

UNIVERSIDAD DE CORDOBA

**Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos
y de Montes**

Departamento de Agronomía

TESIS DOCTORAL

**INDUCCION FLORAL Y LATENCIA DE LAS
YEMAS DEL OLIVO (*Olea europaea* L.)**

Doctorando:

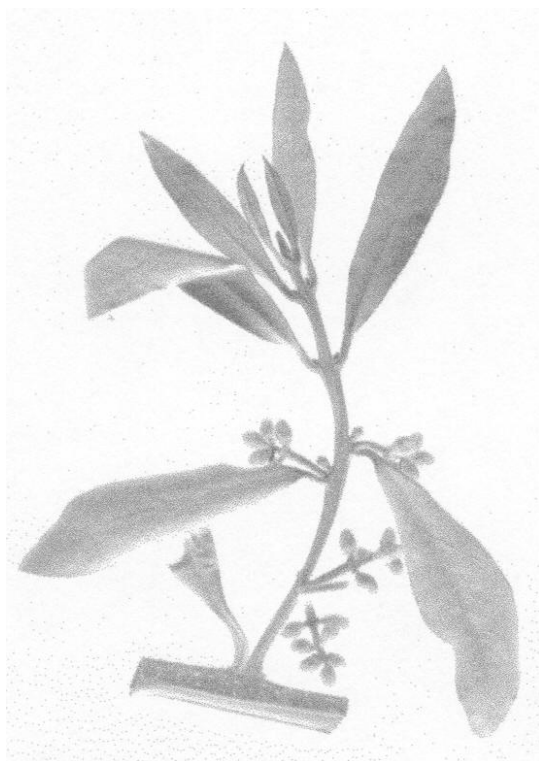
António Maria dos Santos Ramos

Directores:

**Luis Rallo Romero
Hava Rapoport**

Córdoba, 2000

"Toda a verdade se torna falsa
no momento em que nos
contentamos com ela"
(Jones)



Em memória dos meus pais,
António e Teodora



À minha esposa,
Helena
E aos meus filhos,
Pedro Gonçalo,
Ana Catarina
e João Rafael

AGRADECIMIENTOS

- Al Conselho Científico de la Escola Superior Agrária de Castelo Branco, por la aprobación de mi plan de trabajo y de mi dispensa de servicio docente, para la realización de la Tesis Doctoral.
- Al Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba, por aceptarme en su programa de estudios de tercer ciclo.
- Al Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC), por facilitarme los medios necesarios para la realización de mis observaciones microcópicas.
- Al Departamento de Olivicultura del CIFA, por facilitarme el acceso al olivar y a algunas instalaciones (cámara y invernadero).
- A mis directores Luis Rallo Romero y Hava Rapoport por la dirección de mi Tesis, por el apoyo y orientación en la organización del plan de trabajo y de las metodologías experimentales, así como por el rigor y exigencia puestos en la discusión de los resultados, organizando mis ideas a la hora de la escritura y corrección de mi Tesis. Además, les agradezco por brindarme su amistad.
- A mis compañeros de la ESACB, particularmente a Paula Simões y Manuel Silva, por ocuparse de mis clases durante mi ausencia.
- A mis compañeros doctorandos portugueses, António Cordeiro y Fernando Antunes, por haber compartido conmigo sus problemas, alegrías y amistad, en una palabra, siendo mi "familia" en Córdoba.
- A los Profesores Carlos Portas y Rogério de Castro, por su incentivo y al Profesor Shimon Lavee, por su apoyo y sugerencias en la realización de mis primeros ensayos.
- A todos los compañeros y compañeras del departamento de Agronomía, del laboratorio del IAS y del departamento de Olivicultura del CIFA, profesores, becarios, alumnos y funcionarios, por la amistad, presencia y cuantas pequeñas y grandes ayudas me prestaren a lo largo de todo este tiempo.
- A todos mis compañeros y compañeras de la "mesa de la ONU", por toda la convivencia que nos ayudó mutuamente a no sentir tan profundamente la soledad.
- A Marcos, mi "hermano" brasileño y a Anjgelina, mi "hermana" albanesa.
- A mi familia, por el cariño, por la comprensión y por estar siempre presente.

RESUMEN

La presente Tesis profundiza en el papel de la acumulación de frío invernal sobre los procesos de inducción floral y latencia de las yemas del olivo y su relación con los factores que condicionan la expresión de su naturaleza reproductora.

Utilizando estaquillas de 'Manzanillo de Sevilla' con 3 nudos, muestreadas en árboles con alta (ON) o escasa (OFF) producción, se ha podido determinar que: a) la carga del árbol el año previo determina el nivel máximo de la floración de retorno; b) las yemas de los árboles OFF, que manifiestan desde el verano un fenómeno de paralatencia, entran progresivamente en endolatenencia durante el otoño; durante la salida del reposo (eliminación de la endolatenencia) que ocurre en Córdoba desde la primera mitad de enero hasta la primera mitad de febrero, se solapa la endo- y la paralatencia; c) las yemas de los árboles ON no entran en endolatenencia y quedan inhibidas por la hoja adyacente (paralatencia) durante el periodo invernal, no necesitando acumular frío para brotar; d) el establecimiento de la endolatenencia (en otoño) y la completa satisfacción de las necesidades de frío para eliminar la endolatenencia son factores críticos para la expresión de la naturaleza reproductora de las yemas de los árboles OFF; e) a la salida del reposo, las yemas de los árboles OFF y ON presentan un patrón de desarrollo morfológico distinto, que configura un proceso de diferenciación de las inflorescencias y no de inducción floral y f) durante la salida del reposo, el desarrollo reproductor de las yemas necesita condiciones muy estrictas para expresarse, por lo que las temperaturas altas y la defoliación desde el establecimiento de la latencia hasta la completa satisfacción de las necesidades en frío para la salida del reposo y la oscuridad durante el proceso morfogénico de diferenciación de las inflorescencias interfieren en la capacidad de las yemas de los árboles OFF para expresar su naturaleza reproductora, induciendo latencia secundaria o crecimiento vegetativo.

INDICE GENERAL

	Página
Agradecimientos	IV
Resumen	V
Indice General	VI
Indice de Tablas	IX
Indice de Figuras	X
I - Introducción	1
II - Revisión Bibliográfica	4
1. Inducción floral	5
1.1. El meristemo apical	6
1.2. Inducción – Iniciación – Diferenciación	8
1.3. Regulación de la inducción floral	9
1.3.1. Regulación ambiental	10
1.3.2. Regulación hormonal	12
1.3.3. Regulación nutricional	14
1.3.4. Regulación multifactorial	15
2. Latencia de las yemas	17
2.1. Concepto de latencia	17
2.2. Latencia <i>versus</i> morfogénesis	18
2.3. Formación de la yema	19
2.4. Endolatenia y aclimatación al frío	21
2.5. Eliminación de la endolatenia	24
2.6. Promoción de la brotación	25
2.7. Crecimiento	26

3. Latencia y diferenciación floral	28
III - Parte Experimental	31
1. Caracterización de las yemas axilares del olivo durante el verano y el otoño	32
1.1. Material y métodos	34
1.1.1. Preparación y sección de las yemas	36
1.1.2. Tinción de las yemas	38
1.1.3. Observaciones efectuadas	39
1.2. Resultados	41
1.2.1. Crecimiento de los ramos	41
1.2.2. Número de nudos	42
1.2.3. Dimensiones de las yemas	43
1.2.4. Observaciones de almidón	46
1.3. Discusión	47
2. Establecimiento y eliminación de la endolencia en yemas de olivo	50
2.1. Material y métodos	51
2.1.1. Preparación de las estaquillas	51
2.1.2. Tratamientos	52
2.2. Resultados	54
2.3. Discusión	56
3. Efecto de las condiciones de forzado y de la carga del árbol sobre la pauta de la brotación de yemas según la acumulación de frío invernal .	58
3.1. Material y métodos	60
3.2. Resultados	63
3.2.1. Brotación	63
3.2.2. Observaciones anatómicas	68
3.2.2.1. Estatus de las yemas en campo	68
3.2.2.2. Desarrollo en condiciones de forzado	68
3.2.3. Observaciones de almidón	73
3.2.3.1. Estatus de las yemas en campo	73
3.2.3.2. Evolución en condiciones de forzado	73

3.3. Discusión	77
4. Influencia de la defoliación, oscuridad y duración del almacenamiento a 5°C y de las condiciones de forzado sobre la pauta de brotación de las yemas según la acumulación de frío invernal	80
4.1. Material y métodos	81
4.2. Resultados	83
4.2.1. Brotación	83
4.2.2. Observaciones de almidón	92
4.3. Discusión	95
5. Influencia de la oscuridad en la salida del reposo	98
5.1. Material y métodos	99
5.2. Resultados	100
5.3. Discusión	103
 IV - Discusión General	 104
 V - Referencias Bibliográficas	 114

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.1 - Composición (expresa en %) de las soluciones de deshidratación (Johansen, 1940)	38
Tabla 3.1 – Semanas entre la fecha del muestreo y la brotación vegetativa o reproductora en 1997 de las primeras yemas de las estacas forzadas a 12,5°C	66
Tabla 4.1 - Fechas del muestreo y duración del almacenamiento a 5°C	82
Tabla 5.1 - Fechas de inicio y duración del periodo de sombreamiento	99

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 – Ramo del año, ilustrando las posiciones distal y proximal de las que se toman las yemas	35
Figura 1.2 – Detalle de la toma de un nudo seleccionado para fijar	36
Figura 1.3 – Detalle de los cortes efectuados en la preparación de las yemas de un nudo fijado	37
Figura 1.4 – Representación esquemática de una yema, ilustrando las medidas tomadas (basado en De la Rosa <i>et al.</i> , 2000)	40
Figura 1.5 – Variación del número de nudos, de la longitud y de la longitud media del entrenudo de los ramos de árboles en descarga (OFF) y en carga (ON) de junio a diciembre de 1996	41
Figura 1.6 - Porcentajes de yemas formadas por cuatro o cinco nudos, según el mes del muestreo, la posición en el ramo y la carga del árbol en 1996	42
Figura 1.7 – Medias y errores estándar de las anchuras de las yemas de árboles en descarga y en carga en 1996, en posición proximal y distal del ramo	44
Figura 1.8 – Medias y errores estándar de las longitudes de las yemas de árboles en descarga y en carga en 1996, en posición proximal y distal del ramo	45
Figura 1.9 - Corte longitudinal central de la parte distal de las yemas y de la parte central de la porción de muestra adyacente a la yema de árboles OFF y ON en 1996 (Tinción de IIK)	46
Figura 2.1 – Preparación de las estaquillas	52
Figura 2.2 – Brotación total (círculos) y reproductora (triángulos) en 1995/96	54
Figura 2.3 - Brotación total (círculos) y reproductora (triángulos) en 1996/97	55
Figura 3.1 – Brotación total y reproductora en estaquillas con hojas y defoliadas de árboles sin frutos (OFF) en 1996, cuando se forzaron por tiempo variable a 12,5°C, durante 4 semanas a 20°C y durante 2 semanas a 30°C	64
Figura 3.2 – Brotación total y reproductora en estaquillas con hojas y defoliadas de árboles con frutos (ON) en 1996, cuando se forzaron por tiempo variable a 12,5°C, durante 4 semanas a 20°C y durante 2 semanas a 30°C	65
Figura 3.3 – Brotación total y reproductora en estaquillas con hojas y defoliadas de árboles sin frutos (OFF) en 1997, cuando se forzaron durante 4 semanas a 15°C y a 20°C y durante 2 semanas a 30°C	67
Figura 3.4 - Corte longitudinal central de la parte distal de las yemas el 9 de enero y el 7 de	

febrero de 1997 de los árboles OFF y ON en 1996 (Tinción: Azul de Toluidina)	69
Figura 3.5 - Corte longitudinal central de la parte distal de las yemas muestreadas el 9 de enero y forzadas durante 3 días a 20°C y durante 9 días a 30°C de los árboles OFF y ON en 1996 (Tinción: Azul de Toluidina)	70
Figura 3.6 - Corte longitudinal central de las yemas muestreadas en campo el 9 de enero y forzadas en diferentes condiciones (Tinción: Azul de Toluidina)	71
Figura 3.7 - Corte longitudinal central de la parte distal de las yemas antes del reposo y a la salida del reposo (Tinción: Azul de Toluidina)	72
Figura 3.8 - Corte longitudinal central de la parte distal de las yemas el 9 de enero y el 7 de febrero de 1997 de los árboles OFF y ON en 1996 (Tinción de IIK)	74
Figura 3.9 - Corte longitudinal central de la parte distal de las yemas muestreadas el 9 de enero de 1997 de árboles OFF y ON en 1996 y forzadas durante 9 días a 12,5°C y a 30°C (Tinción de IIK)	75
Figura 3.10 - Parte central de la porción de muestra adyacente a la yema en el corte longitudinal central de las yemas muestreadas el 9 de enero de 1997 de árboles OFF y ON en 1996 y forzadas durante 9 días a 12,5° y a 30° (Tinción de IIK)	76
Figura 4.1 – Brotación total y reproductora de las yemas de árboles OFF en 1997, forzadas a 15°C durante 4 semanas y a 30°C durante 2 semanas, con hojas o defoliadas	84
Figura 4.2 - Brotación total y reproductora en condiciones de forzado a 15°C durante 4 semanas, con acumulación de frío natural y con frío artificial complementario, en estaquillas con hojas almacenadas con luz y en oscuridad muestreadas desde octubre hasta febrero	85
Figura 4.3 - Brotación total y reproductora de las yemas de árboles OFF en 1997, muestreadas en campo el 8 de octubre de 1997 y almacenadas durante diferentes periodos a 5°C (con luz y en la oscuridad) y forzadas a 15 durante 4 semanas y a 30°C durante 2 semanas.....	87
Figura 4.4 - Brotación total y reproductora de las yemas de árboles OFF en 1997, muestreadas en campo el 5 de noviembre de 1997 y almacenadas durante diferentes periodos a 5°C (con luz y en la oscuridad) y forzadas a 15 durante 4 semanas y a 30°C durante 2 semanas	88
Figura 4.5 - Brotación total y reproductora de las yemas de árboles OFF en 1997, muestreadas en campo el 3 de diciembre de 1997 y almacenadas durante diferentes periodos a 5°C (con luz y en la oscuridad) y forzadas a 15 durante 4 semanas y a 30°C durante 2 semanas	89
Figura 4.6 - Brotación total y reproductora de las yemas de árboles OFF en 1997, muestreadas en campo el 7 de enero de 1998 y almacenadas durante diferentes periodos a 5°C (con luz y en la oscuridad) y forzadas a 15 durante 4 semanas y a 30°C durante 2 semanas	90
Figura 4.7 - Brotación total y reproductora de las yemas de árboles OFF en 1997, muestreadas en campo el 5 de febrero de 1998 y almacenadas durante diferentes periodos a 5°C (con luz y en la oscuridad) y forzadas a 15 durante 4 semanas y a 30°C durante 2 semanas	91
Figura 4.8 - Corte longitudinal central de la parte distal de yemas de árboles OFF en 1997, muestreadas el 3 de diciembre y almacenadas a 5°C durante 12 semanas (Tinción de IIK)	93

Figura 4.9 - Parte central de la porción de muestra contigua a la base de la yema en el corte longitudinal central de las yemas de árboles OFF en 1997, muestreadas el 3 de diciembre y almacenadas a 5°C durante 12 semanas (Tinción de IIK)	94
Figura 5.1 – Brotación total y reproductora de las yemas de árboles OFF en 1997 con 3 años de edad, cultivadas en macetas y mantenidas en las condiciones del umbráculo o tras periodos de duración variable del tratamiento de obscuridad desde el 27 de noviembre de 1997	100
Figura 5.2 – Brotación total y reproductora de las yemas de árboles OFF en 1997 con 3 años de edad, cultivadas en macetas y mantenidas en las condiciones del umbráculo o tras periodos de duración variable del tratamiento de oscuridad desde el 23 de diciembre de 1997	101
Figura 5.3 – Brotación total y reproductora de las yemas de árboles OFF en 1997 con 3 años de edad, cultivadas en macetas y mantenidas en las condiciones del umbráculo o tras 4 semanas del tratamiento de obscuridad, con inicio en diferentes fechas	102



I - INTRODUCCIÓN

La sucesión de años de elevadas cosechas (año de carga) y de otros de escasa o nula producción (año de descarga) es una característica típica del olivo conocida como alternancia o vecería. El desconocimiento hasta fecha reciente de las causas de la vecería ha implicado que “ninguna estrategia haya sido efectiva en el control de la alternancia del olivo” (Rallo, 1994).

En los últimos años se apunta hacia un papel relevante de la presencia del fruto en la inhibición de la inducción floral (Lavee *et al.*, 1986; Stutte y Martin, 1986b); Fernandez-Escobar *et al.*, 1992) como causa de vecería. La alternancia es fundamentalmente una sucesión de años de elevada y de escasa o nula floración (Vargas, 1993; Rallo *et al.*, 1994).

Las diferencias en floración entre árboles (nº de inflorescencias y nº de flores/inflorescencia) determinadas por la cosecha del año anterior suelen ser compensadas en los mismos durante el desarrollo de las inflorescencias y flores y durante el cuajado y crecimiento del fruto, es decir, una elevada floración va acompañada de un mayor aborto ovárico y menor cuajado y tamaño de frutos (Ait-Radi *et al.*, 1990; Vargas, 1993; Cuevas *et al.*, 1994; Rallo *et al.*, 1994). Sin embargo, estos mecanismos resultan insuficientes para regularizar las cosechas del olivo. Parece, pues, que el control de la vecería depende de la capacidad para modular la floración del árbol, es decir, la formación y desarrollo de las yemas florales.

Desde los estudios clásicos de King (1938), Almeida (1940) y de Hartmann y sus colaboradores (Hartmann, 1953; Hartmann y Porlingis, 1957; Hackett y Hartmann, 1963; 1964; 1967; Badr y Hartmann, 1971; Hartmann y Whisler, 1975) se consideraba que la inducción floral era dependiente de la temperatura y que el frío invernal tenía un papel inductor en la diferenciación floral del olivo (vernalización). Sin embargo, estudios más recientes (Rallo y Martin, 1991; Rallo *et al.*, 1994) ponen en duda ese supuesto y consideran que el frío invernal solamente tiene un papel en la salida del reposo (eliminación de la endolencia) de las yemas reproductoras.

La determinación de la época de la inducción floral desempeña un papel

fundamental en el establecimiento de las posibles causas de la alternancia en el olivo y, por consiguiente, en el desarrollo de prácticas culturales de corrección de la vecería (Fernandez-Escobar *et al.*, 1992).

Las alteraciones asociadas con la inducción floral en el olivo tienen lugar durante el verano anterior a partir de la fase de endurecimiento del endocarpo (Lavee *et al.*, 1986; Stutte y Martin, 1986b). Las giberelinas sintetizadas en las semillas estarían relacionadas con la inhibición de la inducción floral en los años de carga (Navarro *et al.*, 1990; Fernandez-Escobar *et al.*, 1992). Cambios morfológicos e histoquímicos supuestamente asociados con la iniciación floral han sido descritos en el periodo de mediados de octubre a mediados de noviembre (Pinney y Polito, 1990).

En la presente tesis se pretende estudiar de una forma más profunda el papel de la acumulación del frío invernal en los procesos de inducción-diferenciación florales y latencia de las yemas, considerando su relación con otros factores que puedan condicionar la expresión de la naturaleza reproductora de las yemas del olivo. Entre estos, merecen especial atención la carga del árbol en el año previo, la defoliación, la oscuridad y las temperaturas de forzado del crecimiento antes, durante y después del reposo invernal.



II - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Inducción floral

El desarrollo de las plantas ocurre después de la embriogenesis como resultado de la actividad de los meristemos, por reiteradas divisiones y subsecuente diferenciación de las células así producidas (Fosket, 1994), permitiendo a las plantas incrementar continuamente su tamaño con el tiempo (Huala y Sussex, 1993). El meristemo apical puede seguir dos programas de desarrollo básico (Taiz y Zeiger, 1991; Huala y Sussex, 1993; Meeks-Wagner, 1993; Fosket, 1994; Martínez-Zapater y Salinas, 1996): un programa **vegetativo**, durante el cual da origen a hojas, a entrenudos y a ramas laterales o yemas axilares y un programa **reproductor**, durante el cual se producen brácteas florales, inflorescencias y flores. La **transición floral**, cambio del programa de crecimiento vegetativo al programa de desarrollo reproductor, es el más dramático ejemplo de un cambio programado en el desarrollo de las plantas superiores (Fosket, 1994) y ocurre como resultado de la interacción entre mecanismos que determinan el estado de madurez de la planta y del meristemo apical y mecanismos que responden a las condiciones ambientales (Sussex, 1989).

Para que la transición floral pueda ocurrir, o sea, para que una planta pueda responder a un estímulo inductor, es necesario que tenga una cierta edad, tamaño y desarrollo. Este conjunto de características determina la adquisición de la capacidad para responder a un estímulo inductor (“ripeness to respond”) (Taiz y Zeiger, 1991; Salisbury y Ross, 1994), de modo que muchas veces ésta corresponde más al tamaño y desarrollo de las plantas que a la edad cronológica (Taiz y Zeiger, 1991). En plantas herbáceas anuales, el desarrollo reproductor viene a continuación del crecimiento vegetativo en respuesta a determinadas condiciones externas e internas. De este modo, la fase vegetativa termina con el desarrollo de la inflorescencia y la iniciación floral (Meeks-Wagner, 1993). En plantas perennes, es usual la existencia de una fase de duración variable, llamada juvenil, en que la planta solamente presenta crecimiento vegetativo. Ésta precede a la fase adulta, cuando la planta ya puede desarrollarse

reproductivamente (Taiz y Zeiger, 1991; Fosket, 1994; Salisbury y Ross, 1994). En la fase adulta, la planta puede producir estructuras vegetativas o reproductoras, aunque en momentos distintos. Es decir, un cierto crecimiento vegetativo adulto precede la formación de las estructuras reproductoras.

En las plantas leñosas, un ramo vegetativo se origina por la acción de un meristemo apical que diferencia entrenudos, hojas en posición lateral y yemas en la axila de las hojas. El mismo meristemo apical del brote se transforma, en general, en una yema apical al final del periodo de crecimiento. Parte de las yemas apicales y axilares, dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales, origina órganos reproductores, mientras otra parte desarrolla ramos vegetativos o no brota. En general, la brotación y el desarrollo de las yemas, principalmente las que van a dar origen a inflorescencias o flores aisladas, solo ocurre en el año siguiente al que se forman (después de un periodo más o menos prolongado de latencia), por lo que presentan cierta analogía con las plantas herbáceas bienales (Dennis Jr., 1987). Algunas de éstas permanecen durante el invierno bajo una forma de roseta, con entrenudos muy cortos, mientras otras resisten al invierno bajo estructuras de reserva especializadas (bulbos, tubérculos o rizomas) en los cuales se localizan las yemas.

1.1. El meristemo apical

El meristemo apical es un conjunto de pequeñas células isodiamétricas con capacidad de división celular localizadas en la extremidad de los ramos y yemas (Fosket, 1994). Según el mismo autor, los meristemas de las angiospermas tienen normalmente una apariencia altamente estratificada en la cual las capas más externas constituyen la **túnica**, envolviendo las restantes células del meristemo: el **corpus**; en las capas de células de la túnica, todas las divisiones son anticlinales, mientras en el corpus hay divisiones anticlinales y periclinales.

En el meristemo apical activo se distingue normalmente un patrón de organización que se superpone al determinado por túnica y corpus: es la **zonación** citohistológica (King, 1983; Fosket, 1994). En esta zonación pueden identificarse tres zonas con distinta actividad meristemática: a) **zona central** formada por un conjunto de

células relativamente grandes y de baja actividad meristemática en comparación con b) **zona periférica**, alrededor de la central, presentando células de pequeñas dimensiones y elevada actividad meristemática, a partir de la cual se desarrollan los primordios de las hojas y c) **zona subapical**, localizada por debajo de la zona central, responsable por la elongación del tallo. Cuando cesa o se ralentiza la actividad meristemática, como en la imposición de la latencia, solamente es posible identificar la organización túnica-carpus (Fosket, 1994).

Alternativamente a este modelo de zonación, Van der Schoot (1996) propone que el desarrollo vegetativo del meristemo apical es controlado por las células tipo-iniciales localizadas en la zona central, en un modelo que denomina de **estratificación**. En éste, las señales bioquímicas de control provenientes de las “iniciales” se transmiten a sus derivadas a través del *continuum* simplástico (plasmodesmos), en el cual un retículo endoplasmático, también continuo, asumiría un papel fundamental en la comunicación célula a célula. A medida que las células se alejan de la zona central, tras sucesivas divisiones, disminuye el control por las “iniciales”, aumenta su autonomía y se incrementa su actividad mitótica, dando origen a los primordios de las hojas.

Sea cual sea la forma de control del desarrollo en el meristemo apical, tanto el modelo de zonación como el de estratificación coinciden en señalar que durante el crecimiento vegetativo la zona central es la que presenta menor actividad de división y que los primordios de las hojas se originan a partir de la zona periférica del meristemo apical. Este aspecto asume particular importancia por el hecho de que la transición morfológica del desarrollo vegetativo al reproductor del meristemo apical está marcada por un aumento de la frecuencia de las divisiones celulares en la zona central (Herbert *et al.*, 1992; Fosket, 1994; Biju *et al.*, 1997), que adquiere una forma de domo o cúpula característica del programa reproductor, mientras es plano en la fase vegetativa (Martinez-Zapater y Salinas, 1996).

El meristemo reproductor mantiene la identidad de las capas de la túnica, aunque su número se pueda reducir a una sola (Milyaeva y Nikiforova, 1995), pero pierde la zonación citohistológica (Huala y Sussex, 1993). Además, la sincronización de la división celular y una restricción de la comunicación célula a célula parecen ocurrir como consecuencia de la inducción floral (Goodwin y Lyndon, 1983; Juarez *et al.*, 1995).

1.2. Inducción – Iniciación – Diferenciación

Se han utilizado diversas terminologías para caracterizar las fases del desarrollo reproductor. Según la terminología adoptada por el Diccionario de Ciencias Hortícolas (SECH, 1999), el desarrollo reproductor comprende tres fases:

- **Inducción (= determinación) floral:** proceso de cambio fisiológico interno en el meristemo apical de una yema, que determina su naturaleza floral. La inducción floral es previa a cualquier cambio morfológico en la yema.
- **Iniciación floral:** primera modificación morfológica o histoquímica discernible en el meristemo, que evidencia el cambio irreversible de la yema correspondiente a la condición floral.
- **Diferenciación floral:** proceso de cambio morfológico en una yema de flor caracterizado por la formación de la estructura floral.

En las plantas leñosas es difícil caracterizar el desarrollo del programa reproductor de acuerdo con la secuencia inducción-iniciación-diferenciación. Las yemas se forman durante la estación de crecimiento en las axilas de las hojas y al final de la misma en el ápice de los brotes. Según las especies y las condiciones del desarrollo, las yemas pueden seguir dos caminos: a) detener su actividad meristemática cuando se establece un periodo de latencia más o menos largo, permaneciendo como yema indiferenciada; b) iniciar el programa de desarrollo reproductor, con la diferenciación de inflorescencias y/o flores antes de la latencia. En estas plantas no se ha podido identificar la inducción floral. La “prueba” de que hubo inducción floral se obtiene cuando se observa la iniciación morfológica de las inflorescencias, sea en verano o en invierno. Como estas plantas no responden a un estímulo ambiental concreto, como por ejemplo el fotoperiodo, son consideradas plantas de día neutro (Bernier *et al.*, 1993).

En las plantas bienales, que crecen como rosetas durante la fase vegetativa, la transición del desarrollo vegetativo al reproductor va acompañada de un cambio en la longitud de los entrenudos, dando lugar a la formación de un brote floral, el cual se ha considerado clásicamente como un marcador de la iniciación floral (Martinez-Zapater y Salinas, 1996).

1.3. Regulación de la inducción floral

La mayoría de las plantas utiliza señales ambientales para regular la inducción floral por dos razones principales (Taiz y Zeiger, 1991; Bernier *et al.*, 1993):

- todos los individuos de la misma especie deben florecer sincronizadamente para garantizar la polinización;
- todas las especies deben completar su reproducción sexual bajo condiciones externas favorables.

Cualquier variable ambiental con cambios estacionales regulares representa un factor potencial de regulación de la inducción floral, siendo los más importantes el fotoperiodo, la temperatura y las disponibilidades hídricas (Bernier *et al.*, 1993). Las plantas llamadas “autónomas”, que no necesitan de un estímulo específico de fotoperiodo o temperatura para florecer (Taiz y Zeiger, 1991; Bernier *et al.*, 1993) suelen ser sensibles a la radiación (Bernier *et al.*, 1993).

El fotoperiodo y la radiación son percibidos por las hojas maduras; la temperatura es detectada por todas las partes de la planta, aunque las bajas temperaturas sean frecuentemente captadas directamente por el ápice; el déficit hídrico es normalmente percibido por el sistema radical (Bernier *et al.*, 1993). Según los mismos autores, hay fuertes interacciones entre los diferentes factores, por lo que cada uno de ellos puede afectar al intervalo en que los otros son efectivos. De este modo, las plantas pueden utilizar oportunamente factores críticos diferentes para cada ambiente particular en el cual se desarrollan.

Hay tres hipótesis fisiológicas para explicar la inducción floral (Bernier *et al.*, 1993; Martínez-Zapater y Salinas, 1996):

- la hipótesis del **florigeno/antiflorígeno** en la cual el promotor y el inhibidor de la inducción floral son cada uno una hormona simple, sencilla y universal, que sigue sin ser aislada e identificada;
- la hipótesis **nutricional** (“nutrient diversion”) en la cual la inducción floral modificaría las relaciones fuente-sumidero dentro de la planta, de forma que el ápice recibiría un mayor suplemento de asimilados, cuando se dan condiciones inductoras;

- la hipótesis del **control multifactorial** en la cual varios compuestos químicos (asimilados y hormonas conocidas) participan en la inducción floral. La variación genética o las condiciones en que ha ocurrido u ocurre el desarrollo pueden determinar que alguno de los factores implicados en la inducción floral se convierta en un factor limitante en algunas especies o bajo determinadas condiciones ambientales.

1.3.1. Regulación ambiental

El **fotoperiodo** es uno de los factores ambientales más importantes en el control del desarrollo y de la inducción floral en muchas plantas (Fosket, 1994). La evidencia de que el fotoperiodo, percibido por las hojas maduras, conduce a la producción de un estímulo floral transmisible al ápice ha resultado de los experimentos con injertos (Taiz y Zieger, 1991; Bernier *et al.*, 1993). La generalidad de las plantas leñosas, sin embargo, son de día neutro respecto a la determinación fotoperiódica de la inducción floral.

Las plantas pueden tener requerimientos cualitativos (absolutos) o cuantitativos (facultativos) de bajas temperaturas (**vernalización**) para la inducción floral. Las plantas con requerimientos cualitativos o absolutos dependen de un periodo mínimo de frío para florecer, mientras las plantas con requerimientos cuantitativos o facultativos aumentan o aceleran la floración con exposición a las bajas temperaturas, pero acaban siempre por florecer, incluso sin bajas temperaturas (Salisbury y Ross, 1994).

Entre las plantas que presentan habitualmente requerimientos de frío para florecer están las plantas anuales de siembra invernal, como los principales cereales, que son en general cuantitativas, es decir, retrasan o disminuyen la floración si las temperaturas no bajan lo suficiente (Salisbury y Ross, 1994; Metzger, 1996). Otro grupo importante de plantas que requieren frío para florecer son las bienales. En este caso, las necesidades son en general cualitativas, es decir, solamente producen un brote floral, en su segundo año, cuando las temperaturas son suficientemente bajas durante un periodo de tiempo suficiente (Salisbury y Ross, 1994; Metzger, 1996).

Algunas plantas necesitan días largos después del periodo de frío para promover

la floración, a veces de forma absoluta, mientras otras son neutrales después de las bajas temperaturas (Tomita, 1990; Taiz y Zeiger, 1991; Nimura *et al.*, 1994; Salisbury y Ross, 1994; Gianquinto, 1997). De esta forma, parece que la vernalización y el fotoperiodo actúan como vías alternativas respecto a la floración (Taiz y Zeiger, 1991; Bagnall, 1993), contribuyendo a la sincronización del desarrollo reproductor en las plantas sembradas en diferentes fechas (Miglietta *et al.*, 1993).

Las yemas de las plantas leñosas tienen un comportamiento parecido a las plantas bienales (Dennis Jr., 1987). En caso de que ocurra la inducción floral, originan brotación reproductora en el segundo año. En las caducifolias, que presentan yemas florales ya diferenciadas antes del invierno, la floración ocurre muy tempranamente, pero solamente después que las yemas hayan acumulado una cantidad suficiente de frío (variable según las especies o los cultivares) para la eliminación de la endolencia, lo que permite la brotación reproductora en condiciones favorables. En otras leñosas, las yemas se mantienen indiferenciadas hasta el invierno y el frío invernal suele ser considerado como un factor necesario para promover la floración (García-Luis *et al.*, 1992; 1994; 1995b; Chaikiattiyos *et al.*, 1994; Núñez-Elisea y Davenport, 1994; 1995).

Un **estrés hídrico** moderado, que afecta más la expansión celular que la división celular (Sánchez-Díaz y Aguirreolea, 1996), puede regular el balance entre la actividad reproductora y vegetativa (Tombesi *et al.*, 1986), siendo en muchas plantas un factor esencial en el control de la formación de flores (Ghadekar *et al.*, 1993). Sin embargo, su efecto parece relacionarse más con la inhibición del crecimiento vegetativo (Chaikiattiyos *et al.*, 1994; Drinnan y Menzel, 1994; Núñez-Elisea y Davenport, 1994), con la promoción de la brotación de yemas florales ya diferenciadas (Núñez-Elisea y Davenport, 1994; Sánchez-Díaz y Aguirreolea, 1996), con la sincronización de la antesis después de la rehidratación de las yemas florales (Drinnan y Menzel, 1994) y con el desarrollo floral (Nakagima *et al.*, 1993) que con la determinación de la naturaleza reproductora de la yema.

1.3.2. Regulación hormonal

A pesar de que hasta ahora no se ha podido aislar e identificar el florígeno y el antiflorígeno, la intervención de una o varias hormonas en la regulación de la inducción floral ha podido ser probada en múltiples experimentos con injertos entre plantas inducidas y no inducidas realizadas en los años 30, en particular por Chailakhyan y sus colaboradores (revisiones de Chailakhyan, 1968; 1986 y Zeevaart, 1976).

La comprobación de que el estímulo floral era producido en las hojas y translocado a los ápices, de que podía ser transmitido por injerto a las plantas no inducidas y de que las condiciones inductivas podían ser substituidas por su aplicación exógena eran los requisitos necesarios para considerar que ese estímulo fuese de naturaleza hormonal (Salisbury y Ross, 1994). Sin embargo, la naturaleza química e incluso la misma existencia del florígeno continua siendo especulativa (Fosket, 1994; Salisbury y Ross, 1994).

Durante algunos años, se ha considerado que las **giberelinas** podían satisfacer los requisitos del florígeno dado su efecto en la substitución del estímulo promotor por los días largos o por las bajas temperaturas en muchas plantas bienales o en coníferas (Lang, 1957; Purvis, 1961; Pharis y King, 1985; Orvos *et al.*, 1989; Taiz y Zeiger, 1991; Salisbury y Ross, 1994; Talón, 1996). Sin embargo, su efecto inhibitor de la floración en las angiospermas leñosas y en los frutales o cuando se aplican a yemas cultivadas *in vitro* (Guardiola *et al.*, 1982; Scorza, 1982; Yamdagni y Khangia, 1989; Li *et al.*, 1994; Basconsuelo *et al.*, 1995; He *et al.*, 1995; Oosthuyse, 1995; Talón, 1996) no ha permitido que esta hormona pudiera ser considerada la “hormona universal de la inducción floral” (florígeno). Además, parece que en las plantas en roseta la formación de las flores y la elongación del tallo son dos procesos separados (Zeevaart, 1976; Evans *et al.*, 1990; 1994) y las giberelinas solo promueven la elongación del tallo y no la formación de las flores (Wallensiek, 1985; Demeulemeester *et al.*, 1995; Evans y Blundell, 1996).

La morfogénesis *in vitro* ha puesto en evidencia un papel fundamental de las **citoquininas** en la formación y desarrollo de yemas florales y/o inflorescencias (Srinivasan y Mullins, 1978; Jullien y Wyndaele, 1992; Duan y Yazawa, 1995; Galoch *et al.*, 1996; Harada y Murai, 1998). A pesar de la evidencia de que el transporte de las

citoquininas a los ápices se relacionan con los eventos normalmente asociados a la inducción floral (Bernier y Kinet, 1986; Lejeune *et al.*, 1994), su papel no parece determinante en la inducción floral, ya que su aplicación exógena en condiciones no inductoras no promueve la floración (Bernier y Kinet, 1986; Li y Deng, 1992; Bernier *et al.*, 1993), en ciertas condiciones inductoras los niveles endógenos de las citoquininas pueden bajar drásticamente (Bernier y Kinet, 1986; Roberts *et al.*, 1991) y la estimulación de la actividad mitótica y de la síntesis del ADN pueda observarse incluso antes de cualquier movimiento del estímulo floral desde las hojas (Jacqmard *et al.*, 1993). El estímulo de división celular requerido por la inducción floral puede ser el papel de las citoquininas en ese proceso (Kinet *et al.*, 1993; Machackova *et al.*, 1993).

A pesar de la evidencia de un papel regulador de las hormonas en la floración, no queda claro si en realidad las hormonas pueden, *per se*, determinar la inducción floral (cambio en la naturaleza de la yema) o simplemente regular o condicionar el desarrollo de un meristemo previamente determinado. Según Trewavas (1986), el control de la morfogénesis es más una propiedad del sistema que responde a las hormonas que de éstas *per se*, cuyo papel parece ser más regulador de los flujos de nutrientes que controlador de la morfogénesis. Son numerosas las evidencias de un papel regulador de las hormonas en la expresión de la naturaleza reproductora de los meristemas después de la inducción floral, es decir, en la iniciación morfológica y en el desarrollo floral, particularmente en la determinación sexual de las flores (Gargiulo, 1968; Moore, 1970; Lilov y Temenuschka, 1976; Bonnet-Masimbert *et al.*, 1988; Shawky *et al.*, 1998; Olf *et al.*, 1989; Singh (1989); Dickens y Van Staden, 1990; Figueras *et al.*, 1990; Chen, 1991; Roberts *et al.*, 1991; Santoni *et al.*, 1991; Zhang y Yan, 1991; Harkess *et al.*, 1992; Kumar y Bhaft, 1992; Li y Deng, 1992; Marchetti *et al.*, 1992; Ahire *et al.*, 1994; Aribaud y Martin-Tanguy, 1994a; 1994b; Bangerth y Schroder, 1994; Caffaro y Vicente, 1994; Caffaro *et al.*, 1994; Daoudi *et al.*, 1994; Ali y Lovatt, 1995; Tarengi y Martin-Tanguy, 1995; Martin-Tanguy, 1997).

1.3.3. Regulación nutricional

El fracaso en el aislamiento del florígeno llevó al escepticismo sobre su existencia (Salisbury y Ross, 1994). En su lugar, se ha propuesto que el estímulo fotoperiódico provoca una redistribución de los asimilados dentro de la planta, conduciendo a la inducción floral (Sachs, 1978; Sachs y Hackett, 1983). Sin embargo, no ha sido posible determinar si el aumento de los azúcares solubles en el meristemo apical en las plantas expuestas a fotoperiodos inductivos son la causa o la consecuencia de la inducción floral (Bernier, 1988).

Un desequilibrio en la relación C/N ha sido muchas veces señalado como un factor de regulación del desarrollo floral, estando los niveles altos en nitrógeno (C/N baja) asociados con el crecimiento vegetativo y los niveles altos de hidratos de carbono (C/N alta) asociados con el desarrollo reproductor (El-Shamy *et al.*, 1990; Ishioka *et al.*, 1991; Rideout *et al.*, 1992; Kubota y Yoneda, 1993; Duan y Yazawa, 1995; Hume *et al.*, 1995).

Los hidratos de carbono, particularmente la sacarosa, se encuentran entre los primeros compuestos que llegan a los meristemos apicales después del tratamiento inductor (Houssa *et al.*, 1991; King y Evans, 1991; Lejeune *et al.*, 1991; 1993; Bernier *et al.*, 1993; Perilleux y Bernier, 1997). Sin embargo, hay varios tratamientos que pueden provocar aumentos del nivel de azúcares solubles en los meristemos sin que el desarrollo floral ocurra (Taiz y Zeiger, 1991; Bernier *et al.*, 1993). De esta forma, los hidratos de carbono parecen necesarios para el desarrollo floral ulterior a la inducción floral, pero no determinantes de su ocurrencia (Houssa *et al.*, 1991; McDaniel *et al.*, 1991; Bernier *et al.*, 1993; García-Luis *et al.*, 1995a; 1995b).

Se ha relacionado también la falta o el agotamiento de las reservas con el comportamiento alternante de ciertas plantas, en particular los frutales (Goldschmidt y Golomb, 1982; Cartechini y Tombesi, 1986; Howie y Lloyd, 1989; Candolfi-Vasconcelos y Koblet, 1990; Reddy y Singh, 1990; Lauri y Lespinase, 1993; Lespinase y Delort, 1993; 1994; Van der Walt *et al.*, 1993; Chaikiattiyos *et al.*, 1994; Weinbaum *et al.*, 1994; Snowball, AM; Kandušer, 1997; Nzima *et al.*, 1997). En dos mutantes de *Arabidopsis*, uno deficiente (no produce) y otro con exceso (no hidroliza) de almidón, se demora la floración debido a una deficiencia común: la incapacidad para movilizar el

almidón (Bernier *et al.*, 1993). Sin embargo, esta deficiencia parece condicionar solamente el desarrollo floral, no determinando la inducción floral, ya que la floración acaba siempre por ocurrir.

1.3.4. Regulación multifactorial

La ausencia de respuesta a señales fotoperiódicas concretas y el papel de ciertos factores exógenos (temperatura y estrés hídrico, *per se* o en interacción con el fotoperiodo) y endógenos (hormonales y nutricionales) en la modulación del desarrollo floral más que en la determinación de la naturaleza de la yema evidencia la complejidad del proceso de inducción floral y refuerza la hipótesis de una regulación multifactorial.

La obtención de plantas mutantes y transgénicas y las nuevas técnicas de análisis genética y molecular han renovado el interés por el estudio de la inducción floral, en especial sobre la expresión génica en el meristemo apical (Melzer *et al.*, 1990; Zagotta *et al.*, 1992; Meeks-Wagner, 1993; Shannon y Meeks-Wagner, 1993; Chung *et al.*, 1994; Hensel *et al.*, 1994; Jofuku *et al.*, 1994; Ma, 1994; Miura y Worland, 1994; Eimert *et al.*, 1995; Haughn *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1995; Mandel y Yanofsky, 1995; Martínez-Zapater *et al.*, 1995; Weigel y Nilsson, 1995; Wilkinson y Haughn, 1995; Allen y Sussex, 1996; Zagotta *et al.*, 1996; Bonhomme *et al.*, 1997; Mizukami y Ma, 1997; Ruiz-García *et al.*, 1997; Sundas-Larsson *et al.*, 1998).

En *Arabidopsis* se ha trabajado con un mutante (*emf*) que no pasa por la fase de roseta vegetativa y produce inflorescencias inmediatamente tras de la germinación. Para explicar este comportamiento, Sung *et al.* (1992) han propuesto que la reproducción es el programa de desarrollo por defecto del meristemo apical a no ser que el programa vegetativo sea activado a la germinación (ya que se trata de una planta anual). Una vez que el programa vegetativo se inicia, su destino (permanecer vegetativo o cambiar a reproductor) parece controlado por varios conjuntos de genes y sus correspondientes vías de regulación (Bernier *et al.*, 1993; Meeks-Wagner, 1993), sensibles al ambiente (Lee *et al.*, 1993; Meeks-Wagner, 1993).

Martínez-Zapater y Salinas (1996) proponen un modelo de regulación para las plantas del tipo autónomo (aquellas que florecen cuando la planta ha adquirido un cierto

desarrollo vegetativo para sustentar los frutos y las semillas) y para las plantas dependientes de las condiciones ambientales (fotoperiodo o bajas temperaturas) para florecer. En estas últimas, la forma en la cual los genes interactúan con las condiciones ambientales son múltiples y configuran un modelo multifactorial de regulación de la inducción floral.

De acuerdo con este modelo, hay diversas vías genéticas de regulación de la inducción floral que actúan como mecanismos de activación o de inhibición. Las plantas con mecanismos de activación muy fuertes y de inhibición débiles tienen un comportamiento autónomo. Las plantas con mecanismos de inhibición fuertes o de activación débiles presentan requerimientos ambientales para florecer, en las primeras con herencia dominante y en las últimas con herencia recesiva.

2. Latencia de las yemas

Los cambios cíclicos del clima originan periodos favorables al crecimiento separados por otros de crecimiento ralentizado o, incluso, ausente (Villiers, 1975). El éxito de una especie en un determinado *habitat* depende no solamente de su resistencia a condiciones climáticas adversas, sino también de su capacidad para sincronizar sus ciclos de crecimiento y reproducción con los cambios estacionales (Villiers, 1975; Kobayashi, 1987; Leopold, 1996), evitar o aprovechar condiciones ambientales erráticas y explotar otros organismos en la dispersión de las semillas (Leopold, 1996).

De este modo, el desarrollo de la latencia es no solo la función reguladora del desarrollo más dramática sino también la de más capacidad adaptativa para la supervivencia de las plantas (Villiers, 1975; Leopold, 1996). Esta capacidad para suspender todo el crecimiento, **incluso en ausencia de factores limitantes**, es, además de un espectacular tipo de control, una impresionante forma de adaptación (Leopold, 1996).

2.1. Concepto de latencia

Para Seeley (1994), la gran divergencia sobre las terminologías utilizadas para describir la latencia es sintomática del estado del conocimiento sobre este tema, que él considera una “caja negra”. Ello muestra que la primera dificultad en la comprensión global de la latencia se refiere al concepto de latencia.

En un intento para uniformizar la terminología sobre la latencia, Lang (1987) ha definido **latencia** (“dormancy”) como: “la suspensión temporal del crecimiento visible de cualquier estructura de una planta conteniendo un meristemo”. Para distinguir entre los diferentes tipos de latencia, este autor propuso los términos **paralatenia** (“paradormancy”), **ecolatenia** (“ecodormancy”) y **endolatenia** (“endodormancy”),

que define como:

- **paralatencia**: inducción específica de la latencia originada por una estructura distinta de la estructura afectada;
- **ecolatencia**: limitación del crecimiento asociada con factores ambientales desfavorables;
- **endolatencia**: inducción específica de la latencia dentro de la propia estructura afectada.

Los términos para-, eco- y endolatencia serían equivalentes, respectivamente, a los términos **inhibición correlativa** (“correlative inhibition”), **quiescencia** (“quiescence”) y **reposito** (“rest”) en una de las clasificaciones anteriores más utilizadas en yemas (Chouard, 1956, cit. Dennis Jr., 1996).

Los fisiólogos que trabajan con semillas son los más críticos en adoptar esta terminología, porque consideran que las semillas que no germinan por falta de hidratación y que solamente necesitan ser hidratadas para germinar están en un estado “no latente” (Dennis Jr., 1996). Sin embargo, este autor considera que esto es solamente una cuestión semántica, porque las semillas no latentes pueden considerarse en ecolatencia: no germinan por falta de un factor ambiental: agua.

Además, la inhibición del desarrollo del embrión impuesta por el tegumento o por otras partes de la semilla también se pueden clasificar como casos de paralatencia, si se considera la latencia del embrión en lugar de la latencia de la semilla (Dennis Jr., 1996). Con independencia de las cuestiones de terminología, en su estudio comparativo entre latencia de semillas y de yemas, este autor concluye que la latencia de yemas y semillas son fenómenos similares pero no idénticos.

2.2. Latencia versus morfogénesis

El desarrollo de las plantas resulta de la actividad de los meristemos (morfogénesis). Según Van der Schoot (1996), la cuestión: ¿qué es la latencia? es similar a la cuestión: ¿qué es la morfogénesis?. En la **morfogénesis** se denota “organización del desarrollo” y en la **latencia** su “suspensión temporal”. De este modo,

la morfogénesis y la latencia pueden ser modelados como dos estados alternativos de un sistema fisiológico semi-autónomo y dinámicamente organizado (el meristemo apical), siendo la latencia su fase estacionaria (Van der Schoot, 1996).

Además, para el mismo autor, el estado latente puede ser caracterizado separadamente de la forma como es inducido: eco-, para- y endolatenia son similares en el sentido de que son fases estacionarias en el desarrollo del meristemo apical. Los mecanismos por los cuales estos estados son inducidos deben ser estudiados en relación con el contexto en el cual funcionan: supervivencia de la planta o optimización de la estructura de la planta. Solamente la intensidad de la latencia es diferente (Van der Schoot, 1996):

- en ecolatenia, la remoción de los factores ambientales limitantes es suficiente para retomar la actividad morfogenética;
- en paralatenia, es suficiente un cambio en la jerarquía de los meristemos para que sea posible la morfogénesis;
- en endolatenia, es necesario un periodo de tiempo asociado con la progresión estacional de las condiciones ambientales, para que la actividad morfogenética sea retomada.

2.3. Formación de la yema

La separación de los diversos tipos de latencia impuesta por la terminología es reduccionista para el estudio de la latencia: la mera formación de la yema es evidencia del establecimiento de la latencia (Crabbé y Barnola, 1996). La formación de la yema es el resultado de un proceso que conduce a la supresión del crecimiento, determinada no solo por una restricción de la expansión celular sino también por una compleja secuencia de efectos correlativos que originan **heteroblastia**, o sea, desarrollo modificado de los primordios foliares, lo que implica un tipo específico de desarrollo básico (Crabbé y Barnola, 1996).

La interacción de factores endógenos y exógenos cuya eficacia depende del equilibrio entre el estado de desarrollo del tejido y el ambiente parece determinar, pues, un cambio en el patrón del desarrollo (Smart, 1996) que se manifiesta por una

morfogénesis modificada de los primórdios foliares (heteroblastia), caracterizada por una reducción generalizada de la expansión celular (elongación de los entrenudos y expansión foliar) que conduce a la formación de una yema (Crabbé y Barnola, 1996). Según los mismos autores, cualquier factor limitante de cada uno de los subprocesos: división celular, elongación de los entrenudos y expansión foliar, puede inhibir globalmente el crecimiento, sin necesidad de un factor interno o externo específico.

La relación entre la formación de la yema y la inducción de la latencia ya había sido propuesta por Villiers (1975). Para este autor, la disminución de la duración del día sería la señal ambiental inductora del desarrollo de la latencia en el meristemo apical, dando lugar a la producción de estructuras protectoras (escamas) y una intensa preparación para el estado de reposo invernal y también para la nueva época de crecimiento primaveral. Después de la recepción del estímulo adecuado, la elongación de los entrenudos (proceso de expansión celular) quedaría inhibida, pero la división celular y la morfogénesis continúan, produciéndose primordios de hojas o de flores (inflorescencias) que quedarán encerradas dentro de la yema. Cuando las condiciones que inhiben el crecimiento persisten, se detiene la propia organogénesis y todas las células del meristemo dejan de dividirse (Villiers, 1975; Cottignies 1986; Bigras, 1996).

En los árboles, la formación de las yemas puede ser muy temprana, incluso mucho antes del acortamiento de la duración del día. En los brotes en crecimiento activo, las yemas axilares no se desarrollan debido a la dominancia apical o a la inhibición por las hojas y pueden quedar gradualmente endolantes con el tiempo (Champagnat, 1983; Powell, 1987; Balandier *et al.*, 1993; Salisbury y Ross, 1994).

En las yemas, si bien la respuesta más común de las células al ABA (ácido abscísico) es la inhibición del crecimiento (Salisbury y Ross, 1994) y cualquier factor de estrés puede ser inhibidor del crecimiento como primer paso para la formación de la yema y el establecimiento de la latencia (Powell, 1987; Salisbury y Ross, 1994; Bigras, 1996), la parada del crecimiento y la formación de las yemas ocurren incluso en la ausencia de condiciones de estrés.

El hecho de que la aplicación directa de ABA detenga o ralentice el crecimiento pero no conlleve la formación de las escamas características de la yema latente, que el efecto de los días cortos en el desarrollo de la latencia no provoque un incremento en los niveles del ABA en la yema (Salisbury y Ross, 1994), que los niveles endógenos del

ABA no se correlacionen con la latencia de las yemas (Barros y Neill, 1989) y que los niveles del ABA en la yema no se relacionan con las necesidades en frío (Pongsomboon *et al.*, 1990) son aspectos que también sugieren que el ABA no es un factor inductor de latencia. Sin embargo, el ABA parece ser fundamental para inhibir el crecimiento y la brotación prematura, para promover la acumulación de reservas y para la defensa contra los estreses (Kuzina y Kalinina, 1993; Salisbury y Ross, 1994).

Powell (1987) considera que la disminución de los niveles de los promotores, más que el incremento del ABA, puede ser el factor primario de la parada del crecimiento y de la entrada en latencia. El efecto inhibitorio del ABA podría deberse, de este modo, solamente a un reducido potencial de crecimiento. Como la yema se forma en cuanto termina la elongación de los entrenudos (Villiers, 1975; Crabbé y Barnola, 1996) y como el principal efecto fisiológico de las giberelinas es la elongación de los entrenudos (Fosket, 1994; Talón, 1996), es posible que la reducción del potencial de crecimiento determinada por la inhibición de la síntesis de giberelinas sea un paso fundamental en el proceso de transición crecimiento-latencia.

2.4. Endolatenia y aclimatación al frío

Posiblemente por influencia de los estudios de la latencia en semillas y del desarrollo de modelos de predicción de la floración en frutales leñosos, se ha prestado más atención a la búsqueda de factores de inducción y eliminación de la **endolatenia**. Para algunos autores, incluso, solo la endolatenia es la “verdadera” latencia (Powell, 1987). Aunque este autor señale que la suspensión del crecimiento de los ramos y la inducción de la endolatenia son dos procesos separados, en climas más rigurosos (posiblemente porque las plantas tienen que adaptarse a condiciones más extremas con mucho más rapidez) la suspensión del crecimiento, la aclimatación al frío (endurecimiento) y la imposición de la endolatenia son inducidas por la reducción del fotoperiodo y ocurren casi simultáneamente en las coníferas, por lo que es difícil asociar cada cambio bioquímico a un proceso fisiológico dado (Bigras, 1996).

En este caso, el proceso de aclimatación al frío (resistencia a las bajas temperaturas) pasa por dos fases: a) en la primera, la planta es receptiva a la señal de los

días cortos (Fuchigami y Nee, 1987; Bigras, 1996; MacDonald, 1996) o del estrés hídrico (MacDonald, 1996) y las yemas pueden estar en paralatencia y/o ecolatencia; b) en la segunda, la bajada de la temperatura determina la entrada en endolatencia (Fuchigami y Nee, 1987; Bigras, 1996; MacDonald, 1996). Por efecto de las bajas temperaturas, las plantas empiezan a aclimatarse a temperaturas congelantes (“freezing”) y a la desecación, pudiendo sobrevivir a periodos prolongados de almacenamiento y desarrollando una endolatencia profunda (Fuchigami y Nee, 1987).

La búsqueda de mecanismos específicos de inducción, mantenimiento y eliminación de la endolatencia en base a los niveles o equilibrios hormonales fué el principal objetivo de los estudios de la latencia durante muchos años en la llamada “escuela clásica” (Dennis Jr., 1994). En contraposición, la “escuela francesa” (Dennis Jr., 1994) considera la endolatencia como el último estado de una cadena de inhibiciones correlativas que comienzan con la dominancia apical y van gradualmente extendiéndose a los tejidos inmediatamente subyacentes al meristemo, quedando, finalmente, bajo el control endógeno del meristemo (Champagnat y Côme, 1986).

Cualquier factor limitante de cada uno de los subprocesos: división celular, elongación de los entrenudos y expansión foliar, puede inhibir globalmente el crecimiento, sin necesidad de un factor interno o externo específico (Crabbé y Barnola, 1996) y la persistencia de condiciones desfavorables al crecimiento, la dominancia apical y la inhibición por las hojas pueden ser suficientes para que las yemas queden gradualmente endolantes con el tiempo (Powell, 1987; Balandier *et al.*, 1993; Salisbury y Ross, 1994). De esta forma, parece que el comportamiento de las yemas de las plantas leñosas se ajusta más al modelo de la “escuela francesa” que al de la “escuela clásica”.

El ABA parece tener un papel muy importante en la aclimatación al frío o, por lo menos, en la defensa contra el estrés térmico. En efecto, Lang (1994) ha intentado establecer un puente entre los diferentes factores que influyen en la endolatencia y las diferentes técnicas utilizadas para su estudio. En su revisión, este autor presenta un vasto conjunto de experimentos fisiológicos y moleculares que muestran que muchas de las respuestas inducibles por el ABA están involucradas en las respuestas de las plantas a uno o varios **estreses osmóticos**, tales como los que ocurren en las tolerancias a la sequía, a la salinidad, a la desecación, al frío y al calor.

Hoy día, hay considerable evidencia experimental que sugiere que los niveles del ABA aumentan no solo en condiciones de falta de agua, sino también en suelos salinos, frío intenso con temperaturas congelantes e, incluso, bajo temperaturas elevadas e inundación (Fosket, 1994; Kusina y Kalinina, 1994; Salisbury y Ross, 1994; Rock y Zeevaart, 1996; Sánchez-Díaz y Aguirreolea, 1996; Tudela y Tadeo, 1996). En la práctica totalidad de los ejemplos, la deficiencia “real” es la deficiencia de agua en el protoplasto: la falta de agua actúa por pérdida de turgescencia, activando los genes que controlan la síntesis del ABA (Salisbury y Ross, 1994).

Un caso muy interesante en la respuesta de las plantas a los estreses son las proteínas *lea* (“late embryogenesis abundance”), también llamadas dehidrinas (Walker-Simmons y Goldmark, 1996), que permiten sugerir una conexión molecular directa entre las tolerancias a la congelación y a la desecación y la aclimatación al frío, procesos que coinciden frecuentemente con la endolencia en tejidos perennes (Lang, 1994). Las proteínas *lea*, las glicoproteínas y otras proteínas, cuyos correspondientes genes sintetizadores son activados por el ABA o los diferentes estreses, son ricas en glicina, hidrófilas y estables en el calor (algunas pueden permanecer solubles en agua hirviendo) y una de sus funciones puede ser una modificación de las interacciones termodinámicas entre las moléculas y el agua, por exclusión de solutos o ligamiento (“binding”) directo (Lang, 1994; Tudela y Tadeo, 1996; Walker-Simmons y Goldmark, 1996). De este modo, pueden dar estabilidad a las membranas y a las macromoléculas, como las proteínas y los ácidos nucleicos, durante la desecación, previniendo la desnaturalización o inhibiendo la formación de cristales de hielo a temperaturas congelantes (Lang, 1994; Rock y Zeevaart, 1996; Tudela y Tadeo, 1996; Wisniewski *et al.*, 1996).

La conexión molecular directa entre las tolerancias a la congelación y a la desecación y la aclimatación al frío (Lang, 1994) y el hecho de que la deficiencia “real” en los diferentes tipos de estrés sea la deficiencia de agua en el protoplasto (Salisbury y Ross, 1994), suscita una particular atención sobre el papel del agua en la endolencia. Según Guy *et al.* (1992), **la tolerancia a la congelación es principalmente una tolerancia a la desecación** impuesta por la formación de hielo extracelular. La desecación puede ser un indicador de la tolerancia al frío (heladas) en la producción de plántulas de coníferas (Deans *et al.*, 1990; Calmé *et al.*, 1993).

Más recientemente, la aplicación de la técnica de análisis de imagen por resonancia magnética nuclear (MRI) a yemas foliares de manzano (Faust *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1991) ha permitido determinar que la endolatenencia corresponde a un periodo en que todo el agua de la yema se encuentra ligada, o sea, no hay agua libre (Faust *et al.*, 1991). Aunque estas observaciones no puedan determinar una relación causal directa entre la desecación y el proceso de inducción/eliminación de la endolatenencia, por lo menos pone de manifiesto que en este proceso están involucrados cambios en el estado fisiológico y en el contenido del agua en las yemas (Faust *et al.*, 1991; 1995; Rinne *et al.*, 1994). Sin embargo, el hecho de que el agua esté ligada durante la endolatenencia no determina la completa inhibición del crecimiento, sino que solamente se reduce la expansión celular, ya que los primordios aumentan de volumen durante el invierno (Buban y Faust, 1995).

2.5. Eliminación de la endolatenencia

La relación de las bajas temperaturas con la inducción, mantenimiento y eliminación de la endolatenencia es conocida y estudiada desde hace mucho (Samish, 1954), siendo la base del desarrollo de los modelos de predicción de las fechas de brotación y floración de muchos frutales. La eliminación del estado endolatenente ocurre a consecuencia de la exposición a las bajas temperaturas, siendo las más eficientes, en cada especie o cultivar, aquéllas justo por encima del punto de congelación (Samish, 1954). Según Wisniewski *et al.* (1996), los estreses subletales presentan un mismo efecto, por lo que los “estreses” naturales (temperaturas congelantes, desecación, etc.) pueden provocar la inmediata eliminación de la endolatenencia y la posible pérdida del endurecimiento.

Los primeros modelos de predicción de las fechas de brotación y floración en los frutales estaban basados solamente en el conteo del número de horas con temperaturas por debajo de un determinado límite (Weinberger, 1950) o dentro de un intervalo de temperaturas con diferentes eficiencias (Erez y Lavee, 1971; Richardson *et al.*, 1974; Gilreath y Bucanan, 1981; Shaltout y Unrath, 1983; Del Real Laborde *et al.*, 1990). Después de la acumulación del frío suficiente para eliminar la endolatenencia, la brotación

es estimulada por el incremento de las temperaturas (Fuchigami y Nee, 1987). Por eso, algunos modelos incorporan también una componente de acumulación de calor, después de satisfechas las necesidades de frío para la eliminación de la endolatenia (Richardson *et al.*, 1975; Ashcroft *et al.*, 1977), tornando más fiables las previsiones de épocas de brotación o de floración (Carvalho, 1994).

Estos modelos de predicción, sin embargo, añaden poca información sobre el control fisiológico de la endolatenia (Dennis Jr., 1994), ya que, entre otras limitaciones, no integran los factores climáticos (temperatura) con los procesos fisiológicos (Fuchigami y Nee, 1987). Los mecanismos básicos de la endolatenia permanecen sin aclarar y la mayoría de las evidencias experimentales solamente han permitido una gran diversidad de teorías explicativas (Seeley, 1994). Además, el tránsito de la endolatenia al crecimiento en respuesta a las bajas temperaturas no es lineal a lo largo del tiempo (Seeley, 1996).

2.6. Promoción de la brotación

Después de la eliminación de la endolatenia (acumulación de frío), las yemas se quedan en endolatenia hasta que las condiciones de temperatura sean favorables. Dennis Jr. (1987) y Powell (1987) estudian este aspecto, con particular atención a temperaturas intermedias, que solo promueven el crecimiento en yemas parcialmente salidas del reposo pero no contribuyen a la eliminación de la endolatenia.

Los procesos metabólicos frecuentemente asociados con la eliminación de la latencia, como el aumento de la tasa respiratoria (Villiers, 1975; Tylkowski y Wrzesniewski, 1989; Young, 1990; Corbineau *et al.*, 1991; Seshu y Dedlani, 1991; Pu *et al.*, 1994; Bogatek, 1995; Young *et al.*, 1995; MacPehearson *et al.*, 1997; Suttle, 1996; Myking, 1998), la activación de la vía de las pentosas-fosfato (Villiers, 1975; De Meillon *et al.*, 1990; Nir y Lavee, 1993; Pu *et al.*, 1994), la movilización de reservas carbonadas y nitrogenadas (Villiers, 1975; Keegan *et al.*, 1989; Arnold y Young, 1990; Yang *et al.*, 1991; Weges *et al.*, 1991; Whitworth y Young, 1992; Coleman y Chen, 1996; Crabbé y Barnola, 1996; Ndung'u *et al.*, 1997; Suttle, 1996), la síntesis de ADN y ARN (Villiers, 1975; Wang *et al.*, 1986; Li *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 1991; Wu y Fang,

1993; Crabbé y Barnola, 1996; Tang, 1997), el incremento en el contenido de agua (Faust *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1991; Rinne *et al.*, 1994; Crabbé y Barnola, 1996; Watanabe *et al.*, 1997; Erez *et al.*, 1998) y el incremento de la actividad mitótica (Real *et al.*, 1991; Bigras, 1996) parecen ocurrir después de la eliminación de la endolatenia. Esto se debe, probablemente, al efecto de un incremento general de la actividad metabólica (Villiers, 1975; Suttle, 1996), como resultado de un aumento de la energía cinética de las moléculas y de la actividad enzimática asociada a la subida gradual de la temperatura (Salisbury y Ross, 1994).

Por otro lado, los agentes más conocidos para eliminar la latencia, como la anoxia, el etileno, la cianamida, los aceites minerales y el DNOC (dinitro-o-cresol), solamente parecen eliminar la latencia "residual" una vez las yemas han salido parcialmente del reposo (Crabbé y Barnola, 1996), por lo que cabe preguntar si son agentes de eliminación de la endolatenia o simplemente agentes de promoción de la brotación, una vez eliminada la endolatenia por las bajas temperaturas. Hilhorst *et al.* (1996) postulan que: "como rara vez se hace la distinción entre la eliminación de la endolatenia y la promoción de la germinación, el incremento de la actividad metabólica durante la germinación es errónea y frecuentemente atribuido a la eliminación de la latencia". Esta proposición relativa a la germinación de las semillas parece ser adaptable a la brotación de las yemas.

2.7. Crecimiento

Además de la separación entre eliminación de la endolatenia y la promoción de la brotación, hay que considerar otros dos procesos separadamente: la brotación y el crecimiento. Esta separación se pone de manifiesto por el desarrollo anormal de las yemas cuando son forzadas antes de satisfacer completamente las necesidades de frío, sea después de sujetas a temperaturas sub-letales (Wisniewski *et al.*, 1996) o con cianamida (Nee y Fuchigami, 1992).

Las yemas de plantas herbáceas perenes o bienales y de plantas leñosas parcialmente salidas del reposo, presentan un crecimiento en roseta con expansión de las hojas, pero reducida o nula elongación de los entrenudos (Villiers, 1975; Doi, 1992;

Nee y Fuchigami, 1992; Frisby y Seeley, 1993; Wisniewski *et al.*, 1996). Este tipo de desarrollo anormal puede ser eliminado prolongando el periodo de acumulación de frío, con días largos o con aplicación exógena de giberelinas (Villiers, 1975; Erez y Lerner, 1990; Moore y Moore, 1991; Fosket, 1994; Salisbury y Ross, 1994; Talón, 1996).

3. Latencia y diferenciación floral

Desde hace tiempo es conocida la similitud del efecto de las bajas temperaturas en la promoción de la floración (vernalización) y en la eliminación de la endolatenia (Dennis Jr., 1987). La principal diferencia entre los dos procesos resulta del hecho que el frío parece inducir subsecuentes cambios morfológicos en el primero, mientras solamente promueve el crecimiento en el segundo. Los aspectos comunes a ambos procesos incluyen (Metzger, 1996):

- temperaturas óptimas entre 0 y 10°C;
- percepción del estímulo del frío en las regiones meristemáticas de la yema;
- la eliminación de la latencia por acumulación de frío como un proceso autónomo de la célula, o sea, no transmisible;
- tiempo necesario para satisfacer las necesidades de frío para la eliminación de la endolatenia similar al requerido para la máxima floración.

Como el efecto de las bajas temperaturas en la promoción de la floración (vernalización) depende de la capacidad de división celular (Núñez-Elisea *et al.*, 1992; Metzger, 1996) y durante la endolatenia el meristemo pierde incluso la capacidad de división celular (Bigras, 1996), la diferenciación floral solo puede ocurrir en dos momentos: antes o después de la endolatenia.

En los frutales caducifolios más conocidos, la diferenciación de los primórdios florales (sépalos, pétalos, estambres y carpelos) es visible durante el verano, de finales de junio a septiembre (Westwood, 1982; Susuky *et al.*, 1989; Yonemori *et al.*, 1993; Salisbury y Ross, 1994; Li *et al.*, 1995; Rakngan *et al.*, 1995) en las yemas cuya brotación es reproductora en la primavera siguiente. Sin embargo, diferentes genótipos y diferentes condiciones ambientales pueden afectar el momento en que ocurre la diferenciación floral.

Los frutales de zonas templadas en condiciones sub-tropicales suelen

diferenciarse entre agosto y diciembre (SuriyapanAnont *et al.*, 1990), aunque se haya observado el inicio de la diferenciación floral en yemas de manzana en junio, prolongándose de una forma continuada durante todo el otoño/invierno, hasta completarse en principios de marzo en pleno periodo de brotación de las yemas (Fouad *et al.*, 1995).

En otras caducifolias como el nogal, que a veces presenta los sépalos formados antes del invierno (Lin *et al.*, 1977; Schaffer *et al.*, 1996; Polito y Pinney, 1997), la diferenciación floral tiene que completarse en la primavera siguiente, después de la eliminación de la endolatenia. En este caso se encuentra también la vid que, en general, diferencia los primordios de las inflorescencias en el verano y las flores a finales del invierno, justo antes y/o durante la brotación (Carolus, 1970; Pratt y Coombe, 1978; Srinivasan y Mullins, 1981; Pouget, 1981; 1983; Huglin, 1986; Mullins *et al.*, 1989; Cheema *et al.*, 1996). Solamente algunos cultivares de vid en Turquía suelen iniciar los sépalos en otoño, antes de la entrada en endolatenia (Carolus, 1970).

En otros frutales, entre los que podemos destacar las perenifolias, las yemas permanecen indiferenciadas hasta el invierno y solamente a finales de esta estación es posible observar la diferenciación de las inflorescencias y de los primordios florales (Almeida, 1940; Hartmann, 1953; Troncoso, 1967; 1968; Mullins *et al.*, 1989; Iwahori *et al.*, 1990; Guardiola *et al.*, 1982; Davenport y Núñez-Elisea, 1997; Fabbri y Alerci, 1999; De la Rosa *et al.*, 2000). Sin embargo, en estas especies se debate aún si el frío sirve para determinar el cambio en la naturaleza de las yemas o solamente para eliminar la endolatenia o promover la brotación de yemas previamente inducidas.

También en las plantas bulbosas bienales hay varios patrones en el momento del inicio del desarrollo reproductor. Según Salisbury y Ross (1994), en algunas bulbosas las yemas florales se producen antes de la cosecha de la planta, en otras después de la cosecha, durante el periodo de almacenamiento, y en otras después del frío invernal, simultáneamente o incluso después de la formación de nuevos primordios foliares. La existencia de yemas florales en estas plantas (generalmente consideradas con necesidades absolutas de bajas temperaturas para la inducción floral) antes del periodo de frío, parece sugerir que, por lo menos en una parte de ellas, el frío no es un factor determinante del cambio en la naturaleza de la yema.

El papel del frío como factor inductor puede cuestionarse, pero el papel del frío

en la diferenciación floral parece ser evidente. La morfogénesis floral no parece depender de la acumulación de frío, pero se acelera con tratamientos previos a bajas temperaturas (Basconsuelo *et al.*, 1995). La brotación bajo temperaturas elevadas es, para Pouget (1981; 1983), el principal factor que influye en el número de flores por inflorescencia en vid: con temperaturas altas hay una brotación rápida que compite por los asimilados con la diferenciación de las flores, mientras con temperaturas bajas la brotación es lenta y el número de flores por inflorescencia es más elevado.

Hay evidencia de que el cambio brusco de las condiciones de bajas temperaturas a condiciones favorables al crecimiento (como suele ocurrir en la generalidad de los estudios sobre el papel del frío en la floración y en la eliminación de la endolencia) tiene efectos distintos según el desarrollo floral de las yemas en el momento de la transferencia (Lam-Yam y Parisot, 1990; Doi *et al.*, 1991; Guerriero y Bartolini, 1991; Mori *et al.*, 1991a; 1991b; Yoshida *et al.*, 1991; Rawson y Zajac, 1993; Drinnan y Menzel, 1995; Guo *et al.*, 1995; Adams *et al.*, 1998; Bjorkman y Pearson, 1998; King, 1998). Estas observaciones dejan abierta la posibilidad de que las anomalías en la brotación y en la floración normalmente atribuidas a la insatisfacción de las necesidades en frío sean debidas al efecto del aumento de las temperaturas sobre la diferenciación floral. Este efecto de las altas temperaturas podría explicar el efecto "inductor" cuantitativo de las bajas temperaturas en las plantas que diferencian las inflorescencias y/o las flores pasadas las condiciones más severas del invierno.



III - PARTE EXPERIMENTAL

1. Caracterización de las yemas axilares del olivo durante el verano y el otoño

Las yemas del olivo constan de un conjunto de brácteas insertas en un eje con entrenudos muy cortos, un meristemo apical y algunos primordios axilares en las brácteas más basales. En cada nudo de la yema hay un par de brácteas, con una disposición decusada, o sea, cada par de brácteas está inserto en un plano perpendicular a los pares de brácteas de los nudos adyacentes (Almeida, 1940).

Cuando las yemas se cortan para estudios histológicos, en las secciones longitudinales centrales están visibles solamente las brácteas situadas en un determinado plano, puesto que las restantes se encuentran localizadas en el plano perpendicular al del corte. De esta forma, cuando el corte se hace según el plano en donde se encuentran las brácteas del nudo más basal (De la Rosa *et al.*, 2000), son visibles los nudos de orden impar (1º, 3º, 5º, ...). Los nudos de orden par (2º, 4º, ...) no son visibles en el corte central, pero pueden ser observados en cortes secuenciales anteriores o posteriores a éste.

Antes del período invernal, las yemas están constituidas usualmente por 4 pares de brácteas, o sea, 4 nudos (Almeida, 1940; Hackett y Hartmann, 1963; Fabbri y Alerci, 1999), aunque ese número pueda variar. De la Rosa *et al.* (2000) refieren la existencia de 4 ó 5 nudos en noviembre, mientras Pinney y Polito (1990) señalan 5 ó 6 nudos en las yemas de los árboles en descarga (OFF) y 4 ó 5 en las yemas de los árboles en carga (ON), a finales de noviembre.

El desarrollo morfológico de las yemas axilares del olivo durante el período de verano y otoño es generalmente nulo o escaso (Almeida, 1940; Hackett y Hartmann, 1963; Troncoso, 1966; 1967; 1968; Msallem y Hellali, 1988; Fabbri y Alerci, 1999). Sin embargo, Pinney y Polito (1990) refieren la formación de un nudo adicional entre mediados de octubre y mediados de noviembre. En diciembre, Almeida (1940) señala la formación de un nudo adicional, mientras Fabbri y Alerci (1999) notan alguna actividad

metabólica en las zonas periféricas del meristemo apical, pero solamente en las yemas de los ramos vegetativos.

En el hemisferio Norte, las diferencias morfológicas entre yemas vegetativas y reproductoras no son generalmente visibles hasta mediados (Msallem y Hellali, 1988) o finales (Pinney y Polito, 1990) de diciembre, enero (Fabbri y Alerci, 1999), febrero (Almeida, 1940; Troncoso, 1967; 1968) o marzo (Hackett y Hartmann, 1963). Las únicas diferencias morfológicas señaladas entre yemas vegetativas y reproductoras del olivo hasta diciembre son un mayor número de nudos en las yemas de los árboles en descarga en otoño (Pinney y Polito, 1990), mayor actividad metabólica en las zonas periféricas del meristemo apical de las yemas de los ramos vegetativos en diciembre (Fabbri y Alerci, 1999) y las mayores dimensiones (anchura máxima del ápice, longitud del entrenudo apical y longitud del primordio foliar apical) de las yemas de los ramos vegetativos de agosto a diciembre (Fabbri y Alerci, 1999).

La diversidad observada en el número de nudos y en la fecha en que se aprecia el desarrollo reproductor de las yemas de olivo refleja diferencias en el material utilizado (cultivar; tipo de árbol: en carga o en descarga; tipo de ramo: vegetativo o reproductor; o posición de la yema en el ramo: apical o axilar; distal o proxima) y en las condiciones ambientales de las regiones y del año en que se realizaron los estudios. Además, parece que el procedimiento de muestreo puede ser también una fuente de variación en los resultados. Así, Pinney y Polito (1990) y De la Rosa *et al.* (2000) refieren la utilización de las yemas del 3º nudo a partir del ápice del ramo, mientras Fabbri y Alerci (1999) utilizaron yemas de la parte media del ramo. Por otra parte, Troncoso (1966; 1967; 1968) y Fabbri y Alerci (1999) utilizaron ramos vegetativos (verticales y vigorosos localizados en la parte superior de la copa) y reproductores (horizontales en la parte media de la copa) de un mismo árbol, mientras Pinney y Polito (1990) y De la Rosa *et al.* (2000) emplearon ramos de árboles distintos, con elevada o escasa producción. En otros estudios se consideraron como reproductoras las yemas axilares de los ramos del año de los árboles en descarga y vegetativas las yemas apicales de los mismos ramos (Badr *et al.*, 1970). Los restantes autores no especifican las condiciones y el método de muestreo o solamente caracterizaron yemas de un determinado tipo de árbol.

El presente estudio pretende caracterizar las yemas del olivo de árboles en

descarga y en carga, para conocer mejor la estructura de la yema antes y durante el reposo (desde el verano hasta diciembre), buscando diferencias morfológicas entre las yemas de los árboles en carga y en descarga durante ese periodo y, a ser posible, clarificar las diferencias en el número de nudos señaladas por los diferentes autores.

1.1. Material y métodos

Los ramos para las observaciones anatómicas procedían de una plantación en riego de la variedad ‘Manzanilla de Sevilla’ establecida en 1974 a un marco de 6x6 metros en la finca “Alameda del Obispo” del CIFA (Centro de Investigación y Formación Agraria) de Córdoba. Este olivar se cultiva por el Departamento de Olivicultura del citado Centro, siguiendo las prácticas habituales de buen manejo. En el invierno de 1995/96 la plantación se podó ligeramente.

Para el estudio, se utilizaron 5 árboles en descarga (OFF) y 5 árboles en carga (ON) en 1996. En cada árbol, se muestrearon sucesivamente 3 ramos del año, preferentemente en la zona media de la copa, evitando los muy vigorosos o débiles, y se colocaron de inmediato en un recipiente con agua, para evitar su deshidratación. El muestreo se realizó en junio (árboles OFF) o julio (árboles ON), en octubre y en diciembre del año 1996. En cada árbol utilizado, se marcaron también 10 ramos para el control mensual de su crecimiento (número de nudos y longitud).

En el laboratorio, se fijaron nudos enteros de dos posiciones distintas del ramo (Fig. 1.1): a) en posición distal, es decir, el 3º ó 4º nudo bajo el ápice del ramo y b) en posición proximal, o sea, el 4º ó 5º nudo por encima de la inserción del ramo en la madera más vieja. Los ramos se cortaron según un plano transversal, aproximadamente a 5mm de cada lado del nudo en la posición seleccionada (Fig. 1.2 – A), y las hojas se cortaron justo en la zona de separación entre el peciolo y el limbo (Fig. 1.2 - B). El muestreo de los árboles ON en verano solamente se realizó en julio, porque su crecimiento hasta junio (ramos de menos de 10 nudos) no permitió una clara separación entre las yemas en posición distal y proximal.

Los nudos, una vez cortados de la forma descrita, fueron fijados en F:A:E (2:1:10:7 de formalina al 37-40%: ácido acético glacial: etanol al 95%: agua destilada -

Berlyn y Miksche, 1976). Durante cerca de 1 hora, las muestras se sometieron a vacío (-50KPa), para mejorar la penetración del fijador. Para cada tipo de árbol (ON y OFF), posición en el ramo (distal o proximal) y fecha de muestreo se fijaron 15 nudos (1 nudo por ramo muestreado en el campo), lo que supone un total de 30 yemas. De esta forma, se constituyeron los siguientes tratamientos:

- época del muestreo: verano (junio/julio), comienzo (octubre) y final del otoño (diciembre);
- tipo de árbol: en carga (ON) y en descarga (OFF) en 1996;
- posición de la yema en el ramo: distal o proximal.

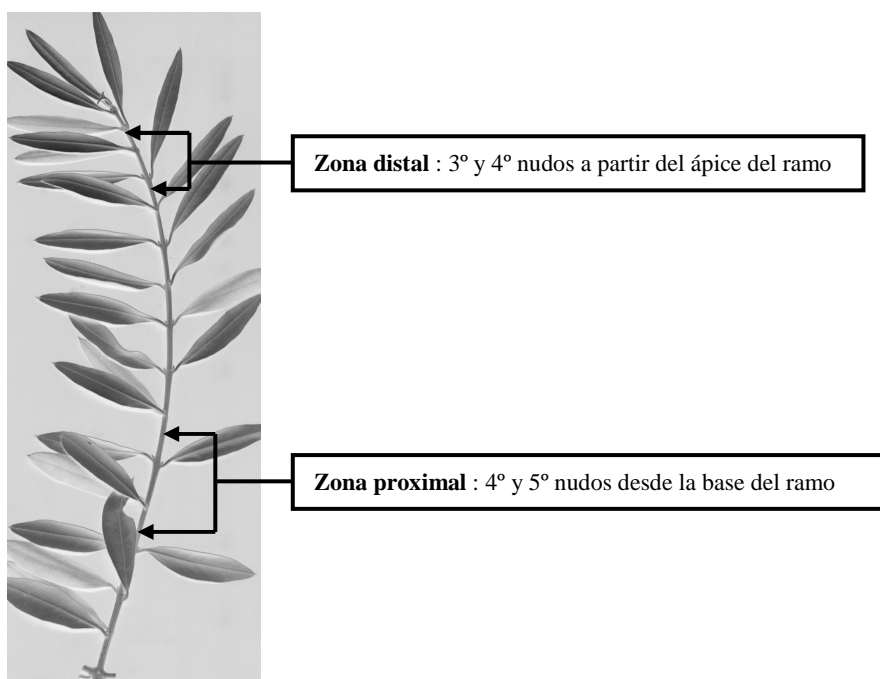


Figura 1.1 – Ramo del año, ilustrando las posiciones distal y proximal de las que se toman las yemas

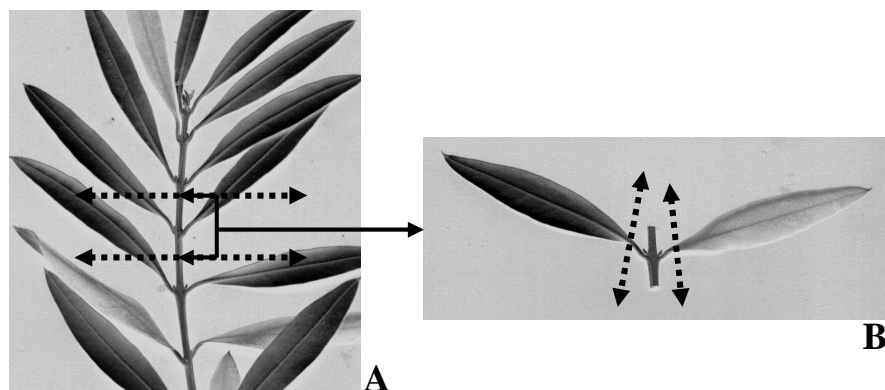


Figura 1.2 – Detalle de la toma de un nudo seleccionado para fijar. Las dobles flechas con línea discontinua indican los cortes efectuados. A: Corte transversal de la madera 5mm a cada lado del nudo seleccionado. B: Corte de las hojas en la zona de separación entre el peciolo y el limbo

1.1.1. Preparación y sección de las yemas

Las yemas, previamente fijadas y almacenadas durante un periodo mínimo de aproximadamente 4 a 5 meses (muestreo de diciembre) o máximo de 10 a 11 meses (muestreo de junio/julio), se separaron con un corte longitudinal de la madera del nudo. Se individualizaron, de esta forma, las dos yemas del nudo (Fig. 1.3 - A). A continuación, se cortó la porción de madera adyacente a la yema por encima de ésta, según un plano paralelo al plano de las brácteas del nudo más basal de la yema (Fig. 1.3 – B: Corte 1), de acuerdo con la orientación y preparación descritas por De la Rosa *et al.* (2000).

La precisión de este corte (debido a la pequeña dimensión del material) es fundamental para que la posición definitiva de la yema en el bloque de parafina, después de cortada en el micrótopo, posibilite su observación en el plano óptimo, es decir, el plano longitudinal que pasa por el centro de la yema y de las brácteas de los nudos de orden impar. Finalmente, se cortaron las porciones de peciolo (Fig. 1.3 – B: Corte 2) y de madera (Fig. 1.3 – B: Corte 3) bajo la yema, lo más próximo posible de la inserción de la yema con el tallo. El corte de las yemas se hizo bajo la lupa en un recipiente con etanol 50% y éstas se guardaron temporalmente en etanol 70%.

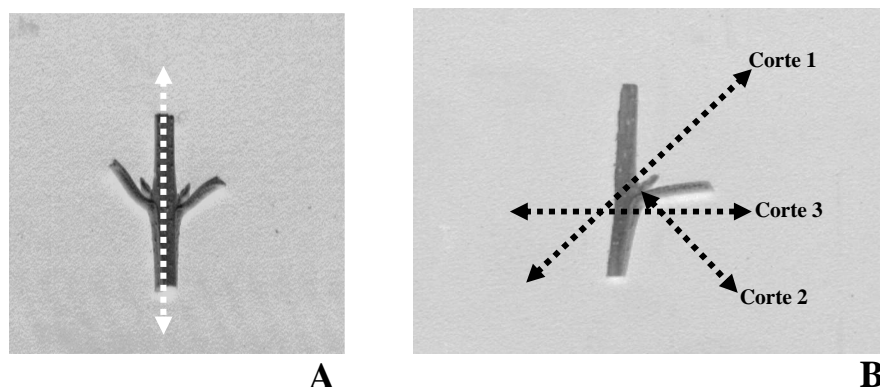


Figura 1.3 – Detalle de los cortes (dobles flechas con línea discontinua) efectuados en la preparación de las yemas de un nudo fijado. A: Separación de las 2 yemas de un mismo nudo. B: Cortes efectuados para aislar la yema de los tejidos contiguos

Las yemas así preparadas siguieron el procedimiento de deshidratación en alcohol butírico terciario (ABT), descrito por Johansen (1940) y Jensen (1962) con las modificaciones específicas para el olivo descritas por Salmerón-Rodríguez (1994) y De la Rosa (1996). En este procedimiento, las muestras se transfirieron a soluciones cada vez más concentradas en ABT, con los últimos 3 cambios ya con ABT puro (Tabla 1.1). La permanencia de las muestras en cada solución fué al menos 5 horas, con un mínimo de 2 y un máximo de 3 cambios por día.

Las muestras se dejaron en reposo durante al menos 3 días en una solución de TBA:aceite de parafina (1:1), para reducir el endurecimiento de la muestra provocado por el cambio a la parafina (Johansen, 1940; Salmerón-Rodríguez, 1994). Pasado ese tiempo, se retiró la mayor parte de esa solución, se adicionó parafina y las muestras se colocaron en una estufa a 60°C, para derretir la parafina y volatilizar el ABT. Para obtener una infiltración completa, la parafina se cambió 3 veces antes de su inclusión en bloques sólidos de parafina de 56-58°C de punto de fusión (Histosec, Merck).

Los bloques de parafina con las muestras se cortaron después con un micrótopo rotativo (Reichter-Jung 2040, Labetec S.A.). En un primer paso se cortó la capa superficial de parafina y se colocaron los bloques en agua con hielo durante un mínimo de 5 horas antes de realizar el corte definitivo. Esta operación es para facilitar el corte

Tabla 1.1 – Composición (expresada en %) de las soluciones de deshidratación (Johansen, 1940)

Componentes	Soluciones (*)						
	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Agua destilada	30	15	0	0	0	0	0
Etanol 95%	50	50	45	0	0	0	0
Etanol 100%	0	0	0	25	0	0	0
ABT (alcohol butírico terciario)	20	35	55	75	100	100	100

(*) La solución de deshidratación I no se presenta, puesto que no fué utilizada. Según Johansen (1940), esta solución solamente se utiliza cuando el fijador tenga baja proporción de alcohol

de material duro (Johansen, 1940; Salmerón-Rodríguez, 1994). En el micrótopo, los cortes se realizaron a 12 µm de grosor y se obtuvieron cintas continuas de parafina con cortes seriados longitudinales de las yemas.

Las cintas de parafina con los cortes correspondientes a las zonas relevantes para observación (eliminando los primeros y los últimos cortes que carecen de interés) se adherieron a un portaobjetos con el adhesivo de Haupt's (1g de gelatina pura disuelta en 100ml de agua destilada a una temperatura de 30°C; 2g de cristales de fenol; 15ml de glicerina – Johansen, 1940). En este paso, se añadieron unas gotas de una solución de formalina al 2% para estirar y desarrugar convenientemente las cintas de parafina. Eliminado el exceso de formalina, los portaobjetos con las muestras se dejaron secar durante una noche sobre una placa calefactora a 43°C, en la cual se había realizado todo el trabajo de montaje.

1.1.2. Tinción de las yemas

Las tinciones que se utilizaron fueron dos: a) una general – el Azul de Toluidina (Sakai, 1973) y b) una específica, el IIK (Iodo Ioduro Potásico), para el almidón (Jensen, 1962).

Los portaobjetos con las cintas de parafina se tiñeron con Azul de Toluidina al 0,05% en tampón citrato-fosfato (Sakai, 1973) durante 15 minutos, se lavaron a

continuación en agua corriente y se dejaron secar al aire. Después de secos, se procedió al desparafinado con dos inmersiones sucesivas en citrosol durante un periodo mínimo de 5 minutos (Salmerón-Rodríguez, 1994). Finalmente, se colocaron los cubreobjetos, utilizando el adhesivo sintético Eukitt. Después de secar durante aproximadamente 24 horas, sobre una placa calefactora a 43°C, las preparaciones quedaron listas para su observación microscópica.

La tinción con Iodo Ioduro de Potásio (IIK) se inicia con el desparafinado e hidratación de las muestras (Jensen, 1962). La serie de soluciones utilizada en el proceso de desparafinado e hidratación puede servir también para eliminar alguna tinción previa, como se hizo en algunos casos de este estudio. Para eliminar la tinción previa, las preparaciones se colocaron en xileno con la finalidad de despegar los cubreobjetos, lo que puede tardar entre 3 y 5 días. La secuencia y el tiempo de permanencia en las soluciones utilizadas a continuación fué la siguiente: xileno (5 min); xileno (5 min); xileno: etanol 100% (1:1 en volumen) (3 a 4 inmersiones sucesivas durante unos segundos); etanol 100% (3 min); etanol 100% (3 min); etanol 95% (2 min); etanol 70% (2 min); etanol 50% (2 min). En general, un paso no es suficiente para eliminar toda la tinción, por lo que tiene que repetirse de 2 a 4 veces. Siempre que sea necesario repetir este paso de xileno a etanol 50% (hidratación), hay que realizar el paso inverso de etanol 50% a xileno (deshidratación). Una vez completamente eliminada la tinción previa, las muestras se dejaron 3 minutos en agua destilada y 5 minutos en una solución de IIK (2% de Ioduro Potásico; 0,2% de Iodo) (Jensen, 1962). Se montaron las preparaciones en agua para su inmediata observación y fotografía al microscopio, ya que esta tinción no tiene carácter permanente y se descolora en pocos días.

1.1.3. Observaciones efectuadas

Las observaciones del corte longitudinal central de la yema se realizaron al microscopio óptico. Se contaron los nudos de las yemas y, utilizando un procesador de imagen Leica Q5001W, se tomaron 3 medidas de anchura (W1, W2 y W3) y 2 medidas de longitud (H1 y H2) de la yema (Fig. 1.4).

El número de yemas observadas por tratamiento varió entre 10 y 20. A partir de

las mediciones efectuadas, se calcularon sus medias y errores estándar.

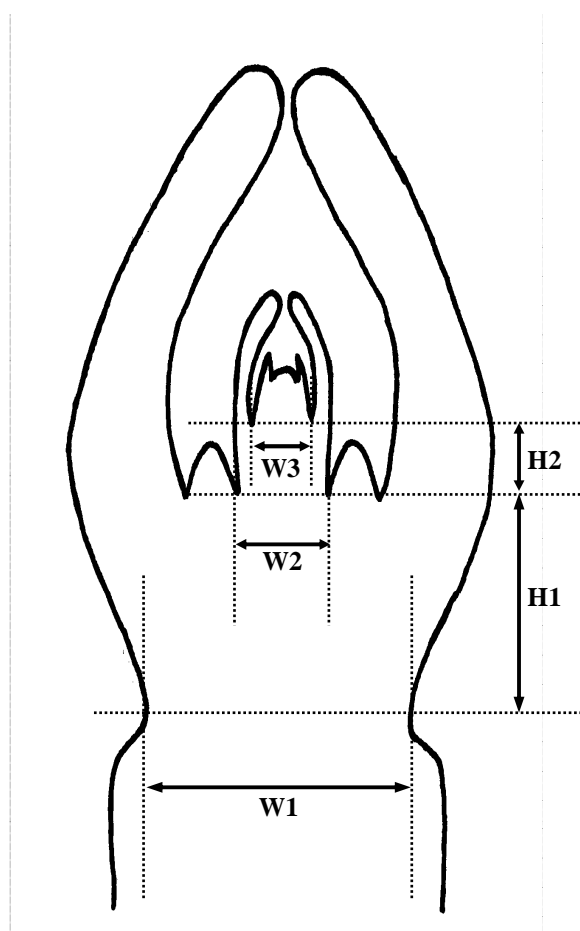


Figura 1.4 – Representación esquemática de una yema, ilustrando las medidas tomadas (basado en De la Rosa *et al.*, 2000) (Leyenda: **W1**: anchura de la inserción de la yema con el tallo; **W2**: anchura de la yema entre las axilas de las brácteas del primer nudo; **W3**: anchura de la yema entre las axilas de las brácteas del tercer nudo; **H1**: longitud del entrenudo basal de la yema; **H2**: longitud entre las axilas de las brácteas del primer y del tercer nudos de la yema.

1.2. Resultados

1.2.1. Crecimiento de los ramos

El número de nudos y la longitud de los ramos fueron mayores en los árboles en descarga (OFF) que en los árboles en carga (ON) (Fig. 1.5). En los árboles OFF, ambos parámetros tendieron a estabilizarse a partir del fin del verano (septiembre). En los árboles ON, el número de nudos siguió aumentando en el otoño, estabilizándose solamente a partir de noviembre. Como resultado del mayor aumento en el número de nudos en los árboles ON durante el otoño, la longitud media del entrenudo disminuyó más acentuadamente durante el otoño en estos árboles que en los árboles OFF (Fig. 1.5).

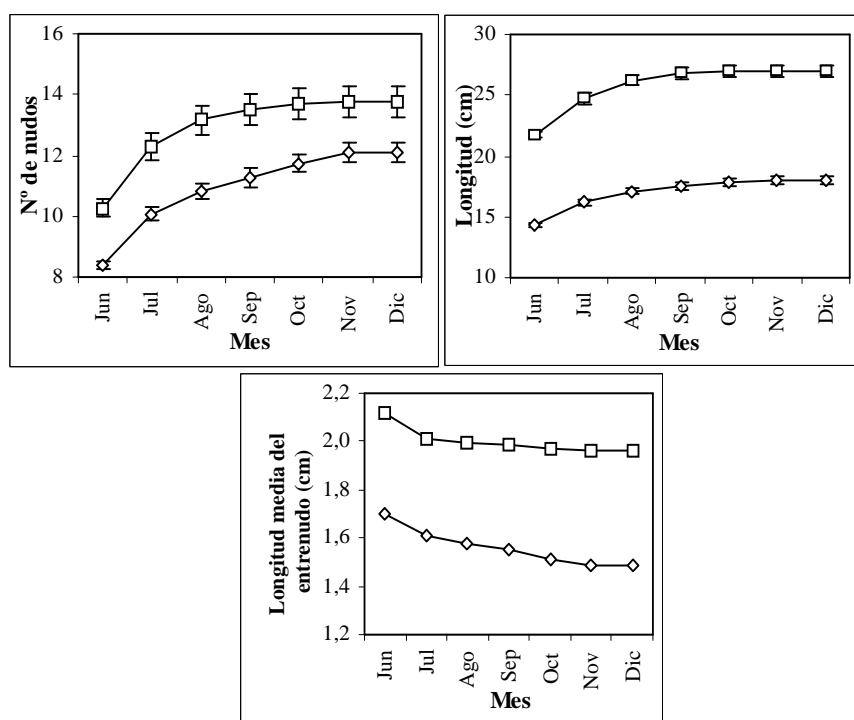


Figura 1.5 – Variación del número de nudos (arriba, izquierda), de la longitud del ramo (arriba, derecha) y de la longitud media del entrenudo (abajo) de los ramos de árboles en descarga (OFF) (cuadrados) y en carga (ON) (rombos) de junio a diciembre de 1996

1.2.2. Número de nudos

Las yemas en posición proximal de los árboles en descarga (OFF) en 1996 estuvieron mayoritariamente constituidas por 4 nudos, mientras las yemas en posición distal presentan un porcentaje más elevado de yemas formadas por 5 nudos. Estos valores se mantuvieron estables a lo largo del verano y del otoño (Fig 1.6). En los árboles en carga (ON) en 1996, las yemas están mayoritariamente constituidas por 4 nudos. Solamente las yemas distales en julio tienen un igual número de yemas formadas por 4 y por 5 nudos.

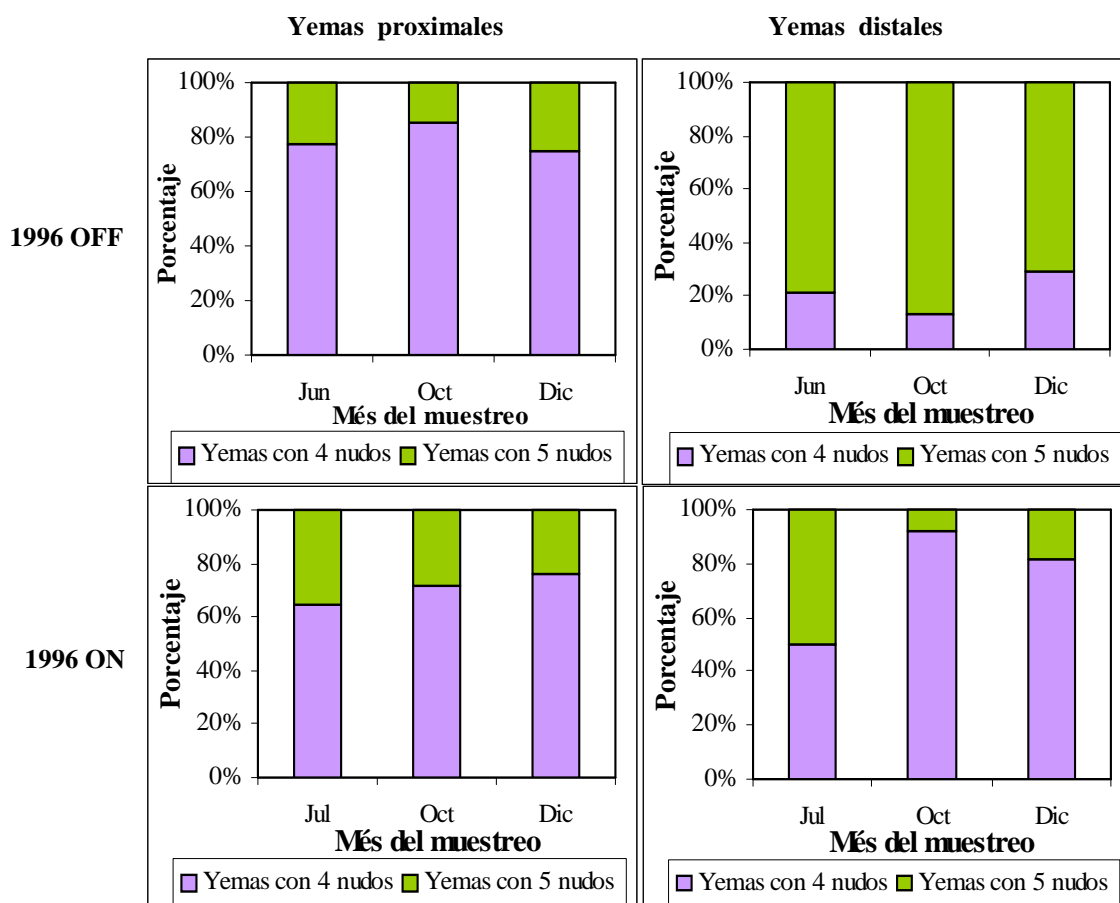


Figura 1.6 - Porcentajes de yemas formadas por 4 (violeta) o 5 (verde) nudos, según el més del muestreo, la posición en el ramo: proximal (izquierda) o distal (derecha) y la carga del árbol en 1996: OFF (arriba) o ON (abajo)

1.2.3. Dimensiones de las yemas

Las **anchuras** W1, W2 y W3 de las yemas distales fueron en general mayores en los árboles en descarga (OFF) que en los árboles en carga (ON). Esa diferencia fué más marcada en el otoño que en el verano, ya que esa medida aumentó en los árboles OFF y disminuyó en los ON (Fig. 1.7). En las yemas en posición proximal, las diferencias fueron menos marcadas, pero se pudieron notar las siguientes tendencias (Fig. 1.7):

- la anchura W1 fué ligeramente mayor en los árboles OFF en 1996;
- las anchuras W2 y W3 fueron similares en el verano en ambos tipos de árbol. Posteriormente, W2 y W3 aumentaron en las yemas de los árboles ON y disminuyeron o fueron similares en los OFF, por lo que en el otoño estas anchuras fueron superiores en los primeros.

Las diferentes medidas mostraron una tendencia distinta entre yemas en posición proximal y distal. La anchura W1 fué en general mayor en las yemas proximales que en las distales, tanto en árboles OFF como ON, particularmente en diciembre. Las anchuras W2 y W3 se comportaron de manera distinta en los árboles OFF y ON. En los primeros, las yemas distales presentaron mayores dimensiones, mientras en los segundos fueron mayores las dimensiones de las yemas proximales. Estas diferencias fueron más marcadas en otoño que en verano (Fig. 1.7).

Las **longitudes** H1 y H2 de las yemas distales fueron en general mayores en los árboles en descarga (OFF) que en los árboles en carga (ON). Esa diferencia fué más marcada en el otoño que en el verano, particularmente en octubre, ya que ambas medidas aumentaron o permanecieron estables en los árboles OFF y disminuyeron en los ON (Fig. 1.8). En las yemas en posición proximal, las variaciones de las medidas fueron más irregulares, pero se pudieron notar las siguientes tendencias (Fig. 1.8):

- la longitud H1 fué mayor en los árboles ON;
- la longitud H2 fué similar en el verano y mayor en otoño en los árboles ON;
- la tendencia de los árboles ON fué siempre creciente en ambas longitudes;
- en los árboles OFF no se observó ninguna tendencia marcada. La longitud H1 aumentó de junio a octubre y en diciembre fué de nuevo similar a junio. En la longitud H2 ocurrió lo contrario: disminuyó primero y aumentó después.

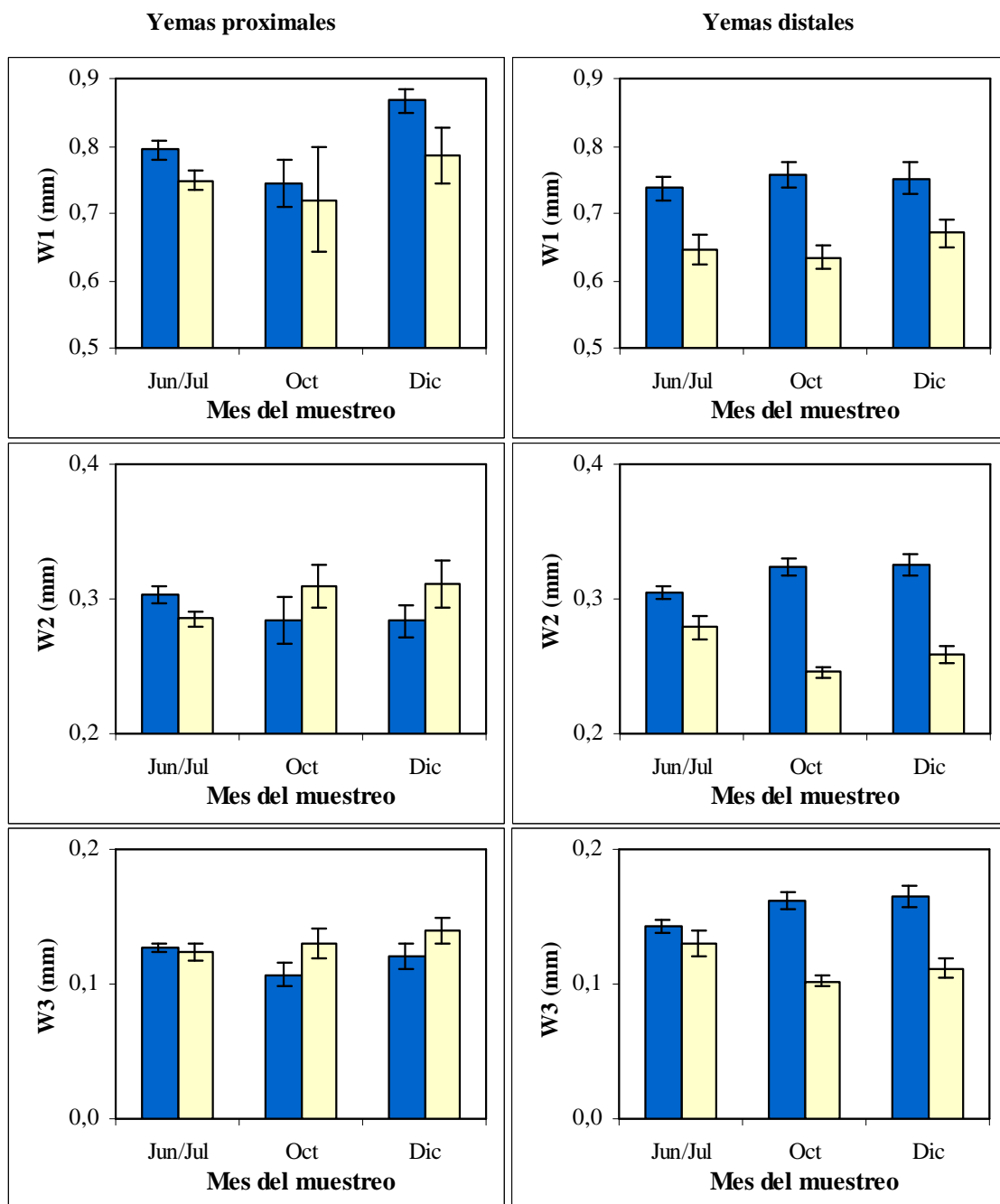


Figura 1.7 – Medias y errores estándar de las anchuras W1 (arriba), W2 (al medio) y W3 (abajo) de las yemas de árboles en descarga (azul) y en carga (amarillo) en 1996, en posición proximal (izquierda) y distal (derecha) del ramo

Las yemas proximales y distales mostraron una tendencia distinta en los diferentes tipos de árbol. En los árboles ON, las medidas H1 y H2 aumentaron en las yemas proximales y disminuyeron en las yemas distales, presentando las primeras valores mayores, en particular en el otoño. En los árboles OFF, no hay una tendencia marcada, pero en ambas medidas los valores de las yemas distales son superiores a los de las proximales. En la longitud H1, las mayores diferencias ocurren en junio y diciembre, mientras en la longitud H2 ocurren en octubre (Fig. 1.8).

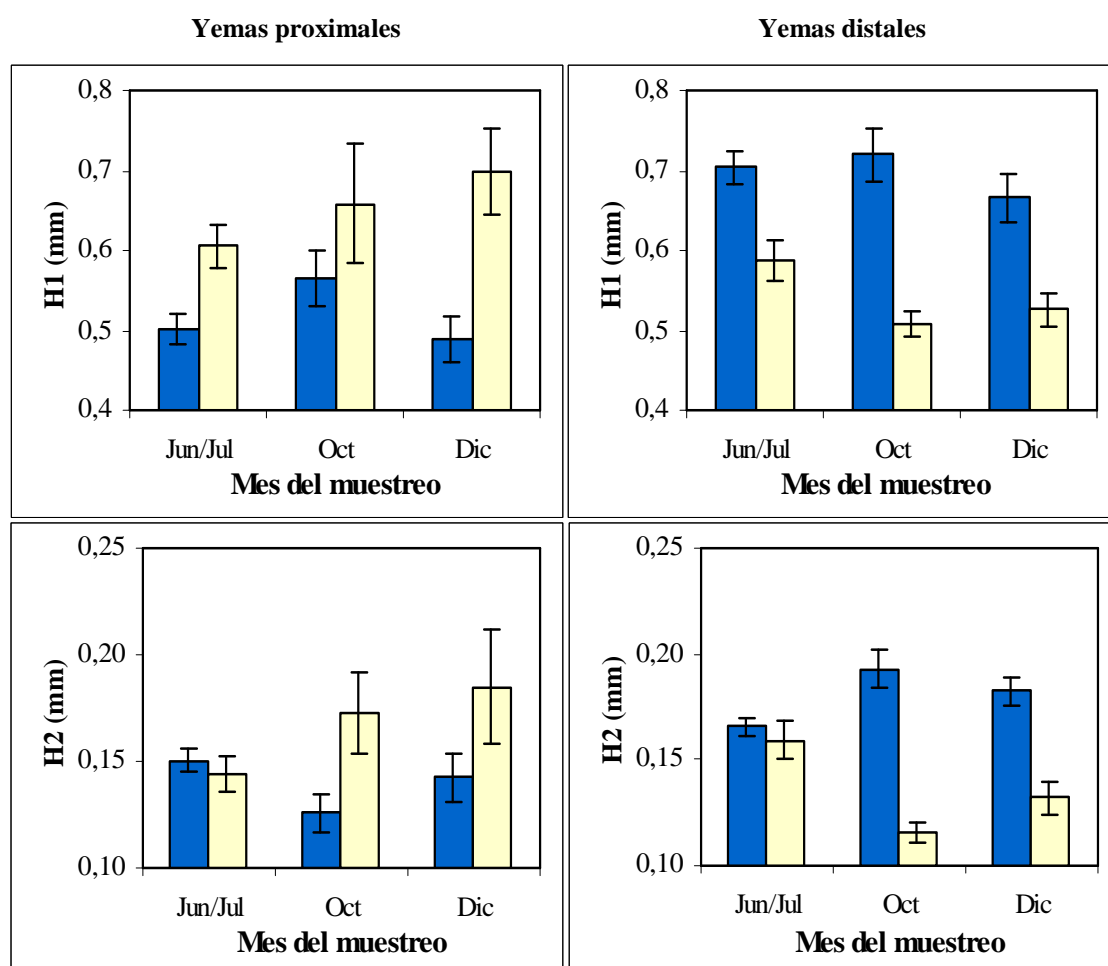


Figura 1.8 – Medias y errores estándar de las **longitudes** H1 (arriba) y H2 (abajo) de las yemas de árboles en descarga (azul) y en carga (amarillo) en 1996, en posición proximal (izquierda) y distal (derecha) del ramo

1.2.4. Observaciones de almidón

Se observó una baja incidencia de la coloración negro/azul indicativa de los gránulos de almidón con la tinción de IIK en las yemas de ambos tipos de árbol (en descarga o en carga en 1996) hasta diciembre (Fig. 1.9 - A y B). La presencia de almidón fué más evidente en la parte central de la porción de muestra adyacente a la yema (Fig. 1.9 - C y D). En este caso, los gránulos de almidón son bien visibles y relativamente abundantes.

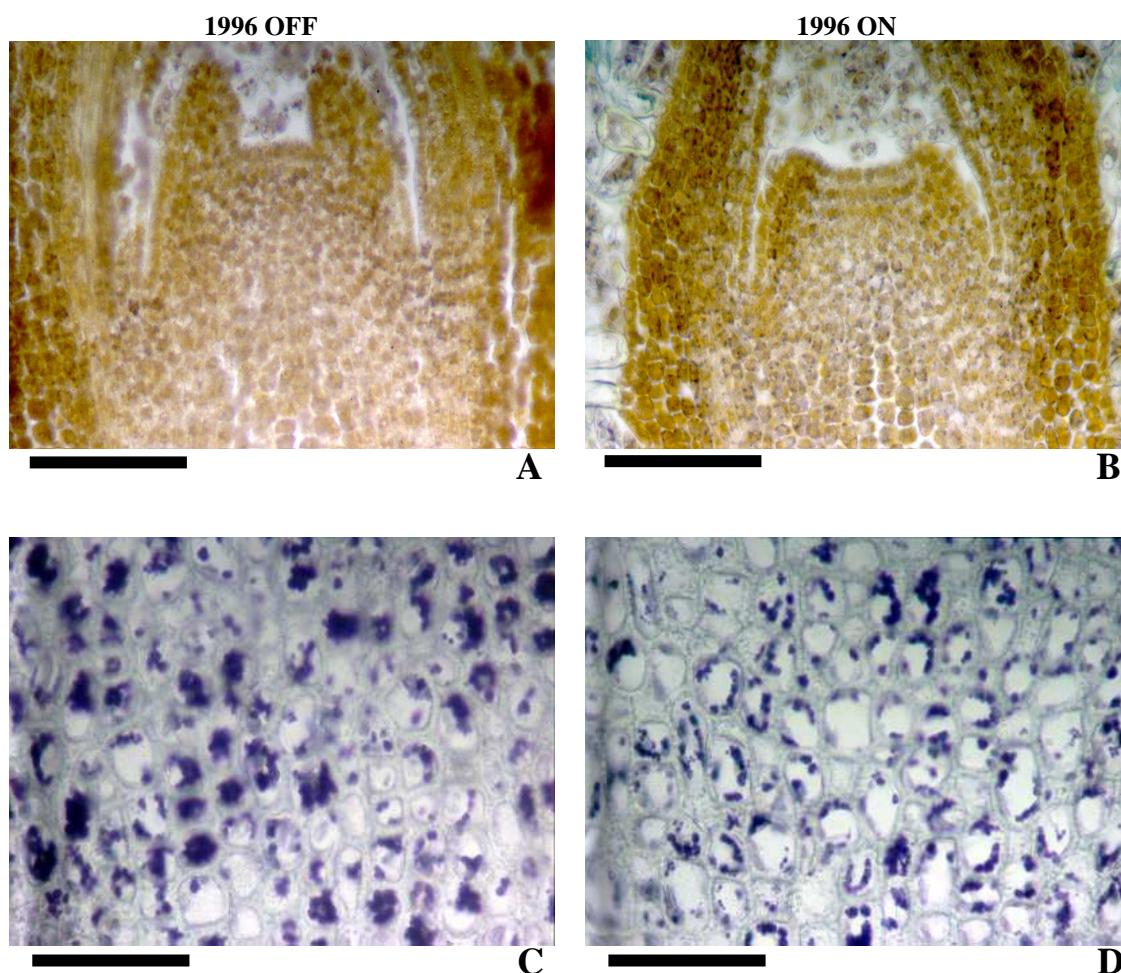


Figura 1.9 - Corte longitudinal central de la parte distal de las yemas (arriba) y de la parte central de la porción del tallo adyacente a la yema (abajo) de árboles OFF (izquierda) y ON (derecha) en 1996 (Tinción de IIK) (Barra = 100 μ m). A y B: coloración negro/azul poco intensa en las yemas. C y D: coloración negro/azul intensa de los gránulos de almidón

1.3. Discusión

Las yemas del olivo durante el verano y el otoño están formadas por 4 ó 5 nudos (Fig. 1.6). Las yemas con 4 nudos predominan en las posiciones proximales de los ramos de árboles ON y OFF y en las partes distales de los árboles ON. Las yemas formadas por 5 nudos solamente predominan en las posiciones distales de los árboles OFF. Estos resultados están de acuerdo con la generalidad de los autores que indican la predominancia de las yemas con 4 nudos (Almeida, 1940; Hackett y Hartmann, 1963; Fabbri y Alerci, 1999), pero también concuerdan con Pinney y Polito (1990) y De la Rosa *et al.* (2000) que observaron 5 nudos en las yemas, ya que estos utilizaron yemas de la parte distal de los ramos.

La formación de un nudo adicional entre mediados de octubre y mediados de noviembre en árboles OFF, referida por Pinney y Polito (1990), no ocurrió en las condiciones de este estudio, por cuanto las yemas de una misma posición en el ramo y del mismo tipo de árbol estuvieron formadas por un número de nudos estable durante este periodo. Este resultado está también de acuerdo con la estabilidad del número de nudos formados en las yemas durante el verano y otoño referida por la mayoría de los autores (Almeida, 1940; Hackett y Hartmann, 1963; Troncoso, 1966; 1967; 1968; Msallem y Hellali, 1988; Fabbri y Alerci, 1999).

El mayor número de nudos en las yemas distales de árboles OFF que en las de los árboles ON está de acuerdo con Pinney y Polito (1990). Fabbri y Alerci (1999) presentan un resultado contrario, o sea, las yemas de los ramos vegetativos presentaron un mayor número de nudos que las yemas de los ramos reproductores. Sin embargo, estos autores emplearon yemas de la parte central de ramos vegetativos (ramos verticales, con crecimiento vigoroso y localizados en la parte alta de la copa) y de ramos reproductores (ramos horizontales, con crecimiento medio y localizados en la parte media de la copa) muestreados en un mismo árbol, no representando ramos de árboles con diferente carga, como Pinney y Polito (1990) y en este estudio.

Las yemas proximales (procedentes del 4° ó 5° nudo desde la inserción del ramo) se formaron simultáneamente en primavera (Fig.1.5) en ambos tipos de árboles (ON y OFF), lo que permite comparaciones entre yemas de la misma edad procedentes de estos árboles. Durante el periodo de formación de estas yemas los árboles estuvieron

expuestos a fotoperiodos de duración creciente y la competencia por asimilados entre órganos vegetativos y reproductores en los árboles en carga (ON) es aún limitada (Rallo y Suárez, 1989). Estas circunstancias pueden justificar que estas yemas estén constituidas mayoritariamente por 4 nudos en ambos tipos de árboles (Fig. 1.6) y que no se observen diferencias en la mayor parte de las medidas de las yemas (excepto en H1) entre árboles ON y OFF en el muestreo de junio/julio (Figs. 1.7 y 1.8).

Con la edad el cambio más significativo observado en este tipo de yemas (proximales) es la creciente elongación de las yemas de los árboles ON, reflejado por el aumento progresivo de H1 y H2 hasta el muestreo de diciembre (Fig.1.8). En contraposición no se observa ninguna pauta clara de modificación con la edad del n° de nudos ni de las dimensiones en las yemas de los árboles OFF (Figs. 1.6 a 1.8). Ambas observaciones sugieren el establecimiento precoz de algún tipo de latencia en las yemas de los árboles OFF y la prolongación del periodo de elongación hasta fechas tardías en las yemas de los árboles ON, en concordancia con un periodo de crecimiento también más prolongado de los ramos (Fig.1.5). La mayor dimension de las yemas proximales de los árboles ON está de acuerdo con los resultados de Fabbri y Alerci (1999), a pesar de las diferencias en el tipo de ramo y en las yemas muestreadas. Sin embargo, el aumento consistente de la longitud del eje de esas yemas en el presente estudio no fué observado por aquellos autores.

Las yemas distales (procedentes del 3° ó 4° nudo bajo el ápice) se han formado sucesivamente desde primavera (muestreo de junio/julio) hasta la primera mitad del verano (muestreos de octubre y diciembre) (Fig.1.5) Durante su formación los árboles estuvieron expuestos a los fotoperiodos más largos (anteriores y posteriores al solsticio de verano). También las yemas de los árboles ON se desarrollaron durante un periodo de fuerte competencia por asimilados entre los brotes portadores de las mismas y los frutos en desarrollo situados en los ramos basípetos del año anterior. En estas circunstancias los ramos de los árboles OFF (en todos los muestreos) y los de los árboles ON (en el muestreo de julio) presentaron una mayor proporción de yemas con 5 nudos (Fig.1.6), lo que sugiere una influencia de la mayor longitud del fotoperiodo en el aumento del número de nudos y una influencia de la carga de frutos en la reducción del número de nudos de las yemas de los árboles ON correspondientes a los muestreos de octubre y diciembre. Estas yemas se formaron durante la primera mitad del verano

(Fig.1.5), periodo que se corresponde con una fuerte competencia por asimilados entre órganos vegetativos y reproductores (Rallo y Suárez, 1989).

Las dimensiones de las yemas distales también parecen reflejar la influencia de los mismos factores (exógenos y endógenos) durante su desarrollo. Todas las dimensiones de las yemas son mayores en los árboles OFF que en los árboles ON y las diferencias se acentúan entre el muestreo de junio/julio y los de octubre y diciembre (Figs. 1.7 y 1.8), en correspondencia con la variación de la competencia por asimilados entre órganos vegetativos y reproductores en los árboles ON. Por otro lado, apenas se observan diferencias en las dimensiones de las yemas de los árboles OFF entre las tres fechas de muestreo, lo que pudiera estar relacionado con el establecimiento precoz de algún tipo de latencia en las yemas de los árboles OFF, tal como también sugerían los datos del número de nudos antes reseñados. La elongación del eje de las yemas de los árboles OFF señalada por Pinney y Polito (1990), no se observó en este estudio, ya que las yemas distales de los árboles OFF mostraron un ligero aumento de junio a octubre en ambas longitudes H1 y H2, pero disminuyeron de nuevo en diciembre.

En resumen, las diferencias reseñadas en estudios previos parecen estar justificadas por el momento y el muestreo efectuados en los mismos y subrayan la necesidad de estandarizar las condiciones del muestreo para estudios comparativos.

2. Establecimiento y eliminación de la endolatenia en yemas de olivo

Los experimentos de Rallo y Martin (1991) han mostrado que la brotación de las yemas reproductoras del olivo aumenta con la acumulación de frío, variando el porcentaje máximo de brotación según la carga de los árboles el año anterior, mucho mayor cuando los árboles estuvieron en fase de descarga en el año previo. En base a estos resultados, concluían que la acumulación de frío invernal era necesaria para la salida del reposo (eliminación de la endolatenia) de las yemas reproductoras.

Trabajos posteriores de Rallo y sus colaboradores (Torreño, 1993; Rallo *et al.*, 1994; Relano, 1996; Ruiz, 1996) han confirmado que hay un periodo desde mediados de enero hasta mediados de febrero (variable con el cultivar y el año) en el cual la brotación de yemas reproductoras y el intervalo de temperaturas favorables a la brotación aumentan. Este tiempo se ha designado **periodo de salida del reposo**. Sin embargo, en todos estos experimentos se inició el muestreo en otoño avanzado y se suponía que las yemas estaban ya en reposo (endolatenia).

La endolatenia ha sido exhaustivamente estudiada en las yemas de frutales caducifolios y de coníferas y en las semillas. El criterio más frecuente para determinar el establecimiento y la eliminación de la endolatenia es el tiempo de brotación o germinación en condiciones ambientales favorables al crecimiento (Saure, 1985; Powell, 1987; Bradford, 1996; Crabbé y Barnola, 1996; Hilhorst *et al.*, 1996; MacDonald, 1996; Seeley, 1994; 1996). En la generalidad de las especies caducifolias, cuando las yemas no brotan a temperaturas entre 20 y 25°C en **2** (Aschcroft *et al.*, 1977; Couvillon y Erez, 1985) ó **3** semanas (Shaltout y Unrath, 1983; Scalabrelli *et al.*, 1992), se considera que están en endolatenia. Como en algunas especies el porcentaje de brotación es bajo, la rapidez de la brotación es un indicador más preciso para determinar la eliminación de la endolatenia (Saure, 1985).

La decapitación del ramo y la defoliación (hasta la caída natural de las hojas)

son necesarias para eliminar los efectos correlativos del ápice (dominancia apical) y de las hojas (inhibición correlativa) (Saure, 1985; Crabbé y Barnola, 1996), que son casos de paratencia (Lang, 1987). Aunque Rallo y Martín (1991), Torreño (1993), Rallo *et al.* (1994), Relaño (1996) y Ruiz (1996) notasen un aumento de la velocidad de la brotación en el periodo de salida del reposo en estaquillas decapitadas, el criterio de la defoliación no se ha comprobado.

El presente estudio trata de establecer una metodología para determinar el periodo de reposo (endolencia) en el olivo y los factores que, aislada o asociadamente a la acumulación de frío invernal, juegan algún papel en ese proceso.

2.1. Material y métodos

Los ramos para la preparación de las estaquillas para este ensayo procedieron del olivar del CIFA (Centro de Investigación y Formación Agraria) de Córdoba, descrito en el apartado 1.1 del capítulo anterior.

2.1.1. Preparación de las estaquillas

Las estaquillas se prepararon a partir de ramos del año de la siguiente forma:

- **en el campo:**
 - los ramos se cogieron uno a uno (preferentemente en la zona media de la copa, evitando los muy vigorosos o débiles) y se colocaron de inmediato en un recipiente con agua, para evitar su deshidratación.
- **en el laboratorio:**
 - cada ramo se decapitó, eliminándose el ápice y el nudo subapical (Fig. 2.1). Cuando el ramo estaba en crecimiento activo, se eliminaban más nudos, es decir, toda la parte superior del ramo con las hojas no totalmente expandidas;
 - se eliminaron las hojas y las yemas de todos los nudos, excepto de los nudos superiores de la estaquilla (1 ó 3, según el experimento) (Fig. 2.1);

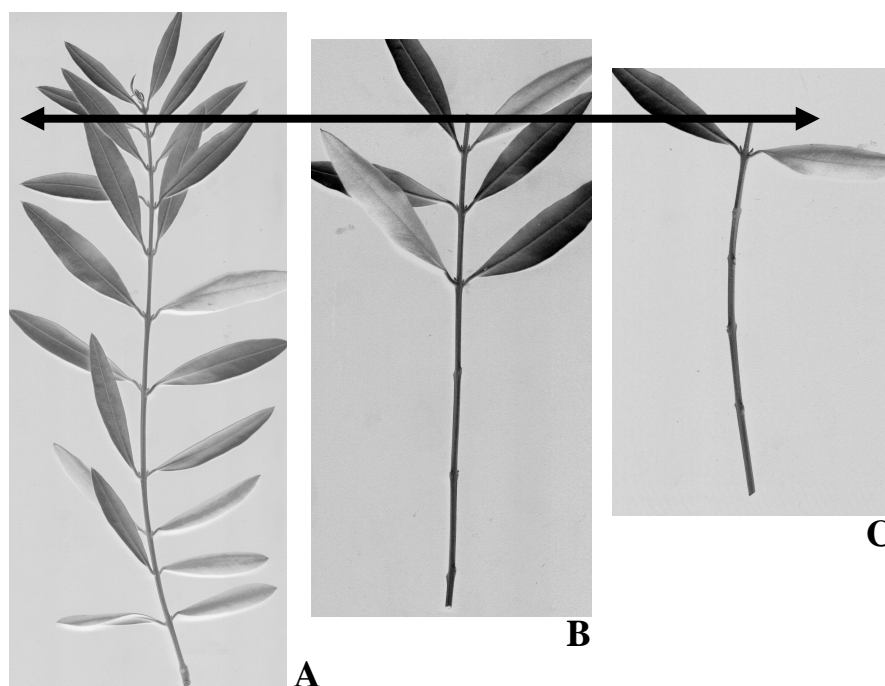


Figura 2.1 – Preparación de las estaquillas. La doble flecha identifica la zona de decapitación del ramo. A: Ramo del año. B: Estaquilla con 3 nudos. C: Estaquilla uninodal

- se eliminó la parte basal sobrante de la estaquilla, dejando solamente cerca de 10cm de tallo sin hojas ni yemas (Fig.2.1). Este corte se efectuó bajo agua para evitar la cavitación en los vasos xilemáticos;
- las estaquillas preparadas de esta forma se trataron con 200ppm de sulfato neutro de oxiquinoleína, un producto con actividades fungicida y bactericida.

3.1.1. Tratamientos

El muestreo de los ramos en el campo se realizó en árboles en carga (ON), es decir con cosecha abundante y en descarga (OFF), o sea con escasa o nula cantidad de frutos. La mitad de las estaquillas de cada tipo de árbol (ON y OFF) se defoliaron. De este modo, en cada fecha de muestreo se establecieron los siguientes tratamientos:

- árboles en carga (ON) – estaquillas con hojas;
- árboles en carga (ON) – estaquillas defoliadas;
- árboles en descarga (OFF) – estaquillas con hojas;
- árboles en descarga (OFF) – estaquillas defoliadas.

Las fechas de muestreo, que corresponden a diferente acumulación de frío invernal), el número de árboles muestreadas, el número de nudos en las estaquillas, las condiciones del forzado y el diseño experimental variaron con el experimento:

- **campaña de 1995/96:**
 - muestreos semanales, desde 16 de noviembre de 1995 hasta 1 de marzo de 1996, en 2 árboles (uno OFF y otro ON en 1995);
 - estaquillas uninodales;
 - forzado en cámara de crecimiento a 30°C, en sustrato de perlita húmeda (en bandejas cubiertas con plástico, para evitar las pérdidas de agua por evaporación), con 12 horas de iluminación;
 - diseño en bloques al azar con 4 repeticiones (parcela elemental: 5 estaquillas por repetición).
- **campaña de 1996/97:**
 - muestreos mensuales, desde junio de 1996 hasta febrero de 1997, en 8 árboles (cuatro OFF y cuatro ON en 1996);
 - estaquillas con 3 nudos;
 - forzado en cámara de crecimiento a 20°C, en sustrato de perlita húmeda, con 12 horas de iluminación y humedad relativa superior o igual a 80%;
 - diseño en bloques al azar con 3 repeticiones (parcela elemental: 4 estaquillas por repetición, siendo una estaquilla procedente de cada árbol muestreada).

Al final de **3** (campaña de 1995/96) ó **4** (campaña de 1996/97) semanas en las condiciones de forzado, se contaron las yemas brotadas. Éstas se clasificaron como vegetativas cuando produjeron hojas o cuyo par de brácteas basales hubiese elongado y como reproductoras cuando produjeron inflorescencias o cuando mostraron elongación en el entrenudo basal, de forma similar al inicio del estado fenológico **B** de Colbrant (1972).

2.2. Resultados

Cuando las estaquillas se defoliaron, la brotación de las yemas en las condiciones del ensayo realizado en la campaña de 1995/96 (estaquillas uninodales y temperaturas altas) fué muy elevada durante todo el otoño/invierno, con independencia del tipo de árbol (Fig. 2.2). En las estaquillas con hojas la brotación fué más irregular. La desaparición del efecto de la presencia de las hojas ocurrió en la primera mitad de febrero en los árboles en descarga (OFF) y a principios de marzo en los árboles en carga (ON).

En 1995/96, la brotación fué de naturaleza vegetativa hasta mediados de enero (Fig. 2.2). A partir de esta época, aumentó progresivamente la brotación de naturaleza reproductora, pero de forma distinta según el tipo de árbol. En las yemas de los árboles en descarga (OFF) la brotación reproductora en las yemas aumentó de una forma

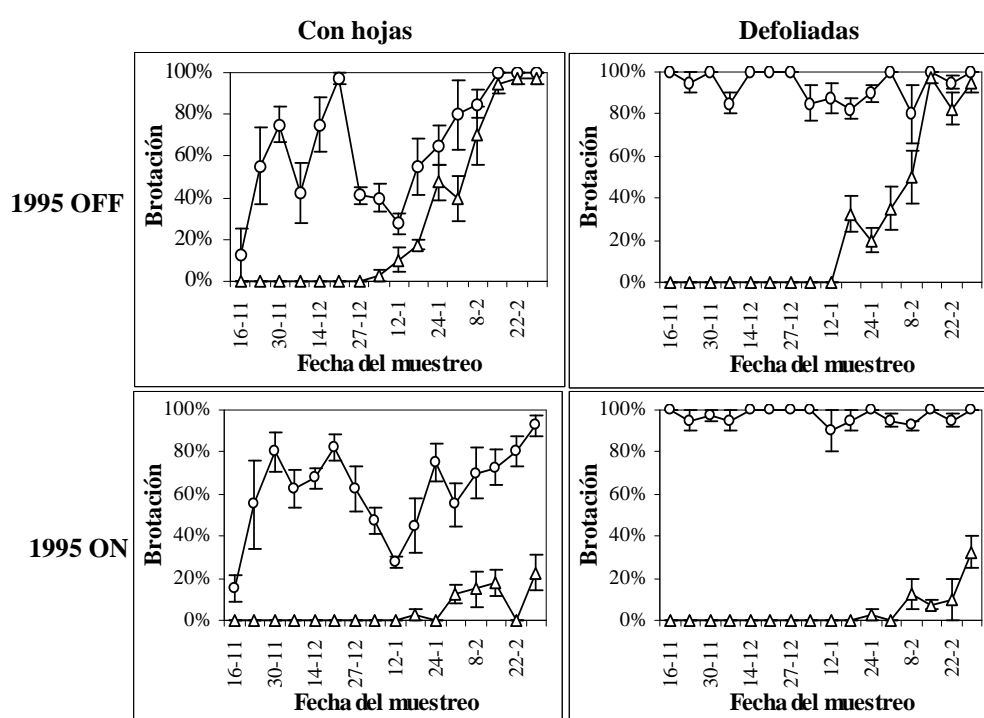


Figura 2.2 – Brotación total (círculos) y reproductora (triángulos) en 1995/96. El crecimiento de las estaquillas con hojas (izquierda) o defoliadas (derecha), muestreadas de árboles en descarga (arriba) y en carga (abajo) se forzó durante 3 semanas a 30°C

continuada una forma continuada desde mediados de enero hasta mediados de febrero, fecha en que alcanzó la práctica totalidad de las yemas, con independencia de la defoliación. En las yemas de los árboles en carga (ON), la brotación reproductora en las yemas fué generalmente baja.

La brotación de las yemas en las condiciones del ensayo realizado en la campaña de 1996/97 (estaquillas con 3 nudos y temperaturas moderadas) estuvo también influida por la presencia o ausencia de las hojas, pero de forma diferente según el tipo de árbol (Fig. 2.3). La brotación de las yemas de las estaquillas defoliadas procedentes de los árboles en descarga (OFF) en 1996 fué relativamente alta en junio, descendió suavemente durante los meses de verano, aumentó puntualmente en septiembre y disminuyó de nuevo de una forma acusada hasta diciembre. En enero empezó a subir hasta alcanzar en febrero la brotación máxima. La brotación de las yemas de las estaquillas defoliadas procedentes de los árboles en carga (ON) en 1996 presentó

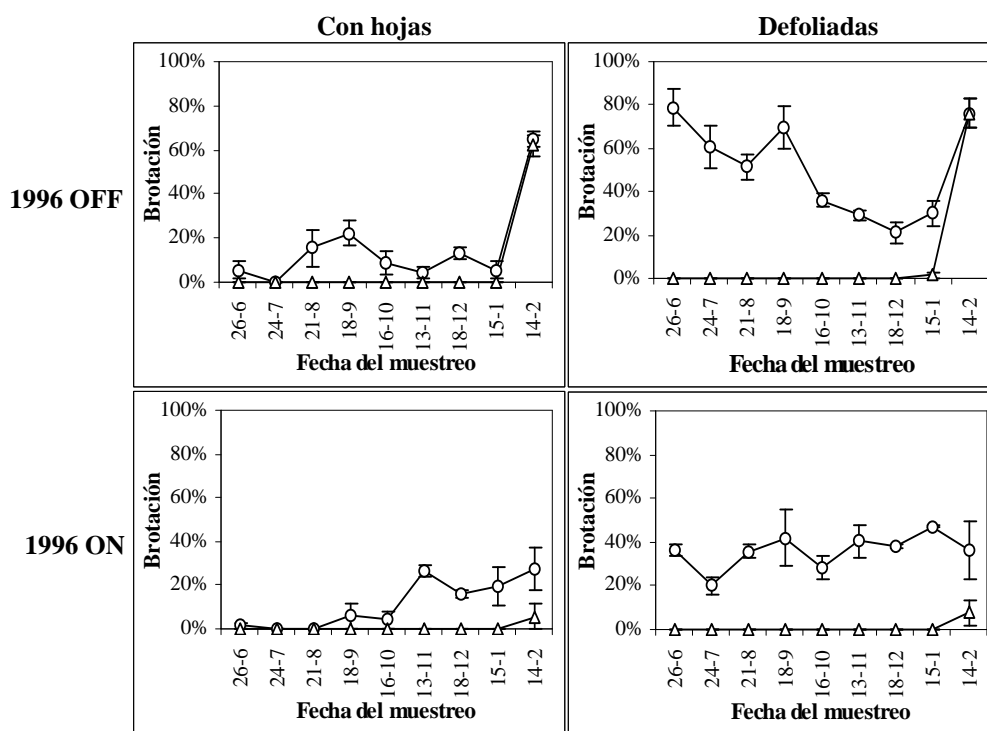


Figura 2.3 - Brotación total (círculos) y reproductora (triángulos) en 1996/97. El crecimiento de las estaquillas con hojas (izquierda) o defoliadas (derecha), muestreadas de árboles en descarga (arriba) y en carga (abajo) se forzó durante 4 semanas a 20°C

mínimos en julio y octubre, pero la tendencia general de la brotación fué uniforme a lo largo del tiempo. En ambos tipos de árbol, la brotación fué en general baja en presencia de las hojas hasta enero.

En 1996/97, el efecto de la defoliación en las yemas de los árboles en descarga (OFF) desapareció entre mediados de enero y mediados de febrero, en correspondencia con el aumento de la brotación reproductora (Fig. 2.3). En las yemas de los árboles en carga (ON), el efecto de la defoliación solamente se anuló a mediados de febrero, la brotación total no aumentó y la brotación reproductora en las yemas fué muy baja.

2.3. Discusión

Las diferencias en el porcentaje máximo de brotación de yemas de naturaleza reproductora fueron determinadas por la carga del árbol. Este resultado fué consistente en ambos experimentos, independientemente de la diferencia en las condiciones del forzado. Solamente los árboles en descarga (OFF) en el año previo presentaron brotación elevada de yemas reproductoras, como había sido observado por Rallo y Martín (1991), poniendo en evidencia el conocido hábito alternante del olivo (vecería).

Las yemas de los árboles en descarga (OFF), contrariamente a las de los árboles en carga (ON), pasan por un periodo de endolencia, y solamente expresan su naturaleza reproductora tras la acumulación de frío. De esta forma, parece que la endolencia y la acumulación de frío para la eliminación de la endolencia son factores críticos en la expresión de la naturaleza reproductora de las yemas de los árboles OFF en el año previo. Estos resultados confirman el periodo de reposo (endolencia) en las yemas de los árboles en descarga el año previo, propuesto por Rallo y Martín (1991), Torreño (1993), Rallo *et al.* (1994), Relano (1996) y Ruiz (1996) en sus experimentos y la mayor tendencia de las yemas de los árboles ON para crecer continuamente hasta diciembre, que se observó en el capítulo anterior.

La defoliación promueve la brotación de las yemas durante todo el periodo del muestreo en los árboles ON. En los árboles OFF, ese efecto solamente ocurre hasta enero. La defoliación incrementó la brotación vegetativa, pero no afectó a la brotación de naturaleza reproductora. El efecto de la presencia o ausencia de las hojas sobre la

brotación de las yemas de estaquillas de olivo no había sido estudiado hasta la fecha. Además, ese efecto ocurrió durante todo el verano/otoño y parte del invierno, *desapareciendo más tempranamente en las yemas de los árboles en descarga en el año previo (OFF), en las cuales la brotación fué de naturaleza reproductora, a la salida del reposo*. El efecto inhibidor de las hojas (que sería un caso de paratencia - Lang, 1987) es común entre los frutales caducifolios durante el verano (Powell, 1987; Crabbé y Barnola, 1996) y ha sido referido también en mango por Núñez-Elisea y Davenport (1995).

Las temperaturas elevadas (30°C) también presentaron un efecto de promoción de la brotación de naturaleza vegetativa, *pero en las yemas de los árboles en descarga en el año previo (OFF) ese efecto disminuyó a medida que se acumuló frío para la salida del reposo, no afectando la brotación de naturaleza reproductora*. Además de la temperatura de forzado, el tipo (número de nudos) de estaquilla fué también responsable por la diferencia observada entre los niveles máximos de la brotación total en las dos campañas, por dominancia apical o acrotonía en la brotación. Sin embargo, en ambos casos la brotación reproductora representó el 100% de la brotación total a mediados de febrero. De esta forma, queda clara la necesidad de estandarizar las metodologías de muestreo, en el tipo de estaquilla y en las condiciones de forzado en estudios futuros.

3. Efecto de las condiciones de forzado y de la carga del árbol sobre la pauta de la brotación de yemas según la acumulación de frío invernal

El olivo es una planta perenifolia típica de las regiones mediterráneas que frutifica en las yemas axilares de los ramos del año anterior. Como las yemas de olivo permanecen morfológicamente indiferenciadas hasta finales del invierno (King, 1938; Almeida, 1940; Hackett y Hartmann, 1963; Troncoso, 1967; 1968) y la acumulación de frío invernal tiene una influencia positiva en la cantidad de inflorescencias (Hartmann, 1953; Hartmann y Porlingis, 1957; Hackett y Hartmann, 1963; 1964; 1967; Milella y Deidda, 1968; Badr y Hartmann, 1971; Hartmann y Whisler, 1975), se ha propuesto durante mucho tiempo un ciclo reproductor anual para esta especie, siendo el frío invernal el factor responsable de la inducción floral. Sin embargo, Hartmann y Whisler (1975) no pudieron relacionar el hábito alternante del olivo con las necesidades de frío.

La producción de los árboles en un determinado año es el principal factor responsable de la variación de la producción en el año siguiente (Rallo *et al.*, 1994). Este efecto de la carga de un año sobre la producción del año siguiente es la causa del conocido fenómeno de alternancia o vecería del olivo y sugiere ya un ciclo reproductor bienal en esta especie. Aunque la vecería pueda tener variadas causas y orígenes (Almeida, 1940; Milella, 1984; Vargas, 1993), esta alternancia de producción está asociada fundamentalmente a la variación de la floración en años consecutivos (Vargas, 1993) y estaría, por consiguiente, determinada por aquellos factores que afectan a la inducción floral y al desarrollo de las correspondientes yemas.

Otros experimentos evidencian el carácter bienal del ciclo reproductor. Lavee *et al.* (1986) han asociado la presencia de frutos desde una fecha posterior y próxima a la floración con una elevación duradera de los niveles del ácido clorogénico en hoja, en contraposición con bajos niveles en caso de ausencia de frutos y eliminación de las

inflorescencias o de los frutos recién cuajados. Como estos tratamientos estuvieron relacionados con la ausencia o presencia de floración al año siguiente, respectivamente, estos autores han sugerido un papel inhibitor del ácido clorogénico en la floración.

Lavee y Avidan (1982, cit. Rallo *et al.*, 1994), Navarro *et al.* (1990) y Fernandez-Escobar *et al.* (1992) han podido comprobar también que la eliminación de los frutos solamente tenía efecto positivo en la floración del año siguiente cuando se efectuó antes de 6-8 semanas después de plena floración, coincidiendo con la fase de endurecimiento del endocarpo (hueso), lo que ocurre aproximadamente durante el mes de julio en el hemisferio norte.

Se ha podido, además, comprobar un efecto negativo de la aplicación de giberelinas desde mayo hasta noviembre (2 a 28 semanas después de la plena floración) sobre la floración del año siguiente (Navarro *et al.*, 1990; Fernandez-Escobar *et al.*, 1992). Aplicaciones en febrero incrementan la longitud de las inflorescencias, pero no reducen su número (Navarro *et al.*, 1990; Fernandez-Escobar *et al.*, 1992; Lavee y Haskal, 1993). Lavee y Avidan (1994) proponen que las giberelinas producidas en los embriones en crecimiento inducen cambios metabólicos en las hojas, llevando a la síntesis del ácido clorogénico, en un proceso de inhibición por "realimentación" ("feedback"). Como la eliminación de las semillas antes del endurecimiento del endocarpo (manteniendo una elevada cantidad de frutos en el árbol) permite una floración abundante en el año siguiente (Stutte y Martin, 1986b; Fernandez-Escobar *et al.*, 1992) se ha propuesto una relación directa entre las giberelinas producidas en las semillas y la inhibición de la inducción floral (Navarro *et al.*, 1990; Fernandez-Escobar *et al.*, 1992).

Otras evidencias experimentales, como la diferencia de tamaño (expresado en peso seco) de las yemas y en los contenidos de ARN entre árboles con y sin frutos, en los meses de julio y agosto (Navarro *et al.*, 1990), el efecto negativo del sombreado a partir de julio sobre la floración del año siguiente (Tombesi y Cartechini, 1986) o el aumento de los niveles de ARN y ADN en la zona central del meristemo apical entre mediados de octubre y mediados de noviembre (Pinney y Polito, 1990) apoyan la idea de una regulación de la inducción floral a partir del año anterior a la floración.

Se ha observado, por otra parte, una brotación creciente y más rápida de yemas reproductoras con la acumulación de frío invernal en estaquillas ubicadas en ambientes

favorables al crecimiento (Rallo y Martin, 1991). Esta pauta fué común en ramos procedentes de árboles con niveles alto y bajo de carga en la cosecha inmediatamente anterior, si bien los niveles máximos de brotación de yemas florales fué mayor en los ramos de las últimas. Observaciones posteriores (Torreño, 1993; Rallo *et al.*, 1994; Relaño, 1996; Ruiz, 1996) han confirmado esta pauta de brotación, por lo que se ha propuesto un papel del frío invernal en la salida del reposo (endolancia) de las yemas inducidas.

En las condiciones de Córdoba, el periodo desde mediados de enero hasta mediados de febrero (variable con el cultivar y el año) en el cual la brotación reproductora y el intervalo de temperaturas favorables a la brotación aumentan se ha designado **periodo de salida del reposo** (Torreño, 1993; Rallo *et al.*, 1994; Relaño, 1996; Ruiz, 1996). Sin embargo, Rallo *et al.* (1994) y Ruiz (1996) no han podido establecer ninguna relación consistente entre las fechas de salida del reposo y los tres modelos más utilizados para cuantificar las necesidades en frío en el olivo: a) nº de horas con temperaturas $\leq 7,5^{\circ}\text{C}$; b) nº de horas con temperaturas $\leq 12,5^{\circ}\text{C}$ y c) nº de días de frío efectivo. Estos últimos son los días con temperaturas mínimas entre 2 y 7 °C y máximas entre 12,5 y 23,5°C (Hartmann y Whisler, 1975).

El ciclo bienal del olivo está, hoy día, generalmente aceptado, pero el papel del frío invernal no está, todavía, completamente esclarecido. ¿Sirve para: a) completar las necesidades de la inducción floral; b) determinar la salida del reposo (endolancia) de las yemas previamente inducidas o c) interviene en ambos procesos? El presente experimento profundiza en esta cuestión.

3.1. Material y métodos

El muestreo de los ramos para la preparación de las estaquillas de este ensayo se realizó en el olivar del CIFA (Centro de Investigación y Formación Agraria) "Alameda del Obispo" de Córdoba, descrito en el apartado 1.1. La preparación de las estaquillas con 3 nudos con hojas y defoliadas se efectuó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 2.1.1 (Fig. 2.1 - B).

Los muestreos se realizaron en dos campañas consecutivas, 1996/97 y 1997/98,

en 8 árboles (cuatro OFF y cuatro ON en el año anterior). Los muestreos (cantidad de acumulación de frío invernal) y algunas condiciones de los tratamientos variaron con el experimento:

- **campaña de 1996/97:**

- muestreos desde 17 de octubre de 1996 hasta 20 de febrero de 1997, siendo 3 mensuales (octubre, noviembre y diciembre) y 4 quincenales (2 en enero y 2 en febrero), en árboles en carga (ON) y en descarga (OFF) en 1996. Estos tratamientos se designan por ON y OFF, respectivamente, en el texto que sigue;
- forzado en cámara de crecimiento a 12,5, 20 y 30°C, en sustrato de perlita húmeda, con 12 horas de iluminación y humedad relativa superior a 60%;
- tiempo de observación (variable con la temperatura): 2 semanas a 30°C; 4 semanas a 20°C; hasta la brotación a 12,5°C.

- **campaña de 1997/98:**

- muestreos desde 12 de diciembre de 1997 hasta 20 de febrero de 1998, siendo 1 mensual (diciembre) y 4 quincenales (2 en enero y 2 en febrero), solamente en árboles en descarga (OFF) en 1997. Este tratamiento se designa por OFF en el texto que sigue;
- forzado en cámara de crecimiento a 15, 20 y 30°C, en sustrato de perlita húmeda, con 12 horas de iluminación y humedad relativa superior a 60%;
- tiempo de observación (variable con la temperatura): 2 semanas a 30°C; 4 semanas a 15 y a 20°C.

Ambos experimentos se realizaron según un diseño en bloques al azar con 3 repeticiones y con 4 estaquillas por repetición (1 estaquilla procedente de cada árbol muestreada). Al final del tiempo de forzado, se contaron las yemas brotadas. En éstas, se clasificaron como vegetativas las yemas que produjeron hojas o cuyo par de brácteas basales hubiese elongado y como reproductoras las que produjeron inflorescencias o que, por lo menos, hayan elongado el entrenudo basal, de forma similar al inicio del estado fenológico **B** de Colbrant (1972). La brotación de las yemas de las estaquillas con hojas de los árboles sin frutos (OFF), forzadas a 20°C, se ha considerado como testigo de los demás tratamientos realizados en la misma fecha (igual cantidad de frío acumulado) (Rallo y Martín, 1991; Torreño, 1993; Rallo *et al.*, 1994; Relaño, 1996;

Ruiz, 1996).

En 1996/97 se analizaron anatómicamente yemas puestas en las diversas condiciones de brotación. Los ramos de árboles en carga (ON) y en descarga (OFF) durante 1996 se muestrearon el 9 de enero y el 7 de febrero de 1997. A partir de los ramos muestreados el 9 de enero se prepararon estaquillas uninodales con hojas según el método descrito en el apartado 2.1.1 (Fig. 2.1 - C). Estas estaquillas (con hojas) se colocaron en las cámaras de crecimiento en las condiciones de forzado de los tratamientos: 12,5; 20 y 30°C. En cada tipo de árbol (ON y OFF) y para cada temperatura (12,5; 20 y 30°C) se fijaron 10 nudos correspondientes a los siguientes muestreos secuenciales:

- **fecha de 9 de enero (F1):**
 - F1+0: testigo;
 - F1+3: yemas muestradas tras 3 días en forzado;
 - F1+9: yemas muestradas tras 9 días en forzado;
- **fecha de 7 de febrero (F2):**
 - F2+0: testigo;

El procedimiento de fijación de los nudos portadores de yemas en FAE, el corte de las yemas, la deshidratación e inclusión en parafina, el corte en el micrótopo rotativo, el montaje y las tinciones de las muestras se realizaron del modo anteriormente descrito en el apartado 1.1. También se utilizaron en este estudio yemas muestradas en otoño (antes del reposo invernal) y utilizadas en el capítulo anterior para comparación con su desarrollo posterior.

3.2. Resultados

3.2.1. Brotación

La brotación de las yemas de las estaquillas con hojas de **árboles OFF** en 1996 (Fig. 3.1), forzadas a 20°C (testigo), fué escasa o nula hasta la primera mitad de enero, fecha a partir de la cual se observó un fuerte incremento de la brotación, que fué totalmente reproductora (Fig. 3.1). Cuando la brotación se efectuó a 12,5°C fué muy lenta y relativamente escasa en el otoño, pero aumentó gradualmente y fué más rápida con la acumulación de frío invernal (Fig. 3.1 y Tabla 3.1). El mayor incremento del porcentaje de yemas brotadas a 12,5°C ocurrió desde mediados de diciembre hasta la primera mitad de enero. En cualquiera de las fechas muestreadas, toda la brotación observada a esta temperatura fué reproductora (Fig. 3.1), como había ocurrido en el testigo (20°C). Cuando el forzado se efectuó a 30°C, ocurrió brotación vegetativa hasta finales de enero y solamente después de la primera mitad de febrero la brotación aumentó acusadamente y fué reproductora (Fig. 3.1).

La defoliación de las estaquillas procedentes de árboles OFF en 1996 (Fig. 3.1) provocó un aumento de la brotación total, que fué vegetativa hasta que se acumuló suficiente frío. A partir de este momento, que fué posterior con el aumento de las temperaturas de forzado, se incrementó gradualmente la brotación reproductora hasta representar la práctica totalidad de la brotación cuando se produjo la completa salida del reposo. Esto ocurrió en la segunda mitad de enero a 12,5°C y en la segunda mitad de febrero a 20 y a 30°C, épocas en las cuales los porcentajes máximos de brotación reproductora fueron similares en las estaquillas con y sin hojas. La Tabla 3.1, que se refiere a estaquillas forzadas a 12,5°C, evidencia que la brotación de yemas fué más rápida con la acumulación de frío y que la defoliación anticipó, en general, la brotación de las yemas.

La brotación reproductora de las estaquillas de **árboles ON** fué siempre muy baja, incluso con forzado a bajas temperaturas y suficiente acumulación de frío invernal (Fig. 3.2). La brotación vegetativa aumentó con la temperatura de forzado y con la defoliación (Fig. 3.2). En ambos tipos de estaquillas (con hojas y defoliadas) el efecto de la fecha de muestreo (acumulación de frío) fué algo errático, aunque se apreció una

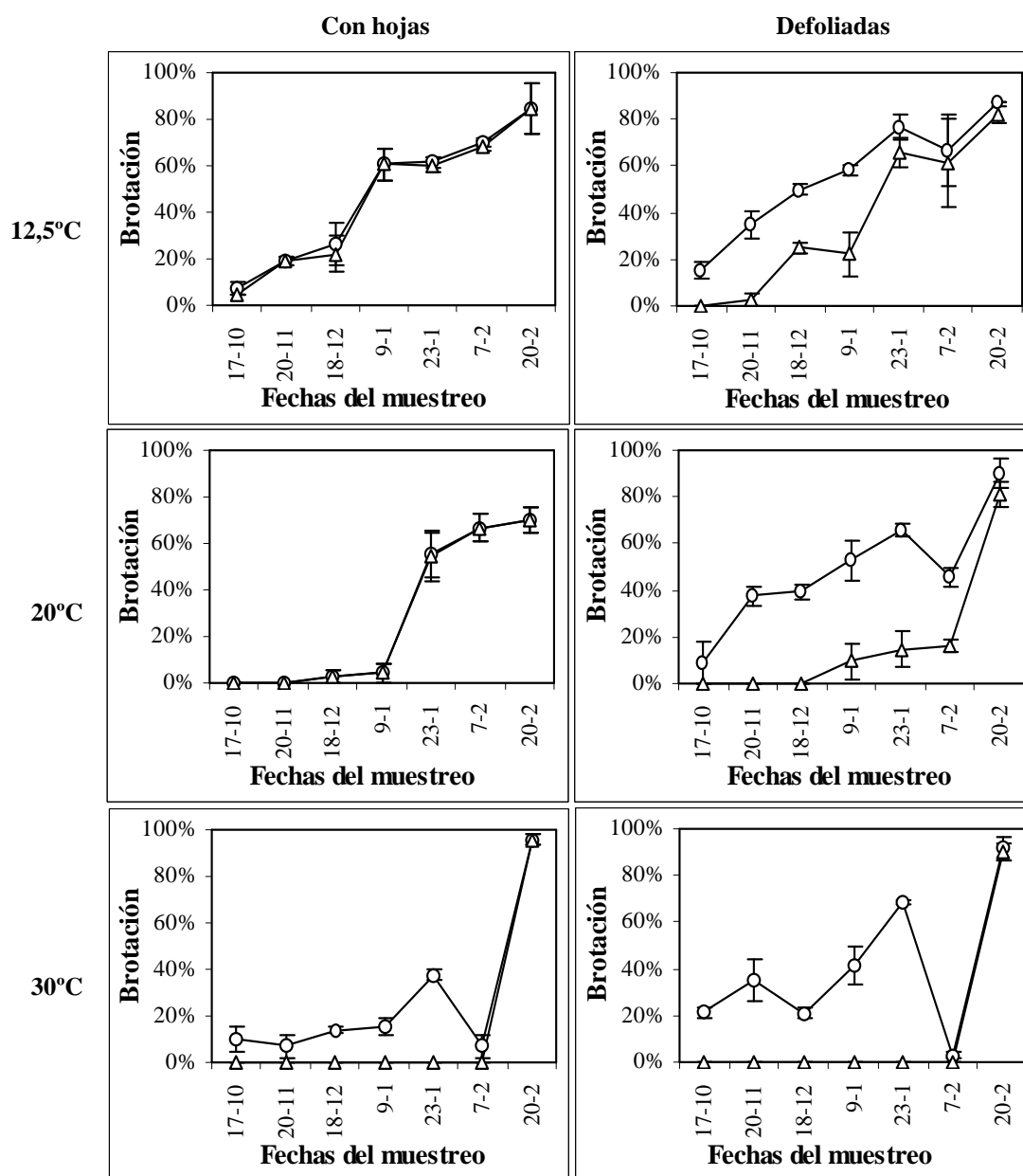


Figura 3.1 – Brotación total (círculos) y reproductora (triángulos) en estaquillas con hojas (izquierda) y defoliadas (derecha) de árboles sin frutos (OFF) en 1996, cuando se forzaron por tiempo variable a 12,5°C (arriba), durante 4 semanas a 20°C (en medio) y durante 2 semanas a 30°C (abajo)

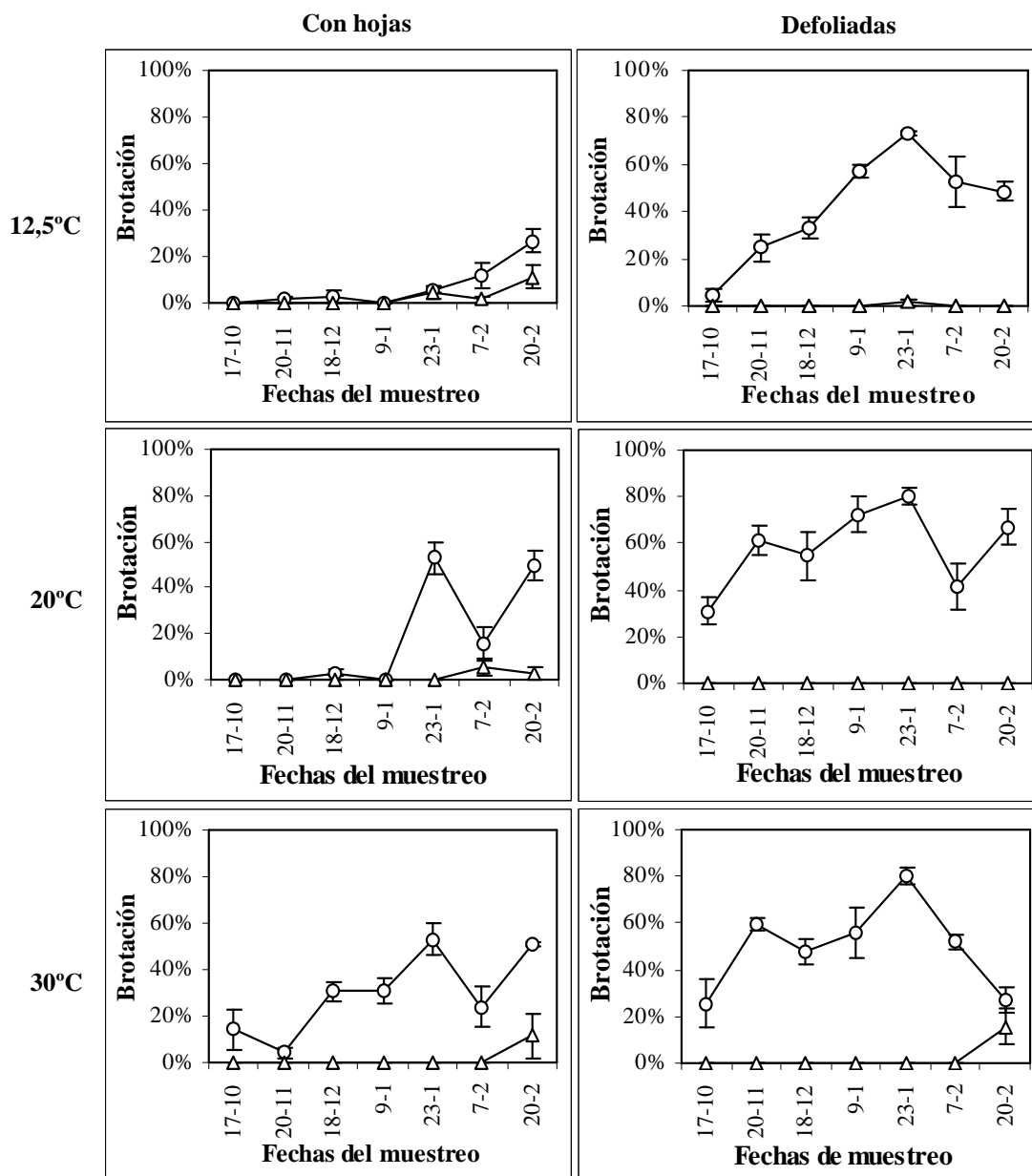


Figura 3.2 – Brotación total (círculos) y reproductora (triángulos) en estaquillas con hojas (izquierda) y defoliadas (derecha) de árboles con frutos (ON) en 1996, cuando se forzaron por tiempo variable a 12,5°C (arriba), durante 4 semanas a 20°C (en medio) y durante 2 semanas a 30°C (abajo)

Tabla 3.1 – Semanas entre la fecha del muestreo y la brotación vegetativa o reproductora en 1997 de las primeras yemas de las estacas forzadas a 12,5°C

Fecha del muestreo	Árboles OFF en 1996				Árboles ON en 1996			
	Estaquilla		Estaquilla		Estaquilla		Estaquilla	
	s con hojas		s defoliadas		s con hojas		s defoliadas	
	Reprod.	Veget.	Reprod.	Veget.	Reprod.	Veget.	Reprod.	Veget.
17 oct 96	18	--	--	10	--	--	--	--
20 nov 96	12	--	7	6	--	11	6	--
18 dic 96	7	11	5	5	--	8	4	--
09 ene 97	4	--	3	4	--	--	4	--
23 ene 97	2	8	2	3	8	8	4	3
07 feb 97	1	6	1	4	5	4	3	--
20 feb 97	0	--	0	4	1	2	3	3

mayor brotación con la acumulación de frío invernal, en particular hasta la segunda mitad de enero con la defoliación o cuando se forzó a la temperatura más elevada (30°C). La Tabla 3.1, que se refiere a estaquillas forzadas a 12,5°C, evidencia que la brotación de yemas de los árboles ON fué más rápida con la acumulación de frío y que la defoliación anticipó, en general, la brotación de las yemas, tal como ocurrió en los árboles OFF.

En la campaña de **1997/98**, la brotación de las yemas de las estaquillas con hojas (Fig. 3.3) aumentó gradualmente con la acumulación de frío invernal (fecha del muestreo) y fué reproductora. Contrariamente a lo ocurrido en la campaña de 1996/97 (Fig. 3.1), la temperatura de forzado a 30°C no incrementó la brotación vegetativa. La brotación reproductora de las estaquillas forzadas a 15°C ocurrió en las muestras de la primera mitad de enero, mientras a 20 y a 30°C esa brotación solamente empezó a aumentar en las correspondientes a la segunda mitad de enero.

La defoliación (Fig. 3.3) incrementó la brotación vegetativa, pero apenas afectó a la brotación reproductora. La influencia de la defoliación en el incremento de la brotación vegetativa se prolongó con el aumento de la temperatura de forzado: hasta la primera mitad de enero a 15°C; hasta la segunda mitad de enero a 20°C; hasta la primera mitad de febrero a 30°C.

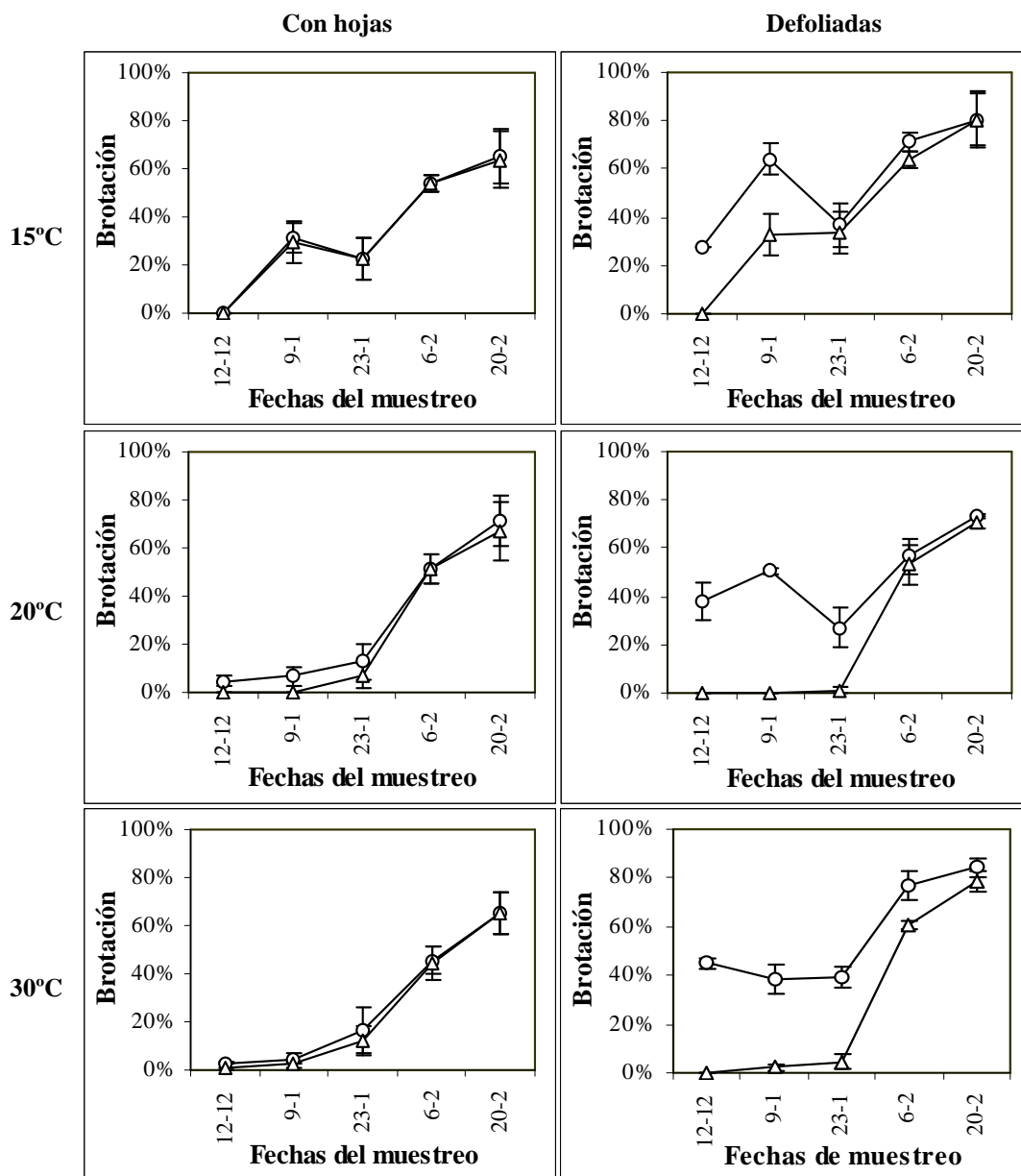


Figura 3.3 – Brotación total (círculos) y reproductora (triángulos) en estaquillas con hojas (izquierda) y defoliadas (derecha) de árboles sin frutos (OFF) en 1997, cuando se forzaron durante 4 semanas a 15°C (arriba) y a 20°C (en medio) y durante 2 semanas a 30°C (abajo)

3.2.2. Observaciones anatómicas

3.2.2.1. Estatus de las yemas en campo

El aspecto estructural de las yemas en los momentos del muestreo de los ramos en campo fué distinto entre las yemas de árboles OFF (Fig. 3.4 - A y C) y ON (Fig. 3.4 - B y D) en 1996. En la primera fecha del muestreo (9 de enero), las yemas de los árboles ON presentaron un meristemo apical plano y aparentemente inactivo (Fig. 3.4 - B), mientras las correspondientes yemas de los árboles OFF mostraron una forma redondeada del meristemo apical y la presencia de un meristemo axilar en el tercer nudo (Fig. 3.4 - A). En la segunda fecha del muestreo (7 de febrero), las yemas de los árboles ON en 1996 siguieron presentando un meristemo plano y aparentemente inactivo (Fig. 3.4 - D), mientras las correspondientes yemas de los árboles OFF en 1996 mostraron una intensa actividad morfogénica, indicada en particular por el gran desarrollo de las estructuras axilares (Fig. 3.4 - C).

3.2.2.2. Desarrollo en condiciones de forzado

El desarrollo anatómico de las yemas muestreadas el 9 de enero estuvo influido por la temperatura y por la carga del árbol (OFF u ON) en el año anterior (Fig. 3.5). En las yemas de los árboles OFF, la actividad de los meristemos axilares del tercer nudo se inició pronto tanto a temperaturas bajas (12,5°C) como moderadas (20°C), originando un primordio axilar (Fig. 3.5 - A), mientras que a temperaturas altas (30°C) no se observó ninguna variación, incluso después de 9 días en el forzado (Fig. 3.5 - C vs. Fig. 3.4 - A). El meristemo apical continuó con forma abombada en el centro (Fig. 3.5 - A y C). En las yemas de los árboles ON en 1996 el meristemo apical continuó plano (Fig. 3.5 - B y D), las brácteas aparecieron erguidas y el eje se elongó (Fig. 3.6 - B y C). Solamente en condiciones de temperatura alta y de mayor tiempo de forzado fué perceptible la formación de un primordio axilar en el tercer nudo (Fig. 3.5 - D), pero con un aspecto distinto del que se observó en los árboles OFF (Fig. 3.5 - A). La posición erguida de las brácteas y la elongación de los entrenudos no se observó en los árboles OFF (Fig. 3.6 - A). En los árboles ON ambas características fueron más

aparentes al aumentar la temperatura y el tiempo de forzado (Fig. 3.6 - B y C).

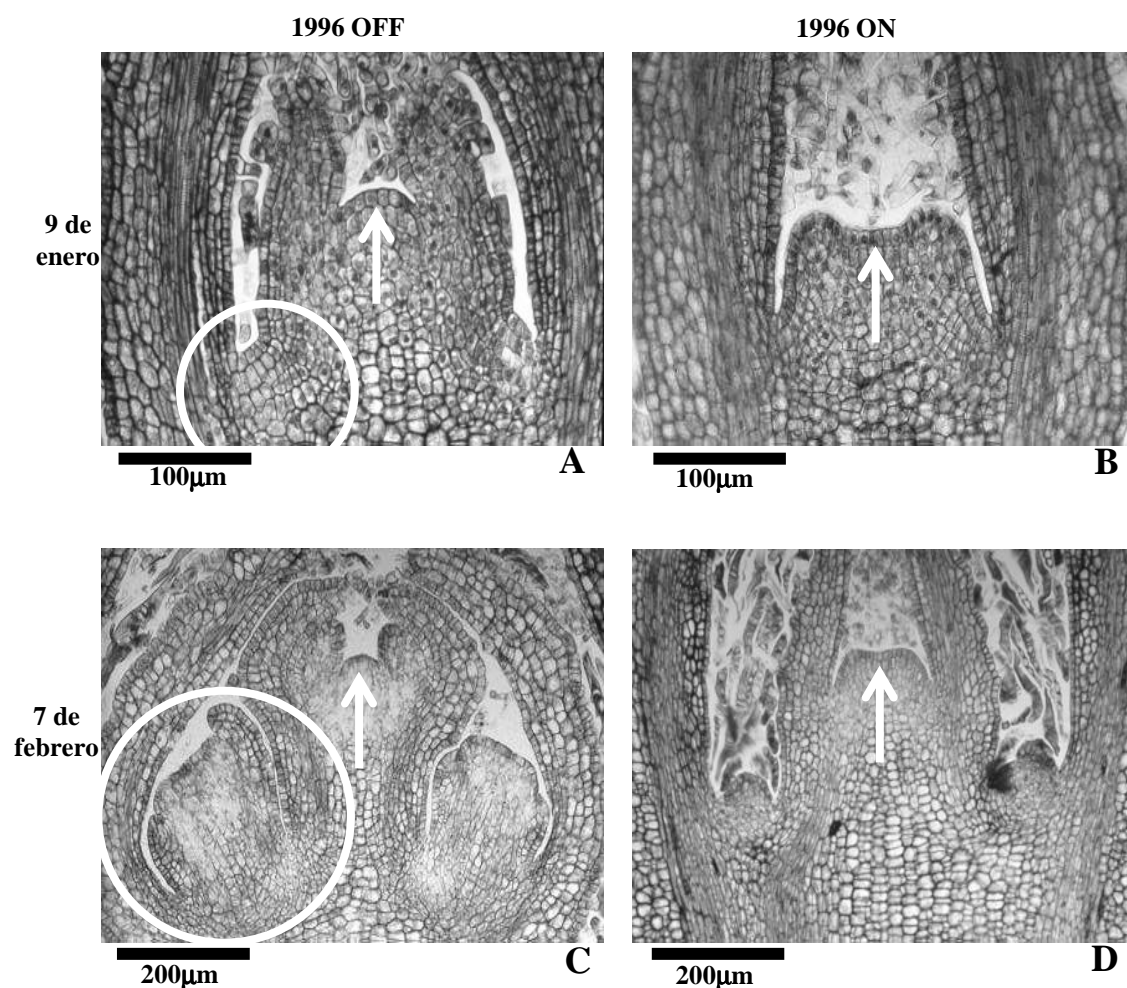


Figura 3.4 - Corte longitudinal central de la parte distal de las yemas el 9 de enero (arriba) y el 7 de febrero de 1997 (abajo) de los árboles OFF (izquierda) y ON (derecha) en 1996 (Tinción: Azul de Toluidina). A: presencia de un meristemo axilar en el tercer nudo (círculo) y aspecto del ápice (flecha) de las yemas de los árboles OFF el 9 de enero. B: aspecto plano del meristemo apical (flecha) de las yemas de los árboles ON el 9 de enero. C: desarrollo axilar en el tercer nudo (círculo) y aspecto del ápice (flecha) de las yemas de los árboles OFF el 7 de febrero. D: aspecto plano del meristemo apical (flecha) de las yemas de los árboles ON el 7 de febrero

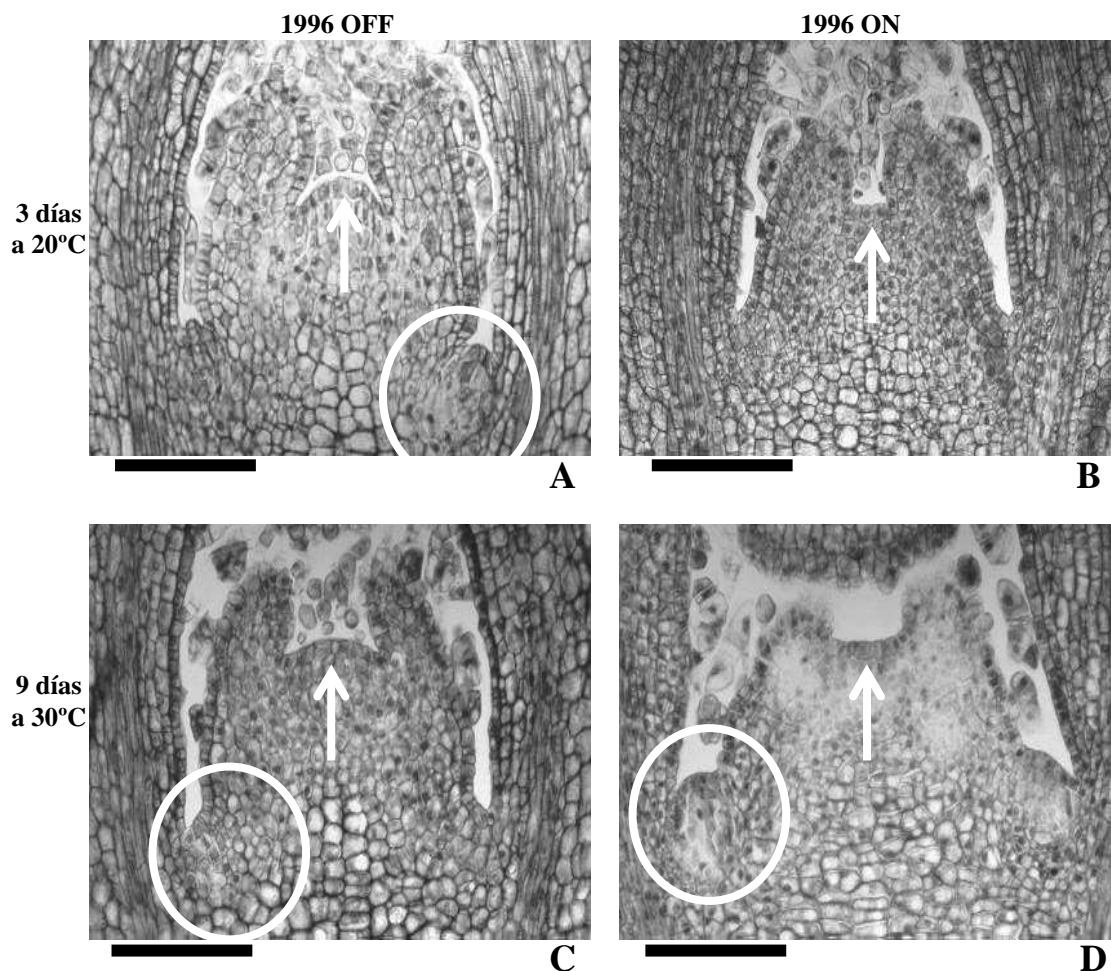


Figura 3.5 - Corte longitudinal central de la parte distal de las yemas muestreadas el **9 de enero** y forzadas durante 3 días a 20°C (arriba) y durante 9 días a 30°C (abajo) de los árboles OFF (izquierda) y ON (derecha) en 1996 (Tinción: Azul de Toluidina) (Barra = 100µm). A: desarrollo de un primordio axilar en el tercer nudo (círculo) y aspecto abombado del ápice (flecha) de las yemas de los árboles OFF forzadas a 20°C durante 3 días. B: aspecto plano del meristemo apical (flecha) de las yemas de los árboles ON forzadas a 20°C durante 3 días. C: meristemo axilar en el tercer nudo (círculo) y aspecto abombado del ápice (flecha) de las yemas de los árboles OFF forzadas a 30°C durante 9 días. D: desarrollo de un primordio axilar en el tercer nudo (círculo) y aspecto plano del meristemo apical (flecha) de las yemas de los árboles ON forzadas a 30°C durante 9 días

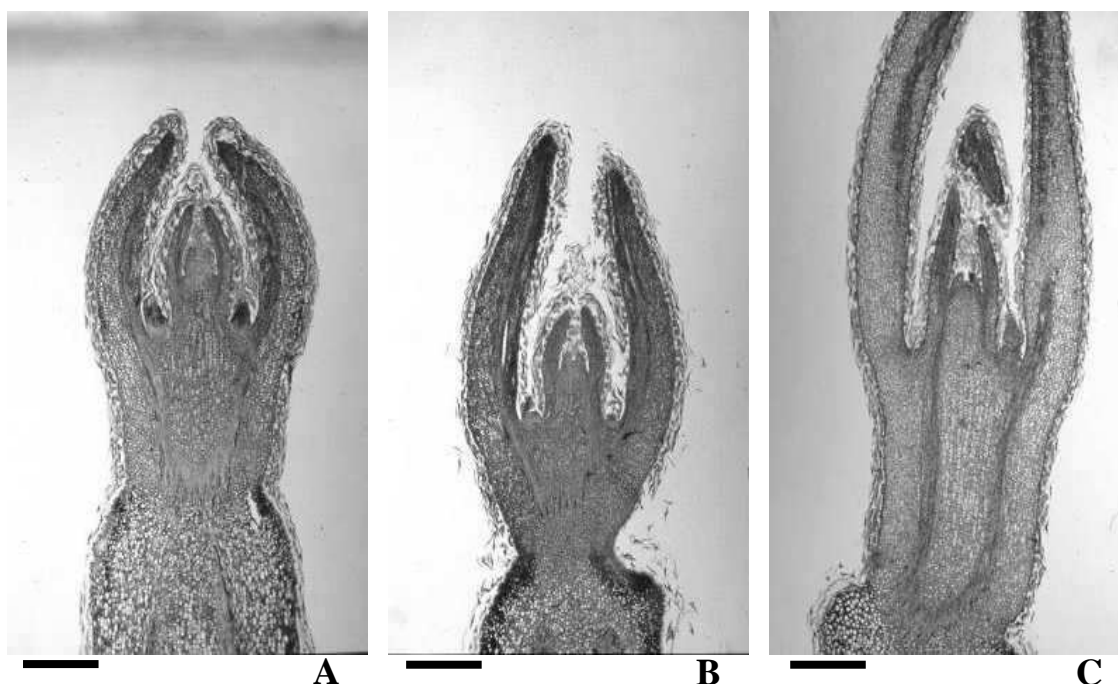


Figura 3.6 - Corte longitudinal central de las yemas muestreadas en campo el 9 de enero y forzadas en diferentes condiciones (Tinción: Azul de Toluidina) (Barra = 500 μ m). A: yema de árbol OFF forzada a 20°C durante 3 días. B: yema de árbol ON forzada a 20°C durante 3 días. C: yema de árbol ON forzada a 30°C durante 9 días

La pauta morfogénica durante la salida del reposo de las yemas de los árboles OFF fué completamente distinto del que ocurrió durante la formación de las yemas indiferenciadas (sea en árboles OFF u ON) antes del reposo. En estas yemas (Fig. 3.7 - A y B), la formación de un quinto nudo antecede a cualquier actividad axilar en el tercer nudo y las brácteas se formaron a partir de las zonas periféricas del meristemo apical y aparecieron siempre por encima de la zona central de ese meristemo. La formación de un quinto nudo en las yemas de los árboles OFF a la salida de la endolatenencia fué posterior al desarrollo del primordio axilar en el tercer nudo (Fig. 3.7 - C) y los primordios de las brácteas se formaron en los flancos del meristemo apical, manteniéndose la zona central de ese meristemo por encima del nivel de las brácteas (Fig. 3.7 - D).

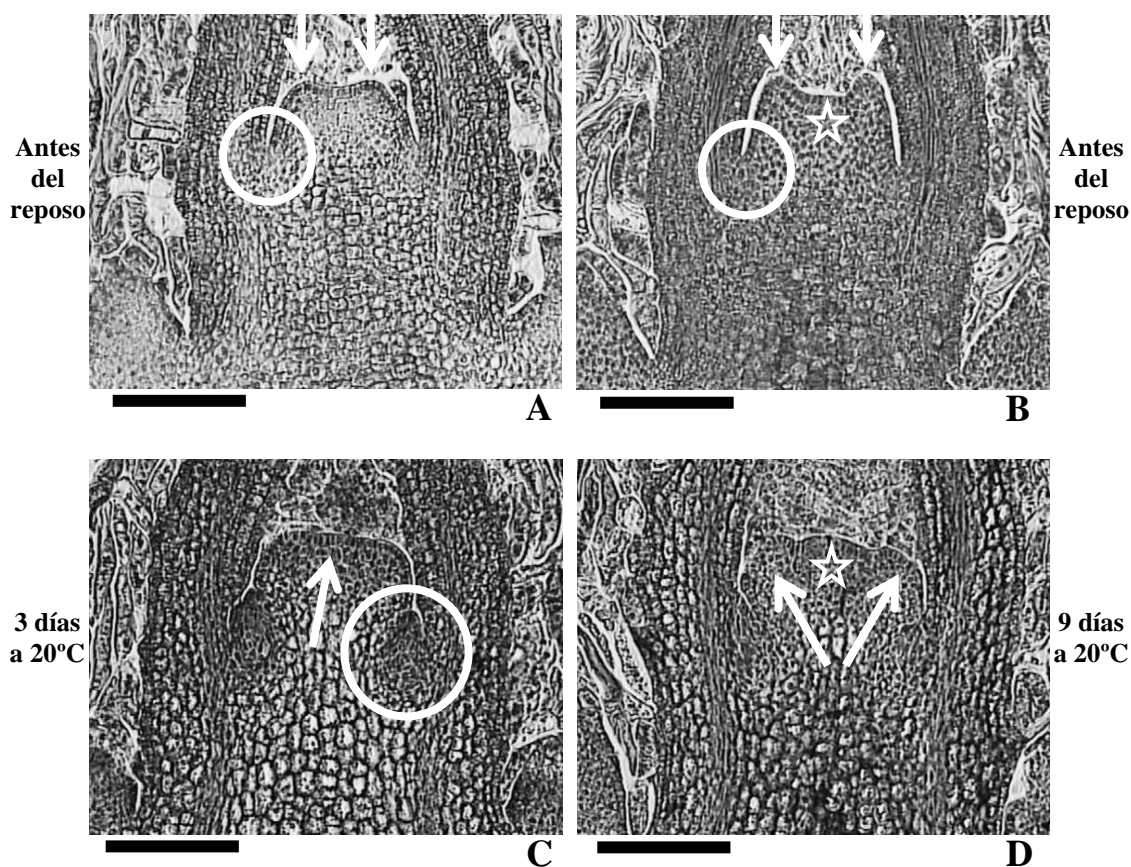


Figura 3.7 - Corte longitudinal central de la parte distal de las yemas del reposo (arriba) y a la salida del reposo (abajo) (Tinción: Azul de Toluidina) (Barra = 100 μ m). A: inicio de la formación del nuevo par de brácteas del quinto nudo en las zonas periféricas del meristemo apical (flechas), antes de cualquier actividad axilar en el tercer nudo (círculo), en yemas muestreadas en octubre/diciembre. B: primordios de las brácteas del quinto nudo ya formados (flechas), sin ninguna señal de actividad en las axilas del tercer nudo (círculo) ni en la zona central del meristemo apical (estrella) en yemas muestreadas en octubre/diciembre C: desarrollo de un primordio axilar en el tercer nudo (círculo) en yemas de árboles OFF muestreadas el 9 de enero y forzadas a 20°C durante 3 días. D: desarrollo del par de brácteas del quinto nudo (flechas) en los flancos del meristemo apical (estrella) en yemas de árboles OFF muestreadas el 9 de enero y forzadas a 20°C durante 9 días

3.2.3. Observaciones de almidón

3.2.3.1. Estatus de las yemas en campo

La presencia del almidón está indicada por la coloración negro/azul de los gránulos de almidón obtenida con la tinción de IIK. La presencia del almidón en las yemas en las fechas del muestreo de los ramos en campo fué distinta entre las yemas de árboles OFF (Fig. 3.8 - A y C) y ON (Fig. 3.8 - B y D) el año anterior. En el muestreo del 9 de enero, el almidón en los árboles OFF fué muy elevado en toda la yema, principalmente en la parte central del eje de la yema y en las brácteas (Fig. 3.8 - A). En el muestreo del 7 febrero permaneció elevado en las brácteas y parte central del eje de la yema, pero no en las zonas axilares y apicales con actividad morfogénica (Fig. 3.8 - C). En los árboles ON en 1996, la tinción de IIK fué poco intensa en ambas fechas, indicando una baja presencia de gránulos de almidón en las yemas de esos árboles (Fig. 3.8 - B y D).

3.2.3.2. Evolución en condiciones de forzado

Las condiciones del forzado de crecimiento afectaron la presencia del almidón en las yemas de los árboles OFF y ON (Fig. 3.9) el año anterior. En las yemas de los árboles OFF muestreadas el 9 de enero, se observó una reducción marcada de la intensidad de la coloración negro/azul de los gránulos de almidón tras 9 días de forzado, tanto en condiciones de temperatura baja (Fig. 3.9 - A) como elevada (Fig. 3.9 - C). No obstante, algunos gránulos de almidón permanecieron visibles. En las yemas de los árboles ON muestreadas el 9 de enero, la intensidad de la tinción de IIK permaneció baja tras 9 días de forzado a 12,5°C (Fig. 3.9 - B) y desapareció completamente de la yema cuando se forzó a 30°C (Fig. 3.9 - D).

En la parte central de la porción del tallo adyacente a la yema, la intensa coloración negro/azul determinada por la presencia de los gránulos de almidón se manifestó con independencia de la temperatura de forzado y del tipo de árbol (Fig. 3.10).

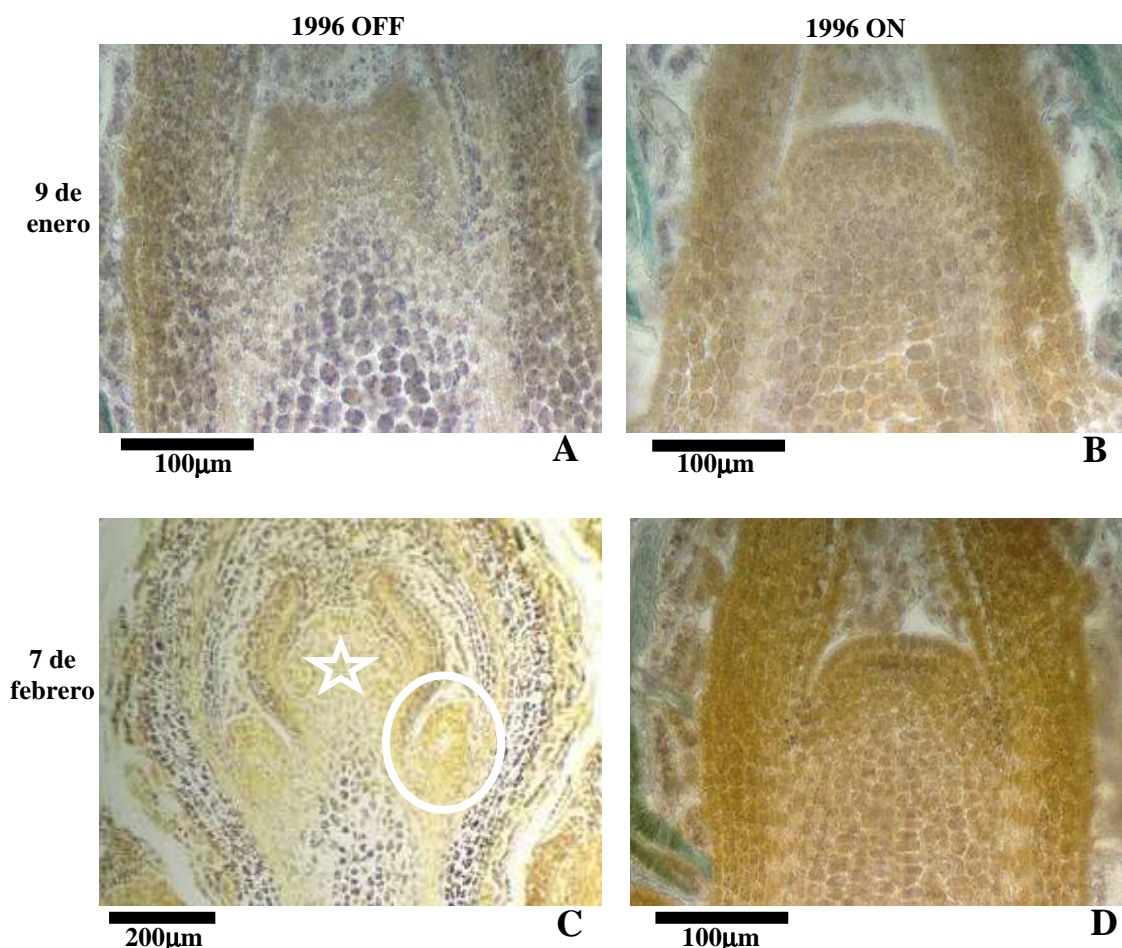


Figura 3.8 - Corte longitudinal central de la parte distal de las yemas el 9 de enero (arriba) y el 7 de febrero de 1997 (abajo) de los árboles OFF (izquierda) y ON (derecha) en 1996 (Tinción de IIK). A: coloración negro/azul intensa de las yemas de los árboles OFF muestreadas el 9 de enero. B: coloración negro/azul poco intensa de las yemas de los árboles ON muestreadas el 9 de enero. C: coloración negro/azul intensa en las brácteas y parte central del eje de la yema y poco intensa en las zonas axilares (círculo) y apicales (estrella) de las yemas de los árboles OFF muestreadas el 7 de febrero. D: coloración negro/azul poco intensa de las yemas de los árboles ON muestreadas el 7 de febrero

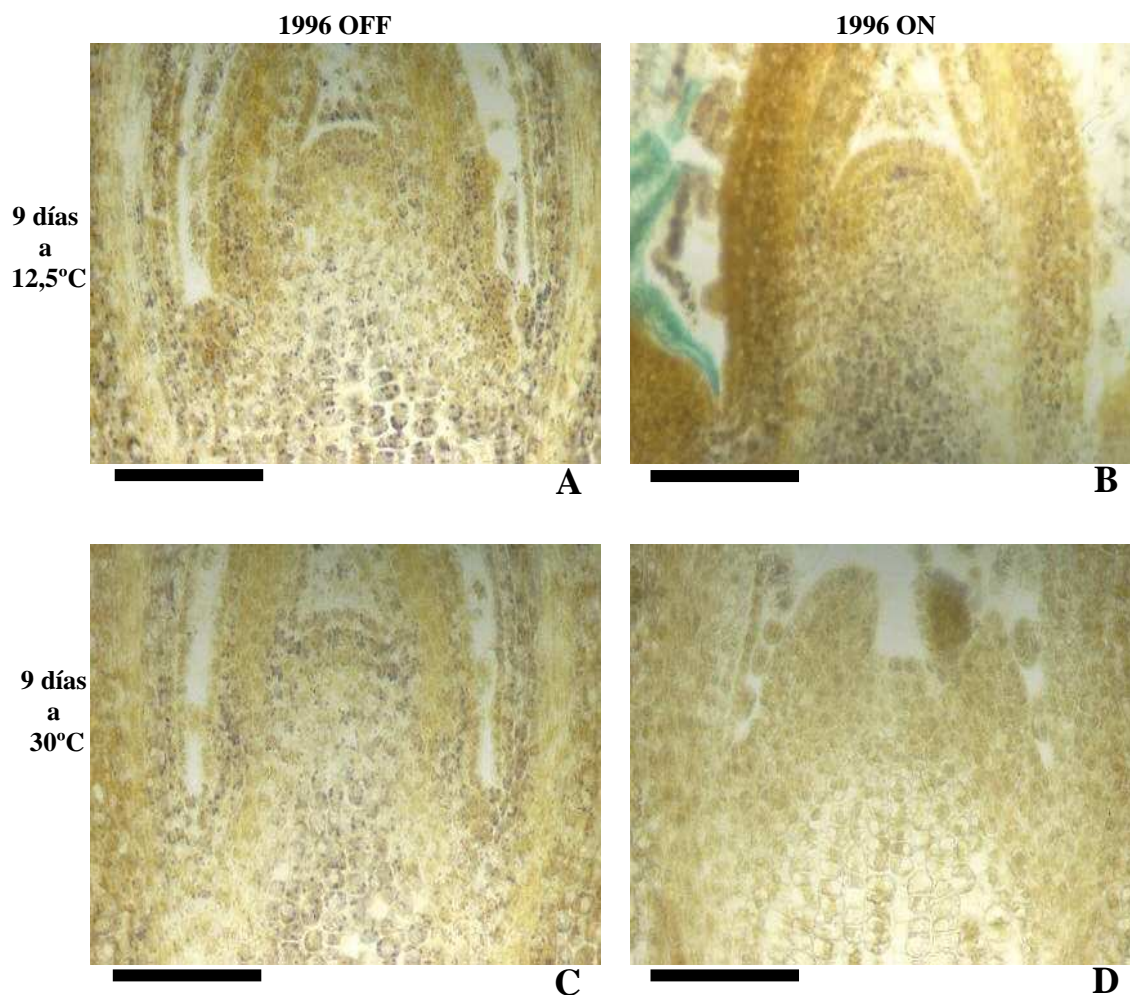


Figura 3.9 - Corte longitudinal central de la parte distal de las yemas muestreadas el 9 de enero de 1997 de árboles OFF (izquierda) y ON (derecha) en 1996 y forzadas durante 9 días a 12,5°C (arriba) y a 30°C (abajo) (Tinción de IIK) (Barra = 100µm). A: gránulos de almidón negro/azul dispersos en yemas de los árboles OFF forzadas a 12,5°C. B: coloración negro/azul poco intensa en yemas de los árboles ON forzadas a 12,5°C. C: gránulos de almidón negro/azul dispersos en yemas de los árboles OFF forzadas a 30°C. D: ausencia de cualquier coloración negro/azul en yemas de los árboles ON forzadas a 30°C

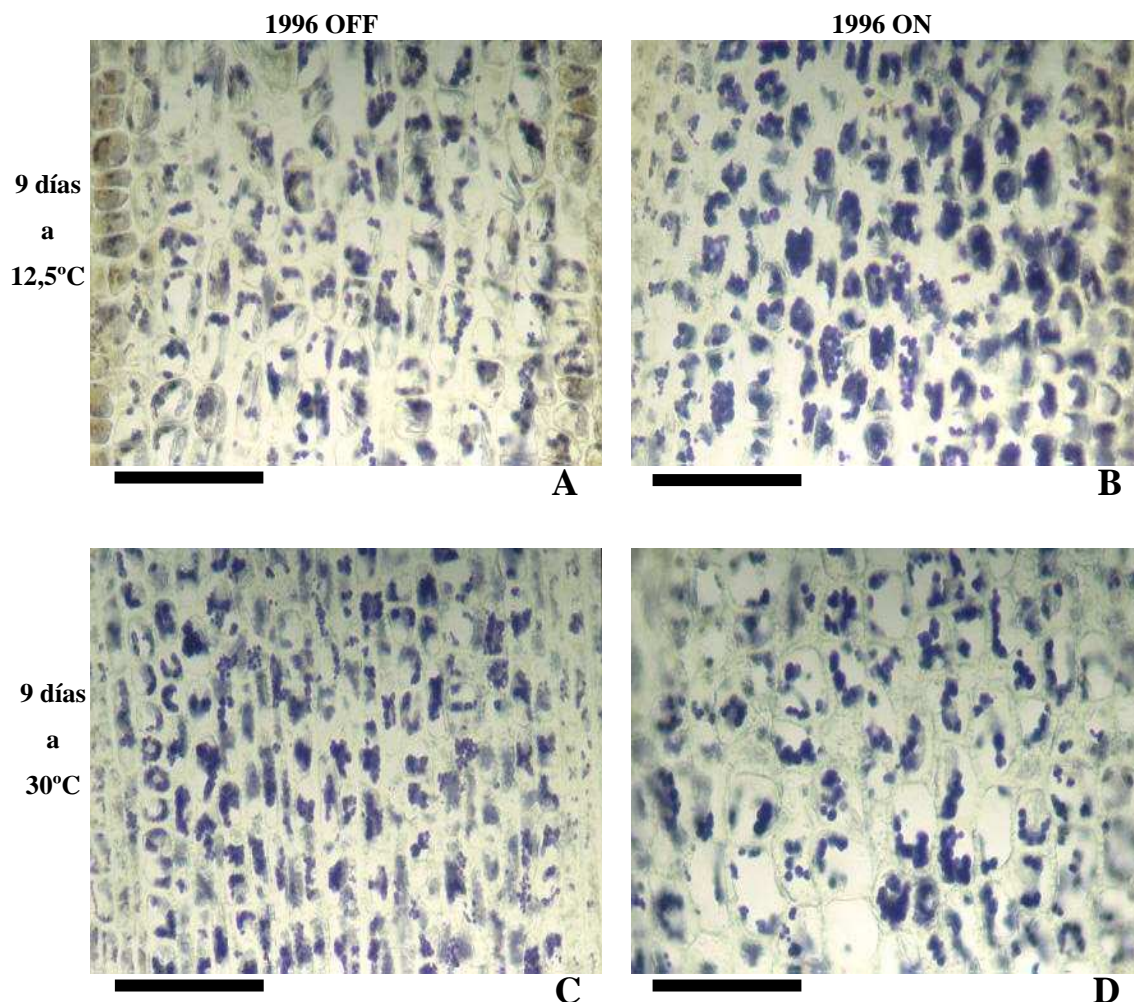


Figura 3.10 - Parte central de la porción del tallo adyacente a la yema en el corte longitudinal central de las yemas muestreadas el 9 de enero de 1997 de árboles OFF (izquierda) y ON (derecha) en 1996 y forzadas durante 9 días a 12,5°C (arriba) y a 30°C (abajo) (Tinción de IIK) (Barra = 100µm). A: gránulos de almidón con coloración negro/azul de muestras de los árboles OFF forzadas a 12,5°C. B: gránulos de almidón con coloración negro/azul de muestras de los árboles ON forzadas a 12,5°C. C: gránulos de almidón con coloración negro/azul de muestras de los árboles OFF forzadas a 30°C. D: gránulos de almidón con coloración negro/azul de muestras de los árboles ON forzadas a 30°C

3.3. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio muestran claramente que el frío invernal *per se* no tiene efecto inductor en el olivo. La naturaleza reproductora de la yema queda determinada por la ausencia de los frutos en el año anterior, confirmándose el ciclo reproductor bienal del olivo demostrado en otros experimentos (Lavee *et al.*, 1986; Stutte y Martin, 1986b; Navarro *et al.*, 1990; Fernandez-Escobar *et al.*, 1992). La plena satisfacción de las necesidades de frío invernal y el forzado de crecimiento a temperaturas supuestamente inductoras (12,5°C - Badr y Hartmann, 1971; Hartmann y Whisler, 1975) no fueron suficientes para inducir o promover el desarrollo de las inflorescencias en las yemas de árboles con frutos (ON) en el año anterior (Fig. 3.2).

El aumento gradual de la brotación reproductora (Figs. 3.1 y 3.3) y de la disminución del tiempo requerido para esa brotación (Tabla 3.1) con la acumulación de frío muestra que éste es necesario para eliminar la endolencia de las yemas reproductoras del olivo, tal como ha sido propuesto por Rallo y Martin (1991), Torreño (1993), Rallo *et al.* (1994), Relaño (1996) y Ruiz (1996).

En las fechas más tempranas, es decir, antes de la acumulación de frío suficiente, la defoliación y las temperaturas altas del forzado de crecimiento provocaron un aumento de la brotación vegetativa y/o una disminución de la brotación reproductora (Figs. 3.1 y 3.4). El efecto de estos factores en la modificación del desarrollo reproductor esperado en las yemas de los árboles OFF disminuye con la acumulación de frío, sugiriendo que es la acumulación de frío la que determina el aumento de la brotación reproductora y la reducción de la brotación vegetativa. Esta interpretación llevó a la conclusión de que la acumulación de frío invernal (vernalización) sería un estímulo inductor necesario para la floración del olivo, muy generalizada hasta mediados de los años 80 (Hartmann, 1953; Hartmann y Porlingis, 1957; Hackett y Hartmann, 1963; 1964; 1967; Milella y Deidda, 1968; Badr y Hartmann, 1971; Hartmann y Whisler, 1975).

Sin embargo, si el frío acumulado hubiera sido el factor determinante de la inducción floral, la brotación reproductora una vez acumulado frío suficiente, es decir para la misma fecha de muestreo, hubiera sido la misma para cualquier temperatura de forzado. Los resultados indican que el aumento de la temperatura de forzado provocó

una menor brotación reproductora para fechas de muestreo entre el 9 de enero y el 7 de febrero de 1997 (Fig. 3.1) y diferencias similares en enero de 1998 (Fig. 3.3). Por otro lado, la brotación máxima alcanzada en las estaquillas con hojas y defoliadas una vez acumulado el frío necesario fué análoga, con independencia de la temperatura de forzado (Figs. 3.1 y 3.3). Estos resultados concuerdan con un proceso de salida del reposo (Saure, 1985).

El creciente y lento aumento de la brotación total (toda de naturaleza reproductora) a 12,5°C de las yemas con hojas de los árboles OFF (Fig. 3.1 y Tabla 3.1) es otra indicación del papel del frío invernal en la eliminación de la latencia y no en la inducción floral. Si la temperatura de 12,5°C fuese inductiva (Badr y Hartmann, 1971; Hartmann y Whisler, 1975), la brotación reproductora sería elevada para todas las fechas del muestreo. De esta forma, como esa brotación se va incrementando a lo largo del tiempo, la acumulación de frío invernal juega un papel fundamental en la adquisición de la capacidad de brotación de las yemas reproductoras del olivo. Como la temperatura de 12,5°C parece tener un doble papel en la satisfacción de las necesidades en frío y en la promoción de la brotación (Rallo y Martín, 1991), la lenta promoción del crecimiento por la temperatura de 12,5°C podría ser responsable del menor efecto de la defoliación en condiciones de forzado a esa temperatura (Fig. 3.1).

Las observaciones anatómicas de las yemas de los árboles OFF en el año anterior confirmaron que la eliminación de la endolatenia empezó en la primera mitad de enero y que la actividad morfogénica subsecuente en condiciones naturales o en condiciones de forzado a temperaturas bajas o moderadas fué particularmente evidente en el domo apical y en las axilas (Figs. 3.4 y 3.5). Las observaciones anatómicas de las yemas de los árboles ON solamente evidenciaron una elongación de las brácteas y de los entrenudos en condiciones de forzado (Fig. 3.6). Estas observaciones están de acuerdo con las descripciones del inicio del desarrollo reproductor (Almeida, 1940; Hackett y Hartmann, 1963; Troncoso, 1967; 1968; Msallem y Hellali, 1988; Pinney y Polito, 1990; De la Rosa, 1996; Fabbri y Alerci, 1999) y vegetativo (Arzee, 1952; Troncoso, 1966; 1967; 1968; Fabbri y Alerci, 1999) de las yemas del olivo.

Las observaciones de almidón confirman que el almidón se acumula en gran cantidad en las yemas de los árboles OFF (Sarmiento *et al.*, 1976; De la Rosa *et al.*, 2000), pero no en los árboles ON (Sarmiento *et al.*, 1976) (Fig. 3.7). En condiciones

naturales, esa acumulación en las yemas de los árboles OFF parece continuar (Fig. 3.7), lo que está de acuerdo con Sarmiento *et al.* (1976), pero en condiciones de forzado el almidón se moviliza rápidamente (Fig. 3.8), como observaron De la Rosa *et al.* (2000).

El conjunto de los resultados de la brotación de las yemas y de las observaciones anatómicas de los árboles OFF evidencia un papel crítico de las condiciones del forzado de crecimiento a la salida del reposo sobre la capacidad de las yemas para expresar su naturaleza reproductora. La presencia de la hoja y las bajas temperaturas parecen fundamentales para inhibir la brotación (paralatencia y ecolatencia), como un mecanismo complementario/alternativo para impedir una brotación extemporánea y asegurar que el desarrollo metabólico y/o morfológico se procese adecuada y progresivamente según la evolución de las condiciones climáticas en ambiente natural. La brotación extemporánea provocada por la defoliación y las temperaturas altas interrumpe ese proceso, inhibiendo o modificando aquel desarrollo metabólico y/o morfológico o induciendo latencia secundaria o crecimiento vegetativo.

Un estudio anatómico descriptivo más completo del desarrollo morfológico y fisiológico de las yemas en condiciones naturales y en condiciones de forzado a temperaturas diferenciadas, con y sin presencia de la hoja, durante el periodo de inicio de enero hasta mediados de febrero será de todo el interés para determinar el modo como la temperatura alta y la defoliación afectan la capacidad de las yemas de los árboles OFF para expresar su naturaleza reproductora.

4. Influencia de la defoliación, oscuridad y duración del almacenamiento a 5°C y de las condiciones de forzado sobre la pauta de brotación de las yemas según la acumulación de frío invernal

Las yemas axilares del olivo permanecen morfológicamente indiferenciadas hasta finales del invierno (King, 1938; Almeida, 1940; Hackett y Hartmann, 1963; Troncoso, 1967; 1968) y la acumulación de frío invernal tiene una influencia positiva en la cantidad de inflorescencias (Hartmann, 1953; Hartmann y Porlingis, 1957; Hackett y Hartmann, 1963; 1964; 1967; Milella y Deidda, 1968; Badr y Hartmann, 1971; Hartmann y Whisler, 1975). De esta forma, se ha propuesto durante mucho tiempo un ciclo reproductor anual para esta especie, siendo el frío invernal el factor responsable de la inducción floral.

El efecto de la carga de un año sobre la producción del año siguiente es la causa del conocido fenómeno de alternancia o vecería del olivo y sugiere un ciclo reproductor bienal en esta especie. A partir de mediados de los años 80, varios experimentos han comprobado el carácter bienal del ciclo reproductor del olivo (Lavee *et al.*, 1986; Stutte y Martin, 1986b; Tombesi y Cartechini, 1986; Navarro *et al.*, 1990; Pinney y Polito, 1990; Fernandez-Escobar *et al.*, 1992; Lavee y Haskal, 1993). Se ha observado, por otra parte, una brotación creciente y más rápida de yemas reproductoras con la acumulación de frío invernal en estaquillas ubicadas en ambientes favorables al crecimiento (Rallo y Martin, 1991). Esta pauta fué común en ramos procedentes de árboles con niveles alto y bajo de carga en la cosecha inmediatamente anterior, si bien los niveles máximos de brotación de yemas florales fué mayor en los ramos de las últimas. Observaciones posteriores (Torreño, 1993; Rallo *et al.*, 1994; Relano, 1996; Ruiz, 1996) han confirmado esta pauta de brotación, por lo que se ha propuesto un papel del frío invernal en la salida del reposo (endolencia) de las yemas inducidas.

Los resultados del capítulo anterior de este estudio confirmaron el efecto inhibitorio de una gran cantidad de frutos sobre la floración del año siguiente y el ciclo reproductor bienal del olivo. Sin embargo, los mismos resultados evidenciaron que las condiciones del forzado de crecimiento después de la eliminación de la endolatenencia fueron condicionantes de la expresión de la naturaleza reproductora de las yemas de los árboles sin frutos el año previo, hasta alcanzar una suficiente acumulación de frío invernal.

Con el presente experimento se pretende profundizar en el efecto de la temperatura sobre el desarrollo reproductor de las yemas de los árboles sin frutos el año anterior, intentando establecer si: a) son las bajas temperaturas necesarias para completar las necesidades de la inducción floral o b) son las altas temperaturas que inhiben o modifican el curso de la diferenciación floral. Para aclarar en definitivo esta cuestión, son críticas las siguientes condiciones:

- disponer de un tratamiento efectivo de eliminación de la endolatenencia, que no sea inductivo;
- efectuar el forzado de crecimiento en condiciones que no modifiquen el desarrollo morfológico de las inflorescencias en las yemas de árboles OFF a la salida del reposo.

La temperatura de 5°C ha probado ser efectiva para la salida del reposo, aunque actuando de una forma más lenta que las temperaturas entre 10 y 13°C (Torreño, 1993). Por otro lado, esta temperatura no tendría el efecto inductor de la floración propuesto por Badr y Hartmann (1971) y Hartmann y Whisler (1975) para la temperatura de 12,5°C. Como la presencia de luz parece ser fundamental para la inducción floral (Ruffaldi, 1958; Tombesi, 1984), el almacenamiento previo a 5°C en la completa oscuridad parece ser el tratamiento adecuado para satisfacer las necesidades en frío para eliminar la endolatenencia, sin que el frío pueda ser "inductor". Las condiciones de forzado de crecimiento a temperatura moderada (15-20°C) con hojas han probado ser adecuadas para promover la brotación de las yemas salidas del reposo, sin modificar el desarrollo reproductor esperado de las yemas de los árboles OFF (capítulo 3).

4.1. Material y métodos

Las estaquillas con 3 nudos, preparadas según el mismo procedimiento descrito en el apartado 2.1.1 (Fig. 2.1 - B), procedían del olivar del CIFA (Centro de Investigación y Formación Agraria) de Córdoba, descrito en el apartado 1.1. Los muestreos en campo se realizaron mensualmente de octubre de 1997 a marzo de 1998, en 4 árboles OFF en 1997. Después de preparadas, las estaquillas en sustrato de perlita húmeda se almacenaron a 5°C, con humedad relativa superior a 90%, con 12 horas de luz o en la completa oscuridad. Las fechas del muestreo y la duración del almacenamiento a 5°C se presentan en la Tabla 4.1. Al final del periodo de almacenamiento, las estaquillas se transfirieron a dos cámaras de crecimiento con diferentes temperaturas de forzado: 15 y a 30°C.

En cada transferencia, para cada condición de luz y para cada temperatura de forzado de crecimiento, los tratamientos de defoliación, realizados según un diseño en bloques al azar con 3 repeticiones (parcela elemental: 4 estaquillas por repetición, siendo 1 estaquilla procedente de cada árbol muestreada), fueron fueron los siguientes:

- estaquillas con hojas durante el almacenamiento y el forzado de crecimiento;
- estaquillas con hojas durante el almacenamiento y defoliadas durante el forzado de crecimiento;
- estaquillas defoliadas durante el almacenamiento y el forzado de crecimiento.

Tabla 4.1 - Fechas del muestreo y duración del almacenamiento a 5°C

Fecha del muestreo	Duración del almacenamiento a 5°C (semanas)
8 de octubre de 1997	0, 2, 4, 8, 12, 16, 20
5 de noviembre de 1997	0, 2, 4, 8, 12, 16
3 de diciembre de 1997	0, 2, 4, 8, 12
7 de enero de 1998	0, 2, 4, 8
5 de febrero de 1998	0, 2, 4
5 de marzo de 1998	0

Al final de **2** (30°C) ó **4** (15°C) semanas en condiciones de forzado, se contaron las yemas brotadas. En éstas, se clasificaron como vegetativas las yemas que produjeron hojas o cuyo par de brácteas basales hubiese elongado y como reproductoras las que produjeron inflorescencias o que, por lo menos, hayan elongado el entrenudo basal, de forma similar al inicio del estado fenológico **B** de Colbrant (1972).

En la tercera fecha de muestreo (3 de diciembre de 1997), se almacenó a 5°C un número adicional de estaquillas correspondientes a diferentes condiciones de luz y defoliación, con la finalidad de muestrear yemas para observación anatómica en la fecha del muestreo y al final de las 12 semanas de almacenamiento. Los procedimientos de fijación, sección, montaje y tinción de las muestras se realizaron del modo anteriormente descrito en el apartado 1.1. La tinción utilizada para observar las diferencias en las yemas según las condiciones del ensayo fué la de IIK, específica para el almidón.

4.2. Resultados

4.2.1. Brotación

La brotación de las yemas de las estaquillas con hojas a 15°C fué reproductora (Fig. 4.1). Esta se incrementó a partir de la primera mitad de enero con mucha consistencia y regularidad. La defoliación provocó un efecto positivo en la brotación vegetativa en octubre, noviembre y enero, pero no tuvo ningún efecto en la brotación reproductora a esta temperatura (Fig. 4.1). Con la temperatura de 30°C, la brotación reproductora solamente aumentó marcadamente a partir de la primera mitad de febrero (Fig. 4.1). Hasta esta época, la defoliación tuvo un efecto positivo en la brotación vegetativa, pero su efecto se anuló cuando la brotación fué reproductora (Fig. 4.1).

Las curvas de brotación total y reproductora de las estaquillas procedentes de ramos con tratamientos de frío natural (en campo) y artificial (almacenamiento a 5°C, con y sin luz) mostraron una misma pauta (Fig. 4.2). No obstante, la brotación fué mayor y más rápida al disminuir la duración del tratamiento de frío artificial (muestreos más tardíos) y consecuentemente aumentar la duración del frío natural recibido en el

árbol. El almacenamiento en la oscuridad redujo en general la brotación respecto al almacenamiento con luz hasta enero (Fig. 4.2).

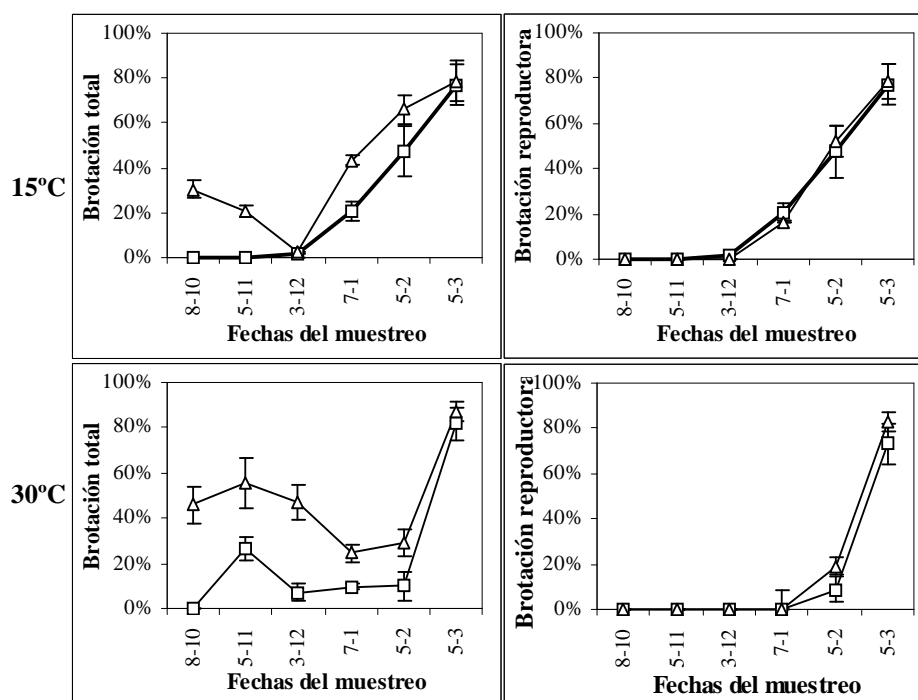


Figura 4.1 – Brotación total (izquierda) y reproductora (derecha) de las yemas de árboles OFF en 1997, forzadas a 15°C durante 4 semanas (arriba) y a 30°C durante 2 semanas (abajo), con hojas (cuadrados) o defoliadas (triángulos)

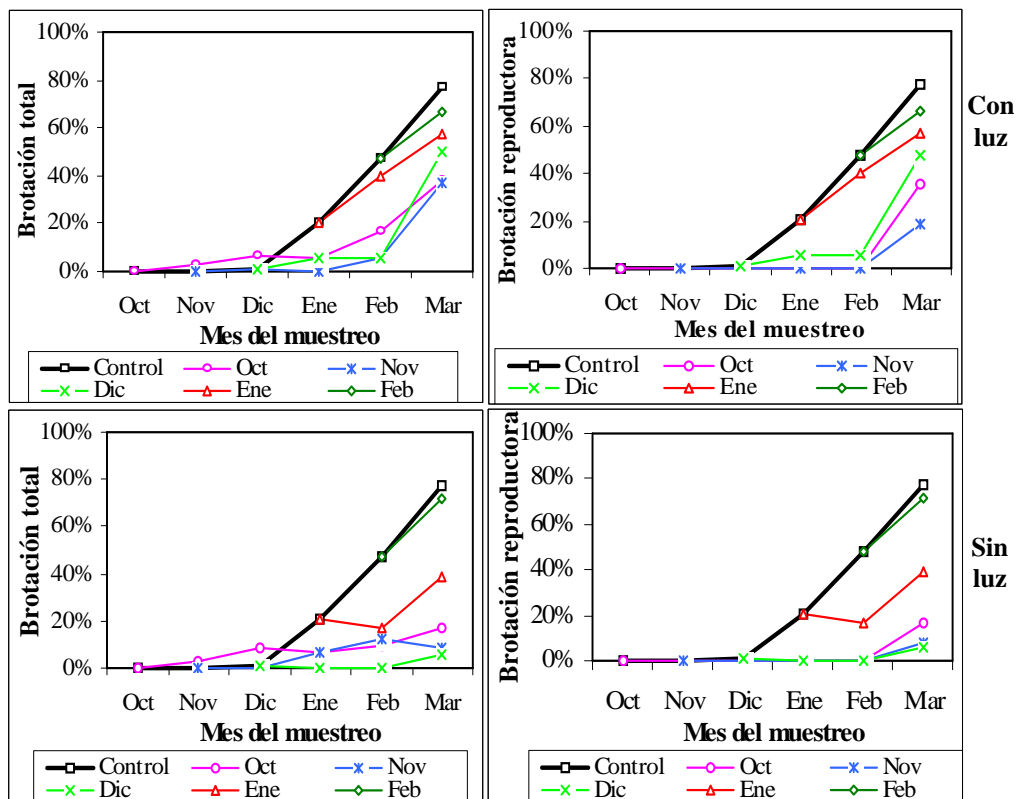


Figura 4.2 - Brotación total (izquierda) y reproductora (derecha) en condiciones de forzado a 15°C durante 4 semanas, con acumulación de frio natural (control) y con frio artificial complementario (almacenamiento a 5°C) en estaquillas con hojas almacenadas con luz (arriba) y en oscuridad (abajo) muestreadas desde octubre hasta febrero

La brotación a 15 y a 30°C de las yemas de las estaquillas almacenadas durante diferentes periodos a 5°C, con luz y en la oscuridad, se presentan en las Figuras 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 y 4.7. Estos gráficos corresponden a los muestreos de 8 de octubre, 5 de noviembre, 3 de diciembre, 7 de enero y 5 de febrero, respectivamente. En un análisis global, se pueden resaltar los siguientes aspectos:

- En cualquier fecha, con luz o en la oscuridad, la brotación reproductora a 15°C siguió siempre el patrón de la brotación total.
- Para fechas de muestreo antes de diciembre, solo las yemas con hojas durante el almacenamiento a 5°C (con luz o en la oscuridad) y forzadas a 15°C dieron lugar a brotación reproductora. A partir de diciembre, las yemas defoliadas durante el almacenamiento a 5°C (con luz o en la oscuridad) y forzadas a 15 °C proporcionaron brotación reproductora.
- La defoliación y las temperaturas altas de forzado (30°C) estimularon la brotación vegetativa. Ese efecto tendió a disminuir con la acumulación de frío, es decir, con el tiempo de almacenamiento a 5°C (en los muestreos hasta diciembre) y con la fecha del muestreo. En diciembre, ese efecto solo se observó a la temperatura de forzado de 30°C.
- La brotación reproductora fué nula con la defoliación y las temperaturas altas de forzado (30°C), hasta febrero. En esta fecha, la brotación reproductora aumentó notablemente cuando se forzó a 30°C, independientemente de la defoliación y del almacenamiento en la oscuridad.

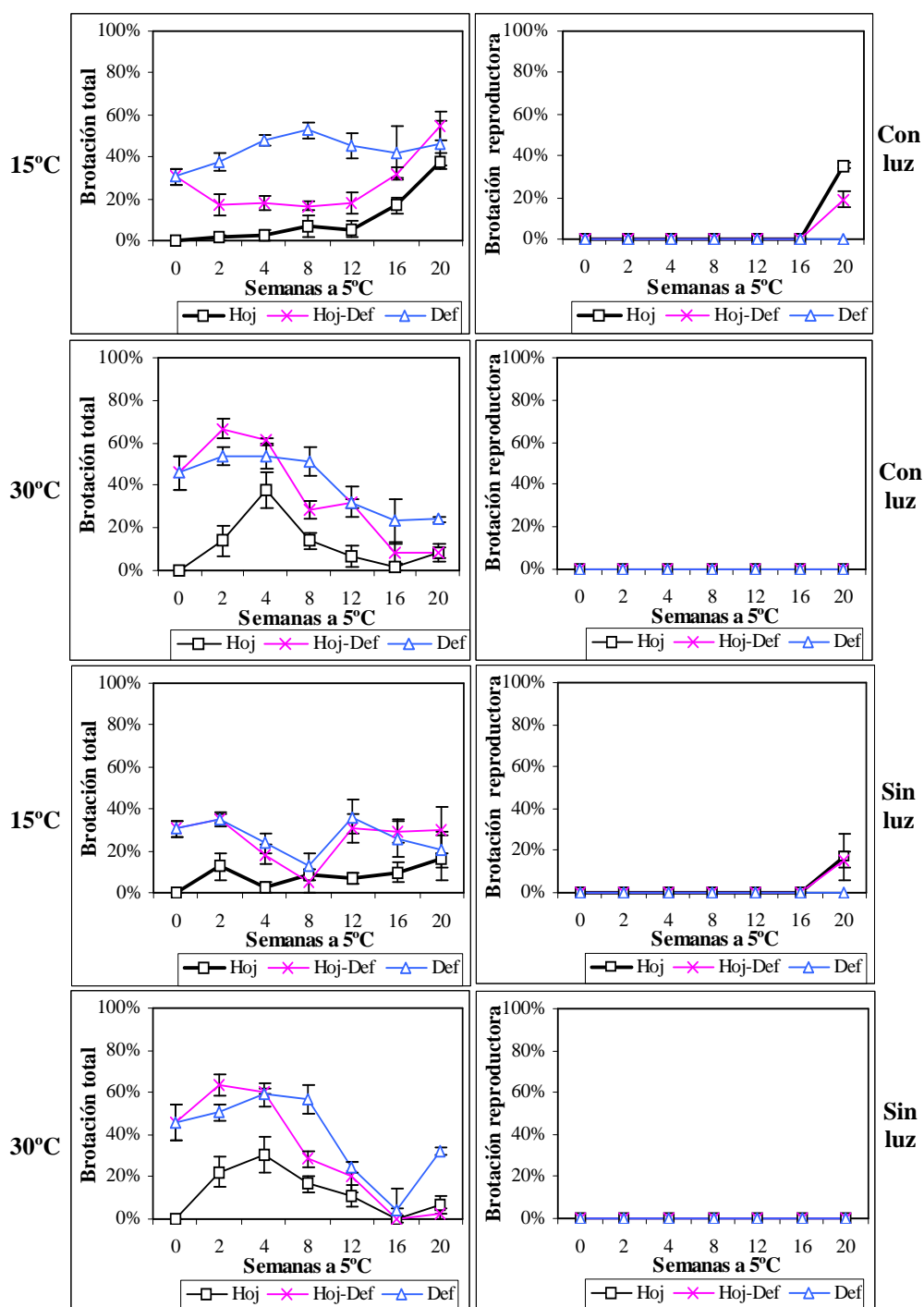


Figura 4.3 - Brotación total (izquierda) y reproductora (derecha) de las yemas de árboles OFF en 1997, muestreadas en campo el **8 de octubre de 1997** y almacenadas durante diferentes periodos a 5°C (con luz y en la oscuridad) y forzadas a 15°C durante 4 semanas o a 30°C durante 2 semanas. (Leyenda: **Hoj**: almacenadas y forzadas con hojas; **Hoj-Def**: almacenadas con hojas y forzadas con defoliación; **Def**: almacenadas y forzadas con defoliación)

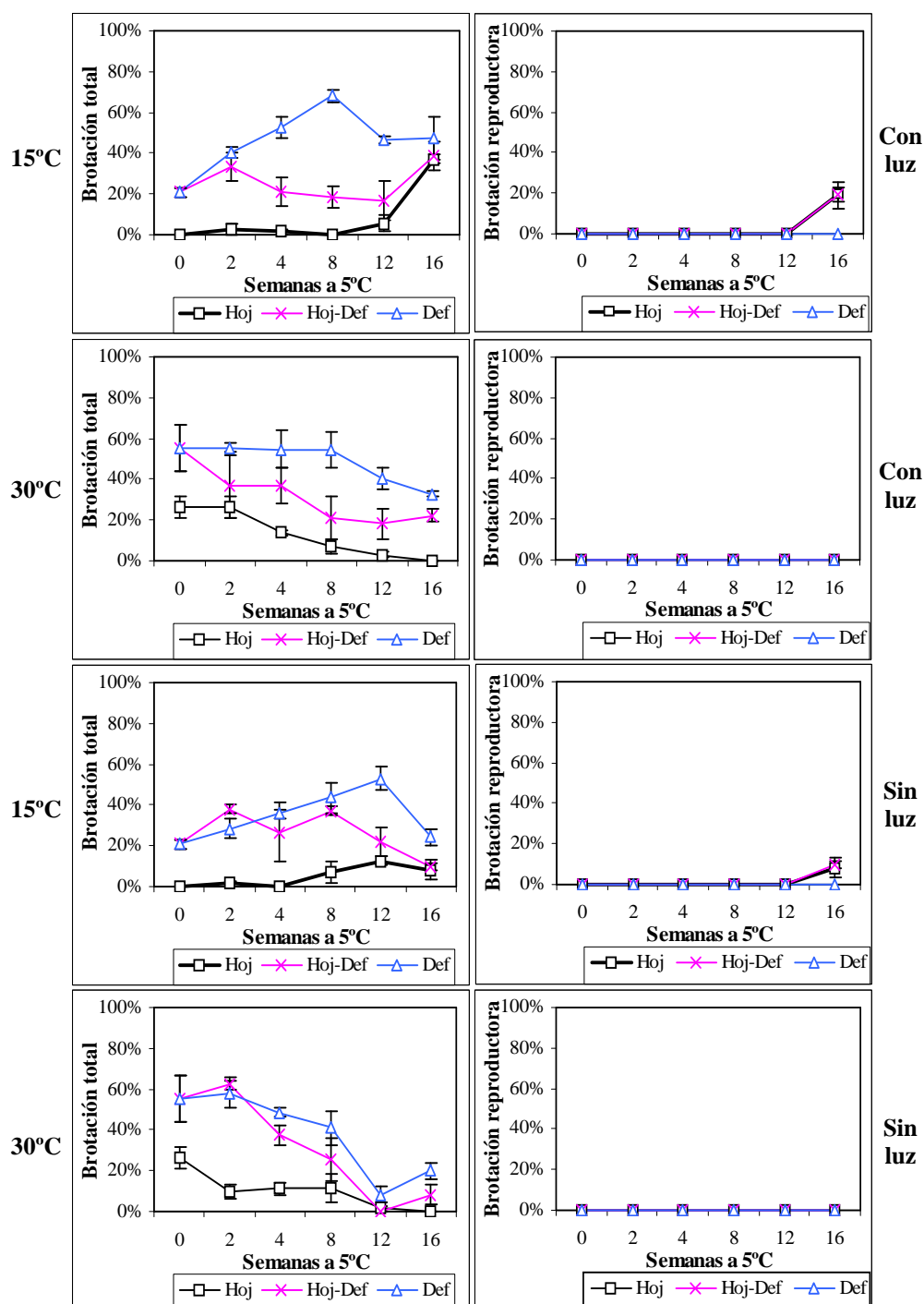


Figura 4.4 - Brotación total (izquierda) y reproductora (derecha) de las yemas de árboles OFF en 1997, muestreadas en campo el **5 de noviembre de 1997** y almacenadas durante diferentes periodos a 5°C (con luz y en la oscuridad) y forzadas a 15°C durante 4 semanas o a 30°C durante 2 semanas. (Leyenda: **Hoj**: almacenadas y forzadas con hojas; **Hoj-Def**: almacenadas con hojas y forzadas con defoliación; **Def**: almacenadas y forzadas con defoliación)

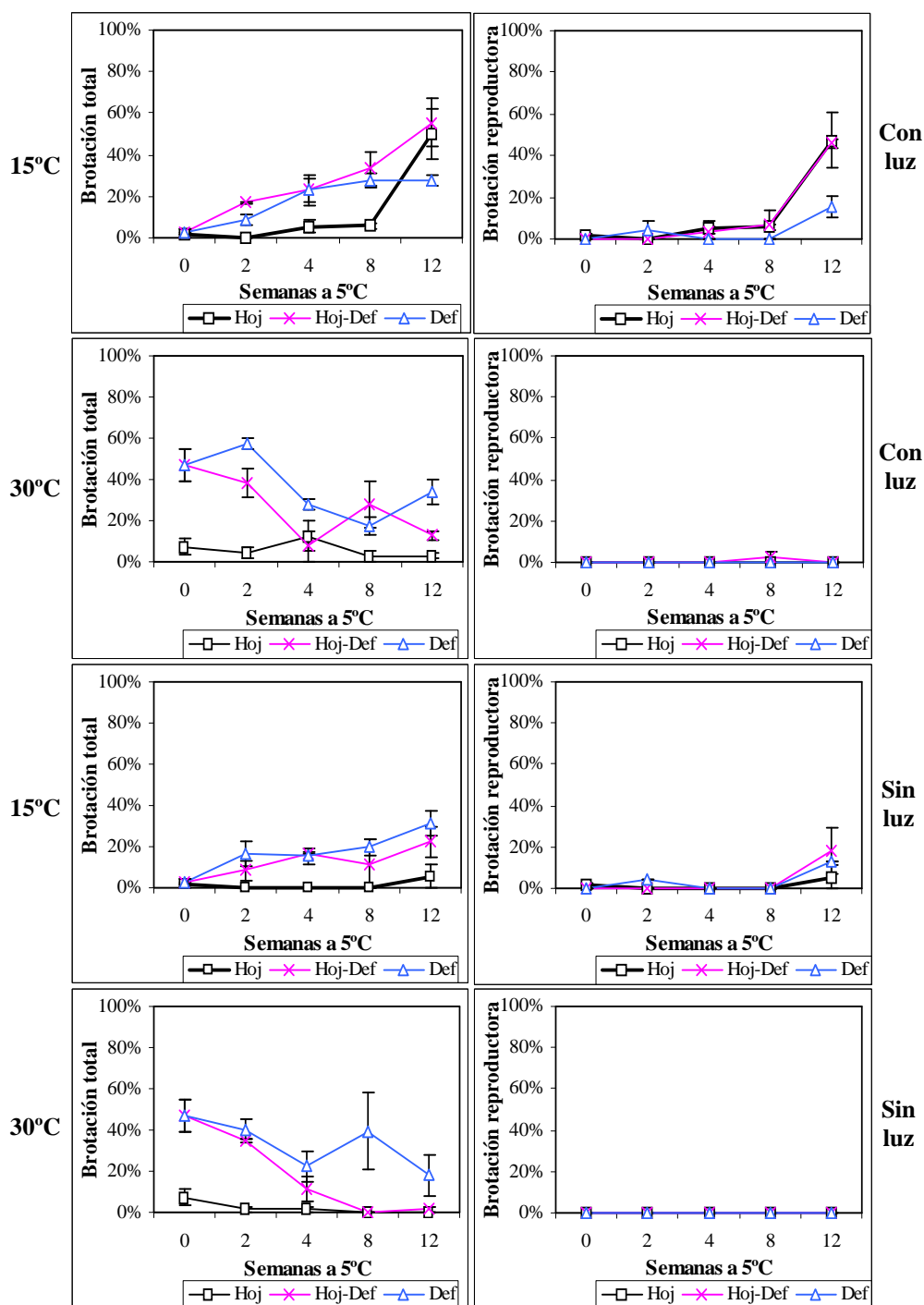


Figura 4.5 - Brotación total (izquierda) y reproductora (derecha) de las yemas de árboles OFF en 1997, muestreadas en campo el **3 de diciembre de 1997** y almacenadas durante diferentes periodos a 5°C (con luz y en la oscuridad) y forzadas a 15°C durante 4 semanas o a 30°C durante 2 semanas. (Leyenda: **Hoj**: almacenadas y forzadas con hojas; **Hoj-Def**: almacenadas con hojas y forzadas con defoliación; **Def**: almacenadas y forzadas con defoliación)

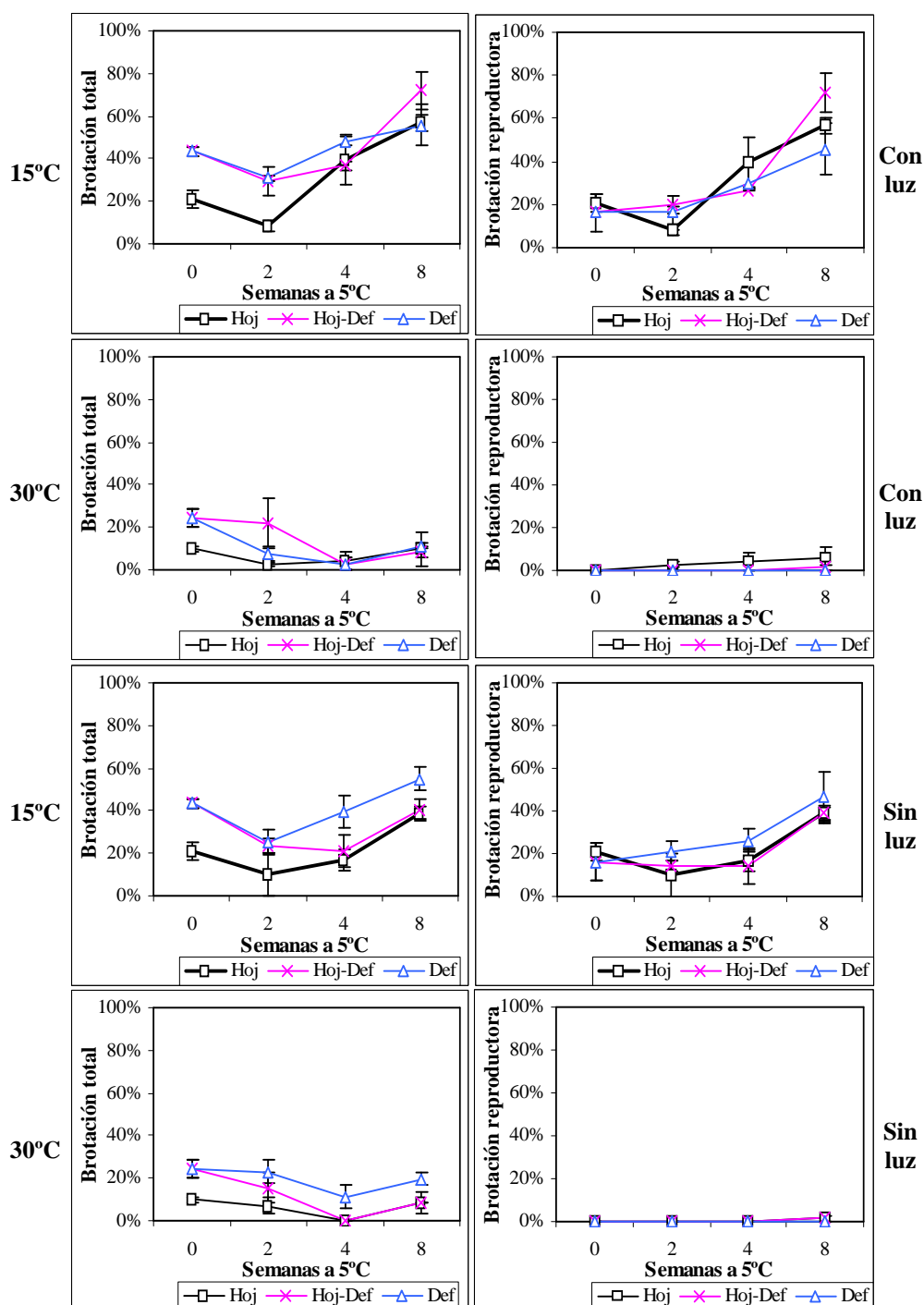


Figura 4.6 - Brotación total (izquierda) y reproductora (derecha) de las yemas de árboles OFF en 1997, muestreadas en campo el **7 de enero de 1998** y almacenadas durante diferentes periodos a 5°C (con luz y en la oscuridad) y forzadas a 15°C durante 4 semanas o a 30°C durante 2 semanas. (Leyenda: **Hoj**: almacenadas y forzadas con hojas; **Hoj-Def**: almacenadas con hojas y forzadas con defoliación; **Def**: almacenadas y forzadas con defoliación)

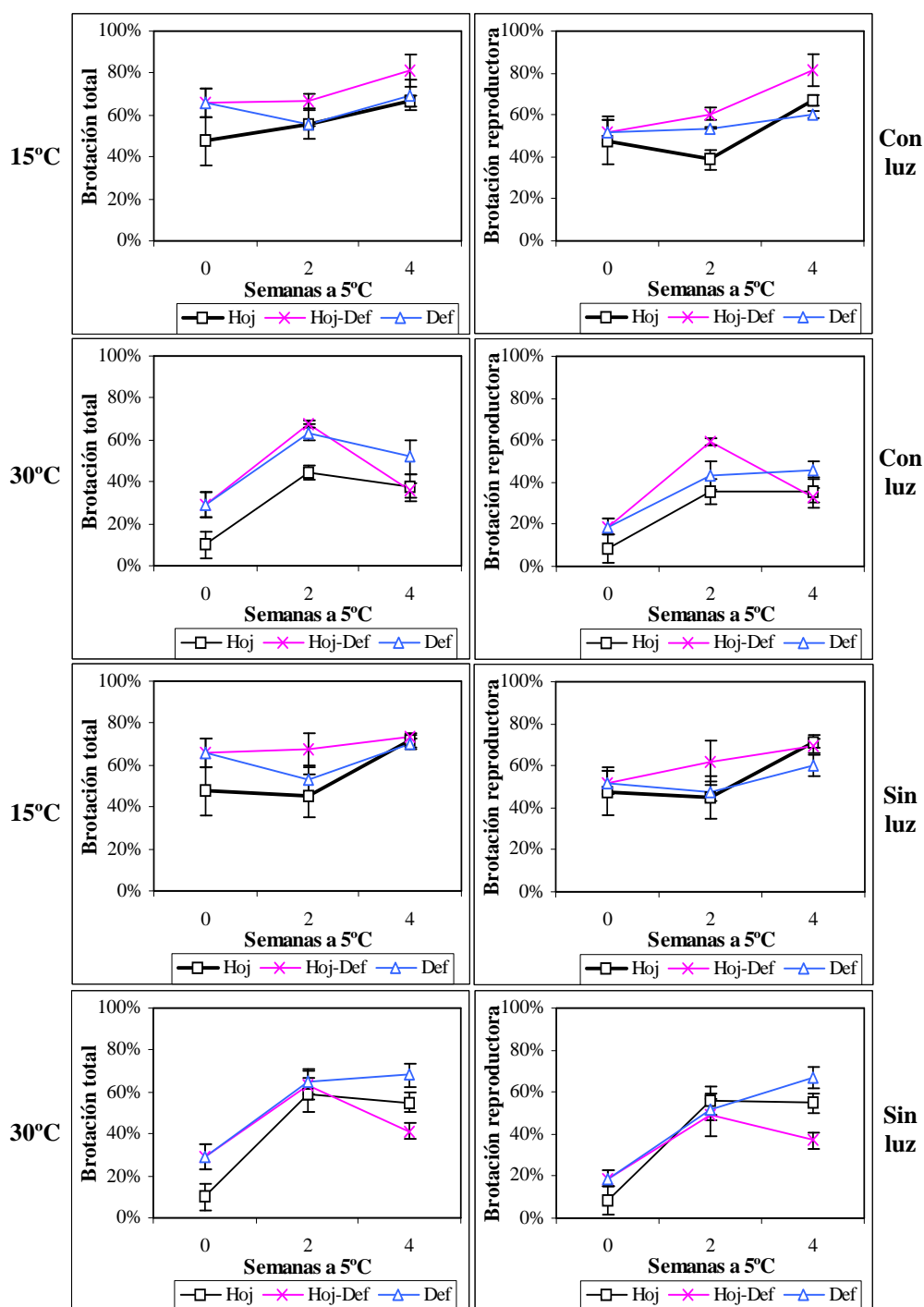


Figura 4.7 - Brotación total (izquierda) y reproductora (derecha) de las yemas de árboles OFF en 1997, muestreadas en campo el 5 de febrero de 1998 y almacenadas durante diferentes periodos a 5°C (con luz y en la oscuridad) y forzadas a 15°C durante 4 semanas o a 30°C durante 2 semanas. (Leyenda: **Hoj**: almacenadas y forzadas con hojas; **Hoj-Def**: almacenadas con hojas y forzadas con defoliación; **Def**: almacenadas y forzadas con defoliación)

4.2.2. Observaciones de almidón

La baja intensidad de la coloración negro/azul con la tinción de IIK indica una baja presencia de gránulos de almidón en las yemas muestreadas el 3 de diciembre (Fig. 3.8 - A). Al final del periodo de almacenamiento a 5°C (12 semanas), aumentó la presencia de gránulos de almidón, pero solo en presencia de luz y de las hojas (Fig. 4.8 - B vs. Figs. 4.8 - C y D).

En la zona central de la porción del tallo contigua a la base de la yema, la presencia de los gránulos de almidón es visible en el muestreo de 3 de diciembre, pero en cantidad poco elevada (Fig. 4.9 - A). Al final del periodo de almacenamiento, aumentó la intensidad de la coloración negro/azul de los gránulos de almidón en presencia de luz, con independencia de la defoliación (Figs. 4.9 - B y C vs. Fig. 4.9 - D). En presencia de luz y de las hojas (Fig. 4.9 - B) ese aumento pareció más marcado que en presencia de luz y con defoliación (Fig. 4.9 - C).

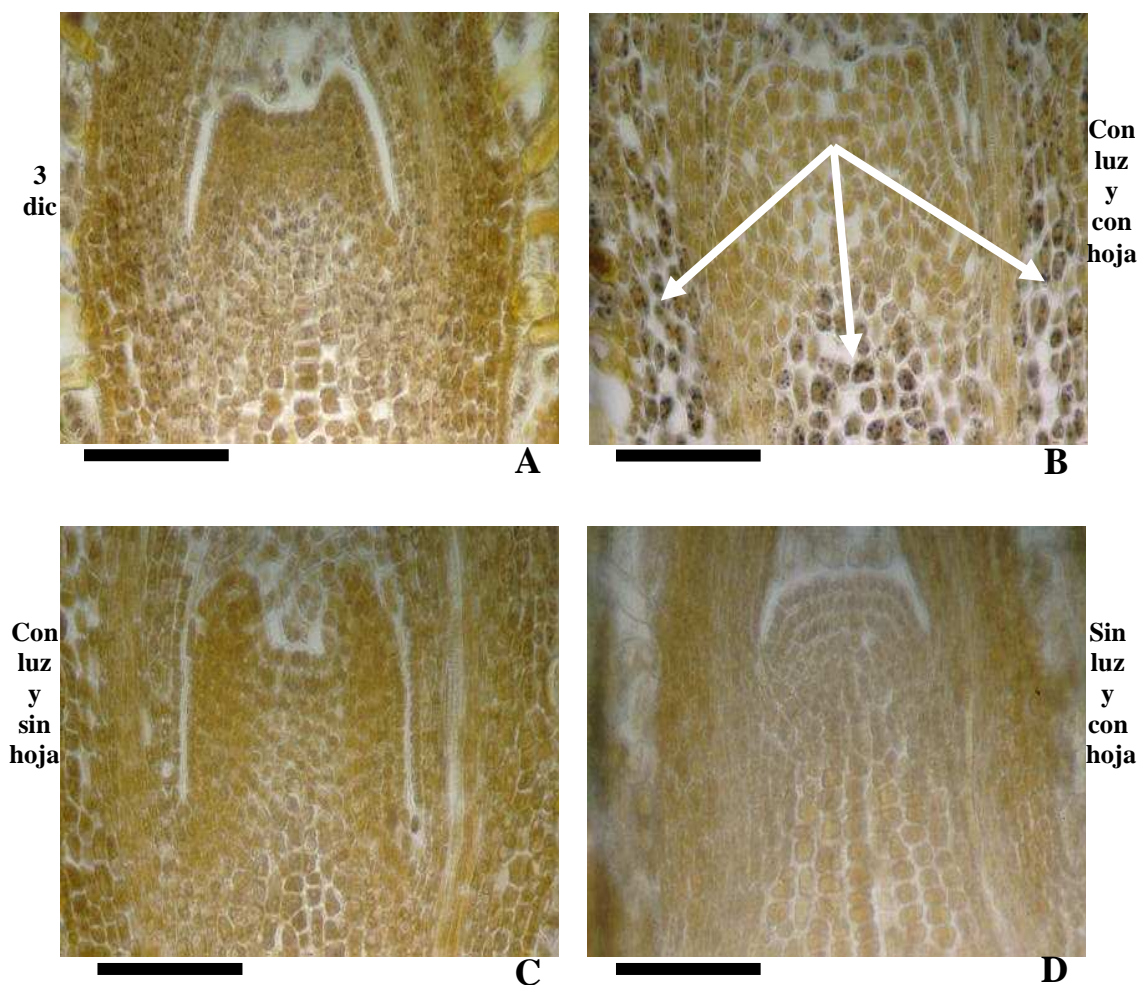


Figura 4.8 - Corte longitudinal central de la parte distal de yemas de árboles OFF en 1997, muestreadas el 3 de diciembre (A) y almacenadas a 5°C durante 12 semanas (B, C y D) (Tinción de IIK) (Barra = 100µm). A: coloración negro/azul poco intensa en las yemas muestreadas el 3 de diciembre (control). B: coloración negro/azul de los gránulos de almidón presentes en la parte central del eje de la yema y en las brácteas (flechas), después del almacenamiento con luz y con hojas. C: coloración negro/azul de los gránulos de almidón apenas visible, después del almacenamiento con luz y sin hojas. D: coloración negro/azul de los gránulos de almidón ausente, después del almacenamiento sin luz y con hojas

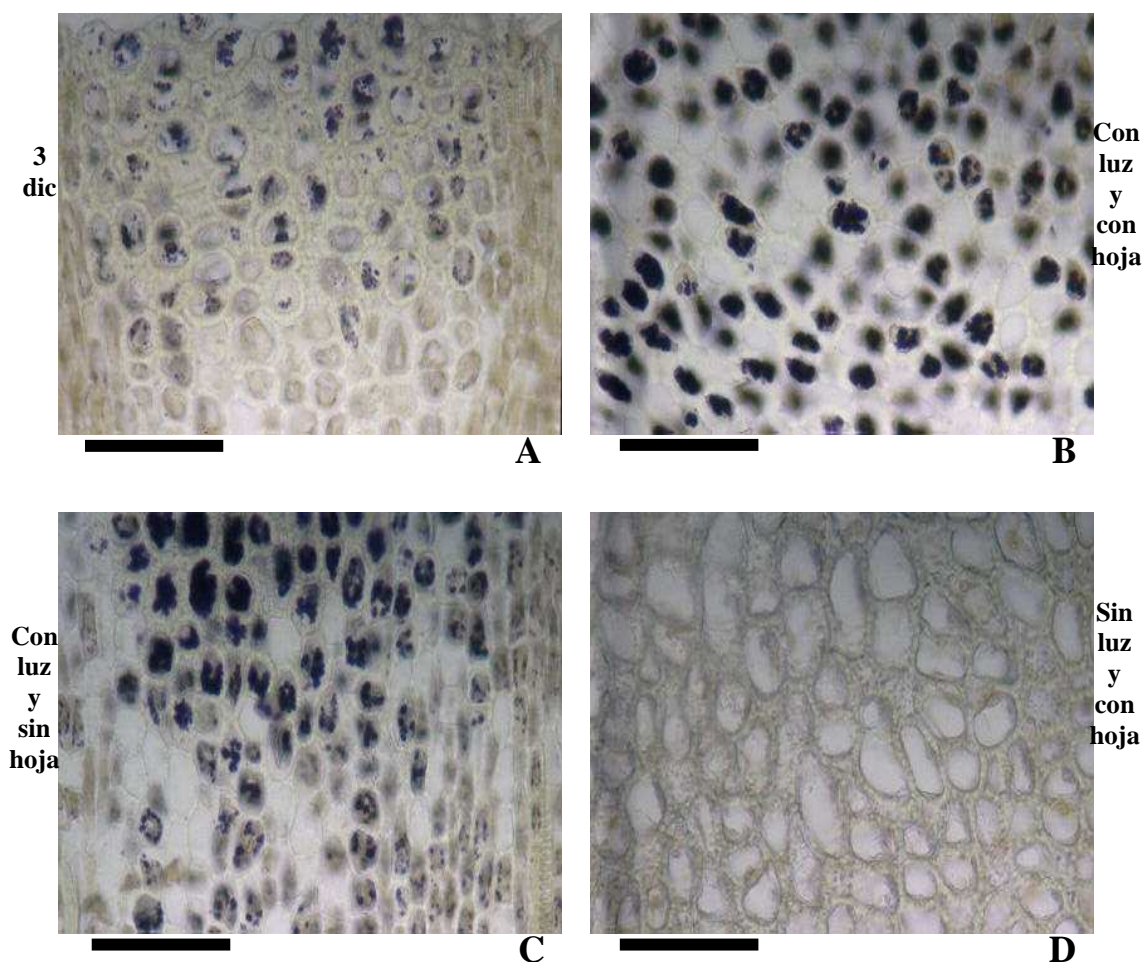


Figura 4.9 - Parte central de la porción del tallo contigua a la base de la yema en el corte longitudinal central de las yemas de árboles OFF en 1997, muestreadas el 3 de diciembre (A) y almacenadas a 5°C durante 12 semanas (B, C y D) (Tinción de IIK) (Barra = 100µm). A: coloración negro/azul presente en cantidad moderada en las muestras del 3 de diciembre (control). B: coloración negro/azul de los gránulos de almidón presentes en gran cantidad, después del almacenamiento con luz y con hojas. C: coloración negro/azul de los gránulos de almidón en gran cantidad, después del almacenamiento con luz y sin hojas. D: coloración negro/azul de los gránulos de almidón ausente, después del almacenamiento sin luz y con hojas

4.3. Discusión

La disminución del efecto de la defoliación sobre la brotación vegetativa a 15°C en los muestreos hasta el 3 de diciembre confirmó que las yemas de los árboles OFF pasan por un periodo de endolancia, que se establece progresivamente durante el otoño (Fig. 4.1). En el muestreo de 7 de enero, el efecto de la defoliación sobre la brotación vegetativa se incrementó de nuevo, se redujo en el muestreo de 5 de febrero y se anuló completamente en el muestreo de 5 de marzo (Fig. 4.1), sugiriendo un periodo de salida del reposo (eliminación de la endolancia) de las yemas de los árboles OFF desde la primera mitad de enero hasta por lo menos mediados de febrero. En el muestreo de 5 de marzo, la brotación es máxima y toda reproductora, independientemente de la defoliación y de la temperatura de forzado (Fig. 4.1), sugiriendo que en el periodo de salida del reposo de las yemas reproductoras del olivo se solapan la endo- y la parolancia, hasta la completa satisfacción de las necesidades de frío.

En los muestreos realizados en octubre y noviembre, las estaquillas almacenadas sin hojas tuvieron una brotación vegetativa siempre elevada a 15°C (Figs. 4.3 y 4.4), confirmando que esos muestreos se realizaron antes del establecimiento de la endolancia y sugiriendo que ésta se establece durante el mes de noviembre. La brotación vegetativa a 15°C se redujo en las estaquillas que fueron previamente almacenadas con hojas (Figs. 4.3 y 4.4), evidenciando el papel del frío (sea natural o artificial) en el establecimiento de la endolancia y sugiriendo un papel activo de la hoja en ese proceso. En el muestreo del 3 de diciembre (Fig. 4.5), la defoliación tuvo un efecto promotor de la brotación vegetativa a 15°C después del periodo de almacenamiento, pero fué independiente de la presencia de las hojas durante dicho periodo, confirmando que este muestreo se realizó ya en el periodo de endolancia. En el muestreo del 7 de enero (Fig. 4.6), el efecto de la defoliación sobre la promoción de la brotación vegetativa a 15°C ocurrió desde el momento del muestreo hasta mitad del periodo de almacenamiento. Ese efecto de la defoliación fué independiente de la presencia de las hojas durante dicho periodo y la brotación reproductora (con o sin hojas) correspondió a la brotación total en las yemas almacenadas con hojas, confirmando el inicio del periodo de salida del reposo a partir de la primera mitad de

enero. A partir del muestreo del 5 de febrero (Fig. 4.7), el efecto de la defoliación (antes o después del periodo de almacenamiento) sobre la brotación vegetativa tendió a anularse, sugiriendo el final del periodo de salida del reposo en la primera mitad de febrero.

El paralelismo entre la pauta de entrada y salida del reposo con frío natural y con frío artificial (Fig. 4.2) probó que el almacenamiento previo de las estaquillas a 5°C fué un tratamiento efectivo en el establecimiento y eliminación de la endolancia. Sin embargo, el frío artificial no fué tan efectivo como el frío natural, ya que el nivel de la brotación fué mayor en condiciones naturales. Este efecto está de acuerdo con lo observado por Torreño (1993). La oscuridad durante el almacenamiento ha limitado un poco la capacidad de brotación de las yemas pero no la posibilidad de expresar su naturaleza reproductora, puesto que en estas condiciones la brotación reproductora se observó en todos los casos en que también ocurrió este tipo de brotación en el almacenamiento con luz (Figs. 4.3 a 4.7). De esta forma, se comprobó una vez más que el frío no es crítico para completar la inducción floral, que está completa antes de la primera fecha del muestreo (8 de octubre).

Otro aspecto interesante de los resultados de este estudio se refiere a que solamente las yemas que pasaron por un periodo de endolancia (estaquillas muestreadas en octubre y noviembre y almacenadas con hojas o estaquillas muestreadas a partir de diciembre) produjeron inflorescencias, confirmando que el establecimiento de la endolancia es un factor crítico en la expresión de la naturaleza reproductora de las yemas del olivo. Por otro lado, la brotación reproductora máxima de las yemas que pasaron por un periodo de endolancia ocurrió en muestreos después del 5 de febrero, cuando se completó el periodo de salida del reposo, con independencia de las condiciones del almacenamiento o del forzado (Fig. 4.1 a 4.7). Como en el periodo de salida del reposo la brotación reproductora a 15°C (con o sin hojas) siguió la pauta de la brotación total (con hojas), mientras a 30°C la brotación reproductora solamente ocurrió al final de dicho periodo (con o sin hojas), queda confirmado que las altas temperaturas interfieren con la capacidad de las yemas de los árboles OFF para expresar su naturaleza reproductora hasta la completa salida del reposo.

De esta forma, si el frío invernal tiene algún papel determinante en el desarrollo reproductor de las yemas del olivo, ese papel solamente puede ser de establecimiento y

eliminación de la endolatenia, en la justa medida en que el establecimiento de la endolatenia por el estímulo del frío y la satisfacción de las necesidades en frío para eliminar la endolatenia son factores críticos que condicionan la expresión de la naturaleza reproductora de las yemas. En conclusión, si la posibilidad de expresión de la naturaleza reproductora (diferenciación morfológica de las inflorescencias) puede estar condicionada por algo que ocurre en el otoño anterior (posiblemente en la segunda mitad de noviembre), eso es una señal de que, fisiológicamente, ocurrió ya la iniciación floral, aunque sin el carácter de irreversibilidad subyacente en el concepto clásico de iniciación floral.

La presencia de gránulos de almidón, indicada por la coloración negro/azul de la tinción de IIK, muestra que hay una acumulación de almidón en las yemas y en la parte central de la porción del tallo contigua a la base de la yema, cuando las estaquillas se almacenan a 5°C en presencia de hojas y con luz durante periodos suficientemente largos (Figs. 4.8 y 4.9). Sin embargo, **el almidón no es un factor necesario** para que ocurra el desarrollo de las inflorescencias, puesto que en el caso del almacenamiento sin luz (Fig. 4.8 - D y 4.9 - D) se observó brotación reproductora, a pesar de que no se apreció vestigio alguno de almidón. **El almidón tampoco es un factor suficiente** para que ocurra desarrollo floral, puesto que el forzado a 30°C en el muestreo de diciembre inhibió cualquier desarrollo de las inflorescencias, incluso en la situación más favorable a su acumulación: almacenamiento con luz y con hojas (Figs. 4.8 - B y 4.9 - B). Como, por otro lado, en el forzado a 15°C la mayor cantidad de almidón en la yema corresponde a un nivel más elevado de brotación reproductora, el papel del almidón parece estar de acuerdo con Bernier *et al.* (1993), cuando refieren que la movilización del almidón parece ser condicionante del desarrollo floral, pero no determinante de la inducción floral.

5. Influencia de la oscuridad en la salida del reposo

El efecto negativo del sombreado sobre la floración del año siguiente ocurre a partir de julio (Tombesi y Cartechini, 1986) y apoya la idea de una regulación de la inducción floral a partir de una época muy temprana en el año anterior a la floración (Lavee *et al.*, 1986; Stutte y Martin, 1986b; Navarro *et al.*, 1990; Pinney y Polito, 1990; Fernandez-Escobar *et al.*, 1992; Lavee y Haskal, 1993). Aquel efecto se debía a una reducción de la fotosíntesis y, en consecuencia, a una menor disponibilidad de asimilados (Ruffaldi, 1958; Tombesi, 1984; Tombesi y Cartechini, 1986).

La presencia o ausencia de los frutos en el año anterior se ha relacionado con distintos patrones de acumulación de nitrógeno (Sarmiento *et al.*, 1977; Lavee y Avidan, 1994) y de almidón (Sarmiento *et al.*, 1976; Cartechini y Tombesi, 1986), con las relaciones nitrógeno proteico/nitrógeno amínico (Sarmiento *et al.*, 1977), almidón/azúcares solubles (Sarmiento *et al.*, 1976), azúcares reductores/azúcares no reductores (Sarmiento *et al.*, 1976; Mazuelos *et al.*, 1983) y con la composición en aminoácidos (Catalina *et al.*, 1978) en las hojas, en la corteza, en las yemas o en las raíces. No obstante, la disponibilidad de asimilados no parece ser determinante del comportamiento alternante del olivo (Stutte y Martin, 1986a; 1986b).

En los resultados obtenidos en el capítulo anterior se confirmó que la oscuridad limitó la acumulación de almidón en las yemas del olivo y condicionó el nivel máximo de la brotación reproductora de las yemas de las estaquillas muestreadas de árboles sin carga (OFF) en el año anterior, pero no eliminó su capacidad de formar inflorescencias.

En este experimento, se pretende determinar el efecto de la oscuridad en los procesos de inducción-diferenciación floral y confirmar con plantas enteras (*in vivo*) los resultados obtenidos previamente con explantos (*in vitro*), que apuntan en el sentido de que la disponibilidad de asimilados (o la movilización de las reservas) condiciona el desarrollo de las inflorescencias, no la capacidad de las yemas en producirlas.

5.1. Material y métodos

El estudio se realizó con olivos en maceta de 'Arbequina' en descarga (OFF) de 3 años de edad. En este estudio, el tratamiento de oscuridad se realizó envolviendo los ramos con 2 bolsas de plástico negro, mientras el tratamiento testigo correspondió al ambiente luminoso dentro del umbráculo del Departamento de Agronomía (ETSIAM) de la Universidad de Córdoba, local donde se prepararon, se cuidaron y se mantuvieron las macetas para este ensayo.

Las fechas de inicio y la duración de los periodos de sombreamiento se presentan en la Tabla 5.1. La asignación de macetas para cada fecha de inicio y duración del tratamiento se realizó aleatoriamente. Por cada fecha de inicio y duración del tratamiento se realizaron 3 repeticiones (árboles). En cada árbol se aplicaron todos los tratamientos, con un mínimo de 3 ramos por tratamiento, asignados aleatoriamente. Los tratamientos aplicados en cada árbol fueron los siguientes: a) testigo, con hojas; b) testigo, con defoliación; c) oscuridad, con hojas y d) oscuridad, con defoliación.

El número total de yemas, el número de yemas brotadas y el número de inflorescencias se contaron en el estado fenológico de botón verde (abril).

Tabla 5.1 - Fechas de inicio y duración del periodo de sombreamiento

Fecha del muestreo	Duración del sombreamiento (semanas, aprox.)
27 de noviembre de 1997	4, 8, 12
23 de diciembre de 1997	4, 8
19 de enero de 1998	4
12 de febrero de 1998	4

5.2. Resultados

Cuando el tratamiento de oscuridad fué aplicado el **27 de noviembre** en ramos con hojas, toda la brotación fué reproductora (Fig. 5.1 - azul vs. amarillo). La oscuridad no influenció la brotación en presencia de las hojas, cuando el tratamiento duró 4 ó 8 semanas, pero cuando el tratamiento fué más prolongado (12 semanas), hubo una tendencia para su reducción. La defoliación *per se* no influenció la brotación total, pero redujo marcadamente la brotación reproductora (Fig. 5.1 - fucsia). Cuando el tratamiento de oscuridad fué aplicado en ramos defoliados, las diferencias entre la brotación total y reproductora fueron equivalentes al efecto de la defoliación *per se* (Fig 5.1 - fucsia vs. verde). Solo en el tratamiento más prolongado (12 semanas) hubo una mayor reducción de la brotación (total y reproductora) debida a la oscuridad.

Cuando el tratamiento de oscuridad fué aplicado el **23 de diciembre** en ramos con hojas, toda la brotación fué reproductora (Fig. 5.2 - azul vs. amarillo). La oscuridad no influenció la brotación en presencia de las hojas, cuando el tratamiento duró 4 semanas, pero cuando el tratamiento fué más prolongado (8 semanas), la brotación fué más reducida. La defoliación *per se* no influenció la brotación total, pero redució la brotación reproductora (Fig. 5.2 - fucsia). Cuando el tratamiento de oscuridad fué

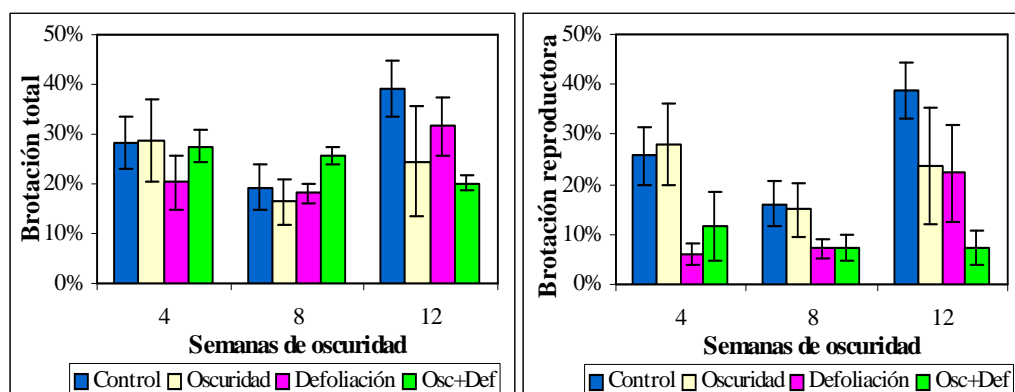


Figura 5.1 – Brotación total (izquierda) y reproductora (derecha) de las yemas de árboles OFF en 1997 con 3 años de edad, cultivadas en macetas y mantenidas en las condiciones del umbráculo, con hojas (azul) o defoliadas (fucsia), o tras periodos de duración variable del tratamiento de oscuridad, con hojas (amarillo) o defoliadas (verde), desde el **27 de noviembre de 1997**

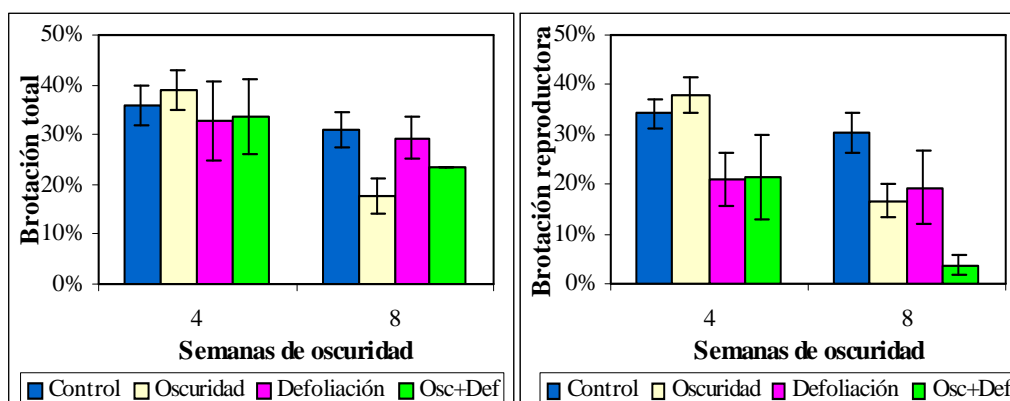


Figura 5.2 – Brotación total (izquierda) y reproductora (derecha) de las yemas de árboles OFF en 1997 con 3 años de edad, cultivadas en macetas y mantenidas en las condiciones del umbráculo, con hojas (azul) o defoliadas (fucsia), o tras periodos de duración variable del tratamiento de oscuridad, con hojas (amarillo) o defoliadas (verde), desde **el 23 de diciembre de 1997**

aplicado en ramos defoliados, el efecto de la oscuridad en el tratamiento más prolongado (8 semanas) se acentuó marcadamente en relación al efecto de la defoliación *per se*, principalmente en la brotación reproductora (Fig. 5.2 - fucsia vs. verde).

El efecto de idénticos periodos de 4 semanas de oscuridad en diferentes momentos varió con la fecha en la cual se inició el tratamiento y con la defoliación (Fig. 5.3). Cuando los tratamientos se iniciaron en noviembre o diciembre (Fig. 5.3 - arriba), solamente la defoliación *per se* provocó una reducción de la brotación reproductora. Cuando los tratamientos se iniciaron en enero, la oscuridad aplicada a ramos defoliados incrementó la brotación vegetativa y solo cuando la oscuridad se aplicó en febrero ocurrió su efecto en la reducción de la brotación reproductora (Fig. 5.3 - abajo). En esta fecha, la defoliación *per se* no afectó la brotación.

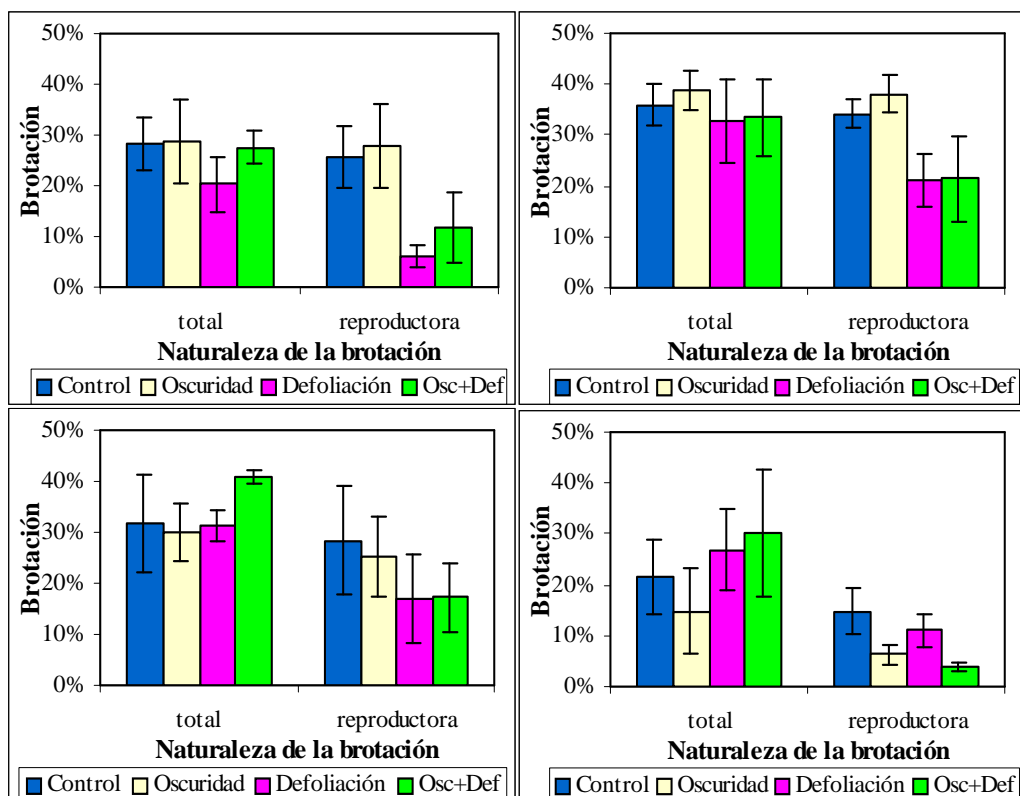


Figura 5.3 – Brotación total y reproductora de las yemas de árboles OFF en 1997 con 3 años de edad, cultivadas en macetas y mantenidas en las condiciones del umbráculo, con hojas (azul) o defoliadas (fucsia), o tras 4 semanas del tratamiento de oscuridad, con hojas (amarillo) o defoliadas (verde), con inicio en diferentes fechas: 27 de noviembre (izquierda, arriba); 23 de diciembre (derecha, arriba); 19 de enero (izquierda, abajo) y 12 de febrero (derecha, abajo)

5.3. Discusión

Los resultados obtenidos con plantas en macetas (*in vivo*) confirmaron el efecto de la defoliación en la promoción de la brotación vegetativa (Figs. 5.1 a 5.3), cuando se efectuó antes de febrero (paralatencia - Lang, 1987). Ese efecto de la defoliación se reflejó en la disminución de la brotación reproductora hasta la misma fecha, sugiriendo un papel importante de las hojas en la expresión de la naturaleza reproductora de las yemas, probablemente como productoras de asimilados. Este efecto de la defoliación sobre la reducción de la brotación de naturaleza reproductora de las yemas hasta febrero no fué debido a la falta de acumulación de frío invernal, ya que todas las plantas recibieron la misma cantidad de frío (frío natural), confirmando resultados anteriormente realizados en condiciones de campo (Rallo y Martín, 1991).

La oscuridad solamente presentó un efecto de reducción de la brotación, en particular la reproductora, cuando los tratamientos de sombreamiento se iniciaron en noviembre y diciembre y se prolongaron hasta febrero o cuando se iniciaron después de mediados de enero (Figs. 5.1 a 5.3). Solo en febrero, el efecto del sombreamiento *per se* fué primordial respecto a la defoliación (Fig. 5.3). Cuando el sombreamiento se aplicó durante la endolatenia, no hubo ningún efecto negativo de la oscuridad sobre la brotación (total o reproductora), siempre que el tratamiento terminó antes de mediados de enero (Fig 5.1 - 4 y 8 semanas y Fig. 5.2- 4 semanas). Como los resultados anteriores del capítulo 3 indicaron que la eliminación de la endolatenia ocurría a partir de la primera mitad de enero, la luz y, en consecuencia, la producción de asimilados sería un factor que condiciona la expresión de la naturaleza reproductora de las yemas después de la eliminación de la endolatenia y durante la diferenciación de las inflorescencias.

En las condiciones de este estudio, el sombreamiento durante el invierno probó, una vez más, que el frío no es un factor de inducción floral, ya que las yemas fueron capaces de brotar reproductivamente en cuanto se eliminó la endolatenia, aunque permanecieran en la oscuridad durante 2 meses, en el periodo supuestamente inductor. Aunque Fabbri y Benelli (2000) refieran la posibilidad de translocación del estímulo inductor de los ramos con luz a los ramos defoliados o sombreados, los resultados idénticos obtenidos con explantos (capítulo 4) indican que tal posibilidad no ocurre en el olivo durante el periodo de acumulación de frío invernal.



IV - DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados de los diversos estudios realizados en el presente trabajo configuran una mejor comprensión de los acontecimientos que ocurren en las yemas del olivo en el curso de su desarrollo, desde que se forman hasta que brotan en la primavera del año siguiente.

La carga del árbol fué el factor determinante de la brotación reproductora en el año siguiente (floración de retorno). La brotación reproductora fué siempre elevada después de un año con pocos frutos (en descarga - OFF) y baja después de un año con una gran cosecha (en carga - ON), independientemente de la cantidad de frío acumulado y de las condiciones de forzado, o sea, estos resultados excluyen el papel del frío en la inducción floral (Figs. 2.2, 2.3, 3.1, 3.2 y 3.3). Este efecto de la carga del año anterior confirma la tendencia alternante (vecería) y el ciclo reproductor bienal del olivo (Lavee *et al.*, 1986; Stutte y Martin, 1986b; Navarro *et al.*, 1990; Fernandez-Escobar *et al.*, 1992).

El efecto de la carga del árbol se hizo sentir en una época muy temprana, marcando una diferencia objetiva en múltiples aspectos del desarrollo de las yemas del olivo a partir del verano del año anterior que se mantuvo en el otoño/invierno y que se tradujo en la diferente floración de retorno en primavera. Los aspectos en que se notó esa influencia fueron:

- *El número de nudos, el tamaño y el crecimiento de las yemas axilares del olivo antes del reposo invernal.* Las yemas distales de los árboles OFF presentaron mayor número de nudos y mayor tamaño que las correspondientes yemas de los árboles ON, de acuerdo con Navarro *et al.* (1990) y Pinney y Polito (1990). Las yemas proximales de los árboles ON mantuvieron una tendencia continuada para elongar los entrenudos (Fig. 1.8) y para formar más nudos durante el otoño (Fig. 1.5), a pesar de la competencia por los asimilados con los frutos en crecimiento y maduración, mientras las yemas de los árboles OFF (distales o proximales) variaron muy

poco a lo largo del tiempo (Figs. 1.6 a 1.8). Esta mayor tendencia para el crecimiento de las yemas de los árboles ON durante el otoño fué notada también por Fabbri y Alerci (1999).

- *La latencia de las yemas axilares del olivo.* La disminución consistente de la brotación de las yemas de estaquillas defoliadas de los árboles OFF a partir del inicio del otoño (Fig. 2.3) confirma que las yemas de los árboles OFF pasan por un periodo de endolatenia, como proponían Rallo y Martin (1990), Torreño (1993), Rallo *et al.* (1994), Relañó (1996) y Ruiz (1996). Como la defoliación de los árboles ON provocó una brotación regular a lo largo de todo el periodo del estudio desde el verano hasta final del invierno (Fig. 2.3), estas yemas no pasaron por ningún periodo de endolatenia, quedando inhibidas por las hojas, es decir, en paralatenia.
- *Las necesidades de frio de las yemas axilares del olivo.* La entrada en endolatenia y la completa satisfacción de las necesidades de frio para eliminar la endolatenia fueron factores críticos para la brotación reproductora de las yemas de los árboles OFF (Figs. 2.2, 2.3, 3.1, 3.3, 4.1). La endolatenia está plenamente establecida en diciembre (Figs. 2.3, 3.1 y 4.1), periodo en que supuestamente se inicia el estímulo inductor de las bajas temperaturas (Hackett y Hartmann, 1963); Cimato y Fiorino, 1986; Msallem y Hellali, 1988). El periodo de salida del reposo ocurre desde la primera mitad de enero hasta la primera mitad de febrero (Figs. 2.2, 2.3, 3.1, 3.3, 4.1), periodo en que la disminución del número de días de frio efectivo provoca una reducción proporcional de la floración (Hartmann, 1953; Hartmann y Porlingis, 1957; Hackett y Hartmann, 1963; 1964; 1967; Milella y Deidda, 1968; Badr y Hartmann, 1971; Hartmann y Whisler, 1975). De esta forma es perfectamente admisible que se hayan interpretado estos resultados como un estímulo de vernalización. Las yemas de los árboles ON (vegetativas) no necesitaron del estímulo del frio para brotar (Figs. 2.2, 2.3 y 3.2), como había observado Hartmann (1953). El frio parece tener pues un papel de "maduración" para impedir la brotación extemporánea o de "sincronización" para garantizar la polinización simultánea. Ambas estrategias son necesarios para el desarrollo de las yemas reproductoras (supervivencia de la especie), mientras el

desarrollo de las yemas vegetativas (supervivencia del individuo) no necesita de condiciones tan estrictas.

- *La morfogénesis de las yemas axilares del olivo después de la eliminación de la endolatenencia.* La actividad morfogenética fué notable en el domo apical y en las axilas de las brácteas (formación de primórdios) de las yemas de los árboles OFF (Figs. 3.5 y 3.7) desde el comienzo de la desaparición de la endolatenencia (a partir de la primera mitad de enero). Esta mayor actividad en la zona central del meristemo apical configura un patrón de desarrollo reproductor (Herbert *et al.*, 1992; Fosket, 1994; Martínez-Zapater y Salinas, 1996; Biju *et al.*, 1997). El desarrollo de las yemas de los árboles ON fué notable en las brácteas y en los entrenudos (elongación), quedando la zona central del meristemo apical con una forma plana (Figs. 3.5 y 3.6) (Martínez-Zapater y Salinas, 1996).
- *La acumulación de almidón en las yemas axilares del olivo después de la eliminación de la endolatenencia.* La acumulación de almidón solamente ocurrió en las yemas axilares de los árboles OFF a partir de la primera mitad de enero, época del inicio de la actividad morfogenética (eliminación de la endolatenencia) (Fig. 3.8). Esta acumulación ocurrió en ambiente natural (Fig. 3.8) o con tratamientos de frío artificial, siempre que hubo presencia de luz y de hojas (Fig. 4.8). Sin embargo, la brotación reproductora fué reducida hasta mediados de febrero con el forzado a temperaturas altas, lo que sugiere que el almidón es necesario para el desarrollo de las inflorescencias a la salida del reposo de las yemas de los árboles OFF y no para determinar el cambio en su naturaleza, de acuerdo con Houssa *et al.* (1991), McDaniel *et al.* (1991), Bernier *et al.* (1993) y García-Luis *et al.* (1995a; 1995b). La acumulación de almidón a partir del inicio del periodo de salida del reposo de las yemas de los árboles OFF sugiere que a partir de ese momento esas yemas son sumideros fuertes (contrariamente a las yemas de los árboles ON) y que la adquisición de la "fuerza de sumidero" es una consecuencia y no la causa de la inducción floral. Esto está de acuerdo con las observaciones de Stutte y Martin (1986a; 1986b) que cuestionaban la disponibilidad de asimilados como causa de alternancia.

La defoliación estimuló la brotación vegetativa. El efecto promotor de la defoliación ocurrió en las yemas de los árboles OFF y ON, pero en periodos y con intensidades distintas. Este efecto pone de manifiesto un fenómeno de paralatenia (Lang, 1987). En las yemas axilares de los árboles ON, la brotación de yemas vegetativas se estimuló de una forma regular a lo largo del periodo estudiado, indicando que la latencia de esas yemas es fundamentalmente un caso de paralatenia (Figs. 2.3 y 3.2). En las yemas axilares de los árboles OFF, el efecto estimulante de la defoliación sobre la brotación vegetativa fué elevado en el verano, disminuyó durante el otoño y aumentó de nuevo en enero (Figs. 2.3, 3.1, 3.3, 4.1 y 4.3 a 4.6), evidenciando que la latencia en el verano es fundamentalmente paralatenia, en el otoño es progresivamente endolatenia y en el invierno se solapa la endolatenia y la paralatenia, en particular durante el periodo de salida del reposo.

Este comportamiento del olivo respecto a la defoliación no se había estudiado hasta el presente. El establecimiento progresivo de la endolatenia durante el otoño es similar al que ocurre en la generalidad de los frutales caducifolios (Saure, 1985; Powell, 1987; Crabbé y Barnola, 1996) y configura la endolatenia como el último estado de una cadena de inhibiciones correlativas que comienzan con la dominancia apical y van gradualmente extendiéndose a los tejidos inmediatamente subyacentes al meristemo, quedando, finalmente, bajo el control endógeno del meristemo (Champagnat, 1983; Champagnat y Côme, 1986), como defiende la "escuela francesa" (Dennis Jr., 1994).

El solape endo- y paralatenia ocurre durante el periodo de salida del reposo de las yemas de los árboles OFF, o sea, entre la primera mitad de enero y la primera mitad de febrero y coincide con el periodo en que se inicia la actividad morfogénica (desarrollo de las inflorescencias) en las yemas salidas del reposo (Figs. 2.3, 3.1, 3.3, 3.4, 3.5, 4.1 y 4.3 a 4.6). A medida que aumenta la acumulación de frío invernal, se incrementa el número de las yemas que salen del reposo (iniciando su desarrollo reproductor) y disminuye el efecto estimulante de la defoliación sobre la brotación vegetativa. Aunque el desarrollo de las inflorescencias ha comenzado en fechas diferentes según la temperatura de forzado, el efecto estimulante de la defoliación sobre la brotación vegetativa empezó a disminuir en cuanto se inició, para la misma temperatura de forzado, el aumento de la brotación reproductora.

El efecto de paralatenia en el periodo de salida del reposo sugiere que la

eliminación de la endolencia de cada yema individual de los árboles OFF parece preceder a la capacidad para expresar su naturaleza reproductora, que necesita la hoja adyacente, posiblemente como fuente de asimilados para el desarrollo de la inflorescencia y como medio adicional para evitar su brotación extemporánea.

La acumulación de frío invernal no juega papel alguno en la inducción floral. Las pruebas que conducen a esta proposición son varias:

- *El porcentaje máximo de floración está determinado por la carga del árbol en el año previo y no se incrementa con la prolongación de la exposición a bajas temperaturas* (Figs. 2.2, 2.3 y 3.1 a 3.3), como señalaron Cimato y Fiorino (1986), Rallo y Martin (1991) y Fabbri y Alerci (1999).
- *La brotación reproductora de las yemas de un mismo árbol que recibieron igual cantidad de frío fué diferente según la temperatura de forzado* (Figs. 3.1, 3.3, 4.1 y 4.3 a 4.6). Esta variación de la brotación con las temperaturas de forzado configura un proceso de eliminación de la endolencia (Saure, 1985).
- *Diferencias en el número de nudos y en el tamaño de las yemas, debidas a la diferente condición del árbol, fueron observadas antes del periodo de reposo invernal* (Figs. 1.6 a 1.8), confirmando las observaciones de Navarro *et al.* (1990), Pinney y Polito (1990) y Fabbri y Alerci (1999).
- Diferencias en la respuesta a la defoliación indican que el frío invernal es fundamental en el establecimiento y eliminación de la endolencia (Figs. 2.3, 3.1, 3.3 y 4.1 a 4.6).
- *Durante el periodo de acumulación de frío, la oscuridad no afectó a la capacidad de las yemas para producir inflorescencias* (Figs. 4.2 a 4.6). El efecto de los tratamientos de oscuridad prueba que la inducción floral está completa en otoño, incluso antes del inicio del periodo de acumulación de frío invernal. Los resultados con explantos (capítulo 4) eliminan cualquier duda sobre la posibilidad de translocación del estímulo inductor de las hojas iluminadas a las sombreadas, referida por Fabbri y Benelli (2000).
- *El desarrollo morfológico de las yemas en el momento de la eliminación de la endolencia se mostró diferente según la condición del árbol* (Figs. 3.4 a

- 3.6). En los árboles OFF, el desarrollo morfológico notable en la zona central del meristemo apical configura un proceso de desarrollo reproductor (Herbert *et al.*, 1992; Fosket, 1994; Martínez-Zapater y Salinas, 1996; Biju *et al.*, 1997). Este tipo patrón de desarrollo fué similar al descrito por Vigodsky de Philippis (1937; 1938), Almeida (1940), Hartmann (1951), Hackett y Hartmann (1963), Troncoso (1967; 1968), Msallem y Hellali (1988), Fabbri y Alerci (1999) y De la Rosa *et al.* (2000).
- *El efecto de las temperaturas altas, de la defoliación y de la oscuridad ocurrieron con posterioridad a los cambios morfológicos que caracterizan las diferencias entre yemas de árboles OFF y ON a la salida del reposo (eliminación de la endolatenencia) (Figs. 3.1, 3.3, 4.1, 4.3 a 4.6 y 5.1 a 5.3). Se puede discutir la irreversibilidad de la "estructura ondulada con 3 protuberancias, de las cuales la central es la más desarrollada" (Fig. 4.5), descrita por Vigodsky de Philippis (1937; 1938). Se puede discutir también si las protuberancias laterales son primordios de brácteas de un nuevo nudo (Almeida, 1940) o primordios de sépalos de una flor terminal (Hartmann, 1951). Sin embargo, como las yemas de los árboles ON no desarrollan esta estructura ondulada, la reducción de la brotación reproductora y/o la promoción de la brotación vegetativa con temperaturas altas, defoliación y oscuridad después de la salida del reposo resultan de un proceso de inhibición o reversión del desarrollo reproductor y no de un cambio incompleto en la naturaleza de la yema. La reversión del desarrollo floral puede conseguirse por "golpes" ambientales, tales como cambios abruptos en el fotoperiodo o temperatura, incluso cuando ocurren muy tarde en el desarrollo de la yema floral (Battey y Lyndon, 1990), como el caso extremo de *Impatiens balsamina* que puede revertir después de diferenciar los estambres (Krishnamoorthy y Nanda, 1968). Por ello, si la propia diferenciación floral puede revertir, ¿porqué poner tanto énfasis en la "irreversibilidad" para defenir la iniciación floral o el final de la inducción floral?.*

Las condiciones del forzado de crecimiento condicionan la expresión de la naturaleza reproductora de las yemas axilares de los árboles OFF. El efecto de las temperaturas altas, de la defoliación y de la oscuridad durante el periodo de salida del reposo (de primera mitad de enero a primera mitad de febrero) en la disminución de la brotación reproductora evidencia la sensibilidad del proceso de desarrollo de las inflorescencias a las condiciones ambientales (Figs. 3.1, 3.3, 4.1, 4.3 a 4.6 y 5.1 a 5.3). Esta sensibilidad a los factores ambientales durante el desarrollo de las inflorescencias explicaría también el efecto de la insuficiente acumulación de frío invernal en el aborto de yemas y aborto ovárico (Milella y Deidda, 1968) y en la reducción del número de flores por inflorescencia (Porlingis y Therios, 1979). Este último efecto es similar al que ocurre en vid (Pouget, 1981; 1983). La presencia de las hojas y la radiación parecen fundamentales en la producción de los asimilados necesarios al desarrollo de las inflorescencias (Figs. 3.8, 3.9, 4.8 y 4.9), pero la demanda de asimilados o la movilización de reservas no fué determinante del cambio en la naturaleza de las yemas como señalaron Stutte y Martin (1986a; 1986b) Houssa *et al.* (1991), McDaniel *et al.* (1991), Bernier *et al.* (1993) y García-Luis *et al.* (1995a; 1995b).

Las temperaturas bajas fueron necesarias para la salida del reposo (endolancia) de las yemas reproductoras del olivo y la presencia de las hojas parecen ser necesarias para evitar la brotación extemporánea de las yemas (paralancia) y permitir el desarrollo reproductor normal de las yemas axilares de los árboles OFF. Por otro lado, las temperaturas altas y la defoliación antes del reposo invernal o de la completa satisfacción de las necesidades en frío para la salida del reposo parecen inducir una latencia secundaria y/o brotación vegetativa, incluso en yemas que habían iniciado la diferenciación de las inflorescencias. Esta respuesta será posiblemente un medio para prevenir el desarrollo reproductor en condiciones desfavorables. De esta forma, las plantas dan prioridad a la supervivencia del individuo (crecimiento) cuando "sienten" que el cambio en las condiciones ambientales puede poner en peligro la estrategia de supervivencia de la especie (reproducción).

El desarrollo (fisiológico y morfológico) reproductor de las yemas de los árboles OFF necesita por lo tanto condiciones muy estrictas para expresarse, lo que determina que la respuesta de cada yema al estímulo de crecimiento (condiciones de forzado) depende de su estado de desarrollo en el momento en que recibe ese estímulo. Este

hecho, que se ha observado reiteradamente en este trabajo, está de acuerdo con el propuesto efecto "devernalizante" y las anormalidades en la brotación y la floración (que se atribuyen generalmente a un efecto inductor incompleto o parcial) observados en múltiples experimentos. En estos, las respuestas morfológicas reseñadas cuando se promueven transferencias bruscas de temperaturas bajas a temperaturas altas resulta más del efecto negativo de las temperaturas altas que del efecto positivo de la acumulación de frío, como sugieren los resultados de numerosos ensayos (Lam-Yam y Parisot, 1990; Doi *et al.*, 1991; Guerriero y Bartolini, 1991; Mori *et al.*, 1991a; 1991b; Yoshida *et al.*, 1991; Rawson y Zajac, 1993; Drinnan y Menzel, 1995; Guo *et al.*, 1995; Adams *et al.*, 1998; Bjorkman y Pearson, 1998; King, 1998).

En estudios futuros parece importante estandarizar al máximo las condiciones del muestreo y del forzado, principalmente si se pretenden comparar diferentes cultivares o resultados obtenidos en distintos años o regiones.

Las estaquillas con 3 nudos en condiciones de forzado con temperaturas entre 15 y 20°C fueron explantos adecuados para los estudios de entrada y salida del reposo. En dichos estudios, el efecto de la defoliación sobre la brotación vegetativa mostró ser una herramienta muy útil para determinar el momento de la entrada en endolancia y el periodo de salida del reposo. Uno o dos muestreos semanales de estaquillas de árboles OFF forzadas en las condiciones mencionadas con hojas y defoliadas desde finales de octubre o principios de noviembre hasta finales de febrero, podrán dar una información muy precisa de la fecha del establecimiento de la endolancia y del periodo de salida del reposo (inicio, final y su correspondiente duración).

La posición de la yema en el ramo también demostró ser fuente de variabilidad en los resultados. Estudiar la entrada y salida del reposo en diferentes posiciones (proximal media y distal) puede ser necesaria para caracterizar el estatus o la intensidad de la endolancia en las yemas a lo largo del ramo, aunque sea difícil de concretar. En todo caso, estudios comparativos (cultivar, año, región,...) únicamente se deberán realizar sobre yemas muestreadas en la misma posición del ramo.

Otro importante aspecto a resaltar fué que los estudios para determinar la época de inducción floral basados en las diferencias anatómicas en el desarrollo de las yemas del olivo solamente tienen sentido cuando éstas proceden de árboles con distinta carga

el año anterior (OFF vs. ON).

En resumen, las yemas del olivo se forman durante la primavera, verano y otoño y su capacidad para producir inflorescencias en la primavera siguiente queda determinada por la carga del árbol: en años con carga elevada (ON), la floración de retorno es escasa, mientras los años con pocos frutos (OFF) determinan una floración de retorno abundante. El desarrollo de las yemas de árboles OFF y ON empieza a diverger desde el verano y mantiene esta pauta hasta la primavera siguiente, cuando se aprecia la diferencia en la floración de retorno. En este periodo, las diferencias más evidentes han sido: a) las yemas de los árboles ON tienden a crecer durante el otoño, mientras las yemas de los árboles OFF entran progresivamente en endolencia; b) las yemas de los árboles ON pasan el invierno inhibidas por las hojas (paralencia) y no necesitan frío para brotar (vegetativamente), mientras las yemas de los árboles OFF pasan por un periodo de endolencia y necesitan acumular frío para brotar (reproductivamente).

A la salida del reposo, las yemas de árboles OFF presentan un patrón de desarrollo morfológico reproductor (diferenciación de las inflorescencias). Los tratamientos con defoliación y oscuridad prueban que este patrón de desarrollo había sido determinado en el otoño y que, por lo tanto, la inducción floral estaba completa antes del estímulo del frío invernal. Durante la salida del reposo, el desarrollo reproductor de las yemas necesita condiciones muy estrictas para expresarse, por lo que las temperaturas altas y la defoliación desde el establecimiento de la latencia hasta la completa satisfacción de las necesidades en frío para la salida del reposo y la oscuridad durante el proceso morfogenético de diferenciación de las inflorescencias interfieren en la capacidad de las yemas de los árboles OFF para expresar su naturaleza reproductora, induciendo latencia secundaria o crecimiento vegetativo.



V - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, SR; Pearson, S y Hadley, P (1998). An appraisal of the use of reciprocal transfer experiments: assessing the stages of photoperiod sensitivity in chrysanthemum cv. Snowdon (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Journal of Experimental Botany*, **49** (325): 1405-1411.
- Ahire, GZ; Desai, UT; Chaudhari, SM; Masalkar, SD y Kale, PN (1994). Effects of growth regulators on flower induction, sex and drop in pomegranate. *Journal of Maharashtra Agricultural Universities*, **19** (1): 153-154.
- Ait-Radi, A; Caballero, JM; y Rallo, L (1990). Influence of fruit set, rate of pistillate inflorescences and level of flowering in the fruiting of olive bearing shoots. *Acta Horticulturae*, **286**: 155-158.
- Ali, AG y Lovatt, CJ (1995). Relationship of polyamines to low-temperature stress-induced flowering of the 'Washington Navel' orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of Horticultural Science*, **70** (3): 491-498.
- Allen, KD y Sussex, IM (1996). Falsiflora and anantha control early stages of floral meristem development in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Planta*, **200** (2): 254-262.
- Almeida, FJ (1940). *Safra e Contra-safra na Oliveira*. Ministério da Agricultura, Série Investigação, nº 7. Lisboa.
- Aribaud, M y Martin-Tanguy, J (1994a). Polyamine metabolism, floral initiation and floral development in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Plant Growth Regulation*, **15** (1): 23-31.
- Aribaud, M y Martin-Tanguy, J (1994b). Polyamine metabolism in normal and sterile *Chrysanthemum morifolium*. *Phytochemistry*, **37** (4): 927-932.
- Arnold, MA y Young, E (1990). Growth and protein content of apple in response to root and shoot temperature following chilling. *HortScience*, **25** (12): 1583-1588.
- Arzee, T (1952). *Structure and Development of the Leaf in Olea europaea L. var. rubra with Special Reference to the Sclereids*. PhD Dissertation. University of California.

- Aschcroft, GD; Richardson, EA y Seeley, SD (1977). A statistical method of determining chill unit and growing degree hour requirements for deciduous fruit trees. *HortScience*, **12** (4): 347-348.
- Badr, SA y Hartmann, HT (1971). Efect of diurnally fluctuating vs. constant temperatures on flower induction and sex expression in the olive. *Physiologia Plantarum*, **24**: 40-45.
- Badr, SA; Hartmann, HT y Martin, GC (1970). Endogenous gibberellins and inhibitors in relation to flower induction and inflorescence development in the olive. *Plant Physiology*, **46**: 674-679.
- Bagnall, DJ (1993). Light quality and vernalization interact in controlling late flowering in *Arabidopsis* ecotypes and mutants. *Annals of Botany*, **71** (1): 75-83.
- Balandier, P; Gendraud, M; Rageau, R; Bonhomme, M; Richard, JP y Parisot, E (1993). Bud break delay on single node cuttings and bud capacity for nucleotide accumulation as parameters for endo- and paradormancy in peach trees in a tropical climate. *Scientia Horticulturae*, **55** (3-4): 249-261.
- Bangerth, F y Schroder, M (1994). Strong synergistic effects of gibberellins with the synthetic cytokinin N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea on parthenocarpic fruit set and other fruit characteristics of apple. *Plant Growth Regulation*, **15** (3): 293-302.
- Barros, RS y Neill, SJ (1989). The status of abscisic acid in willow as related to the induction of bud dormancy. *Acta Physiologiae Plantarum*, **11** (2): 117-123.
- Basconsuelo, S; Reinoso, H; Lorenzo, E y Bottini, R (1995). Dormancy in peach (*Prunus persica* L.) flower buds. IV: Morphogenesis of excised buds as influenced by chilling and gibberellin A₃. *Plant Growth Regulation*, **16** (2): 113-119.
- Batthey, NH y Lyndon, RF (1990). Reversion of flowering. *Botanical Reviews*, **56**: 162-189.
- Berlyn, GP y Miksche, JP (1976). Botanical Microtechnique and Cytochemistry. The Iowa University Press.
- Bernier, G (1988). The control of floral evocation and morphogenesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **39**: 175-219.
- Bernier, G y Kinet, JM (1986). The control of flower initiation and development. *In* M

- Bopp (ed.): *Plant Growth Substances 1985*: 293-302. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg.
- Bernier, G; Havelange, A; Houssa, C; Petitjean, A y Lejeune, P (1993). Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell*, **5** (10): 1147-1155.
- Bigras, FJ (1996). Conifer bud dormancy and stress resistance: a forestry perspective. In GA Lang (ed.): *Plant Dormancy. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*: 171-192. CAB International. Wallingford.
- Biju, SV; Kurien, S y Mohanakumaran, N (1997). The changes in the growing point of 'Red Banana' during various physiological phases. *Infomusa*, **6** (2): 19-21.
- Bjorkman, T y Pearson, KJ (1998). High temperature arrest of inflorescence development in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* L.). *Journal of Experimental Botany*, **49** (318): 101-106.
- Bogatek, R (1995). The possible role of fructose 2,6-bisphosphate in the cyanide-mediated removal of embryonic dormancy in apple. *Physiologia Plantarum*, **94** (3): 460-464.
- Bonhomme, F; Sommer, H; Bernier, G y Jacquard, A (1997). Characterization of *SaMADS D* from *Sinapis alba* suggests a dual function of the gene: in inflorescence development and floral organogenesis. *Plant Molecular Biology*, **34** (4): 573-582.
- Bonnet-Masimbert, M; Imbault, N; Joseph, C y Tardieu, I (1988). Effect of isopentenyladenine on the floral induction of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, **96**: 1-4.
- Bradford, KJ (1996). Population-based models describing seed dormancy behaviour: implications for experimental design and interpretation. In GA Lang (ed.): *Plant Dormancy. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*: 313-339. CAB International. Wallingford.
- Buban, T; y Faust, M (1995). New aspects of bud dormancy in apple trees. *Acta Horticulturae*, **395**: 105-111.
- Caffaro, SV y Vicente, C (1994). Polyamine implication during soybean flower induction and early reproductive transition of vegetative buds. *Plant Physiology and Biochemistry Paris*, **32** (3): 391-397.
- Caffaro, SV; Antognoni, F; Scaramagli, S y Bagni, N (1994). Polyamine translocation

- following photoperiodic flowering induction in soybean. *Physiologia Plantarum*, **91** (2): 251-256.
- Calmé, S; Margolis, HA y Bigras, FJ (1993). Influence of cultural practices on the relationship between frost tolerance and water content of containerized black spruce, white spruce, and jack pine seedlings. *Canadian Journal of Forest Research*, **23**: 503-511.
- Candolfi-Vasconcelos, MC y Koblet, W (1990). Yield, fruit quality, bud fertility and starch reserves of the wood as a function of leaf removal in *Vitis vinifera* - evidence of compensation and stress recovering. *Vitis*, **29** (4): 199-221.
- Carolus, M (1970). *Recherches sur L'organogénèse et L'évolution Morphologique du Bourgeon Latent de la Vigne (Vitis vinifera L. var. Merlot)*. PhD Tesis. Bordeaux.
- Cartechini, A y Tombesi, A (1986). Influenza del contenuto in carboidrati e in grassi sulla differenziazione delle gemme a fiore nell'olivo. *Rivista di Ortoflorofrutticoltura Italiana*, **70**: 287-295.
- Carvalho, MLM (1994). *Caracterização do Pomar de Cerejeira na Cova da Beira. Modelação da Fenologia da Cerejeira (Prunus avium L.)*. Dissertação Curso de Mestrado em Produção Vegetal. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.
- Catalina, L; Sarmiento, R; Gonzalez-García, F y Valpuesta, V (1978). El metabolismo nitrogenado en árboles de *Olea europaea* var. Manzanillo, en relación con la floración. *Anales de Edafología y Agrobiología*, **XXXVIII**: 249-257.
- Chaikiattiyos, S; Menzel, CM y Rasmussen, TS (1994). Floral induction in tropical fruit trees: effects of temperature and water supply. *Journal of Horticultural Science*, **69** (3): 397-415.
- Chailakhyan, MK (1968). Internal factors of plant flowering. *Annual Review of Plant Physiology*, **19**: 1-36
- Chailakhyan, MK (1986). Hormonal regulation of plant flowering. In M Bopp (ed.): *Plant Growth Substances 1985*: 303-307. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg.
- Champagnat, P (1983). Bud dormancy, correlation between organs, and morphogenesis in woody plants. *Soviet Plant Physiology*, **30**: 458-471.
- Champagnat, P y Côme, D (1986). Some thoughts on hormonal regulation of bud and seed dormancies. *Acta Horticulturae*, **179**: 117-127.

- Cheema, SS; Torregrosa, L; Domergue, P y Carbonneau, A (1996). Étude comparée de la différenciation des inflorescences primordiales de *Vitis vinifera* cv. Syrah in situ et en serre. *Progrés Agricole et Viticole*, **113** (12): 279-285.
- Chen, WS (1991). Changes in cytokinins before and during early flower bud differentiation in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *Plant Physiology*, **96** (4): 1203-1206.
- Chung, YY; Kim, SR; Finkel, D; Yanofsky, MF y An, GH (1994). Early flower and reduced apical dominance result from ectopic expression of a rice *MADS* box gene. *Plant Molecular Biology*, **26** (2): 657-665.
- Cimato, A y Fiorino, P (1986). Influence of fruit bearing on flower induction and differentiation in olive. *Olea*, **17**: 55-60.
- Colbrant, T (1972). Les ennemis de l'olivier et leur évolution au cours de l'année 1971. *Phytoma*, **238**: 23-29.
- Coleman, GD y Chen, THH (1996). Photoperiod-associated gene expression during dormancy in woody perennials. In GA Lang (ed.): *Plant Dormancy. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*: 301-309. CAB International. Wallingford.
- Corbineau, F; Goule, B; Lecat, S y Côme, D (1991). Stimulation of germination of dormant oat (*Avena sativa* L.) seeds by ethanol and other alcohols. *Seed Science Research*, **1** (1): 21-28.
- Cottignies, A (1986). Dormance. *Annales des Sciences Naturelles. Botanique*, **8**: 93-142.
- Couvillon, GA y Erez, A (1985). Influence of prolonged exposure to chilling temperatures on bud break and heat requirement for bloom of several fruit species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **110** (1): 47-50.
- Crabbé, J y Barnola, P (1996). A new conceptual approach to bud dormancy in woody plants. In GA Lang (ed.): *Plant Dormancy. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*: 83-113. CAB International. Wallingford.
- Cuevas, J; Rallo, L y Rapoport HF (1994). Crop load effects on floral quality in olive. *Scientia Horticulturae*, **59** (2): 123-130.
- Daoudi, EH; Doumas, P y Bonnet-Masimbert, M (1994). Changes in amino acids and polyamines in shoots and buds of Douglas-fir trees induced to flower by

- nitrogen and gibberellin treatments. *Canadian Journal of Forest Research*, **24** (9): 1854-1863.
- Davenport, TL y Núñez-Elisea, R (1997). Reproductive Physiology. In RE Litz (ed.): *The Mango. Botany, Production and Uses*: 69-146. CAB International. Wallingford.
- De la Rosa R. (1996). *Aspectos Anatómicos de la Salida del Reposo y de la Brotación Inicial de Yemas Reproductivas del Olivo (Olea europaea L.)*. Trabajo Profesional Fin de Carrera. ETSIAM. Universidad de Córdoba.
- De la Rosa, R; Rallo, L y Rapoport, HF (2000). Olive floral bud growth and starch content during winterrest and spring budburst. *HortScience* (en prensa).
- De Meillon, S; Small, JGC y Van de Venter, HA (1990). The respiratory metabolism of *Strelitzia juncea* Ait. seeds: the effect of dormancy release through oxygen incubation of the seeds on the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Journal of Experimental Botany*, **41** (227): 709-714.
- Deans, JD; Lundberg, C; Tabbush, PM; Cannell, MGR; Sheppard, LJ y Murray, MB (1990). The influence of desiccation, rough handling and cold storage on the quality and establishment of Sitka spruce planting stock. *Forestry Oxford*, **63** (2): 129-141.
- Del Real Laborde, JI; Anderson, JL y Seeley, SD (1990). An apple tree dormancy model for subtropical conditions. *Acta Horticulturae*, **276**: 183-191.
- Demeulemeester, MAC; Rademacher, W; Van de Mierop, A y De Proft, MP (1995). Influence of gibberellin biosynthesis inhibitors on stem elongation and floral initiation on *in vitro* chicory root explants under dark and light conditions. *Plant Growth Regulation*, **17** (1): 47-52.
- Dennis Jr. FG (1987). Two methods of studying rest: Temperature alternation and genetic analysis. *HortScience*, **22** (5): 820-823.
- Dennis Jr., FG (1994). Dormancy - what we know (and don't know). *HortScience*, **29** (11): 1249-1255.
- Dennis Jr., FG (1996). A physiological comparison of seed and bud dormancy. In GA Lang (ed.): *Plant Dormancy. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*: 47-56. CAB International. Wallingford.

- Dickens, CWS y Van Staden, J (1990). The *in vitro* flowering of *Kalanchoe blossfeldiana* Poellniz. II: The effects of growth regulators and gallic acid. *Plant and Cell Physiology*, **31** (6): 757-762.
- Doi, M (1992). Studies on the chilling requirement of *Gypsophila paniculata*. *Bulletin of the University of Osaka Prefecture. Series B, Agriculture and Biology*, **45**: 107-154.
- Doi, M; Morita, T; Takeda, Y y Asahira, T (1991). Effects of exposure to high temperature at different developmental stages of shoots on rosette formation and flower malformation of *Gypsophila paniculata* L. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **59** (4): 795-801.
- Drinnan, JE y Menzel, CM (1994). Synchronization of anthesis and enhancement of vegetative growth in coffee (*Coffea arabica* L.) following water stress during floral initiation. *Journal of Horticultural Science*, **69** (5): 841-849.
- Drinnan, JE y Menzel, CM (1995). Temperature affects vegetative growth and flowering of coffee (*Coffea arabica* L.). *Journal of Horticultural Science*, **70** (1): 25-34.
- Duan, JX y Yazawa, S (1995). Floral induction and development in *Phalaenopsis in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **43** (1): 71-74.
- Eimert, K; Wang, SM; Lue, WL y Chen, JC (1995). Monogenic recessive mutations causing both late floral initiation and excess starch accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **7** (10): 1703-1712.
- El-Shamy, HA, Eissa, A y Badr, E (1990). Alternate bearing in some mango cultivars in relation to the chemical composition of trees. *Annals of Agricultural Science Cairo*, **35** (2): 931-938.
- Erez, A y Lavee, S (1971). The effect of climatic conditions on dormancy development of peach buds. I: Temperature. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **96** (6): 711-714.
- Erez, A y Lerner, H (1990). Means to improve leafing of peaches in Israel using the rest-avoidance technique. *Acta Horticulturae*, **279**: 239-246.
- Erez, A; Faust, M y Line, MJ (1998). Changes in water status in peach buds on induction, development and release from dormancy. *Scientia Horticulturae*, **73** (2-3): 111-123.

- Evans, LT y Blundell, C (1996). The acceleration of primordium initiation as a component of floral evocation in *Lolium temulentum* L. *Australian Journal of Plant Physiology*, **23** (5): 569-576.
- Evans, LT; King, RW; Chu, A; Mander, LN y Pharis, RP (1990). Gibberellin structure and florigenic activity in *Lolium temulentum*, a long day plant. *Planta*, **182** (1): 97-106.
- Evans, LT; King, RW; Mander, LN y Pharis, RP (1994). The relative significance for stem elongation and flowering in *Lolium temulentum* of 3beta-hydroxylation of gibberellins. *Planta*, **192** (1): 130-136.
- Fabbri, A y Alerci, L (1999). Reproductive and vegetative bud differentiation in *Olea europaea* L. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **74** (4): 522-527.
- Fabbri, A y Benelli, C (2000). Flower bud induction and differentiation in olive. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, **75** (2): 131-141.
- Faust, M; Liu, D; Line, MJ y Stutte, GW (1995). Conversion of bound to free water in endormant buds of apple is an incremental process. *Acta Horticulturae*, **395**: 113-118.
- Faust, M; Liu, D; Millard, MM y Stutte, GW (1991). Bound *versus* free water in dormant apple buds - a theory for endodormancy. *HortScience*, **26** (7): 887-890.
- Fernandez-Escobar, R; Benlloch, M; Navarro, C y Martin GC (1992). The time of floral induction in the olive. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*, **117** (2): 304-307.
- Figueras, X; Gendy, CA; Pinol, T; Van Tran-Thanh, K y Tiburcio, AF (1990). Polyamine content in relation to ploidy and to different organs of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant and Cell Physiology*, **31** (6): 823.-828.
- Fosket, DE (1994). *Plant Growth and Development. A Molecular Approach*. Academic Press. San Diego.
- Fouad, MM; Khalil, MA; Mohamed, SM y Hussein, AM (1995). Floral bud differentiation and activity of 'Anna' apple trees on different rootstocks. *Acta Horticulturae*, **409**: 241-250.
- Frisby, JW y Seeley, SD (1993). Chilling of endodormant peach propagules. V: Comparisons between seeds, seedlings, and cuttings. *Journal of the American*

- Society for Horticultural Science*, **118** (2): 269-273.
- Fuchigami, LH y Nee, CC (1987). Degree growth stage model and rest-breaking mechanisms in temperate woody perennials. *HortScience*, **22** (5): 836-845.
- Galoch, E; Burkacka-Laukajtys, E y Kopcewicz, J (1996). Effect of cytokinins on flower differentiation in cultured plantlets of *Pharbitis nil* Chois. *Acta Physiologiae Plantarum*, **18** (3): 223-227.
- García-Luis, MA; Fornes, B y Guardiola, JL (1995a). Leaf carbohydrates and flower formation in *Citrus*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **120** (2): 222-227.
- García-Luis, MA; Kandušer, M y Guardiola, JL (1995b). The influence of fruiting on the bud sprouting and flower induction responses to chilling in *Citrus*. *Journal of Horticultural Science*, **70** (5): 817-825.
- García-Luis, MA; Kandušer, M; Sanchez-Perales, M; Santamarina, P y Guardiola, JL (1994). The characterization of the inductive effect of low temperature on flowering in *Citrus*. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, **1**: 364-367.
- García-Luis, MA; Kandušer, M; Santamarina, P y Guardiola, JL (1992). Low temperature influence on flowering in *Citrus*: The separation of inductive and bud dormancy releasing effects. *Physiologia Plantarum*, **86** (4): 648:652.
- Gargiulo, AA (1968). Cambio de sexo en vid. Transformación de flores masculinas en hermafroditas mediante la aplicación de una kinina sintética. *Vitis*, **7**: 294-298.
- Ghadekar, SR; Ladole, SS; Bagde, TR y Matte, AD (1993). Study of moisture stress pattern before monsoon flowering in citrus orchard. *Journal of Soils and Crops*, **3** (1): 6-10.
- Gianquinto, G (1997). Morphological and physiological aspects of phase transition in radicchio (*Cichorium intybus* L. var. *silvestre* Bisch.): influence of daylength and its interaction with low temperature. *Scientia Horticulturae*, **71** (1-2): 13-26.
- Gilreath, PR y Bucanan, DW (1981). Rest prediction model for low-chilling 'Sungold' nectarine. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **106** (4): 426-429.
- Goldschmidt, EE y Golomb, A (1982). The carbohydrate balance of alternate-bearing *Citrus* trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. *Journal*

- of the American Society for Horticultural Science*, **107**: 206-208.
- Goodwin, PB y Lyndon, RF (1983). Synchronization of cell division during the transition to flowering in *Silene* apices is not due to increased symplast permeability. *Protoplasma*, **116**: 219-222.
- Guardiola, JL; Monerri, C y Agusti, M (1982). The inhibitory effect of gibberellic acid on flowering in *Citrus*. *Physiologia Plantarum*, **55**: 136-142.
- Guerriero, R y Bartolini, S (1991). Main factors influencing cropping behaviour of some apricot cultivars in coastal areas. *Acta Horticulturae*, **293**: 229-243
- Guo, Z; Goi, M; Tanaka, M y Fukai, S (1995). Effects of temperature and photoperiod on the bud formation of *Hydrangea*. *Technical Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagawa University*, **47** (1): 23-31.
- Guy, C; Haskell, D.; Neven, L; Klein, P y Smelser, C (1992). Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach. *Planta*, **188**: 265-270.
- Hackett, WP y Hartmann, HT (1963). Morphological development of buds of olive as related to low-temperature requirement for inflorescence formation. *Botanical Gazette*, **16** (5): 383-387.
- Hackett, WP y Hartmann, HT (1964). Inflorescence formation in olive as influenced by temperature, photoperiod, and leaf area. *Botanical Gazette*, **125** (1): 65-72.
- Hackett, WP y Hartmann, HT (1967). The influence of temperature on floral initiation in the olive. *Physiologia Plantarum*, **20**: 430-436.
- Harada, H y Murai, Y (1998). *In vitro* flowering on long-term subcultured pear shoots. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **73** (2): 225-228.
- Harkess, RL; Lyons, RE y Kushad, MM (1992). Floral morphogenesis in *Rudbeckia hirta* in relation to polyamine concentration. *Physiologia Plantarum*, **86** (4): 575-582.
- Hartmann, HT (1951). Time of flower differentiation of the olive in California. *Botanical Gazette*, **112**: 323-327.
- Hartmann, HT (1953). Effect of winter chilling on fruitfulness and vegetative growth in the olive. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, **62**: 184-190.
- Hartmann, HT y Porlingis, IC (1957). Effect of different amounts of winter chilling on

- fruitfulness of several olive varieties. *Botanical Gazette*, **119** (2): 102-104.
- Hartmann, HT y Whisler, JE (1975). Flower production in olive as influenced by various chilling temperature regimes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **100** (6): 670-674.
- Haughn, GW; Schultz, EA y Martinez-Zapater, JM (1995). The regulation of flowering in *Arabidopsis thaliana*: meristems, morphogenesis, and mutants. *Canadian Journal of Botany*, **73** (7): 959-981.
- He, SL; Deng, L; Li, YQ y Zeng, XH (1995). Effects of floral promotion or inhibition on nitrogen and amino acid metabolism during flower induction of citrus plants. *Journal of Southwest Agricultural University*, **17** (6): 501-505.
- Hensel, LL; Nelson, MA; Richmond, TA y Bleecker, AB (1994). The fate of inflorescence meristems is controlled by developing fruits in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **106** (3): 863-876.
- Herbert, RJ; Francis, D y Ormrod, JC (1992). Cellular and morphological changes at the terminal shoot apex of the short-day plant *Pharbitis nil* during the transition to flowering. *Physiologia Plantarum*, **86** (1): 85-92.
- Hilhorst, HWM; Derkx, MPM y Karssen, CM (1996). An integrating model for seed dormancy cycling: characterization of reversible sensitivity. In GA Lang (ed.): *Plant Dormancy. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*: 341-360. CAB International. Wallingford.
- Houssa, P; Bernier, G y Kinet, JM (1991). Qualitative and quantitative analysis of carbohydrates in leaf exudate of the short-day plant, *Xanthium strumarium* L. during floral transition. *Journal of Plant Physiology*, **138** (1): 24-28.
- Howie, H y Lloyd, J (1989). Response of orchard 'Washington Navel' orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, to saline irrigation water. II: Flowering, fruit set and fruit growth. *Australian Journal of Agricultural Research*, **40** (2): 371-380.
- Huala, E y Sussex, IM (1993). Determination and cell interactions in reproductive meristems. *Plant Cell*, **5** (10): 1157-1165.
- Huglin, P (1986). *Biologie et Ecologie de la Vigne*. Editions Payot-Lausanne. Paris.
- Hume, L; Devine, MD y Shirriff, S (1995). The influence of temperature upon physiological processes in early-flowering and late-flowering strains of *Thlaspi arvense* L. *International Journal of Plant Sciences*, **156** (4): 445-449.

- Ishioka, N., Tanimoto, S. y Harada, H. (1991). Roles of nitrogen and carbohydrate in floral-bud formation in *Pharbitis* apex cultures. *Journal of Plant Physiology*, **138** (5): 573-576.
- Iwahori, S; García-Luis, MA; Santamarina, P; Monerri, C y Guardiola JP (1990). The influence of ringing on bud development and floqwering in Satsuma mandarin. *Journal of Experimental Botany*, **41**: 1341-1346.
- Jacqmard, A; Bomans, J; Ormrod, JC y Bernier, G (1993). Early increase in the mitotic index in the shoot apex of *Lolium temulentum* cv. Ceres during the floral transition. *Journal of Experimental Botany*, **44** (265): 1407-1409.
- Jensen, WA (1962). *Botanical Histochemistry*. Freeman and Company. San Francisco.
- Jofuku, KD; Den-Boer, BGW; Van Montagu, M y Okamoto, JK (1994). Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *Apetala2*. *Plant Cell*, **6** (9): 1211-1255.
- Johansen, DA (1940). *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Company. New York.
- Juarez, PN; Orti, EE y Borys, MW (1995). Diferenciación floral en tejocote *Crataegus pubescens* (H.B.K.) Steud. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, **1** (4): 39-46.
- Jullien, F y Wyndaele, R (1992). Precocious *in vitro* flowering of soybean cotyledonary nodes. *Journal of Plant Physiology*, **140** (2): 251-253.
- Kandušer, M (1997). *Control Ambiental y Regulación Endógena de la Inducción Floral en Mandarino Satsuma (Citrus unshiu Marc.)*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- Keegan, AB; Kelly, KM; Van Staden, J y Gilliland, MG (1989). The ultrastructural and biochemical changes associated with dormancy breaking in *Ricinodendron rautanenii* Schinz. seeds following ethylene treatment. *Journal of Plant Physiology*, **133** (6): 747-755.
- Kinet, JM; Lejeune, P y Bernier, G (1993). Shoot-root interactions during floral transition: a possible role for cytokinins. *Environmental and Experimental Botany*, **33** (4): 459-469.
- King, JR (1938). Morphological development of the fruit of the olive. *Hilgardia*, **11** (8): 437-458.
- King, RW (1983). The shoot apex in transition: flowers and other organs. In JE Dale y FL Milthorpe (eds.): *The Growth and Functioning of Leaves*: 109-144.

Cambridge University Press.

- King, RW (1998). Dual control of flower initiation and development by temperature and photoperiod in *Hardenbergia violacea*. *Australian Journal of Botany*, **46** (1): 65-74.
- King, RW y Evans, LT (1991). Shoot apex sugars in relation to long-day induction of flowering in *Lolium temulentum* L. *Australian Journal of Plant Physiology*, **18** (2): 121-135.
- Kobayashi, KD (1987). Mechanisms of rest and dormancy: Introduction. *HortScience*, **22** (5): 816.
- Krishnamoorthy, HN y Nanda, KK (1968). Floral bud reversion in *Impatiens balsamina* under non-inductive photoperiods. *Planta*, **80**: 43-51.
- Kubota, S y Yoneda, K (1993). Effect of light intensity preceding day/night temperature on the sensitivity of *Phalaenopsis* to flower. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **62** (3): 595-600.
- Kumar, A y Bhaft, VP (1992). Effects of some natural and synthetic growth regulators on sex-expression of *Myrica esculenta* Buch-Ham. ex D. Don. *Plant Growth Regulation*, **11** (4): 371-376.
- Kuzina, GV y Kalinina, GA (1993). Abscisic acid level, dormancy induction, and frost resistance of apricot plants in relation to photoperiodic conditions in autumn. *Soviet Plant Physiology*, **40** (3): 345-352.
- Lam-Yam, L y Parisot, E (1990). Preliminary study on peach floral differentiation in mild winter areas. *Acta Horticulturae*, **279**: 231-238.
- Lang, A (1957). The effect of gibberellin upon flower formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **43**: 709-711.
- Lang, GA (1987). Dormancy: A new universal terminology. *HortScience*, **22** (5): 817-820.
- Lang, GA (1994). Dormancy - The missing links: Molecular studies and integration of regulatory plant and environmental interactions. *HortScience*, **29** (11): 1255-1263.
- Lauri, PE y Lespinase, JM (1993). The relationship between cultivar fruiting-type and fruiting branch characteristics in apple trees. *Acta Horticulturae*, **349**: 259-263.
- Lavee, S y Avidan N (1994). Protein contents and composition of leaves and shoot bark

- in relation to alternate bearing of olive trees (*Olea europaea* L.). *Acta Horticulturae*, **356**: 143-147.
- Lavee, S y Haskal, A (1993). Partial fruiting regulation of olive trees (*Olea europaea* L.) with paclobutrazol and gibberellic acid in the orchard. *Advances in Horticultural Sciences*, **7**: 83-86.
- Lavee, S; Harshemesh, H y Avidan, N (1986). Phenolic acids possible involvement in regulating growth and alternate fruiting in olive trees. *Acta Horticulturae*, **179**: 317-328.
- Lee, I; Bleecker, A y Amasino, RM (1993). Analysis of naturally occurring late flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics*, **237** (1-2): 171-176.
- Lejeune, P; Bernier, G y Kinet, JM (1991). Sucrose levels in leaf exudate of floral induction in the long day plant *Sinapis alba*. *Plant Physiology and Biochemistry Paris*, **29** (2): 153-157.
- Lejeune, P; Bernier, G; Requier, MC y Kinet, JM (1993). Sucrose increase during floral induction in the phloem sap collected at the apical part of the shoot of the long-day plant *Sinapis alba* L. *Planta*, **190** (1): 71-74.
- Lejeune, P; Bernier, G; Requier, MC y Kinet, JM (1994). Cytokinins in phloem and xylem saps of *Sinapis alba* during floral induction. *Physiologia Plantarum*, **90** (3): 522-528.
- Leopold, AC(1996). Natural history of seed dormancy. In GA Lang (ed.): *Plant Dormancy. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*: 3-16. CAB International. Wallingford.
- Lespinase, JM y Delort, JF (1993). Regulation of fruiting in apple. Role of the bourse and crowned brindles. *Acta Horticulturae*, **349**: 239-246.
- Lespinase, JM y Delort, JF (1994). Repartition de la croissance et conduite. *Arboriculture Fruitière*, **468**: 20-23.
- Li, QB; Liu, LH y Liang, HG (1989). Changes in ribosome population and in nucleic acids during breaking of dormancy and development of apple flower buds. *Physiologia Plantarum*, **77** (3): 531-536.
- Li, SH; Meng, ZQ; Li TH; Liu, HZ y Tu, YC (1994). A new method for studying the critical period of flower bud induction in apple trees. *Advances in Horticulture*,

- 1: 338-341.
- Li, SH; Meng, ZQ; Li, TH; Liu, HZ y Tu, YC (1995). Critical period of flower bud induction in 'Red Fuji' and 'Ralls Janet' apple trees. *Gartenbauwissenschaft*, **60** (5): 240-245.
- Li, XZ. y Deng, L (1992). Regulation of flower bud differentiation and the contents of endogenous hormones by spraying citrus trees with BA. *Acta Horticulturae Sinica*, **19** (4): 314-318.
- Lilov, D y Temenschka, A (1976). Cytokinins, growth, flower and fruit formation in *Vitis vinifera*. *Vitis*, **15**:160-170.
- Lin, J; Shabany, B y Ramos, D (1977). Pistillate flower development and fruit growth in some English walnut cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **102**: 702-705.
- Liu, D; Norman, A; Stutte, GW y Faust, M (1991). Lipase activity during endodormancy in leaf buds of apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **116** (4): 689-692.
- Ma, H. (1994). The unfolding drama of flower development: recent results from genetic and molecular analysis. *Genes and Development*, **8** (7): 745-756.
- MacDaniel, CN; King, RW y Evans, LT (1991). Floral determination and *in vitro* floral differentiation in isolated shoot apices of *Lolium temulentum* L. *Planta*, **185** (1): 9-16.
- MacDonald, JE (1996). Early development of bud dormancy in conifer seedlings. In GA Lang (ed.): *Plant Dormancy. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*: 193-199. CAB International. Wallingford.
- Machackova, I; Krekule, J; Eder, J; Seidlova, F y Strnad, M (1993). Cytokinins in photoperiodic induction of flowering in *Chenopodium* species. *Physiologia Plantarum*, **86** (2): 160-166.
- MacPehearson, HG; Snelgar, WP; Manson, PJ y Snowball, AM (1997). Bud respiration and dormancy of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Annals of Botany*, **80**: 411-418.
- Mandel, MA y Yanofsky, MF (1995). The *Arabidopsis* *Af18* *MADS* box gene is expressed in inflorescence meristems and is negatively regulated by *APETALA1*. *Plant Cell*, **7** (11): 1763-1771.
- Marchetti, S; Zampa, C y Chiesa, F (1992). Sex modification in *Actinidia deliciosa* var.

- deliciosa*. *Euphytica*, **64** (3): 205-213.
- Martinez-Zapater, JM y Salinas, J (1996). La transición floral. . In J Azcon-Bieto y M Talón (eds.): *Fisiología y Bioquímica Vegetal*: 435-447. Interamericana McGraw-Hill. Madrid.
- Martinez-Zapater, JM; Jarillo, JA; Cruz-Alvarez, M; Roldan, M y Salinas, J (1995). *Arabidopsis* late-flowering *five* mutants are affected in both vegetative and reproductive development. *Plant Journal*, **7** (4): 543-551.
- Martin-Tanguy, J (1997). Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiologia Plantarum*, **100** (3): 675-688.
- Mazuelos, C; Romero, R; Valpuesta, V; Sarmiento, R y Catalina, L (1983). Actividad piruvato quinasa, contenido en potasio y azúcares reductores en yemas de árboles vegetativos y productivos de *Olea europaea* L. *Anales de Edafología y Agrobiología*, **XLII**: 279-284.
- Meeks-Wagner, DR (1993). Gene expression in the early floral meristem. *Plant Cell*, **5** (10): 1167-1174.
- Melzer, S; Majewski, DM y Apel, K (1990). Early changes in gene expression during the transition from vegetative to generative growth in the long day plant *Sinapis alba*. *Plant Cell*, **2** (10): 953-961.
- Metzger, JD (1996). A physiological comparison of vernalization and dormancy chilling requirement. In GA Lang (ed.): *Plant Dormancy. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*: 147-155. CAB International. Wallingford.
- Miglietta, F; Bindi, M; Castellani, M y Maracchi, G (1993). Sviluppo ontogenetico del frumento (*Triticum spp.*). I: Influenza di temperatura, fotoperiodo e vernalizzazione. *Rivista di Agronomia*, **27** (4): 565-569.
- Milella, A (1984). Alternate bearing in the olive-tree: origins, causes and possible control. *Olea*, **14**, 29-32.
- Milella, A y Deidda, P (1968). Le Esigenze in freddo dell'olivo. *Sez III Annali della Facolta di Agraria dell'Università di Sassari*, **16**: 3-22.
- Milyaeva, EL y Nikiforova, VY (1995). Symplastic connections in the stem apex of coneflower plant during floral transition. *Russian Journal of Plant Physiology*, **42** (5): 640-645.

- Miura, H y Worland, AJ (1994). Genetic control of vernalization, daylength response, and earliness *per se* by homoeologous group-3 chromosomes in wheat. *Plant Breeding*, **113** (2): 160-169.
- Mizukami, Y y Ma, H (1997). Determination of *Arabidopsis* floral meristem identity by *AGAMOUS*. *Plant Cell*, **9** (3): 393-408.
- Moore, JN (1970). Cytokinin-induced sex conversion in male clones of *Vitis* species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **95** (4): 387-393.
- Moore, TC y Moore, JA (1991). Induction of ent-kaurene biosynthesis by low temperature in dwarf peas. *Journal of Plant Growth Regulation*, **10** (2): 91-95.
- Mori, G; Imanishi, H y Sakanishi, Y (1991b). Effects of temperature on flowering of *Cyrtanthus mackenii* Hook. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **59** (4): 847-853.
- Mori, G; Kawabata, H; Imanishi, H y Sakanishi, Y (1991a). Effects of temperature on flower initiation and development in *Leucojum aestivum* L. and *L. autumnale* L. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **59** (4): 833-838.
- Msallem, M y Hellali, R (1988). Effets du degré et de la période de défoliation sur la productivité de l'olivier a huile 'Chetoui' (*Olea europaea* L.). *Olea*, **19**: 33-41.
- Mullins, MG; Plummer, JA y Snowball, AM (1989). Flower initiation: New approaches to the study of flowering in perennial fruit plants. In CJ Wright (ed.): *Control of fruiting*: 65-77. Butterworths. London.
- Myking, T (1998). Interrelations between respiration and dormancy in buds of three hardwood species with different chilling requirements for dormancy release. *Trees: Structure and Function*, **12** (4): 224-229.
- Nakagima, Y; Susanto, S y Hasegawa, K (1993). Influence of water stress in autumn on flower induction and fruiting in young pomelo trees (*Citrus grandis* (L.) Osbeck). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **62** (1): 15-20.
- Navarro, C; Fernandez-Escobar, R y Benlloch, M (1990). Flower bud induction in 'Manzanillo' olive. *Acta Horticulturae*, **286**: 195-198.
- Ndung'u, CK; Shimizu, M; Okamoto, G y Hirano, K (1997). Abscisic acid, carbohydrates, and nitrogen contents of 'Kyoho' grapevines in relation to budbreak induction by water stress. *American Journal of Enology and*

- Viticulture*, **48** (1): 115-120.
- Nee, CC y Fuchigami, LH (1992). Overcoming rest at different growth stages with hydrogen cyanamide. *Scientia Horticulturae*, **50** (1-2): 107-113.
- Nimura, M; Sakai, K; Nishio, J y Hara, M (1994). The effect of temperature and daylength on the development and flowering of cineraria. *Research Bulletin of the Aichi-ken Agricultural Research Center*, **26**: 241-246.
- Nir, G y Lavee, S (1993). Metabolic changes during cyanamide induced dormancy release in grapevines. *Acta Horticulturae*, **329**: 271-274.
- Núñez-Elisea, R y Davenport, TL (1994). Flowering of mango trees in containers as influenced by seasonal temperature and water stress. *Scientia Horticulturae*, **58** (1-2): 57-66.
- Núñez-Elisea, R y Davenport, TL (1995). Effect of leaf age, duration of cool temperature treatment, and photoperiod on bud dormancy release and floral initiation in mango. *Scientia Horticulturae*, **62** (1-2): 63-73.
- Núñez-Elisea, R; Davenport, TL y Calderia, ML (1992). An experimental system to study mango flowering using containerized trees propagated by air-layering. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, **104**: 39-41.
- Nzima, MDS; Martin, GC y Nishijima, C (1997). Seasonal changes in total nonstructural carbohydrates within branches and roots of naturally "off" and "on" 'Kerman' pistachio trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **122** (6): 856-862.
- Olf, H; Kuiper, D; Van Damme, JMM y Kuiper, PJC (1989). Gynodioecy in *Plantago lanceolata*. VI: Functions of cytokinins in growth, development, and reproduction of two sex types. *Canadian Journal of Botany*, **67** (9): 2765-2769.
- Oosthuysen, SA (1995). Effect of aqueous application of GA₃ on flowering of mango trees: why in certain instances is flowering prevented, and in others flowering is only delayed? *Yearbook South African Mango Growers Association*, **15**: 21-25.
- Orvos, AR; Lyons, RE y Grayson, RL (1989). Effects of GA₍₄₊₇₎ on flower initiation and development and vegetative growth of *Streptocarpus X hybridus* Voss. 'Hybrid Delta'. *Scientia Horticulturae*, **41** (1-2): 131-140.
- Perilleux, C y Bernier, G (1997). Leaf carbohydrate status in *Lolium temulentum* during the induction of flowering. *New Phytologist*, **135** (1): 59-66.

- Pharis, RP y King, RW (1985). Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Annual Review of Plant Physiology*, **36**: 517-568.
- Pinney, K y Polito, VS (1990). Flower initiation in 'Manzanillo' olive. *Acta Horticulturae*, **286**: 203-205.
- Polito, VS y Pinney, K (1997). The relationship between phenology of pistillate flower organogenesis and mode of heterodichogamy in *Juglans regia* L. (*Juglandaceae*). *Sexual Plant Reproduction*, **10** (1): 36-39.
- Pongsomboon, W; Subhadrabandhu, S y Chapman, KR (1990). Levels of inhibitors in flower buds during bud dormancy of three peach cultivars. *Acta Horticulturae*, **279**: 333-345.
- Pouget, R (1981). Action de la température sur la différenciation des inflorescences et des fleurs durant les phases de pré-débourrement et de post-débourrement des bourgeons latents de la vigne. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, **15** (2): 65-79.
- Pouget, R (1983). La croissance et le développement de la vigne. *Bulletin OIV*, **56** (633): 725-732.
- Porlingis, IC y Therios, IN (1979). The effect of the level of temperature on inflorescence induction, number of flowers per inflorescence and pistil development in the olive tree. *Annals of the Agricultural and Forestry School, Aristotelian University of Thessaloniki*, **22**: 250-255.
- Powell, LE (1987). Hormonal aspects of bud and seed dormancy in temperate-zone woody plants. *HortScience*, **22** (5): 845-850.
- Pratt, C y Coombe, BG (1978). Shoot growth and anthesis in *Vitis*. *Vitis*, **17**: 125-133.
- Pu, XC; Han, JG y Li, M (1994). Metabolic control of zoysiagrass seed at breaking dormancy. *Grassland of China*, **3**: 20-24.
- Purvis, ON (1961). The physiological analysis of vernalization. *Encyclopedia of Plant Physiology*, **16**: 76-122.
- Rakngan, J; Gemma, H y Iwahori, S (1995). Flower bud formation in Japanese pear trees under adverse conditions and effects of some growth regulators. *Japanese Journal of Tropical Agriculture*, **39** (1): 1-6.
- Rallo, L (1994). Frutificación y producción en olivo. *Agricultura*, **746**: 13-16.
- Rallo, L y Martin, GC (1991). The role of chilling in releasing olive floral buds from dormancy. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **116** (6):

1058-1062.

- Rallo, L y Suárez, MP (1989). Seasonal distribution of dry matter within the olive fruit-bearing limb. *Advances in Horticultural Science*, **3** (2): 55-59.
- Rallo, L; Torreño, P; Vargas, A y Alvarado, J (1994). Dormancy and alternate bearing in olive. *Acta Horticulturae*, **356**: 127-136.
- Rawson, HM y Zajac, M (1993). Effects of high temperatures, photoperiod and seed vernalization on development in two spring wheats. *Australian Journal of Plant Physiology*, **20** (2): 211-222.
- Real, M; Perino, C y Bouvier-Durand, M (1991). Cellular events associated with the germination of apple embryos during cold wet treatment. *Bulletin de la Société Botanique de France, Lettres Botaniques*, **138** (1): 15-28.
- Reddy, YTN y Singh, G (1990). Relationship between leaf area and leaf number on fruit development in mango (*Mangifera indica* L.). *Gartenbauwissenschaft*, **55** (3): 138-141.
- Relaño, A (1996). *Influencia del Frio Durante el Periodo de Reposo en Distintas Variedades de Olivo (Olea europaea L.)*. Trabajo Profesional Fin de Carrera. ETSIAM. Universidad de Córdoba.
- Richardson, EA; Seeley, SD y Walker, DR (1974). A model for estimating the completion of rest for 'Redhaven' and 'Elberta' peach trees. *HortScience*, **9** (4): 331-332.
- Richardson, EA; Seeley, SD; Walker, DR; Anderson, JL y Ashcroft, GL (1975). Pheno-climatography of spring peach bud development. *HortScience*, **10** (3): 236-237.
- Rideout, JW; Raper, CD y Miner, GS (1992). Changes in ratio of soluble sugars and free amino nitrogen in the apical meristem during floral transition of tobacco. *International Journal of Plant Sciences*, **153** (1): 78-88.
- Rinne, P; Tuominen, H y Juntilla, O (1994). Seasonal changes in bud dormancy in relation to bud morphology, water and starch content, and abscisic acid concentration in adult trees *Betula pubescens*. *Tree Physiology*, **14** (6): 549-561.
- Roberts, NJ; Menary, RC y Hofman, PJ (1991). Plant growth substances in *Boronia megastigma* Nees. during flowering. *Journal of Horticultural Science*, **66** (3): 327-334.

- Rock, CD y Zeevaart, JAD (1996). Acido abscísico. In J Azcon-Bieto y M Talón (eds.): *Fisiología y Bioquímica Vegetal*: 327-342. Interamericana McGraw-Hill. Madrid.
- Ruffaldi, GB (1958). Contributo a la conoscenza della trasformazione delle gemme nell'olivo. *Olivicoltura*, **13**: 12-15.
- Ruiz, E (1996). *Necesidades de Frio para la Salida del Reposo de Yemas de Flor en Distintos Cultivares de Olivo (Olea europaea L.)*. Trabajo Profesional Fin de Carrera. ETSIAM. Universidad de Córdoba.
- Ruiz-García, L; Madueno, F; Wilkinson, M; Haughn, G; Salinas, J y Martinez-Zapater, JM (1997). Different roles of flowering-time genes in the activation of floral initiation genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **9** (11): 1921-1934.
- Sachs, RM (1978). Nutrient diversion: An hypothesis to explain the chemical control of flowering. *HortScience*, **12**: 220-222.
- Sachs, RM y Hackett, WP (1983). Source-sink relationships and flowering. In WJ Meudt (ed.): *Beltsville Symposia in Agricultural Research. Strategies of Plant Reproduction*: 263-272. Allanheld, Osmun Publishing. Totowa, NJ.
- Sakai, WS (1973). Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technology*, **48**: 247-249.
- Salisbury, FB y Ross, CW (1994). *Plant Physiology* (4th ed.). Wadsworth Publishing Company. Belmont, California.
- Salmerón-Rodríguez, E (1994). *Características Estructurales de la Raíz del Olivo (Olea europaea L.)*. Trabajo Profesional Fin de Carrera. ETSIAM. Universidad de Córdoba.
- Samish, RM (1954). Dormancy in woody plants. *Annual Review of Plant Physiology*, **5**: 184-204.
- Sánchez-Díaz, M y Aguirreolea, J (1996). Relaciones hídricas. In J Azcon-Bieto y M Talón (eds.): *Fisiología y Bioquímica Vegetal*: 49-90. Interamericana McGraw-Hill. Madrid.
- Santoni, V; Vansuyt, G y Rossignol, M (1991). The changing sensitivity to auxin of the plasma-membrane H⁺-ATPase: relationship between plant development and ATPase content of membranes. *Planta*, **185** (2): 227-232.
- Sarmiento, R; Catalina, L; Valpuesta, V y Gonzalez-García, F (1977). El metabolismo

- nitrogenado en árboles de *Olea europaea*, var. Manzanillo, en relación con la floración. I: Estudio de las fracciones nitrogenadas orgánicas. *Anales de Edafología y Agrobiología*, **XXXVI**:565-572.
- Sarmiento, R; Valpuesta, V; Catalina, L y Gonzalez-García, F (1976). Variación de los contenidos de almidón y carbohidratos solubles en hojas y yemas de árboles de *Olea europaea* var. Manzanillo en relación con los procesos vegetativo y productivo. *Anales de Edafología y Agrobiología*, **XXV**: 687-695.
- Saure, MC (1985). Dormancy release in deciduous fruit trees. *Horticultural Reviews*, **7**: 239-300.
- Scalabrelli, G; Di Marco, L; Messina, R y Peterlunger, E (1992). Dormancy release in peach bud dormancy as related to climatic conditions. *Acta Horticulturae*, **315**: 187-195.
- Schaffer, KL; George, MF; Peleg, M; Garrett, HE y Cecich, RA (1996). Pistillate flower development in eastern black walnut. *Canadian Journal of Forest Research*, **26** (8): 1514-1519.
- Scorza, R (1982). *In vitro* flowering. *Horticultural Reviews*, **4**: 106-127.
- SECH (1999). *Diccionario de Ciencias Hortícolas*. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Mundi-Prensa. Madrid.
- Seeley, SD (1994). Dormancy - the black box. *HortScience*, **29** (11): 1248.
- Seeley, SD (1996). Modelling climatic regulation of bud dormancy. In GA Lang (ed.): *Plant Dormancy. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*: 361-376. CAB International. Wallingford.
- Seshu, DV y Dedlani, M (1991). Mechanism of seed dormancy in rice. *Seed Science Research*, **1** (3): 187-194.
- Shaltout, AD y Unrath, CR (1983). Rest completion prediction model for 'Starkrimson Delicious' apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **108** (6): 957-961.
- Shannon, S y Meeks-Wagner, DR (1993). Genetic interactions that regulate inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **5** (6): 639-655.
- Shawky, I; Maximos, S y Abdel-Fattah, M (1988). Effect of gibberellic acid on bud opening and endogenous growth promoters and inhibitors in pear trees. Part I: Effect of GA₃ on bud opening. *Annals of Agriculturae Science Cairo*, **33** (2):

- 1269-1276.
- Singh, K (1989). Hormonal regulation of reproductive phenomena and yield in chickpeas. *Annals of Plant Physiology*, **3** (2): 108-115.
- Smart, CC (1996). Molecular analysis of turion formation in *Spirodela polyrrhiza*: a model system for dormant bud induction. In GA Lang (ed.): *Plant Dormancy. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*: 269-281. CAB International. Wallingford.
- Snowball, AM (1996). The timing of flower evocation in kiwifruit. *Journal of Horticultural Science*, **71** (2): 335-347.
- Srinivasan, C y Mullins, MG (1978). Control of flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). Formation of inflorescences in vitro by isolated tendrils. *Plant Physiology*, **61**: 127-130.
- Srinivasan, C y Mullins, MG (1981). Physiology of flowering in the grapevine - a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, **32** (1): 47-63.
- Stutte, GW y Martin, GC (1986a). Effect of light intensity and carbohydrate reserves on flowering in olive. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **111** (1): 27-31.
- Stutte, GW y Martin, GC (1986b). Effect of killing the seed on return bloom of olive. *Scientia Horticulturae*, **29**: 107-113.
- Sundas-Larsson, A; Landberg, K y Meeks-Wagner, DR (1998). The *TERMINAL FLOWER2 (TFL2)* gene controls the reproductive transition and meristem identity in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **149** (2): 597-605.
- Sung, ZR; Belachew, A; Shunong, B y Bertrand-Garcia, R (1992). *EMF*, an *Arabidopsis* gene required for vegetative shoot development. *Science Washington*, **258** (5088): 1645-1647)
- SuriyapanAnont, S; SuriyapanAnont, V y Tuntawiroon, O (1990). Flower bud development of plum variety 'Gulfruby' in Thailand. *Acta Horticulturae*, **279**, 253-257.
- Sussex, IM (1989). Development programming of the shoot meristem. *Cell*, **56**: 225-229.
- Susuky, H; Sato, H; Ueda, JE y Tanno, S (1989). Floral differentiation period of apple in Akita prefecture. *Bulletin of the Akita Fruit Tree Experiment Station*, **20**: 15-

26.

- Suttle, JC (1996). Dormancy in tuberous organs: problems and perspectives. In GA Lang (ed.): *Plant Dormancy. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*: 133-143. CAB International. Wallingford.
- Taiz, L y Zeiger, E (1991). *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Redwood City, California.
- Talón, M (1996). Giberelinas. In J Azcon-Bieto y M Talón (eds.): *Fisiología y Bioquímica Vegetal*: 301-318. Interamericana McGraw-Hill. Madrid.
- Tang, YM (1997). A study on the dynamics of protein and nucleic acids during dormancy release in the overwintering buds of mulberry (*Morus alba* L.). *Journal of Southwest Agricultural University*, **19** (1): 75-77.
- Tarengi, E y Martin-Tanguy, J (1995). Polyamines, floral induction and floral development of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). *Plant Growth Regulation*, **17** (2): 157-165.
- Tombesi, A (1984). The influence of shading on differentiation of olive inflorescence. *Olea*, **15**: 65-69.
- Tombesi, A y Cartechini, A (1986). L'effetto dell'ombreggiamento della chioma sulla differenziazione delle gemme a fiore dell'olivo. *Rivista di Ortoflorofrutticoltura Italiana*, **70**: 277-285.
- Tombesi, A; Proietti, P y Nottiani, G (1986). Effect of water stress on photosynthesis, transpiration, stomata resistance and carbohydrate level on olive trees. *Olea*, **17**: 35-40.
- Tomita, H (1990). Regulation of flowering in *Pelargonium domesticum*. *Bulletin of the Saitama Horticultural Experiment Station*, **17**: 19-25.
- Torreño, P (1993). *Influencia del Frio en la Salida del Reposo de Yemas de Flor en Olivo*. Trabajo Profesional Fin de Carrera. ETSIAM. Universidad de Córdoba.
- Trewavas, A (1986). Understanding the control of plant development and the role of growth substances. *Australian Journal of Plant Physiology*, **13**: 447-457.
- Troncoso, A (1966). Alcune osservazioni sullo sviluppo delle gemme dell'olivo (*Olea europaea* L.). *Rivista di Frutticoltura*, **5**: 439-447.
- Troncoso, A (1967). Ricerche sulla differenziazione delle gemme a fiore nell'olivo (*Olea europaea* L.). *Rivista di Frutticoltura*, **10**: 535-544.

- Troncoso, A (1968). Algunas observaciones sobre la evolución de las yemas del olivo (*Olea europaea* L.). *Anales de Edafología y Agrobiología*, **XXVII**: 259-276.
- Tudela, D y Tadeo, FR (1996). Respuestas y adaptaciones de las plantas al estrés. . In J Azcon-Bieto y M Talón (eds.): *Fisiología y Bioquímica Vegetal*: 537-553. Interamericana McGraw-Hill. Madrid.
- Tylkowski, T y Wrzesniewski, W (1989). Respiration intensity of northern red oak (*Q. rubra* L.) embryo axes during the overcoming of dormancy. *Arboretum Kornickie*, **31**: 297-302.
- Van der Schoot, C (1996). Dormancy and symplasmic networking at the shoot apical meristem. In GA Lang (ed.): *Plant Dormancy. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*: 59-81. CAB International. Wallingford.
- Van der Walt, M; Davie, SJ y Smith, DG (1993). Carbohydrate and other studies on alternate bearing 'Fuerte' and 'Hass' avocado trees. *Yearbook South African Avocado Growers Association*, **16**: 82-85.
- Vargas, A (1993). *Relación entre Producción y Frutificación en Olivo en Arboles en Contraalternancia*. Trabajo Profesional Fin de Carrera. ETSIAM. Universidad de Córdoba.
- Vigodsky de Philippis, A (1937). L'epoca della differenziazione delle gemme fiorali nell'olivo. *Nuovo Giornalo Botanico Italiano*, **44**: 484-487.
- Vigodsky de Philippis, A (1938). Ulteriori osservazioni sull'epoca di differenziazione delle gemme fiorali nell'olivo. *Nuovo Giornalo Botanico Italiano*, **45**: 45-66.
- Villiers, TA (1975). *Dormancy and the Survival of Plants*. Edward Arnold (Publishers) Limited. London.
- Walker-Simmons, MKy Goldmark, PJ (1997). Characterization of genes expressed when dormant seeds of cereals and wild grasses are hydrated and remain growth-arrested. In GA Lang (ed.): *Plant Dormancy. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*: 283-291. CAB International. Wallingford.
- Wallensiek, SJ (1985). *Campanula medium*. In AH Halevy (ed.): *Handbook of Flowering*, vol. II: 123-126. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Wang, SY; Faust, M y Steffens, GL (1986). Metabolic changes in cherry flower buds associated with breaking of dormancy in early and late blooming cultivars. *Phytochemistry*, **25**: 311.

- Watanabe, G; Iwaya-Inoue, M; Molla, AH y Matsui, K (1997). Dynamic state of water characterized by ¹H-NMR relaxation time (T1) and spectra for pre-chilled tulip plants in growth and development stage. *Acta Horticulturae*, **440**: 452-457.
- Weges, R; Koot-Gronsveld, E y Karssen, CM (1991). Priming relieves dormancy in lettuce seeds independently of changes in osmotic constituents. *Physiologia Plantarum*, **81** (4): 527-533.
- Weigel, D y Nilsson, O (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature London*, **377** (6549): 495-500.
- Weinbaum, SA; Picchioni, GA; Muraoka, TT; Ferguson, L y Brown, PH (1994). Fertilizer nitrogen and boron uptake, storage, and allocation vary during the alternate-bearing cycle in pistachio trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **119** (1): 24-31.
- Weinberger, JH (1950). Prolonged dormancy of peaches. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, **56**: 129-133.
- Westwood, NH (1982). *Fruticultura de Zonas Templadas*. Mundi-Prensa. Madrid.
- Whitworth, JL y Young, E (1992). Chilling unit accumulation and forcing effects on carbohydrates of young apple rootstocks. *Journal of Horticultural Science*, **67** (2): 225-230.
- Wilkinson, MD y Haughn, GW (1995). *UNUSUAL FLORAL ORGANS* controls meristem identity and organ primordia fate in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **7** (9): 1485-1499.
- Wisniewski, M; Fuchigami, LH; Sauter, JJ; Shirazi, A y Zhen, L (1996). Near-lethal stress and bud dormancy in woody plants. In GA Lang (ed.): *Plant Dormancy. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*: 201-210. CAB International. Wallingford.
- Wu, C y Fang, XH (1993). Physiological changes during bud dormancy breaking and effect of zinc on endogenous hormones in tea (*Camelia sinensis*). *Acta Agronomica Sinica*, **19** (2) 179-184.
- Yamdagni, R y Khangia, B (1989). Effect of growth regulators on enzyme activities on shoot tips at various stages of bud differentiation in mango (*Mangifera indica* L.) cv. S. B. Chausa. *South Indian Horticulture*, **37** (4): 194-198.
- Yang, CH; Chen, LJ y Sung, ZR (1995). Genetic regulation of shoot development in

- Arabidopsis*: role of the *EMF* genes. *Developmental Biology*, **169** (2): 421-435.
- Yang, XH; Hu, WY y Sun, XN (1991). Changes in biomacromolecules in *Magnolia denudata* seed during dormancy breaking. *Acta Horticulturae Sinica*, **18** (1): 75-80.
- Yonemori, K; Sugiura, A; Tanaka, K y Kameda, K (1993). Floral ontogeny and sex determination in monoecious-type persimmons. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **118** (2): 293-297.
- Yoshida, Y; Fujime, Y y Chujo, T (1991). Effects of temperature on flower bud development and fruit malformation in 'Ai-Berry' strawberry. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **60** (3): 575-581.
- Young, E (1990). Changes in respiration rate and energy of activation after chilling and forcing dormant apple trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **115** (5): 809-814.
- Young, E; Dautlick, TK y Belding, RD (1995). Respiratory changes during dormancy breaking of apple trees. *Acta Horticulturae*, **395**: 21-33.
- Zagotta, MT; Hicks, KA; Jacobs, CI; Young, JC; Hangarter, RP y Meeks-Wagner, DR (1996). The *Arabidopsis* *ELF3* gene regulates vegetative photomorphogenesis and the photoperiodic induction of flowering. *Plant Journal*, **10** (4): 691-702.
- Zagotta, MT; Shannon, S; Jacobs, C y Meeks-Wagner, DR (1992). Early-flowering mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Australian Journal of Plant Physiology*, **19** (4): 411-418.
- Zeevaart, JAD (1976). Physiology of flower formation. *Annual Review of Plant Physiology*, **27**: 321-348.
- Zhang, X y Yan, CH (1991). Effect of gibberellin on the control of flower number of citrus. *Fujian Agricultural Science and Technology*, **1**: 14-15.