



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



**MICROPROPAGACIÓN DE KIWI (ACTINIDIA
DELICIOSA) A ESCALA INDUSTRIAL**

**MICROPROPAGACIÓN DO KIWI (ACTINIDIA DELICIOSA) A
ESCALA INDUSTRIAL**

**MICROPROPAGATION OF KIWI (ACTINIDIA DELICIOUS)
INDUSTRIAL SCALE**

MARTA FERREIRO LOZANO

Julio 2017



Universidade da Coruña

Cultigar (Fundación Paideia Galiza)

Micropropagación de kiwi (actinida deliciosa) a escala industrial

Micropropagación do kiwi (actinida deliciosa) a escala industrial

Micropropagation of kiwi (actinida delicious) industrial scale

Dra. Margarita Fraga Ares, Directora técnica del laboratorio de Biotecnología vegetal Cultigar (Fundación Paideia Galiza)

INFORMA:

Que ha dirigido y autoriza la presentación ante el tribunal evaluador el trabajo fin de Master titulado “Micropropagación de kiwi (actinida deliciosa) a escala industrial” realizado por Dña. Marta Ferreiro Lozano en la empresa Cultigar (Fundación Paideia Galiza) en Brión (A Coruña).

Brión, Junio de 2017.

Dra. Margarita Fraga Ares

Contenido

Introducción	1
1. ORIGEN Y DIFUSIÓN DEL KIWI	2
2. PROPIEDADES NUTRICIONALES DEL KIWI	3
3. ESTRUCTURA DE LA PLANTA	4
4. PRINCIPALES ESPECIES CULTIVADAS	6
4.1. <i>Actinidia deliciosa</i> (kiwi verde)	6
4.2. <i>Actinidia chinensis Planch</i> (kiwi amarillo)	7
4.3. <i>Actinidia arguta</i> y <i>Actinidia kolomikta</i>	8
5. EL CHANCRO BACTERIANO DEL KIWI	9
6. INTRODUCCIÓN AL CULTIVO IN VITRO	10
7. ANTECEDENTES DEL CULTIVO IN VITRO DEL KIWI	14
Objetivos	15
OBJETIVOS	16
Material y métodos	17
1. MATERIAL Y MÉTODOS	18
1.1. MATERIAL	18
1.1.1. REACTIVOS	18
1.1.2. EQUIPAMIENTO	18
1.1.3. MATERIAL VEGETAL	18
1.2. METODOS	19
1.2.1. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS	19
1.2.2. TRANSFERENCIA DE LA PLANTA	19
1.2.3. ESTABLECIMIENTO	19
1.2.4. MULTIPLICACIÓN	20
1.2.5. ENRAIZAMIENTO	22
1.2.6. ACLIMATACIÓN	22
1.2.6. ANÁLISIS DE DATOS	24
Discusión de resultados	25
1. ESTABLECIMIENTO	26
2. ENSAYO 1 DE MULTIPLICACIÓN	26
3. ENSAYO 2 DE MULTIPLICACIÓN	28
4. ENSAYO DE ENRAIZAMIENTO	32
5. ACLIMATACIÓN	37
Conclusiones	38
CONCLUSIONES	39
Bibliografía	41
BIBLIOGRAFIA	42

Abreviaturas

2,4-D	Ácido 2,4-dicloro fenoxiacético
2-iP	N-isopentenil adenina
ABA	Ácido abcísico
AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido α -naftalenacético
Atm	Atmosferas
BA	Bencilaminopurina
CA	Carbón activo
cm	Centímetros
cc	Centímetros cúbicos
g	Gramos
GA ₃	Acido giberelico
K	Cinetina o 6-furfuril aminopurina
L	Litros
M	Metros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
m ²	Metros cuadrados
μ m	micrómetros
μ mol	micro molar
s	Segundos
TDZ	Tidiazurón
Vit	Vitaminas
Zea	Zeatina

Introducción

1. ORIGEN Y DIFUSIÓN DEL KIWI

La *Actinidia deliciosa* es una planta fructífera perteneciente a la familia Actinidiaceae. Crece de manera espontánea en el valle del río Yang-Tse-Kiang de China, donde las plantas viven como vigorosas lianas trepadoras alcanzando notable altura. Durante mucho tiempo la *Actinidia* ha sido más utilizada como una especie decorativa, debido al vigor de la vegetación y a la belleza del follaje, que por sus posibilidades como especie fructífera. En Europa se conoce desde 1847, pero su verdadera introducción se realizó a principios del siglo XX, primero en Inglaterra y posteriormente en Francia. En Nueva Zelanda, país que le dio carácter frutícola, se obtuvieron las primeras plantas de semilla en 1906; allí crecieron y se desarrollaron, fructificando en 1910. Varios viveristas supieron ver la potencialidad frutal de la planta realizando las primeras selecciones y mejoras que dieron lugar a las variedades actualmente difundidas por el mundo. El cultivo propiamente dicho comenzó a partir de 1940, concentrándose en la Bahía de Plenty. Después del éxito neozelandés otros países iniciaron el cultivo como California (1965), Francia (1967) e Italia (1977). Más tarde se unen a los países productores Japón, Australia, Sudáfrica, Chile, Grecia, España y Portugal (García *et al.*, 2005).

En España la superficie de cultivo aumentó considerablemente en estos últimos años. Actualmente en Galicia hay 849 Ha que han producido 11.510 toneladas de kiwi en el último año (Ministerio de Agricultura y pesca, alimentación y medio ambiente, 2016). Otras comunidades que tienen plantaciones son Cataluña (27 Ha.), País Vasco (111 Ha.) y Asturias (554 Ha), (Tabla 1). Galicia, además de ser la comunidad con mayor superficie, también es la pionera en este cultivo. La primera plantación se realizó en 1969 al sur de la Provincia de Pontevedra y los primeros frutos se obtuvieron en 1972, los cuales fueron exportados casi en su totalidad a Alemania (García *et al.*, 2005).

Tabla 1. Superficie y producción del kiwi en España.

Provincia y Comunidad Autónoma	Superficie en plantación regular (hectáreas)						Árbol de producción (número)	Rendimiento			Producción (toneladas)		
	Total			En producción				Superficie en producción (kg/ha)		Árbol de producción (kg/árbol)	En plantación regular	Árbol de producción	Producción Total
	Socana	Roquía	Total	Socana	Roquía	Total		Socana	Roquía				
A Coruña	218	54	272	218	54	70.987	12.040	15.080	21	3.439	1.491	4.930	
Lugo	19	5	24	19	5	2.231	7.600	19.260	17	241	38	279	
Ourense	14	4	18	14	4	2.661	9.500	19.260	24	210	64	274	
Pontevedra	428	107	535	428	107	10.942	9.500	16.590	17	5.841	186	6.027	
GALICIA	679	170	849	679	170	86.821	19.262	16.252	20	9.731	1.779	11.510	
P. DE ASTURIAS	-	554	554	-	388	15.000	-	12.000	1	4.656	15	4.671	
CANTABRIA	1	-	1	1	-	-	25.000	-	-	25	-	25	
Alava	-	4	4	-	4	-	-	10.880	-	44	-	44	
Guipúzcoa	-	48	48	-	48	1.500	-	15.750	15	756	23	779	
Vizcaya	-	59	59	-	59	815	-	15.000	17	885	14	899	
PAÍS VASCO	-	111	111	-	111	2.315	-	15.176	16	1.685	37	1.722	
NAVARRA	-	26	26	-	21	-	-	15.400	-	323	-	323	
LA RIOJA	-	5	5	-	5	-	-	10.200	-	51	-	51	
Huesca	-	55	55	-	30	-	-	14.767	-	443	-	443	
Zaragoza	54	51	105	54	41	-	4.500	13.988	-	812	-	812	
ARAGÓN	54	106	160	54	71	-	4.500	14.317	-	1.255	-	1.255	
Barcelona	-	8	8	-	8	-	-	16.800	-	134	-	134	
Lleida	-	14	14	-	14	-	-	19.038	-	267	-	267	
Tarragona	-	5	5	-	5	-	-	16.000	-	80	-	80	
CATALUÑA	-	27	27	-	27	-	-	17.812	-	481	-	481	
BALEARES	-	12	12	-	12	-	-	5.583	-	67	-	67	
Valencia	-	-	135	-	-	-	-	-	-	1.155	-	1.155	
C. VALENCIANA	-	-	135	-	-	-	-	-	-	1.155	-	1.155	
Badajoz	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cáceres	-	8	8	-	6	-	-	17.000	-	102	-	102	
EXTREMADURA	-	9	9	-	6	-	-	17.000	-	102	-	102	
Huelva	-	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ANDALUCÍA	-	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lar Palmer	-	-	-	-	-	4.650	-	-	3	-	14	14	
S.C. de Tenerife	-	6	6	-	6	900	1.000	5.000	5	28	5	33	
CANARIAS	-	6	6	-	6	5.550	-	5.000	3	28	19	47	
ESPAÑA	734	1.029	1.898	734	817	109.686	9.358	13.677	17	19.559	1.950	21.409	

2. PROPIEDADES NUTRICIONALES DEL KIWI

El kiwi es uno de los alimentos más recomendados debido a los beneficios nutricionales que aporta. Destaca por aportar las cantidades recomendadas de nueve componentes nutritivos esenciales en la dieta: vitamina A, tiamina, riboflavina, niacina, folato, vitamina C, hierro y calcio, convirtiéndose así en la fruta nutritivamente más completa.

Una de las propiedades más valoradas es su alto contenido en fibra. Está demostrado que una dieta rica en fibra puede reducir los niveles de colesterol, a la vez que mejora el tránsito intestinal ayudando a prevenir posibles tumores de colon. Consumido en ayunas es uno de los mejores laxantes naturales que existen, atribuyéndose a esta propiedad su espectacular consumo mundial.

Debido a su alto contenido en vitamina C, un solo fruto puede cubrir las necesidades diarias de esta vitamina, así como de vitamina E y ácido fólico. Refuerza el sistema inmunitario, ayudando a disminuir los síntomas de enfermedades infecciosas como la gripe, resfriados, etc.

Su alto contenido en agua, unido a su valor energético y elevado índice en potasio y bajo en sodio, convierte al kiwi en un fruto muy recomendado en las dietas. Además, la relación sodio/potasio resulta beneficiosa en el control de la tensión arterial.

El kiwi es también una fuente importante de antioxidantes. Además de las vitaminas C y E, contiene luteína, un carotenoide que no producimos y que actúa como antioxidante de los

radicales libres que están implicados en el envejecimiento y degeneración de las células de nuestro cuerpo. Es por todo esto, que el kiwi se denomina como el fruto de la salud (García *et al.*, 2005).

3. ESTRUCTURA DE LA PLANTA

La planta de kiwi es una liana trepadora que de forma natural se enrolla sobre los árboles que tiene a su alrededor. Es por ello, que aun siendo una especie leñosa, necesita una estructura de soporte para su cultivo comercial. Todas las especies cultivadas son caducifolias y pueden vivir más de 50 años.

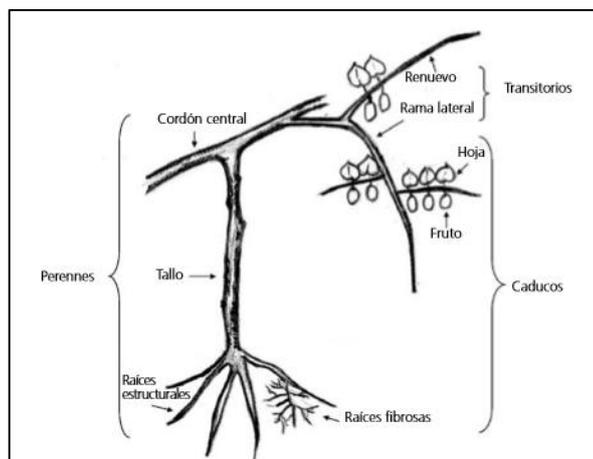


Figura 1. Esquema de la planta.

La planta se divide en tres componentes (Figura 1): Perennes (tallo, cordón central y raíces estructurales), transitorios (ramas laterales y renuevos) y caducos (frutos, hojas y raíces fibrosas).

A continuación se hace la descripción botánica de forma detallada de la planta del kiwi.

-Raíces: son gruesas y de color rosado cuando proceden de semilla, y finas y de color marrón oscuro cuando su origen es clonal. Son altamente exigentes en oxígeno y su desarrollo está favorecido en suelos con bajo contenido en arcilla. El sistema radical de la actinidia tiende a colonizar lenta pero eficazmente el suelo disponible, utilizando de forma intensa los recursos hídricos y nutritivos disponibles.

-Brotos: cuando son jóvenes son muy vellosos y suelen presentar una tonalidad rojiza si proceden de semilla. En condiciones favorables, pueden llegar a crecer hasta 3 cm diarios y alcanzar un crecimiento anual superior a los 3 m. Los brotes pueden ser de dos tipos. Los “brotos determinados” detienen su crecimiento a partir de la cuarta o la sexta hoja y los “brotos indeterminados” continúan su crecimiento hasta que se debilitan y se enrollan sobre sí mismos.

-Hojas: Son caducas, acorazonadas, con el limbo grande, dentado y borde aserrados. El haz es de color verde oscuro, el envés es más pálido y cubierto de pelos muy cortos. Las hojas de los brotes indeterminados tienden a ser más cordiformes que redondeadas y más pubescentes, comparadas con las hojas de los brotes determinados. El área media foliar suele ser menor en la zona fructífera que en la de renovación. Estas características pueden variar ligeramente según variedades, pero sobre todo según las distintas especies, siendo las que más difieren *A. arguta* y *A. Kolomitka* que son más pequeñas y carecen de pilosidad en el envés.

-Yemas: Están situadas en las axilas de las hojas y pueden ser de tres tipos: mixtas, de madera y adventicias. De las yemas mixtas nacen los brotes portadores de los botones florales. De las de madera solo se originan brotes no fructíferos y las adventicias evolucionan cuando se eliminan los brotes fructíferos o de madera, bien por podas o por heladas en la primavera. Así, los nuevos brotes portarán yemas mixtas que pueden producir brotes fructíferos el año siguiente.

-Flores: los botones florales nacen en las axilas de las primeras hojas de los brotes. Las flores se agrupan en inflorescencias denominadas cimas, generalmente de tres flores. Aunque morfológicamente son hermafroditas, ya que poseen los dos sexos, fisiológicamente son unisexuales. Los estambres de las flores de clones femeninos producen polen estéril, y todo el gineceo o aparato reproductor femenino es rudimentario en los pies masculinos. Por ello, la actinidia es una especie dioica que necesita poner al lado de plantas femeninas un número adecuado de masculinas para asegurar la fecundación.

La diferenciación visible de las flores comienza en primavera, desarrollándose hasta finales de mayo o principios de junio, momento donde se alcanza la plena floración.

Las flores de *A. deliciosa* y *A. chinensis* son grandes, de 4-7 cm de diámetro, con 5-7 pétalos de color blanco y 3-7 sépalos de color marrón. En el caso de *A. arguta* y *A. kolomitka* son muy similares en cuanto a su morfología pero muy inferiores en tamaño, generalmente la mitad de estas.

-Frutos: en la Actinidia, cada flor se transforma en un fruto cuyo crecimiento es un desarrollo continuo del ovario de las flores femeninas a lo largo de todo el periodo de cultivo, pero existen diferencias entre ellos según las cuatro principales especies (García *et Al.*, 2005).

4. PRINCIPALES ESPECIES CULTIVADAS

Si bien dentro del género *Actinidia* se han descrito más de 60 especies, solo las cuatro que se detallan a continuación tienen interés por el aprovechamiento comercial de sus frutos.

4.1. *Actinidia deliciosa* (kiwi verde)

Es la especie más cultivada en el mundo. Como se puede observar en la figura 2, produce frutos ovoides con la epidermis de color marrón claro y abundante pilosidad. La pulpa es de color verde esmeralda, con numerosas y pequeñas semillas que envuelve un huso central de color blanco conocido como “columela”. El tamaño medio del fruto está entre los 80 y 120 g. El sabor es acidulado y tienen la capacidad de frigoconservación más alta de todos los kiwis. Aunque existen muchos cultivares de esta especie, y todos dioicos, el más importante es “Hayward”.



Figura 2. Fruto de *A. deliciosa*.

-“**Hayward**”: se seleccionó a finales de la década de 1920 y es aún hoy en día la variedad más cultivada en el mundo. Es una planta vigorosa y muy productiva. Las flores son generalmente solitarias, grandes, muy atractivas y los pétalos de color blanco. El fruto es grande, con peso medio superior a los 100 g y de forma elipsoidal. La piel es de color marrón y está cubierta de vellosidad y la pulpa es de color verde brillante. Tiene la mejor conservación frigorífica de todas las variedades, hasta más de 6 meses. Se cosecha la primera quincena de noviembre.

-“**Hayward, clon 8**”: es un clon de Hayward de origen griego y muy productivo, con un peso medio un 20% superior a Hayward y que madura una semana antes. Produce un menor porcentaje de frutos dobles y es más resistente a las heladas. También es menos susceptible a *Phytophthora* spp que Hayward.

-“**Hayward, clon k**”: es una selección clonal de Hayward que está desprovista de vellosidad.

-“**Summerkiwi**”™: es un clon propiedad de los Viveros Dalpane, Italia. Es el resultado de cruces de Hayward con planta masculina con la particularidad de, además de ser un buen polinizador, produce frutos pequeños pero exageradamente precoces de maduración. Actualmente es la variedad de kiwi verde más precoz de recolección que hay en el mercado,

pudiendo cosecharse de 40-45 días antes que Hayward. Es vigorosa y más productiva que Hayward, ya que posee entrenudos cortos, por lo que tiene un mayor número de yemas por metro de rama. El fruto es algo más pequeño que Hayward, con un peso medio de 90 g. Posee menor acidez y más dulzor que la mayoría de las variedades del kiwi verde y la conservación frigorífica es menor que Hayward.

-**“Megakiwi”™**: esta reciente selección obtenida de una semilla de Hayward, es de origen griego. El fruto es de gran tamaño, 150-180 g, y debido a este gran calibre puede ser apropiada para cultivo ecológico. La pulpa es verde brillante y dulce, con un contenido de vitamina C y antioxidantes superior al resto de variedades de kiwi verde. Su capacidad de conservación todavía no está muy definida.

4.2. *Actinidia chinensis* Planch (kiwi amarillo)

Es la segunda especie de *Actinidia* en importancia en cuanto a superficie de cultivo. No obstante, ha experimentado un fuerte retroceso debido a la susceptibilidad a la bacteriosis en general y en particular al chancro bacteriano (PSA) causado por *Pseudomonas Syringae* pv. *Actinidiae*.

Los frutos de los cultivares de esta especie se caracterizan por tener una piel de color marrón claro y en algunos casos desprovisto de vellosidad. La pulpa es de color amarillo brillante y con mayor dulzor que el kiwi verde. Al igual que *A. deliciosa* todas las variedades de esta especie son dioicas, con pies masculinos y femeninos.

El cultivo de esta variedad es muy reciente y se ha basado en un solo clon, “hort 16A”.

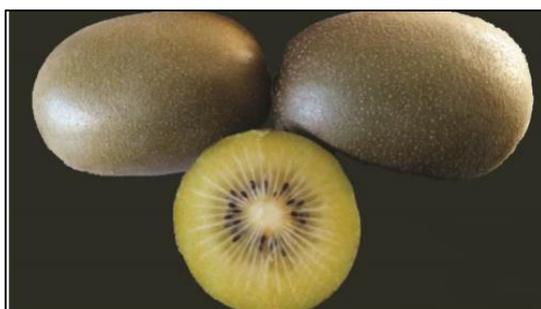


Figura 3. Fruto de *A. Chinensis*.

-**“Hort 16A” (Zespri® Gold)**: fue obtenida en Nueva Zelanda en 1992 y es la variedad amarilla más cultivada en el mundo hasta la actualidad. El fruto es de tamaño medio y muy característico por tener muy pronunciado el extremo floral y la pulpa es amarilla. Es muy productivo y la época de cosecha es similar a Hayward.

-**“Jintao” (Jing Gold®)**: El fruto es de menor tamaño que “Hort 16A”, con la pulpa amarilla y de sabor dulce. Es muy productiva y se cosecha en el mismo periodo que Hayward. Además, parece que es menos sensible que otras variedades amarillas a la bacteriosis.

-“**SunGold**”®: es una nueva selección de la empresa Zespri, con una pulpa suave y cremosa, de color amarillo brillante y un sabor muy dulce y tropical. Esta desprovisto de vellosidad y no tiene tan pronunciado el extremo floral. Tiene un buen tamaño y es muy productivo. Además, parece ser menos sensible a la bacteriosis.

- “**Soreli**”®: variedad seleccionada en Italia. Tiene entrenudos muy cortos y una buena fertilidad de yemas florales, lo que la hace muy productiva. Tolera mejor el frío que el resto de las selecciones amarillas debido a su brotación más tardía. El fruto es de unos 100 g, la pulpa es amarilla y dulce y la piel marrón clara y sin vellosidad. Se cosecha unas 3-4 semanas antes que Hayward y la conservación frigorífica es de 3-4 meses.

-“**Dori**” (AC1536): es un nuevo cultivar, con un crecimiento vegetativo no muy excesivo y la particularidad de mostrar las hojas siempre de un verde atractivo. Es menos sensible al frío invernal y a las bacterias, de las cuales parece estar libre. El fruto es de unos 100g, y la pulpa de color amarillo intenso. La forma es más alargada que Hayward, con la piel fina y carece de vellosidad. Brota y florea antes que Hayward y la cosecha se adelanta unos 35 días.

4.3. *Actinidia arguta* y *Actinidia kolomikta*

Son mucho menos conocidas y extendidas a nivel de producción comercial, aunque empieza a ser habitual su presencia en las cadenas de distribución. Son especies muy resistentes al frío invernal, dado que su origen se sitúa en Asia oriental en el caso de *A. arguta* y en la zona del ártico en el caso de *A. Kolomikta*.

Sus frutos son bayas de pequeño tamaño que raramente superan los 25 g y con forma ovalada o cilíndrica. La piel es lisa, fina, suave y de color verde con tono rojizo en alguna variedad, sin vellosidad alguna y comestible. La pulpa es de color verde brillante con sabor similar al kiwi verde pero más dulce. Posee un contenido de vitaminas, minerales y antioxidantes mayor que el resto de los kiwis. Se recolectan entre los meses de agosto y octubre y la mayoría de las variedades tienen un periodo de conservación de 2 o 3 meses.



Figura 4. Frutos de *A. arguta*.

5. EL CHANCRO BACTERIANO DEL KIWI

El chancro bacteriano es una enfermedad del kiwi que está causando importantes pérdidas en la producción a nivel mundial. La bacteria responsable es *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* (PSA), que fue descrita por primera vez en Japón en 1984 (Takikawa, 1989). Actualmente está presente en otros países productores de kiwi como China y Nueva Zelanda. En Europa, la primera detección fue en Italia en 1992 (Scortichini, 1994) y en los últimos años se ha detectado en Galicia, Francia, Portugal, Suiza y Turquía.

Aunque las principales especies de kiwi son sensibles a la enfermedad, parece que los daños más graves se producen en los cultivares de kiwi amarillo.

El síntoma más específico de la enfermedad son “los exudados” que aparecen al principio de la primavera. Estos pueden ser de color rojo-naranja óxido (Figura 5A) y/o de color blanco (Figura 5B), y van asociados a chancros o heridas en varas, brazos y troncos. Las ramas afectadas acaban secándose, y en caso de infecciones graves, la bacteria puede causar la muerte de las plantas, especialmente en las variedades más sensibles y en plantaciones jóvenes.

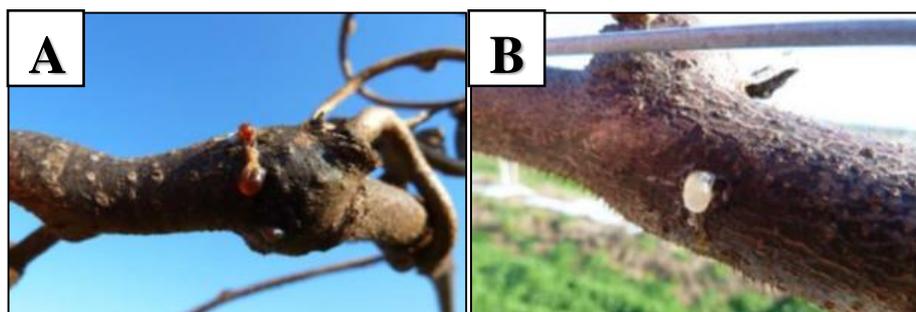


Figura 5. *Exudados del kiwi.*

Los síntomas en botones, flores y hojas, son similares a los producidos por otras bacteriosis, como la coloración marrón y seca de botones florales (Figura 6A) y las manchas necróticas angulares en hojas (Figura 6B), que se aprecian principalmente durante el verano.

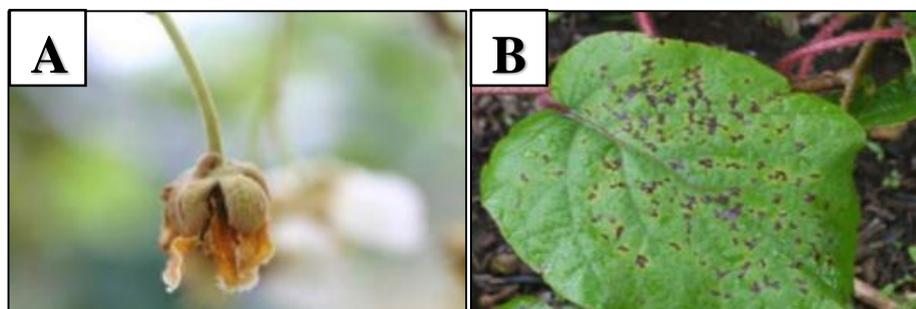


Figura 6. *Botón floral y hoja necrótica.*

Según las condiciones ambientales también se pueden producir exudados de la bacteria en los botones (Figura 7A) y en el envés de las hojas (Figura 7B).

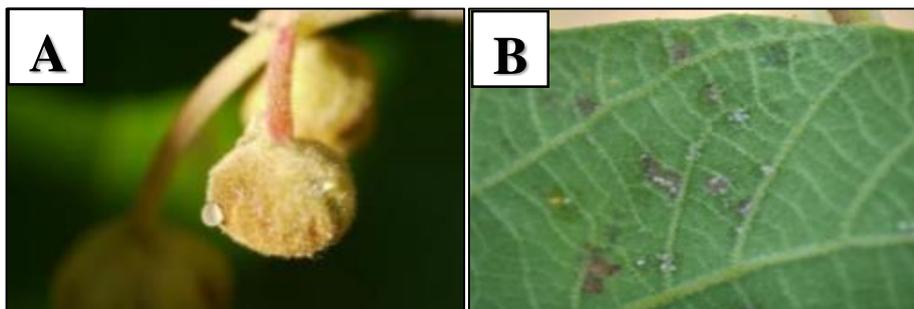


Figura 7. Exudados en los botones y las hojas.

6. INTRODUCCIÓN AL CULTIVO IN VITRO

La reproducción asexual de plantas por cultivo de tejidos es posible gracias a que, en general, varias células de un individuo vegetal poseen la capacidad necesaria para permitir el crecimiento y el desarrollo de un nuevo individuo completo, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales o gametas. Esta capacidad se denomina totipotencialidad celular, y es característica de un grupo de células vegetales conocidas como células meristemáticas, presentes en los distintos órganos de la planta. La potencialidad de una célula diferenciada para generar tejidos nuevos y eventualmente un organismo completo, disminuye con el grado de diferenciación alcanzado por esa célula, pero puede revertirse parcial o completamente según las condiciones de cultivo a las que se la someta.

El cultivo *in vitro* consiste en tomar una porción de una planta (a la que se denominará explanto, como por ej. el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristemo, embrión, nudo, semilla, antera, etc.) y colocarla en un medio nutritivo estéril (usualmente gelificado o semisólido) donde se regenerarán una o muchas plantas. La formulación del medio cambia según se quiera obtener un tejido desdiferenciado (callo), crecer yemas y raíces, u obtener embriones somáticos para producir semillas artificiales.

En todo intento de propagación vegetal, ya sea *in vitro* o *in vivo*, el carácter del proceso de diferenciación depende del genoma de la especie, y está regulado por el balance hormonal propio y por el estado fisiológico del órgano, tejido o célula puesta en cultivo. Sin embargo, ese balance puede ser modificado por el agregado de compuestos que imiten la acción de las hormonas vegetales. Estos compuestos se denominan reguladores del crecimiento, y se emplean en los medios de cultivo para conseguir la micropropagación de una planta.

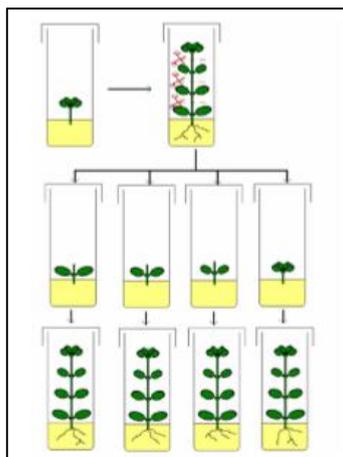


Figura 8. *Micropropagación vegetal a partir de una planta madre.*

En los protocolos utilizados durante el cultivo *in vitro* se pueden distinguir las siguientes etapas:

Etapa 0: Mantenimiento de la planta madre en condiciones fitosanitarias adecuadas.

Etapa 1: Establecimiento, que consiste en la desinfección de los explantos (generalmente con hipoclorito de sodio) y su posterior adaptación al medio artificial a de modo de inducir callo, brote, raíz o embrión somático según se desee.

Etapa 2: Multiplicación, para generar una masa vegetal suficiente para la regeneración del número de plantas necesarias.

Etapa 3: Enraizamiento, en la que se busca la formación de raíces con el fin de convertir los brotes o embriones somáticos en plántulas completas.

Etapa 4: Rusticación, que es la aclimatación de las plántulas obtenidas *in vitro* a las condiciones ambientales *ex vitro* (suelo o algún sustrato inerte).

El éxito de la técnica depende de muchos factores, entre ellos la edad de la planta (a mayor edad, menor potencial de regeneración), el genotipo y las condiciones ambientales. Entre las ventajas del cultivo *in vitro* de material vegetal se pueden incluir: el crecimiento más rápido de la planta que en las condiciones *in vivo*, la posibilidad de ocupar un espacio mucho más pequeño que si se desea propagar material en tierra, conseguir plantas libres de enfermedades, se necesita menor cantidad de planta para iniciar el cultivo, se obtiene una producción homogénea a lo largo del año y puede ser muy útil para el establecimiento de bancos de genes.

Los factores externos que determinan el éxito del cultivo *in vitro* de una especie, son la temperatura, el fotoperíodo y el medio de cultivo en el que se encuentra. La humedad, al tratarse de envases cerrados está siempre cercana al 100%. Por tanto, se necesita un medio de cultivo adecuado para el explanto, compuesto por macro y micronutrientes esenciales

para la supervivencia de la planta, hidratos de carbono (normalmente sacarosa), vitaminas y agentes reguladores del crecimiento. Este medio, puede ser sólido o líquido, y normalmente requiere algún tipo de soporte inerte como un agente gelificante (agar, gelrite, etc.), vermiculita, perlita, etc. El pH de los medios de cultivo para plantas suele variar entre pH=5 y 6,5.



Figura 9. *Cámara de cultivo programable.*

A continuación se enumeran los principales componentes de los medios de cultivo (Secretín, 2006)

Agua destilada: Representa el 95% del medio.

Fuente de carbono: La fuente de carbono es necesaria porque los explantos no son completamente autótrofos. Generalmente se utiliza sacarosa.

Substancias inorgánicas: Macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) y microelementos (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I) en una proporción adecuada según la planta elegida.

Vitaminas: Vitaminas B1, B2, B6, vitamina H, vitamina E, ácido fólico, ácido nicotínico, etc.

Reguladores de crecimiento: Los reguladores del crecimiento que resultan útiles para el establecimiento y crecimiento de los cultivos de tejidos vegetales como así también para la producción de metabolitos se agrupan en varias categorías, de acuerdo a su estructura, tal como se describe en los ítems siguientes (Pierik, 1990).

- **Auxinas:** En las plantas, las auxinas intervienen en el tropismo a la gravedad y a la luz, la dominancia apical, el crecimiento de las partes florales y la diferenciación de los tejidos vasculares (Davies, 1995). Las auxinas más utilizadas son el AIA (ácido indol-3-acético), el ANA (ácido α -naftalenacético), el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), el AIB (ácido indolbutírico).

- **Citocininas:** Son derivados de la adenina que promueven la división celular. Entre ellas cabe mencionar las siguientes: BA (bencil adenina), K (cinetina o 6-furfuril aminopurina), Zea (zeatina) y 2-iP (N-isopentenil adenina). Las dos primeras son citocininas sintéticas y las dos últimas naturales. Las citocininas in vivo incrementan la tasa de división celular, el transporte de solutos hacia las hojas, semillas, flores y frutos y producen un retardo de la senescencia de las hojas (Salisbury y Ross, 1994). La proporción entre auxinas y citocininas permite regular la organogénesis o la desdiferenciación, por lo que se deben programar las concentraciones de auxinas y citocininas a través de diseños factoriales para cada especie y variedad vegetal y según el objetivo del trabajo. En general, cuando la relación auxina/citocinina es alta se forman raíces, cuando es baja se producen vástagos y con relaciones cercanas a 1 se producen callos
- **Giberelinas:** Las giberelinas (GAs) constituyen una familia de compuestos químicos tetracíclicos diterpenoides que regulan varios procesos del crecimiento y desarrollo como la germinación de semillas, la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración. La más utilizada es GA₃, pero es muy sensible al calor (pierde el 90% de su actividad), por lo que se debe añadir después del autoclavado del medio por filtración.
- **Ácido Abscísico (ABA):** es un regulador de crecimiento cuya tasa de biosíntesis se modifica significativamente frente al estrés fisiológico ocasionado por falta de agua, salinidad del suelo, bajas o altas temperaturas.
- **Etileno:** es un compuesto gaseoso reconocido como hormona de maduración de los frutos pero que además regula diversos procesos fisiológicos como la germinación de las semillas, la senescencia de hojas y flores, la abscisión de hojas y frutos y la floración de algunas especies.
- **Otros:** Poliaminas, jasmonatos, ácido salicílico y brasinoestroides

Mezclas de sustancias poco definidas: Extracto de levadura, extractos vegetales.

Materiales inertes: Se utilizan como soporte agar, agarosa, polisacáridos, lana de vidrio, papel de filtro, arena, vermiculita, etc.

Por último las condiciones de temperatura y fotoperiodo (relación de horas de luz y horas de oscuridad) más empleadas varían entre 22 y 26°C, con 16 h de luz y 8 de oscuridad.

7. ANTECEDENTES DEL CULTIVO IN VITRO DEL KIWI

Se han realizado numerosos estudios para la multiplicación de *Actidinia in vitro* a lo largo de los años, siendo el primer método en publicarse el descrito por Harada (1975). Las diferentes especies presentan diferentes respuestas frente al uso de citoquininas (Seelye y Butcher, 1991) e incluso algunas se consideran recalcitrantes.

Moncaleán *et al.*, (2001) empleó con éxito BA para el cultivo in vitro de kiwi, mientras que Takahashi *et al.*, (2004) examinó el efecto de la zeatina en la formación de nuevos brotes.

En el año 2005 se hizo un ensayo con Tomuri y con el clon A utilizando el medio k (h) (Cheng, 1975), al cual se añadieron diferentes reguladores del crecimiento: ANA (0.1, 0.5 mg/L), BA (0.4, 4.4, 2.2, 22 mg/L) y GA₃ (0.3, 1.4 mg/L). Además fue probada la citoquinina TDZ (0.4, 2.2 μM) mejorando los datos de multiplicación de Tomuri (Prado *et al.* 2005).

Se utiliza el medio k (h) (Cheng, 1975) en la variedad Tomuri y se añaden diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento: 23 mg/L de Zeatina (Z) se combina con diferentes concentraciones de la auxina ANA (0.1, 0.5 y 2.7 mg/L), siendo la combinación K (h) 23 mg/L Z, 0.1 mg/L ANA la que produce una mejor inducción de los brotes (Prado *et al.* 2006).

Se utilizó el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) añadiendo diferentes concentraciones de la hormona BA y agua de coco: BA (1.5, 2.0, 2.5 mg/L) y agua de coco (15, 20 y 25%). Se observa que ambos elementos tienen un efecto sinérgico siendo el medio MS 2mg/L BA y agua de coco 20% el que produce mayor multiplicación, brotes más largos y mayor número de nudos (Nasib *et al.* 2008).

Recientemente, en Nueva Zelanda probaron el medio MS, vit B5 (Gamborg *et al.* 1968), 0.3 mg/L BA, 0.05 mg/L AIB, 0.1 mg/L GA₃ obteniéndose unos buenos resultados en cuanto a la multiplicación y al tamaño de los brotes (Debenham *et al.* 2014).

.

Objetivos

OBJETIVOS

La producción de kiwi tiene una gran importancia en Galicia dentro del sector hortofrutícola. Sin embargo, en los últimos años se está viendo afectada por el ataque de una bacteria (*Pseudomonas syringae actinidiae*, PSA), que ha provocado la puesta en cuarentena de algunos viveros productores de planta. Las plantaciones de kiwi existentes están prácticamente en su totalidad infectadas por esta bacteria lo que repercute en una merma en la producción y en la seca de algunas cepas. En función de las condiciones climáticas de cada año, la bacteria puede afectar más o menos a la plantación. También existen diferentes cepas de bacteria con diferente grado de agresividad.

Cultigar dispone de planta madre de dos variedades de kiwi (Hayward y Tomuri, hembra y macho respectivamente) libres de PSA. Los objetivos de este trabajo son:

- 1.- Establecer in vitro material vegetal de estas dos variedades de Kiwi
- 2.- Poner a punto los medios de cultivo más adecuados para su multiplicación y enraizamiento in vitro

Todo ello con la finalidad de proveer al sector agrícola de planta con una garantía sanitaria adecuada.

Material y métodos

1. MATERIAL Y MÉTODOS

1.1. MATERIAL

1.1.1. REACTIVOS

Los reactivos utilizados para la preparación de medios de cultivo *in vitro* fueron de la marca Duchefa.

1.1.2. EQUIPAMIENTO

Para llevar adelante este trabajo, se ha utilizado una cámara de flujo laminar horizontal para generar las condiciones necesarias de esterilidad. Dentro de esta cámara se encuentra un esterilizador seco, en el cual se introducen las pinzas y bisturís durante 30 segundos antes de su uso. También son necesarios autoclaves para la esterilización de todo el material empleado y una cámara de cultivo con temperatura y fotoperíodo programables donde la planta se desarrolla. Las condiciones ambientales de esta cámara son de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ con 16 h de luz, con una intensidad lumínica de $50\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ y 8 h de oscuridad.

1.1.3. MATERIAL VEGETAL

Cultivar dispone en sus invernaderos de planta madre de dos variedades de kiwi, Hayward y Tomuri que se mantienen en condiciones fitosanitarias adecuadas. Para ello se emplean ácaros insectívoros para el control de plagas (mosca blanca), tratamientos con chas (mosca del substrato) y con captan, fungicida de amplio espectro.



Figura 10. *Planta en el invernadero.*

1.2. METODOS

1.2.1. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS

Se calienta el agua con el agar y se prepara la mezcla de macronutrientes, micronutrientes, FeNaEDTA y vitaminas a partir de soluciones stock concentradas. En cuando hierve el agar, se añade la sacarosa y la mezcla previamente preparada.

Se ajusta el pH a 5.7 y se dispensa el medio en las jarras o tubos de ensayo correspondientes. La cantidad de medio que se añade, es de 15 mL por cada tubo de ensayo, 50 mL en las jarras de multiplicación que tienen un volumen total de 300cc y 60 mL de medio en las jarras de enraizamiento que tiene un volumen total de 700cc. A continuación el medio es autoclavado a 120°C y 1 atm durante 20 minutos.

Cuando se prepara un medio con la giberelina GA₃, esta se añade en la cámara de flujo horizontal, después del autoclavado del medio, mediante filtración a través de un filtro de membrana de 0,22 µm ya que es termolábil.

1.2.2. TRANSFERENCIA DE LA PLANTA

Una vez al mes, la planta ha de transferirse a un medio de cultivo fresco, ya que los nutrientes que se le han añadido en un principio ya se habrán agotado. Esta transferencia se aprovecha para individualizar los brotes que hayan regenerado y para cambiar a medio de enraizamiento las plantas que presenten las características adecuadas para ello (Figura 11).



Figura 11. *Planta recién repicada y tras pasar un mes.*

1.2.3. ESTABLECIMIENTO

Se recoge material vegetal de la planta madre del invernadero, seleccionando los brotes más tiernos. Las hojas se desechan y se introducen los nudos y ápices en una jarra estéril para su desinfección. Se han elegido partes de la planta con meristemas preexistentes para evitar problemas de variación somaclonal (George. 1993), ya que es muy importante mantener las características de la planta original, que garanticen un buen comportamiento agronómico.

Los explantos se lavan con hipoclorito de sodio (Cloro comercial: hipoclorito de sodio al 5,25%) al 15% y una gota de twin 20, empleando dos tiempos de exposición; 10 y 15 min. Posteriormente, se realizan tres enjuagues con agua destilada y estéril.

Los explantos se introducen en tubos de ensayo con 15 ml de medio MS y 5 mg/L de BA.



Figura 12. Establecimiento en tubos de ensayo de las dos variedades de kiwi.

Pasada una semana, las plantas son transferidas a otro medio fresco de cultivo con 15 ml de MS, 1 mg/L de BA y 0.1 mg/L de AIB (Tabla 2) y se dejan crecer durante un mes en la cámara de cultivo antes de ser pasados a las jarras de multiplicación.

Tabla 2. Tabla resumen de todos los medios de establecimiento.

	BA (mg/L)	AIB (mg/L)
MS	5	
	1	0,1

1.2.4. MULTIPLICACIÓN

Ensayo 1

Con el fin de conseguir el mejor medio para la multiplicación de kiwi in vitro se realiza el diseño de una serie de ensayos, basándonos en la bibliografía existente y en la experiencia previa de la empresa. Así, se seleccionan en un primer lugar, 6 medios de cultivo con 3 bases salinas diferentes: MS (Murashige y Skoog, 1962), WPM (Lloyd y McCown, 1980) y K(h) (Cheng, 1975). Tanto al MS como al WPM se le añaden los reguladores de crecimiento basados en los descritos por (Liping *et al.*, 2016), pero empleando como auxina AIB en lugar de ANA, es decir, 1 mg/L de BA y 0,1 mg/L de AIB (medios MSA y WPMA). También a las mismas bases salinas se les añade otra combinación de reguladores de crecimiento cambiando la auxina por una giberelina, es decir, 1 mg/L de BA y 0,1 mg/L de GA₃ (medios MSB y WPMB). Por otro lado, al medio K(h) descrito por Cheng, se le añaden dos combinaciones de reguladores de crecimiento descritas por Prado *et al.*, 2005 para Tomuri: 5 mg/L de BA, 0,1 mg/L de ANA y 0,1 mg/L de GA₃ (K(h) A) y 0,5 mg/L de TDZ, 0,1 mg/L de ANA y 0,1 mg/L de GA₃ (K(h) B).

El número de explantos por jarra es de 5 y el total de explantos por medio de cultivo es de 70. Al cabo de 1 mes, se toman datos para cada uno de los medios de cultivo de la tasa de

multiplicación y datos relativos al fenotipo como el color y el tamaño de las hojas y el aspecto general adjudicando a cada uno un valor según la siguiente tabla:

Tabla 3. Apariencia general y color de las hojas que pueden presentar las plantas de las variedades Hayward y Tomuri en cada uno de los medios de cultivo ensayados.

Apariencia de la planta			Color de las hojas		
Buena	Aceptable	Mala	Verde	Verde claro	Clorosis intervenosa
					

Tabla 4. Diferentes tamaños de hoja y de callo que pueden presentar las plantas de las variedades Hayward y Tomuri en cada uno de los medios de cultivo ensayados.

Tamaño de la hoja (cm)			Tamaño de los callos (cm)		
Grande	Mediano	Pequeño	Ausente	Poco	Mucho
6x4	5x3	3x2	0	<3	>3

Ensayo 2

Se realizó un segundo ensayo en donde se compararon los medios que mejor resultado ofrecieron en el primer ensayo, con otros que contenían diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento (Tabla 5) con el fin de obtener mayor elongación en las plantas y un menor crecimiento de las hojas, manteniendo o incluso aumentando las tasas de multiplicación.

Empleando como base el medio MS se aumenta la concentración de la giberelina GA₃ con el fin de conseguir una mayor elongación de la planta, es decir, 1 mg/L de BA y 5 mg/L de GA₃ (medio MSC). Por otro lado, a esta misma base salina se le añaden dos combinaciones de reguladores de crecimiento 1 mg/L de BA y 0.5 mg/L de AIB (MSE) y 0.3 mg/L de BA y 0.05 mg/L de AIB (MSD). Además, a estas dos últimas combinaciones se les añade 0.1 mg/L de GA₃ (medios MSEG y MSDG respectivamente).

Por último, teniendo en cuenta los resultados obtenidos por (Debenham et al, 2016), se añade a los dos medios de cultivo con mejores resultados, las vitaminas B5 (Gamborg et al, 1968) en lugar de las MS para ver si se mejora el crecimiento y fenotipo de las plantas.

El número de explantos por jarra es de 5 y el total de explantos por medio de cultivo es de 20. Al cabo de 1 mes, se toman datos para cada uno de los medios de cultivo de la tasa de

multiplicación y datos relativos al fenotipo como el color y el tamaño de las hojas y el aspecto general.

Tabla 5. *Tabla resumen de todos los medios de multiplicación empleados en los diferentes ensayos de multiplicación de las dos variedades de Kiwi.*

	BA (mg/L)	AIB (mg/L)	GA ₃ (mg/L)	TDZ (mg/L)	ANA (mg/L)
MSA	1	0,1			
MSB	1		0,1		
MSC	1		5		
MSD	0,3	0,05			
MSE	1	0,5			
MSEG	1	0,5	0,1		
MSDG	0,3	0,05	0,1		
MS VIT B5	1	0,5	0,1		
	0,3	0,05	0,1		
WPMA	1	0,1			
	1		0,1		
K(h)A	5		0,1		0,1
K(h)B			0,1	0,5	0,1

1.2.5. ENRAIZAMIENTO

Se ensayaron 6 medios de cultivo tanto en la variedad Hayward como en Tomuri. Se trata de medios MS con los nitratos reducidos a la mitad (Roussos, 2016) y con diferentes concentraciones de AIB (0,5, 1 y 2 mg/L) y carbón activo (CA) (25 y 50 mg/L).

Se introducen 5 explantos por jarra y un total de 20 plantas por medio de cultivo. El tiempo de permanencia de la planta en los diferentes medios fue de 1 mes. Al cabo de este tiempo se toman datos de porcentaje de planta con raíz, número de raíces y longitud de la raíz más larga. Asimismo, se toman datos fenotípicos como el color de la hoja y del aspecto general.

Tabla 6. *Medios de cultivo empleados en el ensayo de enraizamiento en las dos variedades de kiwi.*

	AIB (mg/L)	CA (mg/L)
E.0525	0,5	25
E.0550	0,5	50
E.125	1	25
E.150	1	50
E.225	2	25
E.250	2	50

1.2.6. ACLIMATACIÓN

Una vez enraizadas, las plantas se introducen en bandejas de 40 alveolos que contienen un sustrato especial semillero al que se añade perlita en una proporción 3:1, para favorecer la aireación y el drenaje.

En la primera fase de la aclimatación, la planta se mantiene en la cámara de enraizamiento con temperatura y fotoperiodo controlados de 22°C y 16h de luz/8h de oscuridad, (Figura 13A). Para mantener la humedad las plantas se introducen en unas cajas de poliestireno expandido que permite colocar una tapa traslúcida que hace que se condense la humedad en su interior (Figura 13B).



Figura 13. Cámara de enraizamiento (A) y caja de poliestireno expandido (B).

En esta cámara de enraizamiento, la planta suele permanecer 4 semanas, hasta que se observa movimiento en el desarrollo apical.

Una vez que esto ocurre, la planta se traslada a los túneles de aclimatación del invernadero con parámetros climáticos controlados y humedad relativa elevada, que se va disminuyendo de forma gradual durante un mes (Figura 14).

Al cabo de este tiempo, la planta se mantiene en un invernadero convencional para terminar el proceso de endurecimiento.



Figura 14. Túnel de aclimatación y planta en el túnel de aclimatación.

1.2.6. ANÁLISIS DE DATOS

Se realizó un diseño de bloques al azar con 2 repeticiones.

Las variables cualitativas como el aspecto (malo, aceptable, bueno), color (verde, verde claro, clorosis intervenosa), cantidad de callo (ausente, poco, mucho) o tamaño de la hoja, (pequeña, mediana, grande) fueron descritos usando tablas de contingencia.

Las variables tasa de multiplicación (número de plantas que produce un explanto) y número de raíces fueron analizados usando un modelo lineal generalizado (GLM, Nelder and Wedderburn, 1972) considerando una variable poisson en su respuesta.

Para analizar la longitud de los brotes y de las raíces se ha realizado un análisis de varianza ANOVA (nivel de significación $P < 0.05$) seguida del test de Tuckey HSD (nivel de significación $P < 0.05$) para determinar cuáles de los tratamientos presentaban diferencias estadísticas significativas. Para el análisis estadístico de los resultados se ha empleado el programa R (R Core Team, 2017) para Windows versión 3.4.

Discusión de resultados

1. ESTABLECIMIENTO

	Hayward		Tomuri
Tratamiento	15% 15'	15% 10'	15% 15'
Tasa de multiplicación	1,84	1,79	1,58
% contaminación	0,03	0	0

Tanto en el lavado con hipoclorito sódico al 15% durante 10 minutos como en el de 15 minutos de duración, se observa que la contaminación de los explantos es prácticamente nula, lo cual es debido al buen tratamiento fitosanitario que la planta recibe en el invernadero. Dado que tampoco se observan plantas muertas en ninguno de los dos casos utilizaremos como tratamiento de desinfección de la planta 15% de hipoclorito de sodio y 10 min de exposición, lo cual nos permite ahorrar tiempo de trabajo y resulta menos agresivo para la planta.

El establecimiento de plantas de *Actinidia deliciosa* se ha realizado con anterioridad con diferentes tipos de explantos (Barbieri y Morini, 1987).

Se han obtenido plantas de *Actinidia deliciosa* a partir de segmentos de tallo de plantas cultivadas en el campo (Leva y Bertocci, 1988), a partir del peciolo de la planta (Revilla y Power, 1988), del tallo del hipocotilo (Uematsu *et al.*, 1991) y de explantos de hoja procedentes de planta crecida *in vitro* (Janssen y Gardner, 1993; Predieri *et al.*, 1988; Rugini *et al.*, 1991).

Los dos tipos de explantos utilizados, nudos y ápices, dan resultados buenos y similares. No obstante, en los ápices se observa una tasa de multiplicación ligeramente mayor, debido a que contienen un mayor número de meristemas preexistentes (datos no mostrados).

2. ENSAYO 1 DE MULTIPLICACIÓN

Los resultados obtenidos en el primer ensayo para la variedad Hayward y Tomuri, se muestran en las Tablas 8 a 11.

Tabla 7. Tasa media de multiplicación de la variedad Hayward en los medios de cultivo correspondientes al Ensayo 1. En negrita se muestran los datos con una diferencia significativa $P < 0.05$ con respecto al valor ref. tomado como referencia.

MEDIO	TASA DE MULTIPLICACIÓN	VALOR DE P
MSA	2.79	ref
MSB	2.78	0.944
WPMA	2.12	0.005
WPMB	2.26	0.013

Discusión de resultados

Tabla 8. *Parámetros fenotípicos de la variedad Hayward en los medios de cultivo correspondientes al Ensayo 1.*

Medio	Aspecto general			Callos		Color de la hoja			Tamaño de la hoja		
	Malo	Aceptable	Bueno	Poco	Mucho	Verde	Verde claro	Clorosis intervenal	Pequeña	Mediana	Grande
MSA	0	0	99	99	0	99	0	0	0	0	99
MSB	0	110	0	110	0	17	24	69	6	57	47
WPMA	0	73	0	0	73	0	73	0	0	73	0
WPMB	0	121	0	0	121	1	68	52	11	100	10

Tabla 9. *Tasa media de multiplicación de la variedad Tomuri en los medios de cultivo correspondientes al Ensayo 1.* En negrita se muestran los datos con una diferencia significativa $P < 0.05$ con respecto al valor ref. tomado como referencia.

MEDIO	TASA DE MULTIPLICACIÓN	VALOR DE P
MSA	2,77	ref
MSB	3,52	0,008
WPMA	3,48	0,074
WPMB	3,26	0,115

Tabla 10. *Parámetros fenotípicos de la variedad Tomuri en los medios de cultivo correspondientes al Ensayo 1.*

Medio	Aspecto general			Callos		Color de la hoja			Tamaño de la hoja		
	Malo	Aceptable	Bueno	Poco	Mucho	Verde	Verde claro	Clorosis intervenal	Pequeña	Mediana	Grande
MSA	0	57	24	81	0	24	0	57	0	7	74
MSB	0	62	12	53	21	12	0	62	0	0	74
WPMA	0	16	9	0	25	9	16	0	0	25	0
WPMB	25	21	7	0	53	21	32	0	53	0	0

Como muestran los resultados (Tabla 7), en el caso de la variedad Hayward, existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los medios con base salina WPM y MS, siendo superior la tasa de multiplicación de los medios MS independientemente de los reguladores de crecimiento empleados, ya que entre MSA y MSB, no existen diferencias significativas. Sin embargo, en la tabla de parámetros fenotípicos (Tabla 8), se observa que el medio MSA tiene una mayor frecuencia de aparición de planta con un aspecto bueno y hojas verdes. Por tanto, será el MSA el medio que se escoge de referencia en el siguiente ensayo aunque no se descarta el MSB por tener unos resultados también muy positivos en cuanto a tasa de multiplicación y la disminución del tamaño de la hoja.

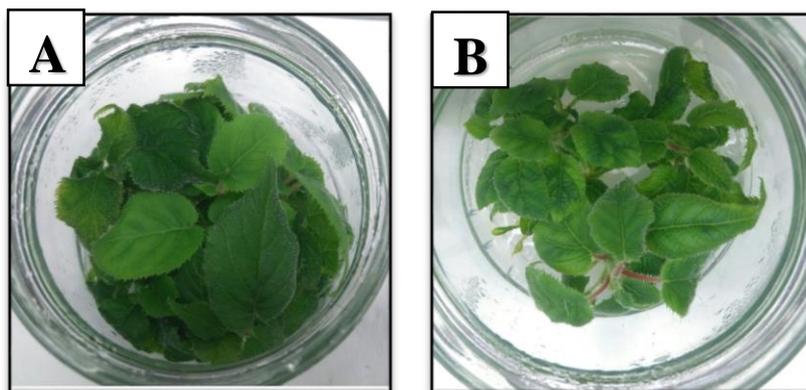


Figura 15. Aspecto general de los medios MS (A) y WPM (B) en la variedad Hayward.

En el caso de la variedad Tomuri, el medio MSB muestra una tasa de multiplicación significativamente mayor a la del MSA (Tabla 9), mientras que los medios WPMA y WPMB a pesar de que muestran unas tasas mayores, las diferencias no alcanzan niveles de significación por tener unos datos más variables.

Desde el punto de vista fenotípico (Tabla 10) no se observan grandes diferencias entre el MSA y el MSB, aunque en el MSB aparece un mayor número de plantas con un aspecto aceptable y en el MSA mayor número de plantas con aspecto bueno. Por tanto, de nuevo se emplearon los dos medios como control en el siguiente ensayo.

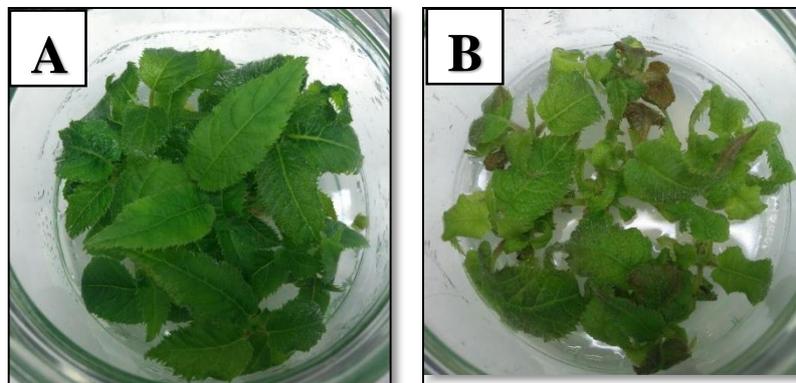


Figura 16. Aspecto general de los medios MS (A) y WPM (B) en la variedad Tomuri.

3. ENSAYO 2 DE MULTIPLICACIÓN

En el primer ensayo, se obtuvieron buenos resultados con las bases salinas MS frente a la WPM. Sin embargo, presentaban pocas plantas lo suficientemente elongadas como para iniciar la fase de enraizamiento. Por otro lado, el tamaño de la hoja es demasiado grande, lo cual entorpece la manipulación de la planta para su repicado. La adición de diferentes concentraciones de AIB (0,05 y 0,5 mg/L) con o sin 0,1 mg/L de GA₃ y con diferentes concentraciones de BA (0,3 y 1 mg/L), dio lugar a los resultados de las Tablas 11 a 14.

Discusión de resultados

Tabla 11. Tasa media de multiplicación de la variedad Hayward en los medios de cultivo correspondientes al Ensayo 2. En negrita se muestran los datos con una diferencia significativa $P < 0.05$ con respecto al valor ref. tomado como referencia.

MEDIO	TASA DE MULTIPLICACIÓN	VALOR DE P
MSA	1,00	Ref
MSB	2,75	<0,01
MSC	12,95	<0,01
MSD	1,00	1,00
MSDG	1,70	0,14
MSE	1,50	0,32
MSEG	2,30	0,01

Tabla 12. Parámetros fenotípicos de la variedad Hayward en los medios de cultivo correspondientes al Ensayo 2.

Medio	Aspecto general			Color de la hoja			Callo			Tamaño de la hoja		
	Malo	Aceptable	Bueno	Verde	Verde claro	Clorosis intervenal	Ausente	Pequeño	Grande	Pequeño	Mediano	Grande
MSA	0	2	10	10	0	0	0	10	0	0	0	10
MSB	0	0	20	20	0	0	0	20	0	0	20	0
MSC	20	0	0	0	20	0	20	0	0	20	0	0
MSD	0	10	0	0	0	10	0	10	0	0	0	10
MSDG	0	0	20	0	0	20	0	20	0	0	0	20
MSE	0	10	0	10	0	0	0	0	10	0	0	10
MSEG	0	0	20	0	20	0	0	20	0	0	20	0

Tabla 13. Tasa media de multiplicación de la variedad Tomuri en los medios de cultivo correspondientes al Ensayo 2. En negrita se muestran los datos con una diferencia significativa $P < 0.05$ con respecto al valor ref. tomado como referencia.

MEDIO	TASA DE MULTIPLICACIÓN	VALOR DE P
MSA	1,40	Ref
MSB	2,25	0,07
MSC	8,95	<0,01
MSD	1,60	0,68
MSDG	1,75	0,41
MSE	1,20	0,67
MSEG	2,20	0,08

Discusión de resultados

Tabla 14. *Parámetros fenotípicos de la variedad Tomuri en los medios de cultivo correspondientes al Ensayo 2.*

Medio	Aspecto general			Color de la hoja			Callo			Tamaño de la hoja		
	Malo	Aceptable	Bueno	Verde	Verde claro	Clorosis intervenal	Ausente	Pequeño	Grande	Pequeño	Mediano	Grande
MSA	0	15	0	0	0	15	0	15		0	15	0
MSB	0	0	20	0	20	0	0	20		0	20	0
MSC	20	0	0	0	20	0	20	0		20	0	0
MSD	0	10	0	10	0	0	0	10		0	0	10
MSDG	0	20	0	20	0	0	0	20		0	0	20
MSE	0	10	0	10	0	0	0	10		0	0	10
MSEG	0	0	20	0	20	0	0	20		0	20	0

En el caso de la variedad Hayward, se observa que el medio de multiplicación con el que se obtiene mejor tasa media de multiplicación (Tabla 11) es el MSC (12,95), sin embargo el fenotipo de la planta es malo, con hojas verde claro y planta etiolada. La siguiente mejor tasa de multiplicación se obtiene en el medio MSB (2,75), en el que, además se obtiene un buen fenotipo (Tabla 12), con hojas verdes y de un tamaño más pequeño que en el caso del MSA, que era uno de los objetivos de este ensayo. Si lo comparamos con el medio MSEG (tasa media de multiplicación de 2,30), observamos que también el tamaño de la hoja es más pequeño aunque da lugar a hojas con un verde menos intenso. Tanto MSB, MSC Y MSEG son significativamente diferentes a MSA, con $P < 0.01$ en el caso del MSB y MSC y con $P = 0.01$ en el caso del MSEG.





Figura 17. Fenotipo de la variedad Hayward en los mejores medios de multiplicación.

En el caso de la variedad Tomuri (Tabla 13), los resultados son similares a Hayward, ya que de nuevo el MSC es el medio con mayor tasa de multiplicación (8.95) pero con peor aspecto. En este caso, tanto el MSB como el MSEG presentan buen aspecto general y unas tasas de multiplicación similares (2,25 y 2,20, respectivamente). Sin embargo, no llegan a ser significativamente diferentes a MSA, con $P=0,07$ en el caso del MSB y $P=0,08$ en el caso del MSEG, muy cercanos ambos al nivel de significación $P=0,05$.

Sería necesario repetir el ensayo con un mayor número de muestra para confirmar los resultados.

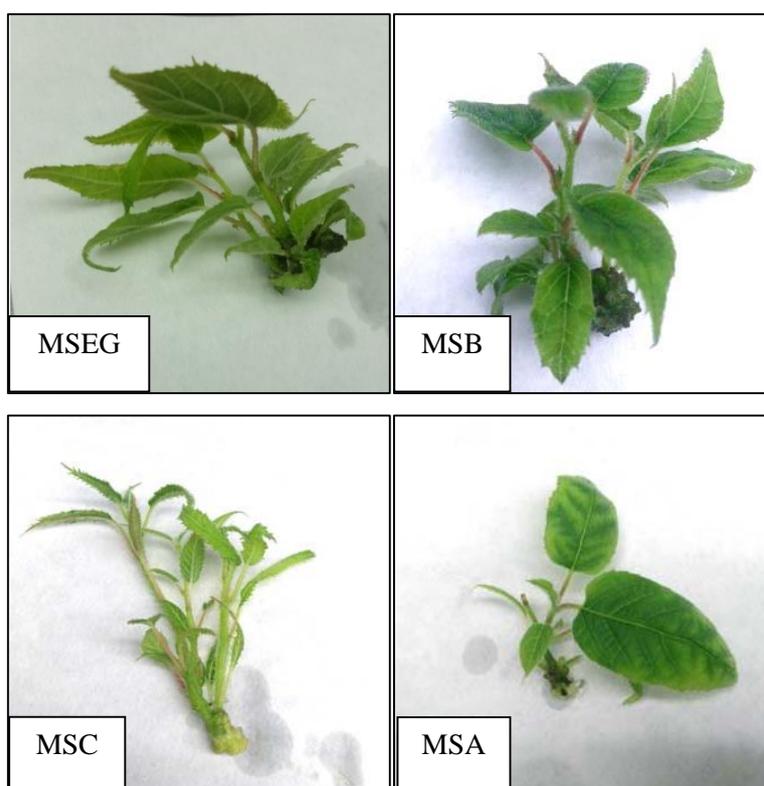


Figura 18. Fenotipo de la variedad Tomuri en los mejores medios de multiplicación

Tabla 15. *Tamaño de la planta de las variedades Hayward y Tomuri.*

MEDIO	Tamaño planta Hayward (cm)	Tamaño planta Tomuri (cm)
MSA	4,87	2.6
MSB	5,05	2.73
MSC	9,37	9.05

El empleo de la citoquinina BA ha resultado ser adecuado para la multiplicación de las dos variedades de kiwi a lo largo de los diferentes subcultivos. La concentración a la que se obtienen mejores resultados es 1 mg/L, lo cual está de acuerdo con Moncaleán *et al.* (2001), aunque no se observa en nuestros cultivos una disminución en el crecimiento de la planta después de sucesivos subcultivos, tal y como Moncaleán describe.

Prado *et al.* (2006), empleó como citoquinina la zeatina para la multiplicación de kiwi. Además de ser la citoquinina más cara que existe, no conseguía elongar las plantas a pesar de cambiarlas a un medio de elongación, ya que se mantenía en el tiempo el efecto de la zeatina en las plantas. Tampoco Barbieri y Morini (1987) consiguieron la elongación de planta de kiwi con AIB. En este trabajo, es indudable la influencia de la adición de la giberelina GA₃ en la elongación de la planta en ambas variedades de kiwi. Si comparamos la elongación media de las plantas en MSB (GA₃ 0,1) con MSC (GA₃ 5) (Tabla 15), se observa que a mayor concentración de GA₃, la planta alcanza mayor longitud y mayor nº de nudos que hacen que la tasa de multiplicación de la planta se dispare. Sin embargo, la presencia de la giberelina a concentraciones elevadas también afecta al fenotipo de la planta, dando lugar a plantas etioladas con aspecto frágil. Por tanto, sería necesario continuar realizando ensayos a otras concentraciones de reguladores de crecimiento hasta dar con una relación elongación-fenotipo adecuada.

Por último, el aumento de la concentración de AIB en el medio de cultivo, en combinación con igual concentración de BA no da lugar a plantas más elongadas y por tanto no mejora la tasa de multiplicación.

4. ENSAYO DE ENRAIZAMIENTO

Aunque existen en la bibliografía algunos artículos donde se recomienda la inmersión basal del tallo de la planta de Kiwi en un medio con auxinas durante un corto período de tiempo (González *et al.*, 1995; Prado *et al.*, 2005), en realidad este método no es demasiado útil a la hora de realizar una reproducción a gran escala de la planta, ya que requiere mucha mano de obra. Por otro lado, se ha comprobado que la planta de kiwi tiene una elevada capacidad de enraizamiento en los diferentes medios de cultivo ensayados, no bajando el porcentaje de

planta con raíz en ningún caso del 68 % (Figura 19). En ningún caso, las plantas han desarrollado raíces en un medio MS sin reguladores de crecimiento.

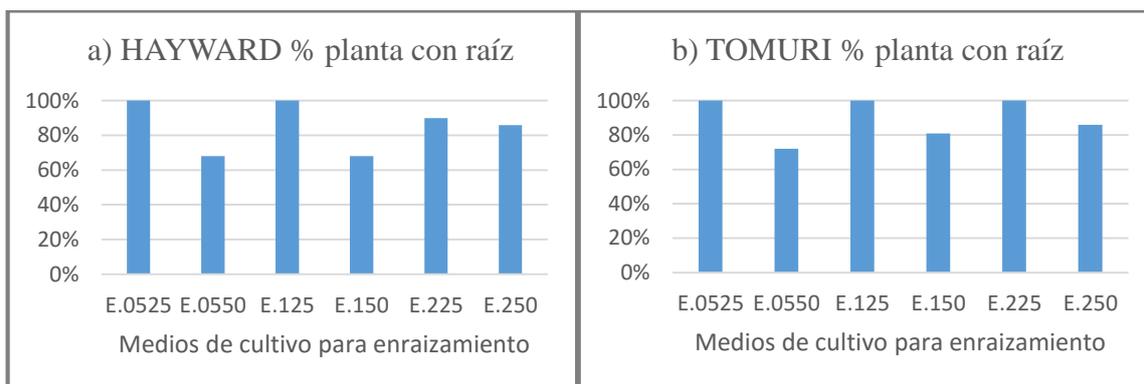


Figura 19. a) Porcentaje de enraizamiento de la variedad Hayward. b) Porcentaje de enraizamiento de la variedad Tomuri.

De los medios comparados para la obtención de raíz tanto para la variedad Hayward como para Tomuri (Tabla 16), se observa que el número de raíces por planta obtenido en los medios que contienen 25 mg/L de carbón activo, es superior al obtenido en los medios de cultivo con 50 mg/L de CA (Figura 20). Esto puede ser debido a que la auxina es adsorbida por el CA (Pan *et al.*, 1988), quedando una menor concentración de la misma a disposición de la planta y por tanto, siendo menos efectiva en la formación de raíces. Por eso, a medida que aumenta la concentración de auxina a igual concentración de carbón activo, el número de raíces por planta también aumenta, a excepción del E.0525 en el caso del Tomuri en el que se obtiene un n° de raíces ligeramente superior que a concentraciones más altas de auxina. Habría que repetir el ensayo con mayor cantidad de muestra para confirmar este resultado.

En cualquier caso, se obtiene un número de raíces por planta elevado a concentraciones de auxina reducidas, en comparación con las empleadas por Debenhan *et al.* 2016 (3 mg/L de AIB).

Tabla 16. Número medio de raíces por planta de las variedades Hayward y Tomuri. En negrita se muestran los datos con una diferencia significativa $P < 0.05$ con respecto al valor ref. tomado como referencia.

Medio de	HAYWARD		TOMURI	
	N° raíces/planta	P	N° raíces/planta	P
E.0525	4,44	ref	9,60	ref
E.0550	1,68	<0,01	1,44	<0,01
E.125	5,40	0,35	7,00	0,04
E.150	2,80	0,01	3,42	<0,01
E.225	6,15	0,07	8,60	0,35
E.250	5,60	0,18	6,13	<0,01

Discusión de resultados

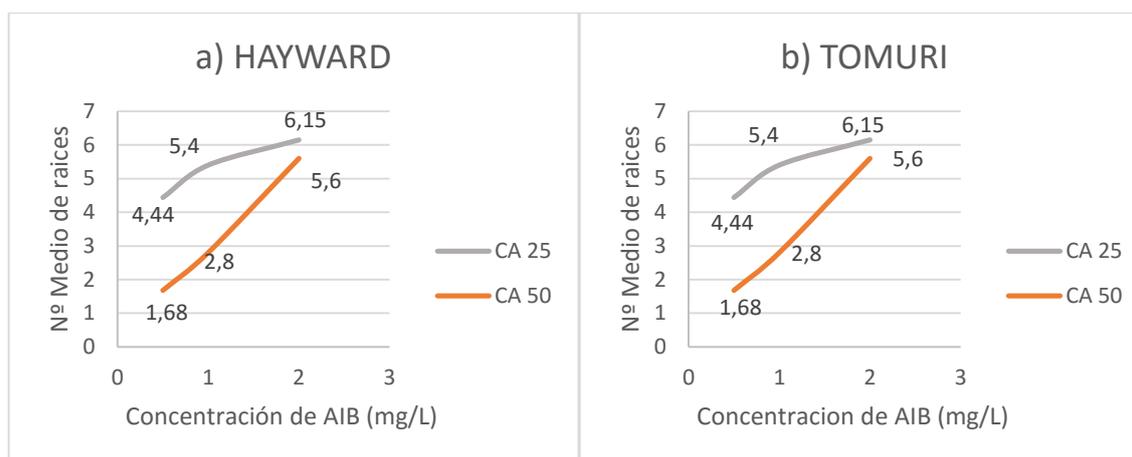


Figura 20. a) Número medio de raíces por planta de la variedad Hayward. b) Número medio de raíces por planta de la variedad Tomuri.

También la longitud media de las raíces obtenidas en las plantas de la variedad Hayward, son mayores en líneas generales en los medios que contienen 25 mg/L de carbón activo, a la obtenida en los medios de cultivo con 50 mg/L de CA (Tabla 17 y Figura 21a), aunque estas diferencias son menores en la variedad Tomuri (Tabla 18 y Figura 21b). Sin embargo, no se observa una diferencia clara con respecto a la concentración de la hormona empleada, pero en todos los casos es un tamaño suficiente para garantizar una adecuada aclimatación de la planta.

Tabla 17. Tamaño medio de la raíz de la variedad Hayward en los medios de enraizamiento

Medio	LONGITUD MEDIA (cm)	desviación típica
E. 0525	3,84	0,76
E. 0550	2,18	2,14
E. 125	3,60	1,30
E. 150	1,87	1,83
E. 225	4,12	1,86
E. 250	3,66	2,36

Tabla 18. Tamaño medio de la raíz de la variedad Tomuri en los medios de enraizamiento.

Medio	LONGITUD MEDIA (cm)	desviación típica
E.0525	6,43	2,54
E.0550	2,12	2,06
E.125	3,40	1,72
E.150	2,16	2,00
E.225	4,97	2,01
E.250	3,21	3,21

Discusión de resultados

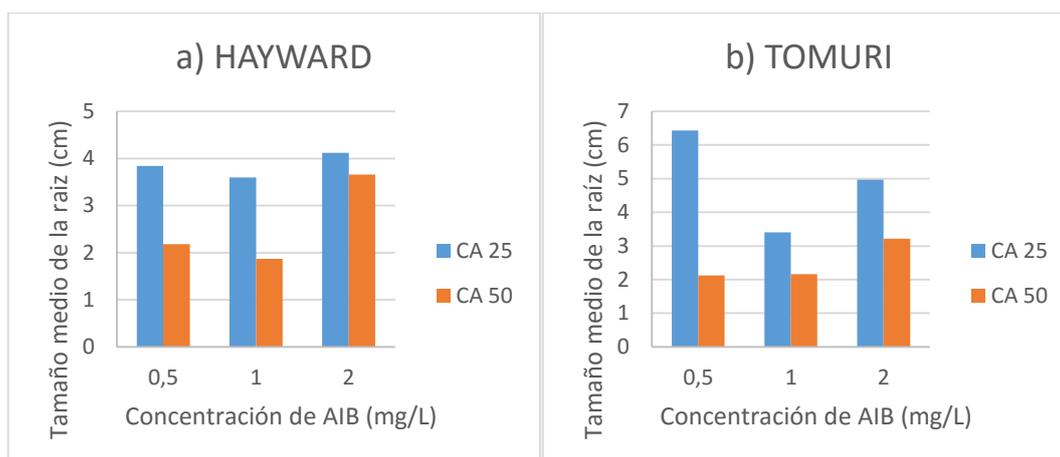


Figura 21. a) *Tamaño medio de la raíz de la variedad Hayward.* b) *Tamaño medio de la raíz de la variedad Tomuri.*

En resumen, en ambas variedades, el medio de enraizamiento que genera mayor número de raíces con diferencias significativas frente a los demás y con una adecuada longitud de sus raíces, es el E.0525. Este medio, además de suponer un menor consumo de reactivos, da lugar a plantas con el fenotipo buscado ya que sus hojas son de color verde y presentan un tamaño pequeño (Tabla 19). En la variedad Tomuri no se puede descartar el medio de enraizamiento E.125, ya que da lugar a un elevado número de raíces (7,00) con diferencias significativas con los demás medios y con un fenotipo similar al del E.0525 (Tabla 20).

Tabla 19. *Aspecto general de la variedad Hayward en los medios de enraizamiento.*

Medio de enraizamiento	Color de la hoja			Tamaño de la hoja		
	Verde	Verde claro	Clorosis intervenal	Pequeña	Mediana	Grande
E.0525	9	0	0	9	0	0
E.0550	25	0	0	0	5	20
E.125	10	0	0	10	0	0
E.150	25	0	0	0	0	25
E.225	15	0	7	0	20	2
E.250	29	0	9	0	16	22

Tabla 20. *Aspecto general de la variedad Tomuri en los medios de enraizamiento.*

Medio de enraizamiento	Color de la hoja			Tamaño de la hoja		
	Verde	Verde claro	Clorosis intervenal	Pequeña	Mediana	Grande
E. 0525	10	0	0	10	0	0
E. 0550	25	0	0	0	0	25
E. 125	10	0	0	10	0	0
E. 150	23	0	10	0	0	33
E. 225	33	1	2	0	3	33
E. 250	50	0	0	0	0	50

Hablando del fenotipo, se puede observar en la variedad Hayward (Tabla 19), en general, todos los medios presentan plantas con hojas de color verde y que existe una tendencia mayor a presentar hojas con clorosis intervenosa en los dos medios con 2 mg/L de AIB. El tamaño de la hoja es más variable según el tipo de concentración empleada tanto de carbón activo como de la auxina. Así, con una baja concentración de auxina (0.5 y 1 mg/L) y 25mg/L de CA el tamaño de la hoja es pequeño, mientras que con el resto de combinaciones el tamaño es mediano o grande, encontrándonos con un mayor número de planta con la hoja grande cuando la concentración de CA es 50 mg/L (Figura 22).



Figura 22. Fenotipo de la variedad Hayward en los mejores medios de enraizamiento.

En el caso de la variedad Tomuri (Tabla 20) también en líneas generales se puede decir que en todos los medios ensayados se obtienen plantas con hojas de color verde, aunque el medio E.150 tiene mayor tendencia a la clorosis intervenosa en las hojas. Al igual que ocurre en la variedad Hayward, a concentraciones bajas de auxina (0.5 y 1 mg/L) y 25 mg/L de CA el tamaño de la hoja es pequeño. En el resto de los medios el tamaño de la hoja es grande, no habiendo apenas presencia de plantas con hojas medianas (Figura 23).



Figura 23. Fenotipo de la variedad Tomuri en los mejores medios de enraizamiento.

5. ACLIMATACIÓN

De la planta que sale a aclimatación más del 90% de la misma permanece viva 1 mes después en ambas variedades. La planta tiene un buen aspecto y las hojas son de color verde (Figura 24). Igual porcentaje obtienen Prado *et al.*, (2006) y González *et al.*, (1995).

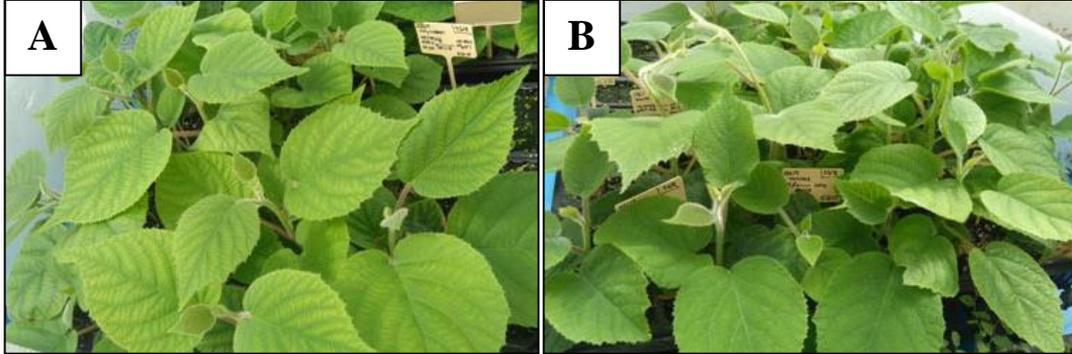


Figura 24. Variedad Hayward (A) y Tomuri (B) en aclimatación.

Conclusiones

CONCLUSIONES

El éxito en el desarrollo del protocolo para el cultivo *in vitro* de una especie depende de múltiples factores, desde el genotipo, el estado fisiológico de la planta madre y el medio de cultivo empleado para su desarrollo, hasta las condiciones ambientales a las que está sometida la planta durante su cultivo. La dificultad en el control de todos los factores involucrados, se ve incrementada cuando se trata de especies leñosas, ya que muchas de ellas se consideran especies recalcitrantes al cultivo *in vitro*.

En el caso de las dos variedades de *Actidinia deliciosa* empleadas en este estudio, ha sido fundamental el establecimiento del cultivo a partir de yemas preexistentes para garantizar la estabilidad genética de sus descendientes. Después de analizar los resultados obtenidos en todos los medios de cultivo ensayados, se puede concluir que son varios los medios de cultivo con los que se obtiene un protocolo válido para su micropropagación, aunque habría que realizar nuevos ensayos para encontrar el método óptimo.

Se ha conseguido la propagación *in vitro* y posterior aclimatación de las variedades de kiwi Hayward y Tomuri. Con el medio de cultivo MSA, se obtiene una micropropagación aceptable, aunque la planta presenta unas hojas excesivamente grandes, que dificultan la manipulación de la planta y un crecimiento escaso. Los medios de cultivo MSB y MSEG son los que han dado mejores resultados en cuanto a tasa de multiplicación y aspecto fenotípico de la planta con unas tasas de multiplicación de 2,75 y 2,30 en Hayward y 2,25 y 2,20 en Tomuri, respectivamente. La presencia en estos medios de la giberelina hace que se obtengan plantas más elongadas y con un tamaño de las hojas más pequeño, que era uno de los objetivos de los ensayos, aunque habría que mejorar la tasa de planta lo suficientemente elongada para iniciar la fase de enraizamiento.

Sin embargo, un aumento de la concentración de AIB no mejoró los resultados de elongación. Tampoco la adición de las vitaminas B5 supuso una mejora en la planta.

El kiwi tiene una elevada capacidad de enraizamiento, no bajando el porcentaje de planta con raíz en ninguno de los medios de cultivo ensayados del 68% y siendo la media de 85% en Hayward y 89 % en Tomuri. El medio de cultivo que se empleará es el E.0525, ya que presenta mayor número de raíces (con diferencia significativa frente a los demás) y mantiene un buen fenotipo en la planta (hojas verdes y pequeñas) siendo además el que contiene una menor concentración de reactivos, haciendo más rentable su empleo. Además, aunque al

Conclusiones

aumentar la concentración de auxina en el medio, aumenta el número de raíces por planta, también se observa una tendencia a la aparición de hojas con clorosis intravenosa.

El aumento de la concentración de carbón activo en el medio de enraizamiento provoca una disminución en el número de raíces por planta a igual concentración de auxina, debido a que parte de la auxina queda adsorbida por el carbón activo, quedando menos disponible para la planta.

Finalmente la planta se ha aclimatado de forma gradual a las condiciones ambientales normales con un porcentaje de supervivencia de un 90%.

El protocolo obtenido es suficientemente válido para iniciar una producción a gran escala de planta de kiwi. Sin embargo todavía se pueden realizar muchas mejoras que lo hagan más eficaz.

A pesar de que se han estudiado dos genotipos diferentes, se pretende obtener un protocolo que sea adecuado para ambos, ya que esto facilita en gran medida su implementación en el laboratorio de micropropagación.

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

- Barbieri, C., Morini, S. (1987). Plant regeneration from Actinidia callus cultures. *J. Hort. Sci.* 62(1), 107-109.
- Cheng, T. Y. (1975). Adventitious bud formation in culture of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). *Plant Sci Let.* 5(2), 97-102.
- Davies, P. J. (1995). The plant hormone concept: concentration, sensitivity and transport. *In Plant hormones.* (pp. 13-38). Springer Netherlands.
- Debenham, M. C., Seelye, J. F., Mullan, A. C. (2014). An in vitro repository for clonal kiwifruit. In XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): 1113 (pp. 93-98).
- Gamborg, O. L., Miller, R., Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp cell res.* 50(1), 151-158.
- García, J. C., García, G., Ciordia, M., (2005). El cultivo del kiwi. España: Serida, pp. 16-49.
- George, E. F. (1993). Plant propagation by tissue culture. Part 1: the technology (No. Ed. 2). Exegetics limited.
- Gonzalez, M.V., Rey, M., Rodríguez, R. (1995). Plant regeneration from petioles of kiwifruit microshoots. *J. Hort Sci.* 30:1302–1303.
- Harada, H. (1975). In vitro organ culture of *Actinidia chinensis* PL as a technique for vegetative multiplication. *J. Hort. Sci.* 50(1), 81-83.
- Janssen, B.J., Gardner, R.C. (1993). The use of transient GUS expression to develop an *Agrobacterium*-mediated gene transfer system for kiwifruit. *Plant Cell Rpt.* 13:28–31.
- Leva, A.R., Bertocci, F. (1988). The effect of sorbitol and mannitol on the morphogenesis of *Actinidia deliciosa* (A. Chev.) Liang and Ferguson callus. *Acta Hort.* 227:447–449.
- Lloyd, G., McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc. Int. Plant. Prop. Soc.* 30, 421-427.
- Mansilla, J.P., Vázquez, R.A., Abelleira, A., SALINERO, M.C. (1988). Problemática fitosanitaria de la Actinidia en Galicia. *Bol. San. Veg. Plagas*, 14(2), 279-293.
- Ministerio de agricultura y pesca, alimentación y medio ambiente. (2016). Datos provisionales de frutales NO cítricos y de frutales secos año 2016. Recuperado el 20 de junio de 2017 de <http://www.mapama.gob.es/>
- Moncaleán, P., Rodríguez, A., Fernandez, B. (2001). In vitro response of *Actinidia deliciosa* explants to different BA incubation periods. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 67:257–266.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(3), 473-497.
- Nasib, A., Ali, K., Khan, S. (2008). An optimized and improved method for the in vitro propagation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) using coconut water. *Pak. J. Bot.* 40(6), 2355-2360.
- Nelder, J.A. Wedderburn, W.M. (1972). Generalized Linear Models. *J. R. Stat. Soc.* Vol. 135, No 3, pp. 370-384.
- Pan, M., Staden, J. (1998). The use of charcoal in in vitro culture. *Plant Growth Regul.* 26: 155.
- Pierik, R.L.M. (1990). Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madrid: Mundi-prensa.
- Prado, M.J., Herrera, M.T., Vázquez, R.A., Romo, S., González, M.V. (2005). Micropropagation of two selected male kiwifruit and analysis of genetic variation with AFLP markers. *J. Hort. Sci.* 40(3), 740-746.
- Prado, M.J., Gonzalez, M.V., Romo, S., Herrera, M.T. (2007). Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 88(1), 1-10.

Bibliografia

- Predieri, S., Mezzetti, B., Ranieri, R. (1988). Rigenerazione “in vitro” da foglie di *Actinidia deliciosa* cv. Hayward. *Rivista Frutticoltura Ortofloricoltura*. 50(11):69–72.
- R Core Team. (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Revilla, M.A., Power, J.B. (1988). Morphogenic potential of long-term callus cultures of *Actinidia*. *J. Hort. Sci.* 63:541–545.
- Roussos, P.A., Archimandriti, A., Beldekou, I. (2016). Improving in vitro multiplication of juvenile European chestnut (*Castanea sativa* Mill) explants by the use of growth retardants. *J. Hort. Sci.* 198, 254-256.
- Rugini, E., Pellegrineschi, A., Mencuccini, M., Mariotti, D. (1991). Increase of rooting ability in the woody species kiwi (*Actinidia deliciosa* A. Chev.) by transformation with *Agrobacterium rhizogenes* rol genes. *Plant. Cell. Rpt.* 10:291–295.
- Salisbury, F., Ross, B. (1994). *Fisiología vegetal*. No. 581.1. Grupo Editorial Iberoamérica.
- Scortichini, M. (1994). Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. *Plant Path.* 43(6), 1035-1038.
- Seelye, J.F., Butcher, S.M. (1991). In vitro response of *Actinidia* leaf and callus tissue to thidiazuron. New Zealand. *J. Hort. Sci.* 19(4), 447-450.
- Segretín, M.E. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología*.
- Takahashi, W., Sugawara, F., Yamamoto, N., Bando, E., Matsushita, J., Tanaka, O. (2004). Plant regeneration in *Actinidia polygama* Miq. by leaf, stem, and petiole culture with zeatin, and from stem-derived calli on low-sucrose medium. *J. For. Res.* 9(1), 85-88.
- Takikawa, Y., Serizawa, S., Ichikawa, T., Tsuyumu, S., Goto, M. (1989). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov. *Jpn. J. of Phytopath.* 55(4), 437-444.
- Uematsu, C., Murase, M., Ichikawa, H., Imamura, J. (1991). *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of kiwifruit. *Plant Cell Rpt.* 10:286–290.