germinar (período de dormancia), realizando un promedio y una desviación estándar únicamente de los días hasta la germinación de embriones que sí habían germinado, la cual fue de unos $16,14 \pm 10,68$ días.

4.2 Formación de callo y enraizamiento de esquejes de argán *in vitro*

Tras la germinación, se mantuvieron las plántulas durante un par de semanas adicionales en el medio de germinación para favorecer el crecimiento de la raíz principal, la expansión de los cotiledones y la aparición de las primeras hojas. En algunos casos (12,5%), se observó la aparición de raíces adventicias que se originaron a partir de los tejidos internos del hipocótilo (Figura 14). Para inducir la formación de raíces adventicias, se eliminó con un bisturí el ápice de la raíz principal en 22 plántulas de argán y se observó que en 9 de ellas aparecieron raíces adventicias entre 5 y 11 días después de la escisión en la raíz (40,9%). En aquellas plántulas con raíces adventicias, el número promedio fue de $4,9 \pm 3,6$ raíces. Podemos concluir de nuestros resultados que la eliminación del meristemo apical radicular induce la formación de raíces adventicias y, en consecuencia,

podría mejorar el enraizamiento y la capacidad de absorber nutrientes de los individuos jóvenes de argán. A continuación, se transfirieron estas plántulas ya enraizadas a distintos frascos de cultivo con medio de inducción de brotes y se mantuvieron durante dos semanas en este medio. Tras 15 días, se observó la producción de brotes en el 80% de las plántulas enraizadas.

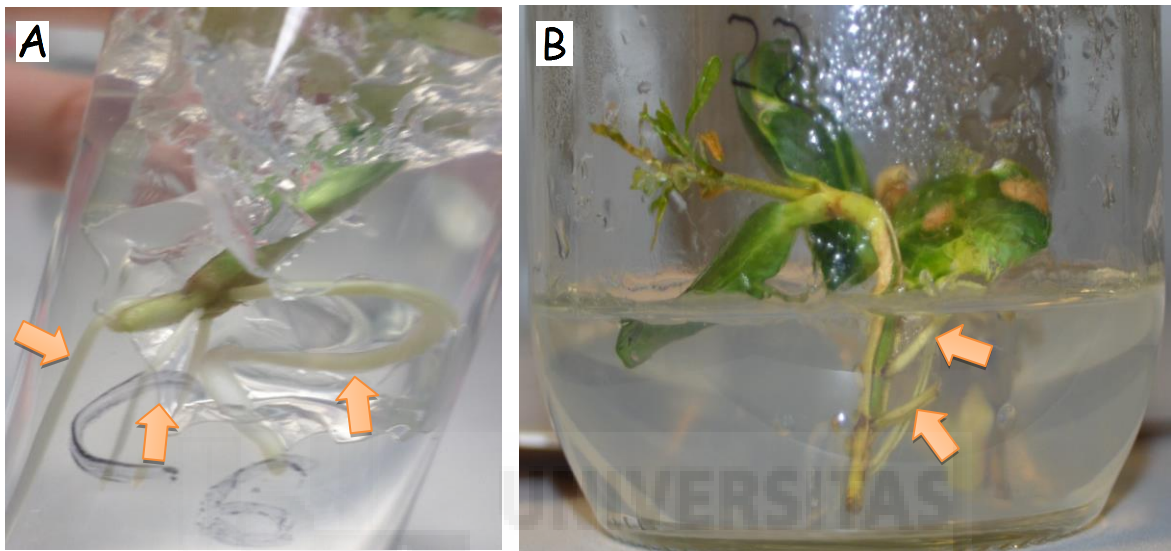


Figura 14.- Aparición de raíces adventicias en plántulas de argán. (A) Se aprecia la formación de raíces adventicias (flechas naranjas) en un argán que se encuentra en medio de germinación. (B) raíces adventicias formadas a partir del tejido interno del hipocótilo en plántulas con el meristemo apical radicular seccionado.

Cada uno de los brotes se cortó en tres fragmentos iguales, de unos 10 mm de longitud y con 2-3 hojas, que se transfirieron a frascos de cultivo *in vitro* con medio de cultivo control (C) o con medio de cultivo con una combinación de dos auxinas sintéticas (A1+A2). En cada uno de los botes se cultivaron entre 5 y 6 esquejes (Figura 15A). El experimento se realizó por triplicado.

Tras tres semanas de incubación en este medio de cultivo, se determinó visualmente la presencia (1) o ausencia (0) de una estructura callosa en la base de cada uno de los esquejes y se utilizaron estos datos para estimar el efecto del cóctel de auxinas utilizado sobre la formación del callo (Figura 15B).

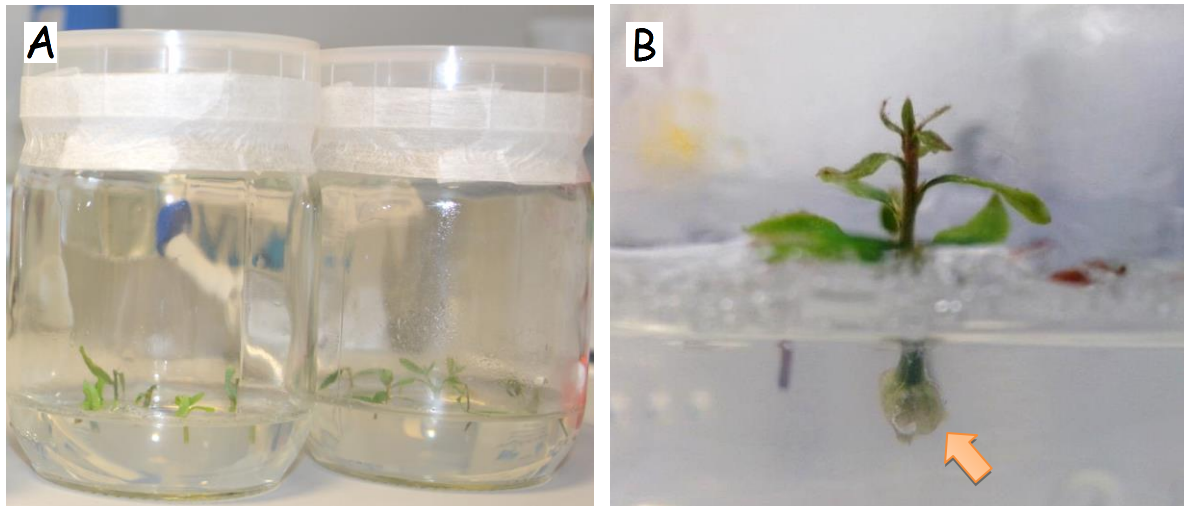


Figura 15.- Esquejes de argán en cultivo *in vitro*. (A) Puesta en medio de cultivo de los esquejes de argán obtenidos a partir de las plántulas crecidas *in vitro*. (B) Ejemplo de la formación de callo en la base de un esqueje de argán *in vitro* (flecha naranja).

Tabla 3. Prueba de rango múltiple para la formación de callo en esquejes de argán *in vitro*

Tratamiento	Promedio \pm DE	Grupos homogéneos
C	0,000 \pm 0,000	a
A1+A2 (R1)	0,667 \pm 0,516	b
A1+A2 (R2)	1,000 \pm 0,000	b
A1+A2 (R3)	0,600 \pm 0,548	b

El promedio se refiere a los valores de cada una de las clases fenotípicas que se han definido previamente (1: presencia de callo, 0: ausencia de callo).

En ninguno de los esquejes que se pasaron al medio control se observó la presencia de callos (Tabla 3). Sin embargo, en un 75% de los esquejes que se pasaron a medio con auxinas se observó la aparición de un callo en la base del esqueje. Es de esperar que, más adelante, a partir de estos callos se desarrollen raíces.

A través de este procedimiento se ha conseguido establecer un protocolo efectivo para el rescate de embriones y la germinación *in vitro* de plántulas de argán. Hemos optimizado el proceso de enraizamiento y la producción de yemas *in vitro* y hemos desarrollado un protocolo de micropropagación de argán que permite la formación de callo y, eventualmente, el desarrollo de raíces a partir de esquejes. Nuestro procedimiento puede ser de utilidad para la producción de plántulas de argán libres de patógenos y para la propagación clonal de genotipos de interés. Además, nuestro

procedimiento puede utilizarse para llevar a cabo un programa de mejora vegetal del argán mediante mutagénesis química (ver Figura 10 en Procedimientos experimentales).

4.3 Formación de callo y enraizamiento de esquejes de argán *in vivo*

En paralelo a los estudios de enraizamiento de esquejes de argán *in vitro* que se describen en el apartado anterior, se realizaron ensayos de enraizamiento de esquejes en condiciones de invernadero y se utilizó como material de partida un conjunto de ramas jóvenes de árboles adultos de argán que se habían recolectado con antelación. Los esquejes de argán se prepararon y se cultivaron de la manera que se indica en el apartado 3.5 de los Procedimientos experimentales. De cada uno de los tratamientos, C1, C2, A1 y A2, se sembraron entre 14 y 42 esquejes.

La longitud de los esquejes de argán utilizados en este experimento fue de $89,92 \pm 13,27$ mm, y no se observaron diferencias significativas en su longitud para los distintos tratamientos. Los esquejes se plantaron el 11/03/16 hasta el día 13/06/16, cuando se determinó visualmente la presencia (1) o ausencia (0) de una estructura callosa en la base de cada uno de los esquejes, así como el número de raíces adventicias y el número de hojas verdes en cada esqueje (ver datos en Anexo 1).

Mediante la prueba de medianas de Mood hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$) en la formación de callo para los distintos tratamientos y se determinó por una prueba de rango múltiple que los cuatro tratamientos se agrupaban en tres grupos distintos (Tabla 4). Se obtuvieron resultados similares para el número de raíces adventicias (Tabla 5) y el número de hojas verdes por esqueje (Tabla 6).

Tabla 4. Prueba de rango múltiple para la formación de callo en esquejes de argán enraizados *in vivo*

Tratamiento	Casos	Promedio \pm DE	Grupos homogéneos
CC	14	$0,000 \pm 0,114$	a
AC	17	$0,000 \pm 0,103$	a
AA	42	$0,357 \pm 0,066$	b
CA	42	$0,548 \pm 0,066$	c

Tabla 5. Prueba de rango múltiple para el número de raíces en esquejes de argán enraizados *in vivo*

Tratamiento	Casos	Promedio \pm DE	Grupos homogéneos
CC	14	0,000 \pm 0,000	a
AC	17	0,000 \pm 0,000	a
AA	42	0,142 \pm 0,417	b
CA	42	0,881 \pm 2,222	b

Tabla 6. Prueba de rango múltiple para el número de hojas en esquejes de argán enraizados *in vivo*

Tratamiento	Casos	Promedio \pm DE	Grupos homogéneos
CC	14	0,000 \pm 0,000	a
AC	17	0,000 \pm 0,000	a
AA	42	6,214 \pm 4,781	b
CA	42	5,000 \pm 4,596	b

El promedio se refiere a los valores de cada una de las clases fenotípicas que se han definido previamente (1: presencia de callo, 0: ausencia de callo).

Estos resultados demuestran que el procedimiento más efectivo para lograr el enraizamiento de los esquejes de argán se consigue al tratar los esquejes con una mezcla comercial de auxinas en polvo antes de su trasplante en macetas (tratamiento CA), dado que se incrementa de manera significativa tanto la formación de callo como la aparición de raíces adventicias a partir de éste (Figura 16). Por el contrario, cuando no se añade la mezcla comercial de auxinas en polvo no se produce enraizamiento y los esquejes acaban muriendo en su totalidad, como lo demuestra la defoliación observada.



Figura 16.- Enraizamiento de esquejes de argán. (A) Esquejes de argán con los distintos tratamientos en invernadero. (B) Ejemplo de esquejes enraizados con el tratamiento CA.

Por último se determinó si existía algún tipo de correlación entre parejas de parámetros estudiados en los esquejes de argán (Tabla 7). Se encontró una correlación positiva, de baja intensidad aunque estadísticamente significativa entre la formación de callos y el número de raíces.

Tabla 7. Matriz de correlaciones entre parámetros del enraizamiento de esquejes de argán

	Número de raíces	Número de hojas	Longitud de esquejes
Formación de callo	<i>0,379</i>	<i>0,249</i>	-0,034
Número de raíces		0,047	0,012
Número de hojas			0,124

Se muestran en cursiva los valores del coeficiente de correlación de Pearson que fueron estadísticamente significativos ($P < 0,05$).

4.4 Enraizamiento de esquejes de olivo

Para los ensayos de enraizamiento de esquejes de olivo de la variedad “Alfafarenca” se utilizó como material de partida ramas jóvenes de árboles adultos que se habían recolectado de manera reciente por personal especializado de *Momcor Esquejados S.L.* En cada una de las dos réplicas experimentales se obtuvieron unos 625 esquejes de olivo que se utilizaron en 12 tratamientos distintos (véase la Tabla 1 en Procedimientos experimentales). En el diseño experimental que se llevó a cabo para estudiar el enraizamiento de esquejes de olivo se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

- ¿Cuál es el efecto sobre el enraizamiento del sustrato de cultivo? Se comparó el efecto de los sustratos A y B en los mismos tratamientos (T1A, T2A, T3A, T4A, T5A, T6A vs. T1B, T2B, T3B, T4B, T5B, T6B).
- ¿Cuál es el efecto sobre el enraizamiento del tipo de auxina utilizada? Se compararon las auxinas sintéticas 1 y 2 a una concentración concreta (T4A y T4B vs. T5A y T5B).
- ¿Cuál es el efecto sobre el enraizamiento de la concentración exógena de auxina utilizada? Se compararon dos concentraciones de la auxina 1: concentración baja y concentración alta (T2A y T2B vs. T4A y T4B).

- ¿Cuál es el efecto sobre el enraizamiento de la combinación de auxinas? Se compararon las combinaciones de auxinas sintéticas 1 y 2, con la auxina 1, y con una mezcla comercial de auxinas en polvo (T2A, T2B vs. T3A, T3B vs. T6A, T6B)
- ¿Cuál es el efecto del envejecimiento de los esquejes? Para ello, la réplica 2 se inició 48 horas después de la réplica 1 (R1 vs. R2).

Los esquejes se trasplantaron a las bandejas de alveolos en el invernadero el 03/03/16 (réplica 1) y el 05/03/16 (réplica 2), y permanecieron durante dos meses y medio hasta el 23/05/16 (réplica 1) y 25/05/16 (réplica 2), respectivamente. Al finalizar el experimento, los esquejes se sacaron del sustrato, se lavaron y se tomaron imágenes para su análisis (véanse los apartados 3.6 y 3.7 de los Procedimientos experimentales). Los datos brutos de los esquejes de olivo se encuentran disponibles en el Anexo 2.

La longitud de los esquejes de olivo al finalizar el experimento fue de $86,12 \pm 15,36$ mm (Figura 17). Los parámetros adicionales que se cuantificaron fueron el estadio del callo (de 0 a 4, siguiendo los criterios que se definen en el apartado 3.5), el número de raíces y el número de hojas. En primer lugar se determinó si existía algún tipo de correlación entre parejas de parámetros estudiados en los esquejes de olivo (Tabla 8). Se encontró una correlación positiva, de baja intensidad aunque estadísticamente significativa entre la estadio del callo y el número de hojas.

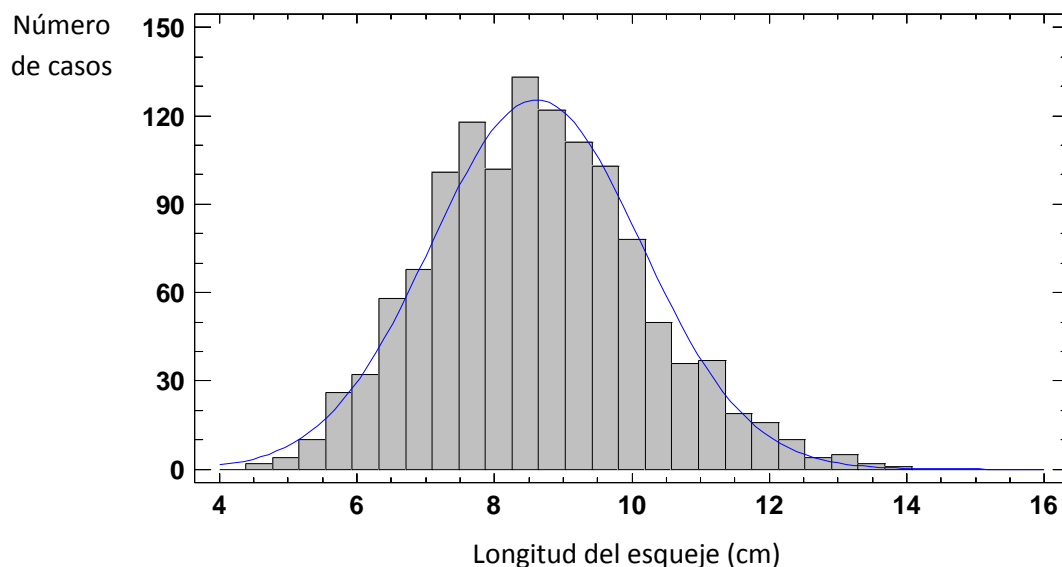


Figura 17.- Distribución de frecuencias para la longitud del esqueje. En azul se muestra la curva de del ajuste a la distribución normal de los datos.

Tabla 8. Matriz de correlaciones entre parámetros del enraizamiento de esquejes de olivo

	Número de raíces	Número de hojas	Longitud de esquejes
Estadío del callo	<i>0,124</i>	<i>0,301</i>	0,045
Número de raíces		<i>0,114</i>	-0,003
Número de hojas			<i>0,187</i>

Se muestran en cursiva los valores del coeficiente de correlación de Pearson que fueron estadísticamente significativos ($P < 0,05$).

4.4.1 Formación del callo

A continuación se determinó, mediante un ANOVA multifactorial, el efecto de los distintos factores (réplica, tratamiento y sustrato) sobre el parámetro que hemos denominado estadío del callo, encontrándose que la mayor parte de la variación observada podría atribuirse al tratamiento ($P < 0,001$), mientras que no resultó significativa la variación atribuida a la réplica ($P = 0,269$) o al sustrato ($P = 0,089$). Estos resultados indican que ni el sustrato de cultivo ni el envejecimiento de los esquejes influyen significativamente en el proceso de formación de callo en la región basal del esqueje, mientras que el tratamiento hormonal es un factor determinante. De hecho, la formación de callo se produce de forma residual en ausencia de auxina exógena. En la prueba de rango múltiple para los distintos tratamientos (Tabla 9), se observó que éstos se agrupaban en 3 grupos. No se observaron cambios significativos entre el tratamiento control (T1) y el tratamiento con la auxina 2 a alta concentración (T5), por lo que se puede concluir que esta auxina carece de efecto para la formación de callos en esquejes de olivo. En aquellos tratamientos que incluyen la auxina 1 a baja concentración (T2 y T3) se observa un aumento en la formación de callos. Por último, entre el tratamiento de alta concentración de auxina 1 (T4) y la mezcla comercial de auxinas en polvo (T6), sí que se observó un incremento significativo de la producción de callos en comparación con el tratamiento control (Figura 18). Estos resultados indican que un tratamiento de choque de una concentración elevada de auxina 1 (T4) produce el mayor efecto sobre la formación de callos en la base de los esquejes de olivo (Figura 19).

Tabla 9. Prueba de rango múltiple para el estadio de callo en esquejes de olivo

Tratamiento	Casos	Promedio \pm DE	Grupos homogéneos
T1	208	0,702 \pm 0,772	a
T2	208	1,115 \pm 1,015	b
T3	208	0,976 \pm 1,065	b
T4	208	1,716 \pm 1,224	c
T5	208	0,913 \pm 0,938	ab
T6	208	1,697 \pm 1,304	c

Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$) entre los distintos tratamientos ensayados.

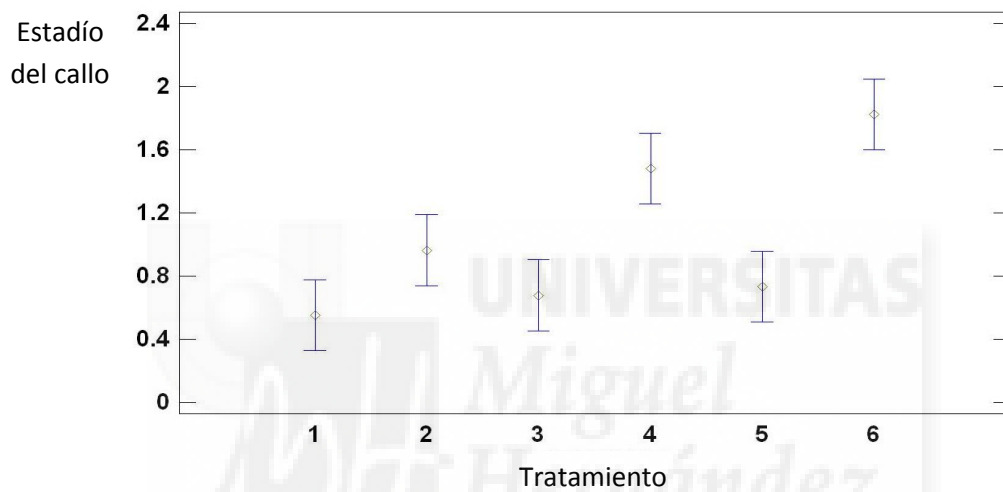


Figura 18.- Estadío del callo y tratamiento en esquejes de olivo. Gráfico de medias que muestra la distribución de datos de estadio de callo en los distintos tratamientos.



Figura 19.- Formación de callo en distintos tratamientos. Comparativa entre los distintos grados de formación de callo en el tratamiento control T1 (A) y los tratamientos T4 (B) y T6 (C).

4.4.2 Número de raíces adventicias

De manera similar a lo que se describe arriba para el estadio del callo, se determinó la contribución relativa de cada uno de los factores ensayados (réplica, tratamiento y sustrato) sobre el número de raíces adventicias en los esquejes. La mayor parte de la variación observada se atribuyó al tratamiento ($P < 0,001$). Ni el sustrato ($P = 0,726$) ni la réplica ($P = 0,080$) tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el número de raíces adventicias. Mediante la prueba de medianas de Mood hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$) en el número de raíces adventicias para los distintos tratamientos. De hecho, en sólo dos tratamientos se observó la formación de raíces; en el tratamiento con alta concentración de la auxina 1 (T4) y en el de la mezcla comercial de auxinas en polvo (T6), con valores de $0,019 \pm 0,169$ y $0,173 \pm 1,175$ raíces por esqueje. Estos resultados indican que el tratamiento con la mezcla comercial de auxinas en polvo (T6) conduce a los mejores resultados en la formación de raíces adventicias en la base de los esquejes de olivo (Figura 20).



Figura 20.- Una imagen representativa de esquejes de olivo tratados con la mezcla comercial de auxinas en polvo (T6).

4.4.3 Número de hojas

A diferencia del resto de parámetros estudiados hasta ahora, se ha encontrado que tanto el tratamiento ($P < 0,001$) como la réplica ($P = 0,028$) influyen de manera estadísticamente significativa sobre el número de hojas de los esquejes. El valor promedio del número de hojas es sensiblemente mayor en la réplica 1 ($1,051 \pm 1,773$ hojas por esqueje) que en la réplica 2 ($0,862 \pm 1,302$ hojas por esqueje), lo que indica que los esquejes más envejecidos de la réplica 2 presentan un mayor porcentaje de defoliación que los más frescos de la réplica 1.

Tabla 10. Prueba de rango múltiple para el número de hojas en esquejes de olivo

Tratamiento	Casos	Promedio \pm DE	Grupos homogéneos
T1	208	$1,293 \pm 1,997$	b
T2	208	$1,053 \pm 1,567$	b
T3	208	$0,582 \pm 1,197$	a
T4	208	$1,144 \pm 1,547$	b
T5	208	$1,019 \pm 1,484$	b
T6	208	$0,649 \pm 1,321$	a

Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los distintos tratamientos ensayados.

En la prueba de rango múltiple para los distintos tratamientos (Tabla 10), se observó que éstos se agrupaban en 2 grupos: aquéllos en los que el número de hojas por esqueje no se ve afectado por el tratamiento y aquéllos en los que el tratamiento parece aumentar la defoliación de los esquejes. En este último grupo se incluyen los tratamientos que combinan dos auxinas sintéticas (T3 y T6). Podemos concluir que el uso de un combinado de auxinas, aunque favorece la formación de callo y de raíces adventicias, podría causar algún tipo de estrés adicional que disminuye las posibilidades de supervivencia de los esquejes.



CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

- Hemos desarrollado un procedimiento para el rescate, desinfección y cultivo *in vitro* de embriones de argán (*Argania spinosa* (L.) Skeels) que incrementa el porcentaje de germinación y disminuye la dormancia.
- Hemos establecido un protocolo micropropagación *in vitro* de argán basado en la inducción de brotes y su transferencia a un medio de enraizamiento adecuado.
- Hemos conseguido desarrollar un protocolo adecuado para el enraizamiento de esquejes de argán en condiciones de invernadero que presenta una alta eficacia.
- Hemos evaluado el efecto del sustrato de cultivo, la concentración y el tipo de auxinas exógenas y su combinación en la mejora del enraizamiento de una variedad recalcitrante de olivo (*Olea europea* L.).
- Hemos determinado que el tratamiento con una concentración elevada de auxina 1 incrementa el enraizamiento de esquejes de olivo de la variedad "Alfarenca" sin afectar a su viabilidad.
- Nuestros procedimientos permitirán aumentar la eficacia de la propagación vegetativa en especies y variedades recalcitrantes de interés económico, como el olivo y el argán.



BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta M, Oliveros-Valenzuela MR, Nicolás C, Sánchez-Bravo J** (2009) Rooting of carnation cuttings: The auxin signal. *Plant Signal Behav* **4**, 234-236.
- Agulló-Antón, M. Á., Ferrández-Ayela, A., Fernández-García, N., Nicolás, C., Albacete, A., Pérez-Alfocea, F. & Acosta, M.** (2014). Early steps of adventitious rooting: morphology, hormonal profiling and carbohydrate turnover in carnation stem cuttings. *Physiologia plantarum*, **150** (3), 446-462.
- Ahkami, A. H., Melzer, M., Ghaffari, M. R., Pollmann, S., Javid, M. G., Shahinnia, F. & Druge, U.** (2013). Distribution of indole-3-acetic acid in *Petunia hybrida* shoot tip cuttings and relationship between auxin transport, carbohydrate metabolism and adventitious root formation. *Planta*, **238** (3), 499-517.
- Ait Aabd, N., El Ayadi, F., Msanda, F. & El mousadik, A.** (2011). Evaluation of agromorphological variability of Argan tree under different environmental conditions in Morocco: Implication for selection. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, **3** (3), 73-82
- Al-menaie, H. S., Bhat, N. R., AboEl-Nil, Al-Dosery, S. M., Al-Shatti, A., Gamalin, P. and Suresh, N.** (2007). Seed germination of Argan (*Argania spinosa* L.) *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, **2** (1), 01-04.
- Al-menaie, H. S., Bhat, N. R., AboEl-Nil, M. & Al-Shatti, A.** (2008). Nursery Production Techniques for Argan (*Argania spinosa* L.) *European Journal of Scientific Research*, **23** (4), 639-643.
- Allach, M.** (2012). Variabilidad morfológica, isoenzimática e histológica del argán (*Argania spinosa* L.) y de su aceite en la región de Chouhiya (Berkane, Marruecos). Contribución a su propagación *in vitro*. Tesis doctoral, Universidad de Granada, España.
- Alouani, M. & Bani-Aameur, F.** (2004). Argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) seed germination under nursery conditions: Effect of cold storage, gibberelic acid and mother-tree genotype. *Annals of Forest Science*, **61** (2), 191-194.
- Angelopoulos, K., Dichio, B. & Xiloyannis, C.** (1996). Inhibition of photosynthesis in olive trees (*Olea europea* L.) during water stress and rewatering. *Journal of Experimental Botany*, **47**, 1093-1100.
- Bani-Aameur, F.** (2000). Phenological phases of *Argania spinosa* (L. Skeels) flower. *Forest Genetics*, **7** (4), 329-334.
- Bani-Aameur, F.** (2002). *Argania spinosa* (L.) Skeels flowering phenology. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **49**, 11-19.

- Bani-Aameur, F. & Alouani, M.** (1999). Viabilidad et dormance des semences d'arganier. *Ecologia Mediterranea*, **25**, 75-86.
- Barranco, D.** (2004). Variedades y patrones. En: El cultivo del olivo. Barranco, D., Fernández-Escobar, R. & Rallo, L. (Eds), MundiPrensa-Junta de Andalucía, Madrid.
- Bellefontaine, R., Ferradous, A. & Alifriqui, M.** (2011). Optimisation des techniques de bouturage sous mist chez l'arganier. Actes du Premier Congrès International de l'Arganier, 135-144.
- Bellini, C., Pacurar, D. I., & Perrone, I.** (2014). Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annual review of plant biology*, **65**, 639-666.
- Bosabalidis, A. M. & Kofidis, G.** (2002). Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. *Plant Science*, **163**, 375-379.
- Bousselmime, F., Kenny, L. & Chlyah, H.** (2001). Optimisation des conditions de culture pour l'enracinement *in vitro* de l'arganier (*Argania spinosa* L.). *Life Sciences*, **324**, 995-1000.
- Cano, A., Pérez-Pérez, J. M., & Acosta, M.** (2014). Adventitious Root Development in Ornamental Plants: Insights from Carnation Stem Cuttings. In *Root Engineering* (pp. 423-441). Springer Berlin Heidelberg.
- Castillo, A.** (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA, Uruguay.
- Chakravarti, I. M., & Laha, R. G.** (1967). Handbook of methods of applied statistics. In *Handbook of methods of applied statistics*. John Wiley & Sons.
- Chiapetta, A., Gagliardi, C., Bruno, L. & Bitoni, M. B.** (2014). *In vitro* culture conditions and *OeARF* and *OeH3* expressions modulate adventitious root formation from *Oleaster* (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) cuttings. Hindawi Publishing Corporation, **2014**, ID 974086, 9 pp.
- De Klerk, G. J., van der Krieken, W., & de Jong, J. C.** (1999). Review the formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **35** (3), 189-199.
- FAOSTAT** (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nations. http://faostat3.fao.org/download/Q/*/E
- García-Férriz, L. & Ibarra-Huesa, M.** (2005). Aspectos comerciales del cultivo *in vitro*: justificación de su uso. <http://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/75753-Del-laboratorio-in-vitro-al-vivero.html>
- Giorgi, F. & Lionello, P.** (2008). Climate change projections for the Mediterranean region. *Global and Planetary Change*, **63**, 90-104.
- Gómez-Escalonilla, M. & Vidal, J.** (2006). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Hojas Divulgadoras, 2117.

- Hedayati, V., Mousavi, A., Razavi, K., Cultrera, N. Alagna, F., Mariotti, R., Hosseini-Mazinani, M. & Baldoni, L.** (2015). Polymorphisms in the AOX2 gene are associated with the rooting ability of olive cuttings. *Plant Cell Rep*, **34**, 1151-1164.
- Informe COI** (2012). Consejo Oleícola Internacional. Informe: L'oléiculture en Espagne. <http://www.internationaloliveoil.org/documents/viewfile/7132-espagne>
- Lambardi, M., Ozudogru, E. A., & Roncasaglia, R.** (2013). *In Vitro* Propagation of Olive (*Olea europea* L.) by Nodal Segmentation of Elongated Shoots. *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants. Methods in Molecular Biology*, **994** (3), 33-44.
- Llorens, L., Peñuelas, J. & Emmett B.** (2002). Developmental instability and gas Exchange responses of a heathland shrub to experimental drought and warming. *International Journal of Plant Sciences*, **163** (6), 959-967.
- Majourhat, K., Hafidi, A., Piqueras, A. & Martínez-Gómez, P.** (2007). Multiplicación *in vitro* de la especie oleaginosa argania [*Argania spinosa* (L.) Sheel.] procedente de Marruecos. *Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Actas de Horticultura*, **48**, 647-649.
- Mangal, M., Sharma, D., Sharma, M. & Kumar, S.** (2014). *In vitro* regeneration in olive (*Olea europaea* L.) cv, "Frontio" from nodal segments. *Indian Journal of Experimental Biology*, **52**, 912-916.
- Miloudi, A. & Belkhodja, M.** (2009). The contribution to the research of the germination conditions of argan seeds (*Argania spinosa* L. Skeels): The particular study of the water pre-soaking duration and the harvest year of seeds effects on the germination. *European Journal of Scientific Research*, **25** (3), 376-383.
- Mokhtari, M. & Zakri, B.** (1998). Limites phytotechniques et physiologiques au bouturage, marcottage et greffage de l'arganier (*Argania spinosa* L.). In: *Actes du Colloque International sur les Ressources Végétales*. Université d'Agadir, Agadir, Marruecos, 124-131.
- Moreno, J. M.** (2005). Principales Conclusiones de la Evaluación Preliminar de los Impactos en España por Efecto del Cambio Climático. Proyecto ECCE: Oficina Española de Cambio Climático (OECC) en colaboración con la Universidad de Castilla-la Mancha y el Ministerio de Medio Ambiente, España.
- Msanda, F.** (1993). Ecologie et cartographie des groupements végétaux d'Anzi (Anti Atlas occidental, Maroc) et contribution à l'étude de la diversité génétique de l'Arganier (*Argania spinosa* L. Skeels). Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier, Grenoble, France.
- Msanda, F., El Aboudi, A. & Peltier JP.** (2005). Biodiversité et biogéographie de l'arganeraie marocaine. *Cahiers Agricultures*, **14** (4), 357-364.
- Muñoz, M. M.** (2002). Conferencia: El cambio climático, procesos y efectos en la cuenca mediterránea-Comunidad Valenciana, Centre Cultural de Bancaixa, Valencia, España.

- De Muth, J. E.** (2014). Basic statistics and pharmaceutical statistical applications. CRC Press.
- Nerd, A., Irijimovich, V. & Mizrahi, Y.** (1998). Phenology, breeding system and fruit development of Argan [*Argania spinosa*, Sapotaceae] cultivated in Israel. *Economic Botany*, **52**(2), 161-167.
- Nouaim, R., Mangin, G., Breuil, M. C. & Chaussod, R.** (2002). The argan tree (*Argania spinosa*) in Morocco: Propagation by seeds, cuttings and *in vitro* techniques. *Agroforestry Systems*, **54**, 71-81.
- Oteros, J., Orlandi, F., García-Mozo, H., Aguilera, F., Dhiab, A. B., Bonofiglio, T., Abichou, M., Ruiz-Valenzuela, L., del Trigo, M. M., de la Guardia, C. D., Domínguez-Vilches, E., Msallem, M., Fornaciari, M. & Galán, C.** (2014). Better prediction of Mediterranean olive production using pollen-based models. *Agronomy for Sustainable Development*, **34** (3), 685-694.
- Prendergast, H. D. V. & Walker, C. C.** (1992). The argan: multipurpose tree of Morocco. *Curtis's Botanical Magazine*, **9**, 75-85.
- Rapoport, H. F., Hammami, S. B. M., Martins, P., Pérez-Priego, O. & Orgaz, F.** (2012). Influence of water deficits at different times during olive tree inflorescence and flower development. *Environmental and Experimental Botany*, **77**, 227-233.
- Rojas, S., García, J. & Alarcón, M.** (2004). Propagación Asexual de Plantas: Conceptos Básicos y Experiencias con Especies Amazónicas. Colaboración con Corpoica, Pronata y Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Colombia.
- Sukumar, P., Maloney, G. S., & Muday, G. K.** (2013). Localized induction of the ATP-binding cassette B19 auxin transporter enhances adventitious root formation in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, **162** (3), 1392-1405.
- Van Norman, J. M., Zhang, J., Cazzonelli, C. I., Pogson, B. J., Harrison, P. J., Bugg, T. D., ... & Benfey, P. N.** (2014). Periodic root branching in *Arabidopsis* requires synthesis of an uncharacterized carotenoid derivative. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111** (13), E1300-E1309.
- Verstraeten, I., Beeckman, T., & Geelen, D.** (2013). Adventitious root induction in *Arabidopsis thaliana* as a model for *in vitro* root organogenesis. In *Plant Organogenesis* (pp. 159-175). Humana Press.
- Zahidi, A. & Bani-Aameur, F.** (1997). Germination des amandes d'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels): effet du genotype, de la date de semis et de l'année de récolte. *Ann. Rech. For. Maroc*, **30**, 2-16.
- Zamora, M. A., Báñez, F., Báñez, C. & Alamino, P.** (2004). Aceite de oliva: influencia y beneficios sobre algunas patologías. *Anales de Medicina Interna*, **21** (3), 138-142.
- Zuccherelli, G. & Zuccherelli, S.** (2002). *In vitro* propagation of fifty olive cultivars. *Acta Horticulturae*, **586**, 931-934.



ANEXO

ANEXO I.- Datos recopilados para los esquejes de argán

Tratamiento	Nº individuo bandeja	Nº individuo global	Presencia/ausencia callo	Nº. raíces	Nº hojas	Long. esqueje (mm)
C1	1	1	0	0	0	59,2
C1	2	2	0	0	0	101,0
C1	3	3	0	0	0	106,2
C1	4	4	0	0	0	74,9
C1	5	5	0	0	0	97,8
C1	6	6	0	0	0	81,2
C1	7	7	0	0	0	85,4
C1	8	8	0	0	0	102,7
C1	9	9	0	0	0	87,7
C1	10	10	0	0	0	73,6
C1	11	11	0	0	0	78,4
C1	12	12	0	0	0	78,2
C1	13	13	0	0	0	76,1
C1	14	14	0	0	0	72,5
C2	1	15	0	0	0	108,6
C	2	16	0	0	10	86,2
C2	3	17	1	0	0	76,7
C2	4	18	1	11	2	77,6
C2	5	19	1	0	0	91,9
C2	6	20	1	1	4	103,3
C2	7	21	0	0	0	96,5
C2	8	22	1	3	15	89,3
C2	9	23	1	0	5	84,4
C2	10	24	0	0	11	79,6
C2	11	25	0	0	4	82,0
C2	12	26	1	1	1	82,5
C2	13	27	1	1	5	75,8
C2	14	28	1	0	1	93,4
C2	15	29	1	2	7	89,9
C2	16	30	0	0	0	107,4
C2	17	31	1	9	3	108,1
C2	18	32	0	0	0	80,5
C2	19	33	1	0	8	107,5
C2	20	34	1	1	15	82,2
C2	21	35	0	0	0	90,3
C2	22	36	0	0	12	102,7
C2	23	37	0	0	6	98,7
C2	24	38	1	3	5	90,0
C	25	39	0	0	3	96,1
C2	26	40	1	0	7	90,9

Tratamiento	Nº individuo bandeja	Nº individuo global	Presencia/ausencia callo	Nº. raíces	Nº hojas	Long. esqueje (mm)
C2	28	42	0	0	0	90,3
C2	29	43	0	0	6	90,3
C2	30	44	1	1	5	90,5
C2	31	45	1	2	3	103,8
C2	32	46	0	0	4	90,7
C2	33	47	0	0	0	88,7
C2	34	48	0	0	0	93,5
C2	35	49	1	1	15	95,2
C2	36	50	1	0	7	84,1
C2	37	51	1	0	12	100,6
C2	38	52	1	0	4	90,2
C2	39	53	0	0	11	85,5
C2	40	54	0	0	5	93,3
C2	41	55	1	1	9	110,3
C2	42	56	0	0	0	89,6
A1	1	57	0	0	0	101,0
A1	2	58	0	0	0	100,5
A1	3	59	0	0	0	96,0
A1	4	60	0	0	0	124,1
A1	5	61	0	0	0	87,4
A1	6	62	0	0	0	97,9
A1	7	63	0	0	0	109,7
A1	8	64	0	0	0	93,7
A1	9	65	0	0	0	88,7
A1	10	66	0	0	0	90,5
A1	11	67	0	0	0	97,9
A1	12	68	0	0	0	81,6
A1	13	69	0	0	0	46,4
A1	14	70	0	0	0	91,3
A1	15	71	0	0	0	71,0
A1	16	72	0	0	0	67,0
A1	17	73	0	0	0	102,7
A2	1	74	1	1	7	55,6
A2	2	75	0	0	6	101,8
A2	3	76	0	0	11	91,7
A2	4	77	1	0	7	77,6
A2	5	78	1	2	4	73,7
A2	6	79	0	0	11	103,7
A2	7	80	0	0	0	87,1
A2	8	81	1	1	7	104,7
A2	9	82	0	0	16	88,4

Tratamiento	Nº individuo bandeja	Nº individuo global	Presencia/ausencia callo	Nº. raíces	Nº hojas	Long. esqueje (mm)
A2	10	83	1	1	5	96,9
A2	11	84	1	0	5	104,6
A2	12	85	0	0	0	101,3
A2	13	86	0	0	12	108,3
A2	14	87	1	0	1	79,6
A2	15	88	0	0	8	99,4
A2	16	89	0	0	5	77,3
A2	17	90	0	0	13	87,7
A2	18	91	0	0	6	97,9
A2	19	92	0	0	3	81,2
A2	20	93	0	0	0	74,7
A2	21	94	1	1	2	96,8
A2	22	95	1	0	10	79,5
A2	23	96	0	0	11	97,4
A2	24	97	0	0	15	121,1
A2	25	98	0	0	12	84,9
A2	26	99	1	0	13	113,9
A2	27	100	0	0	4	115,4
A2	28	101	0	0	3	82,2
A2	29	102	0	0	8	98,1
A2	30	103	1	0	3	74,6
A2	31	104	1	0	0	81,5
A2	32	105	0	0	0	76,3
A2	33	106	0	0	5	101,1
A2	34	107	0	0	0	94,5
A2	35	108	1	0	3	74,0
A2	36	109	1	0	11	90,1
A2	37	110	0	0	7	56,5
A2	38	111	0	0	0	100,0
A2	39	112	0	0	11	77,3
A2	40	113	0	0	0	94,4
A2	41	114	0	0	13	76,0
A2	42	115	1	0	3	91,5

ANEXO II.- Datos recopilados para los esquejes de olivo

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
1	1	A	1	1	1	0	0	12,82
1	1	A	2	2	2	0	0	8,73
1	1	A	3	3	1	0	3	10,12
1	1	A	4	4	1	0	1	8,02
1	1	A	5	5	1	0	1	12,97
1	1	A	6	6	0	0	0	9,98
1	1	A	7	7	0	0	7	10,15
1	1	A	8	8	0	0	5	12,13
1	1	A	9	9	1	0	0	8,38
1	1	A	10	10	1	0	11	8,97
1	1	A	11	11	0	0	1	10,5
1	1	A	12	12	1	0	0	9,37
1	1	A	13	13	0	0	0	9,45
1	1	A	14	14	1	0	6	11,24
1	1	A	15	15	1	0	5	10,36
1	1	A	16	16	0	0	3	10,23
1	1	A	17	17	2	0	4	11,6
1	1	A	18	18	0	0	1	10,5
1	1	A	19	19	2	0	3	12,2
1	1	A	20	20	2	0	2	10,66
1	1	A	21	21	0	0	0	9,7
1	1	A	22	22	0	0	0	7,85
1	1	A	23	23	0	0	1	11,3
1	1	A	24	24	0	0	2	10,75
1	1	A	25	25	0	0	3	9,37
1	1	A	26	26	0	0	0	9,71
1	1	A	27	27	1	0	1	11,02
1	1	A	28	28	1	0	0	11,11
1	1	A	29	29	0	0	1	9,38
1	1	A	30	30	0	0	2	11,3
1	1	A	31	31	1	0	0	10,97
1	1	A	32	32	0	0	0	7,1
1	1	A	33	33	2	0	1	10,17
1	1	A	34	34	2	0	7	9,8
1	1	A	35	35	0	0	0	10,05
1	1	A	36	36	1	0	0	11,75
1	1	A	37	37	1	0	0	9,4
1	1	A	38	38	0	0	0	9,14
1	1	A	39	39	0	0	3	10,32
1	1	A	40	40	0	0	2	10,5
1	1	A	41	41	1	0	0	7,8
1	1	A	42	42	1	0	0	9,22

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
1	1	A	43	43	2	0	2	10,07
1	1	A	44	44	1	0	0	9,07
1	1	A	45	45	1	0	0	9,42
1	1	A	46	46	1	0	4	12,2
1	1	A	47	47	1	0	0	11,33
1	1	A	48	48	1	0	0	7,74
1	1	A	49	49	1	0	3	10,17
1	1	A	50	50	1	0	0	7,72
1	1	A	51	51	1	0	0	9,98
1	1	A	52	52	1	0	0	6,61
1	1	B	1	53	2	0	1	11
1	1	B	2	54	1	0	2	9,86
1	1	B	3	55	1	0	2	9,85
1	1	B	4	56	1	0	0	9,5
1	1	B	5	57	1	0	4	7,9
1	1	B	6	58	0	0	1	8,37
1	1	B	7	59	0	0	0	11,35
1	1	B	8	60	0	0	3	11,95
1	1	B	9	61	0	0	0	8,52
1	1	B	10	62	1	0	0	10,97
1	1	B	11	63	1	0	0	10,17
1	1	B	12	64	0	0	0	8,88
1	1	B	13	65	0	0	0	9,93
1	1	B	14	66	0	0	2	9,38
1	1	B	15	67	2	0	2	9,99
1	1	B	16	68	2	0	3	8,22
1	1	B	17	69	2	0	2	9,09
1	1	B	18	70	1	0	0	10,97
1	1	B	19	71	0	0	8	9,87
1	1	B	20	72	0	0	0	8,05
1	1	B	21	73	0	0	1	10,41
1	1	B	22	74	0	0	3	10
1	1	B	23	75	2	0	1	8,99
1	1	B	24	76	0	0	0	9,45
1	1	B	25	77	0	0	2	8,54
1	1	B	26	78	0	0	4	11,66
1	1	B	27	79	0	0	0	9,17
1	1	B	28	80	0	0	3	12,02
1	1	B	29	81	1	0	1	11,77
1	1	B	30	82	1	0	3	10,5
1	1	B	31	83	0	0	0	11,83
1	1	B	32	84	0	0	2	11,15
1	1	B	33	85	2	0	4	8,22
1	1	B	34	86	1	0	0	10,42

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
1	1	B	35	87	4	0	9	9,85
1	1	B	36	88	1	0	0	10,15
1	1	B	37	89	0	0	2	13,28
1	1	B	38	90	0	0	2	11,35
1	1	B	39	91	0	0	0	9,55
1	1	B	40	92	0	0	0	9,89
1	1	B	41	93	0	0	4	8,76
1	1	B	42	94	0	0	5	9,72
1	1	B	43	95	1	0	4	11,22
1	1	B	44	96	0	0	0	9,33
1	1	B	45	97	0	0	0	10,9
1	1	B	46	98	1	0	5	11,5
1	1	B	47	99	0	0	0	11,67
1	1	B	48	100	1	0	0	8,64
1	1	B	49	101	1	0	0	9,23
1	1	B	50	102	1	0	5	11,4
1	1	B	51	103	2	0	10	8,83
1	1	B	52	104	0	0	5	10,04
1	2	A	1	105	2	0	0	9,68
1	2	A	2	106	0	0	6	10,96
1	2	A	3	107	0	0	0	6,46
1	2	A	4	108	1	0	0	10,21
1	2	A	5	109	1	0	4	8,36
1	2	A	6	110	1	0	6	8,47
1	2	A	7	111	1	0	2	9,67
1	2	A	8	112	0	0	5	10,88
1	2	A	9	113	0	0	0	9,47
1	2	A	10	114	1	0	0	8,46
1	2	A	11	115	2	0	4	10,24
1	2	A	12	116	2	0	4	9,3
1	2	A	13	117	1	0	0	9,17
1	2	A	14	118	2	0	3	8,61
1	2	A	15	119	1	0	1	7,77
1	2	A	16	120	0	0	0	10,03
1	2	A	17	121	2	0	3	10,6
1	2	A	18	122	1	0	0	5,73
1	2	A	19	123	2	0	0	9,53
1	2	A	20	124	2	0	5	9,55
1	2	A	21	125	1	0	0	8,42
1	2	A	22	126	1	0	1	10,2
1	2	A	23	127	2	0	2	9,7
1	2	A	24	128	0	0	0	5,88
1	2	A	25	129	0	0	0	6,54
1	2	A	26	130	2	0	6	9,05

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
1	2	A	27	131	0	0	0	5,63
1	2	A	28	132	1	0	2	9,25
1	2	A	29	133	2	0	6	12,82
1	2	A	30	134	0	0	0	10,72
1	2	A	31	135	0	0	0	6,09
1	2	A	32	136	1	0	4	8,32
1	2	A	33	137	1	0	7	11,82
1	2	A	34	138	2	0	3	10,16
1	2	A	35	139	1	0	0	8,62
1	2	A	36	140	0	0	0	9,09
1	2	A	37	141	0	0	0	9,32
1	2	A	38	142	2	0	5	8,26
1	2	A	39	143	2	0	0	8,97
1	2	A	40	144	0	0	3	10,31
1	2	A	41	145	1	0	1	9,58
1	2	A	42	146	0	0	0	9,04
1	2	A	43	147	0	0	0	9,94
1	2	A	44	148	0	0	0	6,74
1	2	A	45	149	0	0	0	6,33
1	2	A	46	150	1	0	0	7,12
1	2	A	47	151	3	0	0	9,42
1	2	A	48	152	0	0	0	8,61
1	2	A	49	153	2	0	0	6,92
1	2	A	50	154	0	0	0	7,48
1	2	A	51	155	1	0	0	8,69
1	2	A	52	156	0	0	0	6,04
1	2	B	1	157	0	0	1	9,8
1	2	B	2	158	1	0	0	8,64
1	2	B	3	159	0	0	0	8,44
1	2	B	4	160	1	0	2	7,63
1	2	B	5	161	0	0	1	7,51
1	2	B	6	162	0	0	0	7,71
1	2	B	7	163	0	0	0	11,18
1	2	B	8	164	0	0	0	8,68
1	2	B	9	165	2	0	0	9,25
1	2	B	10	166	2	0	2	7,7
1	2	B	11	167	2	0	2	9,68
1	2	B	12	168	1	0	0	8,51
1	2	B	13	169	1	0	0	10,3
1	2	B	14	170	0	0	0	7,08
1	2	B	15	171	1	0	2	7,64
1	2	B	16	172	2	0	0	10,7
1	2	B	17	173	1	0	5	13,16
1	2	B	18	174	0	0	0	7,71

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
1	2	B	19	175	0	0	0	9,05
1	2	B	20	176	0	0	0	6,41
1	2	B	21	177	0	0	0	10,53
1	2	B	22	178	1	0	1	8,12
1	2	B	23	179	0	0	0	8,48
1	2	B	24	180	0	0	0	7,86
1	2	B	25	181	1	0	0	9,91
1	2	B	26	182	1	0	0	8,92
1	2	B	27	183	0	0	0	7,32
1	2	B	28	184	1	0	1	9,38
1	2	B	29	185	1	0	0	9,05
1	2	B	30	186	1	0	0	8,06
1	2	B	31	187	0	0	2	7,21
1	2	B	32	188	0	0	0	9,61
1	2	B	33	189	1	0	0	9,8
1	2	B	34	190	1	0	1	10,13
1	2	B	35	191	0	0	0	7,64
1	2	B	36	192	2	0	0	8,6
1	2	B	37	193	4	0	0	7,21
1	2	B	38	194	1	0	3	9,38
1	2	B	39	195	0	0	0	7,54
1	2	B	40	196	0	0	0	9,47
1	2	B	41	197	2	0	0	8,45
1	2	B	42	198	1	0	1	10,8
1	2	B	43	199	0	0	0	10,17
1	2	B	44	200	1	0	1	9,2
1	2	B	45	201	0	0	0	7,98
1	2	B	46	202	0	0	0	8,05
1	2	B	47	203	2	0	0	9,1
1	2	B	48	204	0	0	1	6,87
1	2	B	49	205	0	0	1	7,7
1	2	B	50	206	1	0	0	8,34
1	2	B	51	207	0	0	0	7,73
1	2	B	52	208	0	0	5	7,4
1	3	A	1	209	3	0	5	11,53
1	3	A	2	210	0	0	0	10,15
1	3	A	3	211	0	0	3	7,6
1	3	A	4	212	4	0	4	12,23
1	3	A	5	213	3	0	2	8,97
1	3	A	6	214	1	0	4	9,51
1	3	A	7	215	0	0	0	7,15
1	3	A	8	216	2	0	2	9,22
1	3	A	9	217	2	0	0	7,53
1	3	A	10	218	0	0	0	10,95

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
1	3	A	11	219	1	0	2	7,22
1	3	A	12	220	0	0	6	9,13
1	3	A	13	221	1	0	0	8,03
1	3	A	14	222	3	0	3	9,84
1	3	A	15	223	0	0	0	9,87
1	3	A	16	224	0	0	0	9,92
1	3	A	17	225	0	0	0	7,4
1	3	A	18	226	1	0	0	8,08
1	3	A	19	227	0	0	0	6,5
1	3	A	20	228	2	0	0	8,68
1	3	A	21	229	0	0	0	7,03
1	3	A	22	230	0	0	0	8,26
1	3	A	23	231	0	0	0	5,27
1	3	A	24	232	1	0	2	10,98
1	3	A	25	233	2	0	0	7,24
1	3	A	26	234	0	0	0	5,68
1	3	A	27	235	1	0	3	7,4
1	3	A	28	236	0	0	0	7,42
1	3	A	29	237	0	0	0	8,05
1	3	A	30	238	2	0	2	12,99
1	3	A	31	239	1	0	0	10,86
1	3	A	32	240	1	0	0	7,44
1	3	A	33	241	2	0	0	8,5
1	3	A	34	242	0	0	0	7,73
1	3	A	35	243	0	0	0	10,33
1	3	A	36	244	0	0	0	8,02
1	3	A	37	245	0	0	1	9,43
1	3	A	38	246	0	0	0	11,17
1	3	A	39	247	0	0	0	6
1	3	A	40	248	0	0	0	8,57
1	3	A	41	249	0	0	0	7,94
1	3	A	42	250	0	0	0	6,04
1	3	A	43	251	1	0	0	7,74
1	3	A	44	252	0	0	2	10,9
1	3	A	45	253	2	0	0	8,6
1	3	A	46	254	0	0	0	5,75
1	3	A	47	255	2	0	0	8,12
1	3	A	48	256	1	0	0	8,51
1	3	A	49	257	2	0	0	9,93
1	3	A	50	258	0	0	0	8,27
1	3	A	51	259	2	0	0	8,97
1	3	A	52	260	0	0	0	6,5
1	3	B	1	261	0	0	0	8,63
1	3	B	2	262	1	0	1	9,83

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
1	3	B	3	263	1	0	0	10,72
1	3	B	4	264	1	0	0	9,43
1	3	B	5	265	2	0	0	5,66
1	3	B	6	266	2	0	0	8,76
1	3	B	7	267	1	0	1	11,2
1	3	B	8	268	0	0	0	10,02
1	3	B	9	269	0	0	0	10,9
1	3	B	10	270	0	0	0	6,12
1	3	B	11	271	0	0	0	8,67
1	3	B	12	272	0	0	0	8,48
1	3	B	13	273	1	0	1	9,73
1	3	B	14	274	0	0	0	7,34
1	3	B	15	275	1	0	0	8,04
1	3	B	16	276	1	0	0	11,36
1	3	B	17	277	1	0	0	8,23
1	3	B	18	278	1	0	0	7,98
1	3	B	19	279	0	0	0	8,15
1	3	B	20	280	1	0	3	12,31
1	3	B	21	281	0	0	0	9,65
1	3	B	22	282	0	0	0	7,28
1	3	B	23	283	1	0	0	9,3
1	3	B	24	284	0	0	0	10,1
1	3	B	25	285	1	0	0	7,65
1	3	B	26	286	3	0	0	8,44
1	3	B	27	287	0	0	0	8,9
1	3	B	28	288	0	0	0	9,7
1	3	B	29	289	1	0	0	7,7
1	3	B	30	290	2	0	0	8,96
1	3	B	31	291	0	0	0	8,67
1	3	B	32	292	0	0	0	8,14
1	3	B	33	293	0	0	0	6,33
1	3	B	34	294	0	0	0	6,63
1	3	B	35	295	0	0	0	8,71
1	3	B	36	296	1	0	0	8,27
1	3	B	37	297	0	0	0	9,5
1	3	B	38	298	2	0	0	7,82
1	3	B	39	299	2	0	1	10
1	3	B	40	300	3	0	0	9,01
1	3	B	41	301	0	0	0	8,98
1	3	B	42	302	1	0	0	9,8
1	3	B	43	303	1	0	0	6,61
1	3	B	44	304	2	0	4	7,28
1	3	B	45	305	2	0	0	6,52
1	3	B	46	306	1	0	0	8,25

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
1	3	B	47	307	1	0	0	8,57
1	3	B	48	308	0	0	0	9,43
1	3	B	49	309	0	0	0	8,57
1	3	B	50	310	3	0	2	9,07
1	3	B	51	311	4	0	0	8,82
1	3	B	52	312	1	0	0	7
1	4	A	1	313	3	2	4	6,48
1	4	A	2	314	4	1	3	7,14
1	4	A	3	315	4	0	3	5,16
1	4	A	4	316	2	0	3	6,62
1	4	A	5	317	3	0	3	10,6
1	4	A	6	318	3	0	4	7,48
1	4	A	7	319	3	0	3	5,4
1	4	A	8	320	2	0	3	6,36
1	4	A	9	321	0	0	0	7,67
1	4	A	10	322	3	0	1	7,03
1	4	A	11	323	3	0	2	5,51
1	4	A	12	324	3	0	0	9,72
1	4	A	13	325	3	0	2	9,27
1	4	A	14	326	3	0	0	8,58
1	4	A	15	327	1	0	0	6,12
1	4	A	16	328	3	0	3	6,37
1	4	A	17	329	0	0	0	7,57
1	4	A	18	330	3	0	3	6,65
1	4	A	19	331	3	0	0	8,44
1	4	A	20	332	3	0	0	5,8
1	4	A	21	333	3	0	2	6,43
1	4	A	22	334	4	0	2	6,8
1	4	A	23	335	3	0	4	8,16
1	4	A	24	336	4	0	1	6,98
1	4	A	25	337	2	0	0	12,75
1	4	A	26	338	2	0	0	9,3
1	4	A	27	339	0	0	0	7,71
1	4	A	28	340	3	0	10	8,36
1	4	A	29	341	0	0	0	8,22
1	4	A	30	342	4	0	0	10,93
1	4	A	31	343	0	0	0	11,1
1	4	A	32	344	3	0	5	5,3
1	4	A	33	345	2	0	3	7,82
1	4	A	34	346	0	0	0	6,86
1	4	A	35	347	1	0	2	8,02
1	4	A	36	348	0	0	0	9,78
1	4	A	37	349	2	0	1	6,98
1	4	A	38	350	4	0	0	11,33

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
1	4	A	39	351	3	0	3	6,13
1	4	A	40	352	3	0	2	6,2
1	4	A	41	353	2	0	0	9,63
1	4	A	42	354	2	0	0	5,5
1	4	A	43	355	0	0	0	8,4
1	4	A	44	356	0	0	0	7,56
1	4	A	45	357	0	0	0	6,55
1	4	A	46	358	2	0	0	8,74
1	4	A	47	359	0	0	0	6,62
1	4	A	48	360	2	0	0	5,73
1	4	A	49	361	0	0	0	6,3
1	4	A	50	362	2	0	0	8,6
1	4	A	51	363	1	0	0	5,16
1	4	A	52	364	1	0	0	9,9
1	4	B	1	365	4	1	2	9,43
1	4	B	2	366	1	0	4	8,6
1	4	B	3	367	4	0	0	8,64
1	4	B	4	368	2	0	1	8,38
1	4	B	5	369	0	0	2	8,07
1	4	B	6	370	0	0	0	7,48
1	4	B	7	371	3	0	2	7,95
1	4	B	8	372	1	0	0	12,08
1	4	B	9	373	2	0	2	7,18
1	4	B	10	374	2	0	0	9,53
1	4	B	11	375	0	0	2	7,43
1	4	B	12	376	3	0	2	8,64
1	4	B	13	377	1	0	0	7,72
1	4	B	14	378	0	0	0	7,23
1	4	B	15	379	2	0	0	11,54
1	4	B	16	380	2	0	0	9,17
1	4	B	17	381	2	0	4	7,41
1	4	B	18	382	2	0	0	9,33
1	4	B	19	383	3	0	2	11,49
1	4	B	20	384	3	0	0	13,58
1	4	B	21	385	1	0	4	9,25
1	4	B	22	386	1	0	0	4,94
1	4	B	23	387	0	0	0	7,23
1	4	B	24	388	0	0	0	9,7
1	4	B	25	389	4	0	0	6,94
1	4	B	26	390	3	0	2	10,16
1	4	B	27	391	1	0	0	6,55
1	4	B	28	392	0	0	0	6,73
1	4	B	29	393	0	0	0	11,2
1	4	B	30	394	2	0	1	8,75

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
1	4	B	31	395	3	0	2	7,72
1	4	B	32	396	0	0	0	7,22
1	4	B	33	397	3	0	4	8,84
1	4	B	34	398	0	0	0	8,24
1	4	B	35	399	0	0	0	8,26
1	4	B	36	400	0	0	0	9,73
1	4	B	37	401	2	0	2	9,59
1	4	B	38	402	2	0	1	7,93
1	4	B	39	403	3	0	1	13,37
1	4	B	40	404	3	0	1	12,12
1	4	B	41	405	2	0	0	7,57
1	4	B	42	406	2	0	0	10,28
1	4	B	43	407	2	0	0	8,93
1	4	B	44	408	3	0	0	7,43
1	4	B	45	409	2	0	0	8,1
1	4	B	46	410	4	0	1	11,61
1	4	B	47	411	2	0	0	7,44
1	4	B	48	412	3	0	0	12,22
1	4	B	49	413	0	0	0	6,94
1	4	B	50	414	0	0	0	6,73
1	4	B	51	415	1	0	0	7,41
1	4	B	52	416	0	0	0	7,15
1	5	A	1	417	2	0	4	8,05
1	5	A	2	418	0	0	3	12,11
1	5	A	3	419	1	0	4	10
1	5	A	4	420	1	0	1	7,66
1	5	A	5	421	4	0	4	5,86
1	5	A	6	422	0	0	4	10,35
1	5	A	7	423	2	0	3	8,55
1	5	A	8	424	0	0	0	9,77
1	5	A	9	425	0	0	0	8,96
1	5	A	10	426	0	0	2	7,31
1	5	A	11	427	0	0	4	8,9
1	5	A	12	428	2	0	5	6,11
1	5	A	13	429	3	0	4	7,07
1	5	A	14	430	1	0	0	7,44
1	5	A	15	431	0	0	0	9,9
1	5	A	16	432	2	0	3	9,86
1	5	A	17	433	0	0	0	8,89
1	5	A	18	434	2	0	0	6,44
1	5	A	19	435	0	0	0	8,01
1	5	A	20	436	2	0	4	9,37
1	5	A	21	437	0	0	0	6,96
1	5	A	22	438	0	0	0	9,2

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
1	5	A	23	439	0	0	2	7,05
1	5	A	24	440	0	0	0	8,3
1	5	A	25	441	0	0	0	8,13
1	5	A	26	442	0	0	0	7,71
1	5	A	27	443	2	0	0	8,01
1	5	A	28	444	2	0	0	9,09
1	5	A	29	445	0	0	0	5,87
1	5	A	30	446	0	0	0	7,24
1	5	A	31	447	0	0	3	8,36
1	5	A	32	448	1	0	0	6,85
1	5	A	33	449	0	0	0	8,14
1	5	A	34	450	2	0	3	9,59
1	5	A	35	451	2	0	1	9,98
1	5	A	36	452	0	0	0	7,57
1	5	A	37	453	0	0	0	9,76
1	5	A	38	454	2	0	3	7,92
1	5	A	39	455	0	0	0	8,55
1	5	A	40	456	1	0	0	8,5
1	5	A	41	457	1	0	0	8,2
1	5	A	42	458	2	0	1	6,46
1	5	A	43	459	2	0	0	8,46
1	5	A	44	460	0	0	0	6,01
1	5	A	45	461	0	0	0	8,82
1	5	A	46	462	1	0	0	6,86
1	5	A	47	463	0	0	0	8,03
1	5	A	48	464	0	0	0	6,91
1	5	A	49	465	0	0	0	5,62
1	5	A	50	466	0	0	0	8,47
1	5	A	51	467	0	0	0	6,74
1	5	A	52	468	0	0	0	7,73
1	5	B	1	469	0	0	1	6,9
1	5	B	2	470	0	0	0	8,5
1	5	B	3	471	1	0	1	8,7
1	5	B	4	472	0	0	0	12,26
1	5	B	5	473	2	0	3	8,15
1	5	B	6	474	0	0	0	10,16
1	5	B	7	475	2	0	2	8,15
1	5	B	8	476	0	0	1	9,32
1	5	B	9	477	0	0	3	10,68
1	5	B	10	478	0	0	0	8,88
1	5	B	11	479	1	0	3	10,66
1	5	B	12	480	1	0	5	9,54
1	5	B	13	481	0	0	0	9,27
1	5	B	14	482	2	0	4	8,45

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
1	5	B	15	483	3	0	1	8,8
1	5	B	16	484	0	0	0	8,75
1	5	B	17	485	2	0	3	7,4
1	5	B	18	486	0	0	0	7,33
1	5	B	19	487	0	0	0	8,78
1	5	B	20	488	2	0	1	6,91
1	5	B	21	489	2	0	3	12,95
1	5	B	22	490	0	0	0	7,19
1	5	B	23	491	0	0	0	7,67
1	5	B	24	492	2	0	3	11,85
1	5	B	25	493	1	0	4	7,57
1	5	B	26	494	3	0	2	11,62
1	5	B	27	495	2	0	0	8,83
1	5	B	28	496	2	0	3	5,76
1	5	B	29	497	1	0	4	5,68
1	5	B	30	498	1	0	0	6,13
1	5	B	31	499	1	0	0	6,54
1	5	B	32	500	0	0	1	8,6
1	5	B	33	501	0	0	0	8,47
1	5	B	34	502	2	0	0	9,41
1	5	B	35	503	2	0	2	6,34
1	5	B	36	504	0	0	0	8,25
1	5	B	37	505	0	0	1	5,78
1	5	B	38	506	3	0	0	8,48
1	5	B	39	507	2	0	8	11,24
1	5	B	40	508	1	0	0	7,88
1	5	B	41	509	1	0	1	6,3
1	5	B	42	510	3	0	1	7,32
1	5	B	43	511	0	0	0	8,22
1	5	B	44	512	0	0	0	8,37
1	5	B	45	513	0	0	0	7,54
1	5	B	46	514	0	0	0	10,82
1	5	B	47	515	0	0	0	9,63
1	5	B	48	516	0	0	0	8,81
1	5	B	49	517	0	0	0	7,34
1	5	B	50	518	0	0	0	7,41
1	5	B	51	519	0	0	0	6,61
1	5	B	52	520	2	0	0	7,26
1	6	A	1	521	4	10	5	8,95
1	6	A	2	522	4	2	4	9,33
1	6	A	3	523	4	2	4	6,37
1	6	A	4	524	4	1	2	6,36
1	6	A	5	525	4	0	4	5,47
1	6	A	6	526	4	0	1	6,72

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
1	6	A	7	527	3	0	2	9,95
1	6	A	8	528	3	0	4	10,98
1	6	A	9	529	0	0	0	9,49
1	6	A	10	530	3	0	1	7,62
1	6	A	11	531	3	0	0	8,99
1	6	A	12	532	4	0	0	9,47
1	6	A	13	533	3	0	0	9,7
1	6	A	14	534	2	0	1	8,22
1	6	A	15	535	4	0	0	6,6
1	6	A	16	536	4	0	0	9,02
1	6	A	17	537	4	0	0	8,87
1	6	A	18	538	2	0	0	6,9
1	6	A	19	539	3	0	0	10,56
1	6	A	20	540	2	0	0	8,74
1	6	A	21	541	3	0	0	6,64
1	6	A	22	542	2	0	0	9,5
1	6	A	23	543	3	0	0	8,41
1	6	A	24	544	2	0	0	8,85
1	6	A	25	545	3	0	1	7,44
1	6	A	26	546	4	0	0	8,07
1	6	A	27	547	3	0	0	7,93
1	6	A	28	548	1	0	0	9,61
1	6	A	29	549	1	0	0	6,36
1	6	A	30	550	0	0	0	8,83
1	6	A	31	551	1	0	0	8,21
1	6	A	32	552	2	0	0	10,18
1	6	A	33	553	0	0	0	8,29
1	6	A	34	554	1	0	1	8,67
1	6	A	35	555	0	0	0	9,46
1	6	A	36	556	0	0	0	8,99
1	6	A	37	557	3	0	0	11,4
1	6	A	38	558	4	0	0	7,86
1	6	A	39	559	0	0	0	6,35
1	6	A	40	560	0	0	0	5,22
1	6	A	41	561	0	0	0	7,01
1	6	A	42	562	3	0	0	7,77
1	6	A	43	563	2	0	0	7,02
1	6	A	44	564	3	0	0	7,05
1	6	A	45	565	3	0	0	8,3
1	6	A	46	566	3	0	0	7,35
1	6	A	47	567	0	0	0	8,57
1	6	A	48	568	3	0	0	6,17
1	6	A	49	569	2	0	0	7,8
1	6	A	50	570	0	0	0	7,2

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
1	6	A	51	571	0	0	0	7,9
1	6	A	52	572	3	0	0	7,14
1	6	B	1	573	3	13	4	8,81
1	6	B	2	574	3	0	0	7,96
1	6	B	3	575	4	0	1	9,12
1	6	B	4	576	3	1	6	10,3
1	6	B	5	577	4	1	0	8,74
1	6	B	6	578	3	0	3	9,64
1	6	B	7	579	3	0	2	8,45
1	6	B	8	580	0	0	1	9,77
1	6	B	9	581	0	0	0	8,11
1	6	B	10	582	3	0	0	6,96
1	6	B	11	583	3	0	7	9,6
1	6	B	12	584	3	0	0	8,18
1	6	B	13	585	0	0	0	9,57
1	6	B	14	586	0	0	0	8,65
1	6	B	15	587	0	0	0	9,27
1	6	B	16	588	0	0	0	7,91
1	6	B	17	589	3	0	0	9,83
1	6	B	18	590	0	0	0	6,78
1	6	B	19	591	3	0	3	9,08
1	6	B	20	592	3	0	0	11,3
1	6	B	21	593	3	0	1	9,6
1	6	B	22	594	0	0	0	8,66
1	6	B	23	595	2	0	0	8,96
1	6	B	24	596	0	0	0	8,33
1	6	B	25	597	1	1	0	9,68
1	6	B	26	598	2	0	4	8,82
1	6	B	27	599	0	0	0	8,76
1	6	B	28	600	0	0	0	10,32
1	6	B	29	601	0	0	0	8,52
1	6	B	30	602	2	0	0	10,08
1	6	B	31	603	0	0	0	11,43
1	6	B	32	604	2	0	0	9,11
1	6	B	33	605	2	0	0	6,63
1	6	B	34	606	2	0	0	14,01
1	6	B	35	607	2	0	0	7,93
1	6	B	36	608	1	0	0	9,85
1	6	B	37	609	0	0	0	10,37
1	6	B	38	610	2	0	1	9,17
1	6	B	39	611	0	0	0	7,43
1	6	B	40	612	0	0	0	8,46
1	6	B	41	613	0	0	0	7,31
1	6	B	42	614	0	0	0	7,26

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
1	6	B	43	615	2	0	0	8,89
1	6	B	44	616	2	0	0	6,14
1	6	B	45	617	0	0	0	12,65
1	6	B	46	618	3	0	1	11,34
1	6	B	47	619	2	0	0	9,17
1	6	B	48	620	3	0	0	7,18
1	6	B	49	621	0	0	0	7,02
1	6	B	50	622	0	0	0	8,86
1	6	B	51	623	0	0	0	7,09
1	6	B	52	624	1	0	0	9,12
2	1	A	1	625	1	0	0	7,06
2	1	A	2	626	2	0	4	8,9
2	1	A	3	627	1	0	0	6,87
2	1	A	4	628	0	0	1	7,56
2	1	A	5	629	2	0	2	8,76
2	1	A	6	630	0	0	0	8,94
2	1	A	7	631	1	0	2	6,96
2	1	A	8	632	0	0	0	5,57
2	1	A	9	633	2	0	3	9,91
2	1	A	10	634	0	0	0	6,92
2	1	A	11	635	2	0	4	10,19
2	1	A	12	636	1	0	1	9,2
2	1	A	13	637	1	0	0	7,78
2	1	A	14	638	2	0	4	7,88
2	1	A	15	639	1	0	0	8,64
2	1	A	16	640	0	0	0	7,45
2	1	A	17	641	0	0	0	8,61
2	1	A	18	642	0	0	1	9,22
2	1	A	19	643	0	0	0	7,27
2	1	A	20	644	0	0	0	9,58
2	1	A	21	645	1	0	1	7,73
2	1	A	22	646	1	0	0	10,07
2	1	A	23	647	1	0	2	11,37
2	1	A	24	648	1	0	0	8,72
2	1	A	25	649	1	0	0	8,12
2	1	A	26	650	0	0	0	7,22
2	1	A	27	651	0	0	0	7,07
2	1	A	28	652	0	0	0	7,61
2	1	A	29	653	1	0	2	8,03
2	1	A	30	654	1	0	0	8,52
2	1	A	31	655	0	0	0	8,41
2	1	A	32	656	1	0	0	7,89
2	1	A	33	657	1	0	0	8,78
2	1	A	34	658	0	0	0	9,56

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
2	1	A	35	659	0	0	0	7,87
2	1	A	36	660	1	0	0	8,56
2	1	A	37	661	1	0	0	8,65
2	1	A	38	662	2	0	2	9,4
2	1	A	39	663	0	0	0	9,4
2	1	A	40	664	1	0	0	7,34
2	1	A	41	665	0	0	3	8,21
2	1	A	42	666	0	0	0	8,12
2	1	A	43	667	1	0	0	8,94
2	1	A	44	668	1	0	0	6,44
2	1	A	45	669	0	0	0	7,38
2	1	A	46	670	0	0	0	7,97
2	1	A	47	671	0	0	0	7,8
2	1	A	48	672	1	0	1	8,26
2	1	A	49	673	1	0	0	9,33
2	1	A	50	674	0	0	0	6,41
2	1	A	51	675	0	0	0	7,87
2	1	A	52	676	0	0	0	9,34
2	1	B	1	677	0	0	0	9,02
2	1	B	2	678	2	0	2	9,71
2	1	B	3	679	0	0	0	7,86
2	1	B	4	680	0	0	0	9,08
2	1	B	5	681	0	0	3	8,34
2	1	B	6	682	1	0	1	5,8
2	1	B	7	683	1	0	1	7,23
2	1	B	8	684	3	0	6	8,18
2	1	B	9	685	2	0	1	6,3
2	1	B	10	686	0	0	0	8,81
2	1	B	11	687	1	0	1	8,02
2	1	B	12	688	0	0	1	7,62
2	1	B	13	689	2	0	0	8,47
2	1	B	14	690	0	0	0	6,1
2	1	B	15	691	2	0	2	6,85
2	1	B	16	692	0	0	0	7,73
2	1	B	17	693	2	0	0	5,65
2	1	B	18	694	1	0	0	8,97
2	1	B	19	695	1	0	0	8,5
2	1	B	20	696	1	0	5	8,5
2	1	B	21	697	0	0	0	6,63
2	1	B	22	698	1	0	3	11,75
2	1	B	23	699	0	0	0	7,8
2	1	B	24	700	2	0	4	6,99
2	1	B	25	701	1	0	0	8,24
2	1	B	26	702	1	0	0	7,58

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
2	1	B	27	703	2	0	4	8,96
2	1	B	28	704	0	0	0	7,17
2	1	B	29	705	0	0	0	7,8
2	1	B	30	706	0	0	2	8,99
2	1	B	31	707	1	0	1	7,82
2	1	B	32	708	2	0	0	8,87
2	1	B	33	709	2	0	3	6,2
2	1	B	34	710	0	0	0	7,33
2	1	B	35	711	0	0	0	6,62
2	1	B	36	712	0	0	0	9,09
2	1	B	37	713	0	0	0	6,07
2	1	B	38	714	0	0	1	8,25
2	1	B	39	715	0	0	0	8,29
2	1	B	40	716	0	0	0	7,03
2	1	B	41	717	1	0	0	6,84
2	1	B	42	718	0	0	0	8,48
2	1	B	43	719	0	0	0	8,76
2	1	B	44	720	1	0	0	8,3
2	1	B	45	721	1	0	0	6,9
2	1	B	46	722	0	0	0	6,3
2	1	B	47	723	1	0	3	11,12
2	1	B	48	724	2	0	2	8,08
2	1	B	49	725	0	0	0	6,47
2	1	B	50	726	0	0	0	7,86
2	1	B	51	727	0	0	0	8,25
2	1	B	52	728	2	0	0	6,95
2	2	A	1	729	1	0	0	6,33
2	2	A	2	730	2	0	1	7,17
2	2	A	3	731	3	0	0	9,65
2	2	A	4	732	3	0	0	6,53
2	2	A	5	733	1	0	0	7,14
2	2	A	6	734	2	0	1	6,7
2	2	A	7	735	3	0	0	9,08
2	2	A	8	736	0	0	0	6,38
2	2	A	9	737	2	0	0	9,86
2	2	A	10	738	2	0	0	7,94
2	2	A	11	739	3	0	2	9,26
2	2	A	12	740	1	0	0	10,44
2	2	A	13	741	0	0	0	7,6
2	2	A	14	742	1	0	1	6,44
2	2	A	15	743	0	0	0	11,13
2	2	A	16	744	3	0	2	7,36
2	2	A	17	745	2	0	1	8,55
2	2	A	18	746	0	0	0	7,37

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
2	2	A	19	747	3	0	1	8,92
2	2	A	20	748	1	0	1	7,82
2	2	A	21	749	0	0	0	8,08
2	2	A	22	750	2	0	2	9,07
2	2	A	23	751	1	0	1	9,3
2	2	A	24	752	1	0	1	7,5
2	2	A	25	753	0	0	0	6,58
2	2	A	26	754	2	0	2	9,26
2	2	A	27	755	3	0	0	9,6
2	2	A	28	756	2	0	2	8,81
2	2	A	29	757	2	0	1	9,5
2	2	A	30	758	2	0	0	7,52
2	2	A	31	759	2	0	1	7,1
2	2	A	32	760	0	0	1	8,54
2	2	A	33	761	2	0	4	7,82
2	2	A	34	762	3	0	4	9,67
2	2	A	35	763	1	0	0	8,27
2	2	A	36	764	0	0	0	8,17
2	2	A	37	765	0	0	0	9,68
2	2	A	38	766	0	0	0	10,28
2	2	A	39	767	2	0	2	9,17
2	2	A	40	768	0	0	1	9,27
2	2	A	41	769	0	0	0	8,85
2	2	A	42	770	0	0	2	6,96
2	2	A	43	771	1	0	0	9,1
2	2	A	44	772	1	0	0	8,81
2	2	A	45	773	0	0	4	6,2
2	2	A	46	774	0	0	0	7,23
2	2	A	47	775	3	0	2	7,6
2	2	A	48	776	1	0	1	8,71
2	2	A	49	777	0	0	0	7,77
2	2	A	50	778	0	0	0	8,02
2	2	A	51	779	0	0	0	7,96
2	2	A	52	780	2	0	4	8,07
2	2	B	1	781	2	0	2	6,08
2	2	B	2	782	3	0	1	6,93
2	2	B	3	783	3	0	2	8,14
2	2	B	4	784	1	0	0	5,75
2	2	B	5	785	1	0	0	6,8
2	2	B	6	786	1	0	0	8,36
2	2	B	7	787	1	0	0	6,92
2	2	B	8	788	2	0	1	8,65
2	2	B	9	789	1	0	3	6,75
2	2	B	10	790	2	0	3	7,28

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
2	2	B	11	791	1	0	0	8,46
2	2	B	12	792	2	0	1	9,2
2	2	B	13	793	1	0	0	6,21
2	2	B	14	794	2	0	0	10,88
2	2	B	15	795	0	0	2	9,97
2	2	B	16	796	1	0	0	7,5
2	2	B	17	797	2	0	3	9
2	2	B	18	798	1	0	0	4,67
2	2	B	19	799	2	0	5	9,4
2	2	B	20	800	0	0	0	6,97
2	2	B	21	801	1	0	2	11,91
2	2	B	22	802	3	0	1	7,31
2	2	B	23	803	2	0	3	10,86
2	2	B	24	804	3	0	1	8,2
2	2	B	25	805	2	0	0	8,5
2	2	B	26	806	2	0	0	7,72
2	2	B	27	807	3	0	3	9,54
2	2	B	28	808	1	0	0	7,3
2	2	B	29	809	2	0	2	7,2
2	2	B	30	810	2	0	1	10,38
2	2	B	31	811	1	0	2	9,91
2	2	B	32	812	1	0	0	9,45
2	2	B	33	813	2	0	2	6,57
2	2	B	34	814	0	0	0	6,81
2	2	B	35	815	3	0	5	7,81
2	2	B	36	816	3	0	2	12,4
2	2	B	37	817	3	0	1	7,57
2	2	B	38	818	0	0	0	7,72
2	2	B	39	819	3	0	3	9,73
2	2	B	40	820	2	0	2	9,61
2	2	B	41	821	1	0	0	9,36
2	2	B	42	822	0	0	0	7,74
2	2	B	43	823	2	0	1	9,73
2	2	B	44	824	1	0	0	9,22
2	2	B	45	825	2	0	3	7,06
2	2	B	46	826	3	0	1	7,52
2	2	B	47	827	3	0	0	6,5
2	2	B	48	828	1	0	0	6,35
2	2	B	49	829	0	0	1	7,05
2	2	B	50	830	1	0	0	7,68
2	2	B	51	831	0	0	0	8,4
2	2	B	52	832	0	0	0	7,23
2	3	A	1	833	0	0	2	9,38
2	3	A	2	834	1	0	0	8,47

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
2	3	A	3	835	1	0	1	9,5
2	3	A	4	836	1	0	0	11,1
2	3	A	5	837	1	0	0	9,3
2	3	A	6	838	1	0	0	7,42
2	3	A	7	839	0	0	0	6,71
2	3	A	8	840	3	0	0	7,47
2	3	A	9	841	3	0	0	9,15
2	3	A	10	842	3	0	0	8,9
2	3	A	11	843	0	0	2	9,7
2	3	A	12	844	0	0	0	6,41
2	3	A	13	845	0	0	3	6,5
2	3	A	14	846	0	0	0	6,25
2	3	A	15	847	0	0	0	7,72
2	3	A	16	848	1	0	4	9,48
2	3	A	17	849	3	0	1	7,37
2	3	A	18	850	0	0	0	7,18
2	3	A	19	851	0	0	0	7,5
2	3	A	20	852	1	0	2	7,38
2	3	A	21	853	1	0	0	7,4
2	3	A	22	854	2	0	1	8,47
2	3	A	23	855	0	0	0	7,11
2	3	A	24	856	2	0	1	8,83
2	3	A	25	857	0	0	0	9,62
2	3	A	26	858	3	0	6	9,28
2	3	A	27	859	0	0	0	7,38
2	3	A	28	860	0	0	0	8,1
2	3	A	29	861	3	0	1	7,68
2	3	A	30	862	2	0	1	7,86
2	3	A	31	863	0	0	0	8,71
2	3	A	32	864	1	0	0	10
2	3	A	33	865	0	0	0	7,62
2	3	A	34	866	3	0	2	8,99
2	3	A	35	867	2	0	0	10,84
2	3	A	36	868	2	0	1	9,2
2	3	A	37	869	3	0	3	8,33
2	3	A	38	870	0	0	0	7,7
2	3	A	39	871	2	0	1	8,6
2	3	A	40	872	0	0	0	8,66
2	3	A	41	873	1	0	0	10,2
2	3	A	42	874	3	0	1	9,86
2	3	A	43	875	2	0	0	10,46
2	3	A	44	876	3	0	0	10,54
2	3	A	45	877	2	0	0	8,38
2	3	A	46	878	2	0	0	9,91

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
2	3	A	47	879	3	0	0	7,55
2	3	A	48	880	0	0	0	6,82
2	3	A	49	881	1	0	0	9,05
2	3	A	50	882	0	0	0	11,4
2	3	A	51	883	0	0	0	6,92
2	3	A	52	884	0	0	0	7,3
2	3	B	1	885	0	0	0	9,92
2	3	B	2	886	1	0	2	9,95
2	3	B	3	887	1	0	0	11,11
2	3	B	4	888	2	0	0	10,52
2	3	B	5	889	1	0	0	6,06
2	3	B	6	890	0	0	0	7,14
2	3	B	7	891	2	0	1	7,46
2	3	B	8	892	0	0	0	10,13
2	3	B	9	893	0	0	3	10,42
2	3	B	10	894	0	0	0	9,93
2	3	B	11	895	2	0	2	10,7
2	3	B	12	896	0	0	0	9,94
2	3	B	13	897	2	0	0	8,28
2	3	B	14	898	0	0	0	10,66
2	3	B	15	899	3	0	2	9,14
2	3	B	16	900	2	0	1	10,34
2	3	B	17	901	2	0	0	7,77
2	3	B	18	902	2	0	0	7,2
2	3	B	19	903	1	0	0	8,27
2	3	B	20	904	1	0	0	4,96
2	3	B	21	905	0	0	0	7,9
2	3	B	22	906	3	0	1	9,84
2	3	B	23	907	3	0	4	6,43
2	3	B	24	908	1	0	0	7,95
2	3	B	25	909	1	0	0	9,37
2	3	B	26	910	0	0	0	10,77
2	3	B	27	911	3	0	3	9,13
2	3	B	28	912	1	0	0	8,65
2	3	B	29	913	1	0	0	10,58
2	3	B	30	914	3	0	2	8,74
2	3	B	31	915	2	0	1	7,23
2	3	B	32	916	1	0	0	6,86
2	3	B	33	917	0	0	0	7,76
2	3	B	34	918	1	0	0	8,62
2	3	B	35	919	0	0	0	7,3
2	3	B	36	920	0	0	0	7,63
2	3	B	37	921	2	0	5	9,45
2	3	B	38	922	0	0	0	10,26

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
2	3	B	39	923	2	0	1	7,96
2	3	B	40	924	1	0	0	11,16
2	3	B	41	925	0	0	0	10,54
2	3	B	42	926	0	0	1	8,7
2	3	B	43	927	2	0	0	7,76
2	3	B	44	928	0	0	3	7,41
2	3	B	45	929	1	0	0	7,74
2	3	B	46	930	0	0	2	12,49
2	3	B	47	931	1	0	0	7,52
2	3	B	48	932	0	0	0	10,41
2	3	B	49	933	0	0	0	6,94
2	3	B	50	934	1	0	0	8,64
2	3	B	51	935	0	0	0	8,53
2	3	B	52	936	0	0	0	10,04
2	4	A	1	937	1	0	0	7,53
2	4	A	2	938	1	0	0	7,16
2	4	A	3	939	3	0	2	8,38
2	4	A	4	940	2	0	1	7,77
2	4	A	5	941	1	0	0	9,54
2	4	A	6	942	2	0	0	8,31
2	4	A	7	943	2	0	1	8,7
2	4	A	8	944	3	0	3	8,88
2	4	A	9	945	0	0	0	8,3
2	4	A	10	946	2	0	4	9,42
2	4	A	11	947	3	0	1	8,34
2	4	A	12	948	2	0	0	9,23
2	4	A	13	949	2	0	2	7,9
2	4	A	14	950	2	0	0	8,1
2	4	A	15	951	0	0	0	7,33
2	4	A	16	952	2	0	3	8,67
2	4	A	17	953	1	0	0	7,87
2	4	A	18	954	2	0	1	8,11
2	4	A	19	955	2	0	0	5,83
2	4	A	20	956	0	0	0	5,73
2	4	A	21	957	3	0	3	7,28
2	4	A	22	958	3	0	2	6,52
2	4	A	23	959	3	0	0	8,78
2	4	A	24	960	0	0	0	7,66
2	4	A	25	961	0	0	0	7,81
2	4	A	26	962	3	0	2	8,5
2	4	A	27	963	1	0	0	7,82
2	4	A	28	964	2	0	0	5,61
2	4	A	29	965	1	0	0	8,17
2	4	A	30	966	2	0	0	7,74

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
2	4	A	31	967	1	0	0	6,08
2	4	A	32	968	3	0	2	8,55
2	4	A	33	969	2	0	0	9,31
2	4	A	34	970	2	0	3	9,3
2	4	A	35	971	2	0	0	7,83
2	4	A	36	972	1	0	0	6,7
2	4	A	37	973	3	0	1	9,23
2	4	A	38	974	0	0	0	6,58
2	4	A	39	975	1	0	5	9,9
2	4	A	40	976	2	0	2	8,6
2	4	A	41	977	1	0	0	9
2	4	A	42	978	2	0	3	7,9
2	4	A	43	979	0	0	0	7,16
2	4	A	44	980	1	0	3	7,91
2	4	A	45	981	0	0	0	6,66
2	4	A	46	982	2	0	4	7,96
2	4	A	47	983	2	0	1	5,71
2	4	A	48	984	2	0	4	8,53
2	4	A	49	985	0	0	0	8,18
2	4	A	50	986	1	0	0	7,27
2	4	A	51	987	2	0	4	9,41
2	4	A	52	988	3	0	2	7,11
2	4	B	1	989	4	0	0	8,67
2	4	B	2	990	2	0	0	6,95
2	4	B	3	991	1	0	0	6,72
2	4	B	4	992	2	0	2	8,33
2	4	B	5	993	3	0	4	8,65
2	4	B	6	994	0	0	0	7,61
2	4	B	7	995	0	0	4	8,62
2	4	B	8	996	1	0	2	7,32
2	4	B	9	997	1	0	1	7,56
2	4	B	10	998	1	0	1	7,58
2	4	B	11	999	2	0	1	6,81
2	4	B	12	1000	3	0	1	10,32
2	4	B	13	1001	1	0	2	7,98
2	4	B	14	1002	2	0	0	9,56
2	4	B	15	1003	2	0	0	7,66
2	4	B	16	1004	1	0	0	5,17
2	4	B	17	1005	3	0	3	6,6
2	4	B	18	1006	2	0	0	8,58
2	4	B	19	1007	0	0	2	8,28
2	4	B	20	1008	2	0	2	8,5
2	4	B	21	1009	0	0	0	6,16
2	4	B	22	1010	1	0	0	6,8

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
2	4	B	23	1011	1	0	0	8,42
2	4	B	24	1012	3	0	1	7,9
2	4	B	25	1013	2	0	1	8,99
2	4	B	26	1014	1	0	5	9,75
2	4	B	27	1015	4	0	2	7,7
2	4	B	28	1016	2	0	1	6,95
2	4	B	29	1017	1	0	0	8,5
2	4	B	30	1018	0	0	0	8,07
2	4	B	31	1019	2	0	5	9,1
2	4	B	32	1020	2	0	3	8,7
2	4	B	33	1021	2	0	3	6,85
2	4	B	34	1022	2	0	0	7,26
2	4	B	35	1023	2	0	2	8,37
2	4	B	36	1024	2	0	3	8,74
2	4	B	37	1025	1	0	0	8,88
2	4	B	38	1026	1	0	0	6,1
2	4	B	39	1027	0	0	0	7,97
2	4	B	40	1028	3	0	2	9,4
2	4	B	41	1029	0	0	0	7,6
2	4	B	42	1030	2	0	0	7,56
2	4	B	43	1031	2	0	2	10,5
2	4	B	44	1032	0	0	0	8,27
2	4	B	45	1033	4	0	2	7,11
2	4	B	46	1034	0	0	0	7,43
2	4	B	47	1035	3	0	3	8,45
2	4	B	48	1036	0	0	0	6,99
2	4	B	49	1037	0	0	0	9,61
2	4	B	50	1038	0	0	0	8,9
2	4	B	51	1039	1	0	4	8,58
2	4	B	52	1040	3	0	1	9,1
2	5	A	1	1041	2	0	0	9
2	5	A	2	1042	1	0	1	10,34
2	5	A	3	1043	2	0	0	10,63
2	5	A	4	1044	1	0	6	10,5
2	5	A	5	1045	2	0	1	7,82
2	5	A	6	1046	0	0	0	9,6
2	5	A	7	1047	0	0	0	7,73
2	5	A	8	1048	0	0	0	8,76
2	5	A	9	1049	0	0	0	8,34
2	5	A	10	1050	1	0	3	8,3
2	5	A	11	1051	0	0	0	9,68
2	5	A	12	1052	2	0	1	8,98
2	5	A	13	1053	1	0	1	10,36
2	5	A	14	1054	1	0	0	9,53

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
2	5	A	15	1055	2	0	2	9,92
2	5	A	16	1056	0	0	0	7,7
2	5	A	17	1057	0	0	0	11,37
2	5	A	18	1058	1	0	2	8,54
2	5	A	19	1059	1	0	1	8,86
2	5	A	20	1060	1	0	1	7,95
2	5	A	21	1061	0	0	0	8,73
2	5	A	22	1062	1	0	2	9,86
2	5	A	23	1063	1	0	0	10,72
2	5	A	24	1064	2	0	4	9,68
2	5	A	25	1065	0	0	0	7,08
2	5	A	26	1066	1	0	1	9,35
2	5	A	27	1067	0	0	1	8,41
2	5	A	28	1068	0	0	0	9,4
2	5	A	29	1069	1	0	0	8,17
2	5	A	30	1070	1	0	0	7,15
2	5	A	31	1071	0	0	0	8,07
2	5	A	32	1072	1	0	1	7,5
2	5	A	33	1073	0	0	0	8,8
2	5	A	34	1074	2	0	2	9,3
2	5	A	35	1075	1	0	0	5,73
2	5	A	36	1076	0	0	0	9,31
2	5	A	37	1077	1	0	3	10,78
2	5	A	38	1078	1	0	2	9,67
2	5	A	39	1079	1	0	1	9,26
2	5	A	40	1080	1	0	1	10,05
2	5	A	41	1081	0	0	0	5,52
2	5	A	42	1082	2	0	2	6,44
2	5	A	43	1083	0	0	0	9,35
2	5	A	44	1084	1	0	0	7,33
2	5	A	45	1085	0	0	0	5,84
2	5	A	46	1086	1	0	2	9,1
2	5	A	47	1087	1	0	0	9,41
2	5	A	48	1088	1	0	4	8,7
2	5	A	49	1089	0	0	0	9,38
2	5	A	50	1090	1	0	0	8,94
2	5	A	51	1091	1	0	0	6,4
2	5	A	52	1092	1	0	0	7,72
2	5	B	1	1093	0	0	2	8,36
2	5	B	2	1094	0	0	0	9,85
2	5	B	3	1095	2	0	0	8,6
2	5	B	4	1096	0	0	0	8,65
2	5	B	5	1097	0	0	0	8,44
2	5	B	6	1098	1	0	1	9,65

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
2	5	B	7	1099	1	0	0	6,11
2	5	B	8	1100	0	0	0	9,67
2	5	B	9	1101	1	0	1	9,2
2	5	B	10	1102	2	0	0	10,97
2	5	B	11	1103	2	0	5	11,76
2	5	B	12	1104	0	0	0	6,4
2	5	B	13	1105	0	0	0	10,74
2	5	B	14	1106	0	0	1	10,01
2	5	B	15	1107	0	0	0	6,28
2	5	B	16	1108	2	0	2	11,63
2	5	B	17	1109	1	0	0	6,91
2	5	B	18	1110	2	0	2	7,76
2	5	B	19	1111	2	0	0	9,42
2	5	B	20	1112	3	0	2	9,18
2	5	B	21	1113	1	0	0	8,9
2	5	B	22	1114	1	0	0	11,11
2	5	B	23	1115	2	0	1	7,38
2	5	B	24	1116	1	0	1	9,46
2	5	B	25	1117	1	0	2	8,3
2	5	B	26	1118	2	0	1	8,51
2	5	B	27	1119	1	0	0	9,7
2	5	B	28	1120	1	0	0	7,27
2	5	B	29	1121	2	0	1	8,73
2	5	B	30	1122	1	0	0	10,37
2	5	B	31	1123	2	0	0	8,14
2	5	B	32	1124	2	0	1	10,21
2	5	B	33	1125	2	0	2	9,9
2	5	B	34	1126	1	0	0	7,65
2	5	B	35	1127	0	0	0	9,16
2	5	B	36	1128	3	0	2	9,03
2	5	B	37	1129	2	0	0	8,99
2	5	B	38	1130	0	0	0	9,11
2	5	B	39	1131	0	0	2	8,1
2	5	B	40	1132	2	0	1	9,05
2	5	B	41	1133	0	0	0	9,84
2	5	B	42	1134	0	0	0	8,4
2	5	B	43	1135	1	0	4	9,45
2	5	B	44	1136	0	0	0	6,35
2	5	B	45	1137	2	0	3	8,45
2	5	B	46	1138	0	0	0	11,21
2	5	B	47	1139	2	0	2	8,2
2	5	B	48	1140	2	0	2	9,35
2	5	B	49	1141	2	0	0	9,92
2	5	B	50	1142	2	0	4	9,05

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
2	5	B	51	1143	1	0	0	6,03
2	5	B	52	1144	3	0	3	10,6
2	6	A	1	1145	2	0	1	7,4
2	6	A	2	1146	3	3	2	8,77
2	6	A	3	1147	3	0	2	12,28
2	6	A	4	1148	1	0	0	7,33
2	6	A	5	1149	1	1	0	9,56
2	6	A	6	1150	2	0	2	8,15
2	6	A	7	1151	2	0	0	9,8
2	6	A	8	1152	3	0	1	11,76
2	6	A	9	1153	2	1	1	8,26
2	6	A	10	1154	1	0	0	7,64
2	6	A	11	1155	3	0	0	9,82
2	6	A	12	1156	2	0	4	11,1
2	6	A	13	1157	2	0	2	8,82
2	6	A	14	1158	1	0	0	9,34
2	6	A	15	1159	1	0	0	9,67
2	6	A	16	1160	1	0	0	9,72
2	6	A	17	1161	2	0	0	9,85
2	6	A	18	1162	2	0	0	10,81
2	6	A	19	1163	1	0	0	9,51
2	6	A	20	1164	1	0	0	9,4
2	6	A	21	1165	2	0	0	9,36
2	6	A	22	1166	1	0	0	8,9
2	6	A	23	1167	3	0	3	9,55
2	6	A	24	1168	3	0	1	7,6
2	6	A	25	1169	0	0	0	6,03
2	6	A	26	1170	1	0	0	8,82
2	6	A	27	1171	1	0	0	8,64
2	6	A	28	1172	2	0	0	9,38
2	6	A	29	1173	1	0	0	8,71
2	6	A	30	1174	1	0	3	8,51
2	6	A	31	1175	0	0	0	4,75
2	6	A	32	1176	2	0	2	7,8
2	6	A	33	1177	2	0	0	5,8
2	6	A	34	1178	3	0	3	10,46
2	6	A	35	1179	0	0	0	7,62
2	6	A	36	1180	2	0	0	7,22
2	6	A	37	1181	3	0	4	9,38
2	6	A	38	1182	0	0	0	7,28
2	6	A	39	1183	3	0	3	10,38
2	6	A	40	1184	1	0	0	8,99
2	6	A	41	1185	3	0	2	8,78
2	6	A	42	1186	0	0	0	7,92

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
2	6	A	43	1187	1	0	0	9,6
2	6	A	44	1188	1	0	0	8,37
2	6	A	45	1189	3	0	1	8,6
2	6	A	46	1190	1	0	0	9,28
2	6	A	47	1191	3	0	1	8,98
2	6	A	48	1192	1	0	0	11,08
2	6	A	49	1193	4	0	1	7,76
2	6	A	50	1194	1	0	0	5,85
2	6	A	51	1195	3	0	3	8
2	6	A	52	1196	0	0	0	10,71
2	6	B	1	1197	1	0	0	11,13
2	6	B	2	1198	1	0	0	8,53
2	6	B	3	1199	1	0	1	11,6
2	6	B	4	1200	0	0	0	11,01
2	6	B	5	1201	1	0	0	7,76
2	6	B	6	1202	3	0	1	10,66
2	6	B	7	1203	0	0	0	9,47
2	6	B	8	1204	0	0	0	9,87
2	6	B	9	1205	0	0	0	9,92
2	6	B	10	1206	0	0	5	11,54
2	6	B	11	1207	1	0	0	10,48
2	6	B	12	1208	2	0	0	9,94
2	6	B	13	1209	2	0	2	11,8
2	6	B	14	1210	2	0	0	8,06
2	6	B	15	1211	3	0	0	6,85
2	6	B	16	1212	3	0	0	10,18
2	6	B	17	1213	2	0	3	8,78
2	6	B	18	1214	3	0	0	10,56
2	6	B	19	1215	2	0	0	8,77
2	6	B	20	1216	3	0	0	8,22
2	6	B	21	1217	1	0	0	7,63
2	6	B	22	1218	1	0	2	10,55
2	6	B	23	1219	0	0	0	10,01
2	6	B	24	1220	0	0	0	10,91
2	6	B	25	1221	3	0	4	10,78
2	6	B	26	1222	3	0	0	9,43
2	6	B	27	1223	3	0	0	10,6
2	6	B	28	1224	3	0	1	10,33
2	6	B	29	1225	0	0	0	10,2
2	6	B	30	1226	0	0	0	8,12
2	6	B	31	1227	1	0	0	8,83
2	6	B	32	1228	1	0	0	9,78
2	6	B	33	1229	2	0	3	7,83
2	6	B	34	1230	1	0	0	9,48

Réplica	Tratamiento	Sustrato	Nº individuo	Nº individuo global	Estadío callo	Nº raíces	Nº hojas	Long esqueje (cm)
2	6	B	35	1231	0	0	0	9,32
2	6	B	36	1232	2	0	0	7,78
2	6	B	37	1233	0	0	0	7,2
2	6	B	38	1234	3	0	3	9,1
2	6	B	39	1235	3	0	0	10,5
2	6	B	40	1236	0	0	0	8,33
2	6	B	41	1237	1	0	0	8,09
2	6	B	42	1238	1	0	0	8,75
2	6	B	43	1239	2	0	0	9,62
2	6	B	44	1240	1	0	4	11,8
2	6	B	45	1241	0	0	0	9,38
2	6	B	46	1242	1	0	0	5,44
2	6	B	47	1243	3	0	0	8,84
2	6	B	48	1244	0	0	0	9,44
2	6	B	49	1245	1	0	0	8,6
2	6	B	50	1246	1	0	0	7,71
2	6	B	51	1247	2	0	0	7,74
2	6	B	52	1248	1	0	0	8,55



AGRADECIMIENTOS

A José Manuel Pérez Pérez, por haberme permitido realizar este trabajo en su laboratorio bajo su atenta dirección, y por encontrar siempre algún hueco en su ajetreada agenda para ayudarme y resolver mis dudas.

A María Salud Justamante, por su inestimable ayuda y dedicación en este trabajo, por haberme hecho sentir muy cómodo en el laboratorio, enseñándome siempre cómo trabajar correctamente en él, y por darme tantos consejos. Sin ella este trabajo no habría sido lo mismo.

A José Manuel Pérez, María Salud Justamante, María Ángeles Fernández y Aurora Alaguero por hacerme sentir como uno más en el laboratorio y hacerme muy amenas muchas comidas fuera del laboratorio.

A mi familia y amigos, por estar siempre ahí apoyándome y por todos los momentos vividos y por vivir.

