

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Agronomía

**Respuesta a la micropropagación IN VITRO del Olivo
(*Olea europaea* L.) variedad sevillana haciendo
uso del medio Woody Plant Medium (WPM)**

TESIS

Presentada por:

Bach. Bret Gary Luque Zúñiga

Para optar el título profesional de:

INGENIERO AGRÓNOMO

TACNA – PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

TACNA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Agronomía

“Respuesta a la micropropagación in vitro del Olivo (*Olea europaea* L.) variedad sevillana haciendo uso del medio Woody Plant Medium (WPM)”

TESIS SUSTENTADA Y APROBADA EL 28 DE NOVIEMBRE DEL 2016,
SIENDO EL JURADO CALIFICADOR:

PRESIDENTE :


.....
MSc. MAGNO ROBLES TELLO

MIEMBRO :


.....
Dra. NELLY ARÉVALO SOLSOL

MIEMBRO :


.....
Dr. ELOY MARTIN CASILLA GARCÍA

ASESOR :


.....
Dr. OSCAR OCTAVIO FERNANDEZ CUTIRE

DEDICATORIA

Dedicado a mi querida madre, por su constante apoyo, su gran amor y por la confianza que siempre me ha tenido.

AGRADECIMIENTO

A mi familia y amigos que siempre me alentaron a culminar mi tesis para comenzar una nueva etapa en mi vida.

A mis asesores Ph. D. Oscar Fernández Cutire y la Ing. Betty Mamani Huarcaya, por brindarme las facilidades para realizar la experimentación en los ambientes del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, por sus aportes, comentarios y sugerencias las cuales me ayudaron a continuar y culminar mi trabajo de experimentación.

Para culminar un agradecimiento de manera especial a todos mis profesores, compañeros y administrativos quienes me acompañaron durante toda mi formación universitaria de quienes guardo maravillosos recuerdos en la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

INDICE

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO I: EL PROBLEMA..... | 4 |
| 1.1. Planteamiento del problema | 4 |
| 1.1.1. El olivo en Tacna..... | 4 |
| 1.1.2. Problemática | 4 |
| 1.2. Formulación y sistematización del problema | 8 |
| 1.2.1. Formulación del problema..... | 8 |
| 1.2.2. Sistematización del problema | 8 |
| 1.3. Delimitación de la investigación | 9 |
| 1.4. Justificación | 10 |
| 1.5. Limitaciones..... | 14 |
| 1.6. Objetivos..... | 14 |
| 1.6.1. General | 14 |
| 1.6.2. Específico | 15 |
| CAPÍTULO II: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA | 16 |
| 2.1. Conceptos generales y definiciones | 16 |
| 2.1.1. Aspectos generales sobre el cultivo del olivo..... | 16 |
| 2.1.2. Bases celulares de la propagación asexual | 26 |
| 2.1.3. Influencia de la auxina | 27 |
| 2.1.4. Métodos de la propagación del olivo..... | 32 |
| 2.1.5. Enfoques teóricos – técnicos | 36 |

| | | |
|--|--|----|
| 2.1.6. | Material vegetal..... | 57 |
| 2.1.7. | Tratamiento de las yemas uninodales..... | 57 |
| 2.1.8. | Medio de cultivo | 64 |
| 2.1.9. | Medio Woody Plant Medium (WPM) | 66 |
| 2.2. | Antecedentes de estudio | 68 |
| CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES..... | | 73 |
| 3.1. | Hipótesis Generales y Específicas | 73 |
| 3.1.1. | Hipótesis general | 73 |
| 3.1.2. | Hipótesis específicas..... | 73 |
| CAPÍTULO IV: metodología de la investigación | | 76 |
| 4.1. | Tipo de investigación | 76 |
| 4.2. | Población y muestra | 76 |
| 4.3. | Materiales y métodos..... | 76 |
| 4.3.1. | Ubicación del campo experimental | 76 |
| 4.3.2. | Material experimental..... | 77 |
| 4.3.3. | Características de la Variedad utilizada | 77 |
| 4.3.4. | Diseño experimental | 78 |
| 4.3.5. | Análisis estadístico..... | 79 |
| 4.3.6. | Materiales | 79 |
| 4.3.7. | Método | 83 |
| CAPÍTULO V: TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS..... | | 91 |
| 5.1. | Técnicas aplicadas en la recolección de la información . | 91 |

| | | |
|--------|--------------------------------------|-----|
| 5.2. | Resultados..... | 91 |
| 5.2.1. | Número de unidades contaminadas..... | 91 |
| 5.2.2. | Longitud de Brote..... | 93 |
| 5.2.3. | Número de brote | 101 |
| 5.2.4. | Número de yemas..... | 103 |
| 5.3. | Discusión de resultados..... | 107 |
| | CONCLUSIONES | 110 |
| | RECOMENDACIONES..... | 111 |
| | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 112 |
| | ANEXOS | 128 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Gráfico 1: Longitud promedio de brotes por explante..... (cm) a los 15 días, Tacna 2016 | 94 |
| Gráfico 2: Longitud promedio de brotes por explante..... (cm) a los 30 días, Tacna 2016 | 97 |
| Gráfico 3: Longitud promedio de brotes por explante..... (cm) a los 15 días en medio de multiplicación, Tacna 2016 | 100 |
| Gráfico 4: Número promedio de brotes por explante a los 30 días, Tacna 2016 | 102 |
| Gráfico 5: Número promedio de yemas por explante a los 30 días, Tacna 2016 | 105 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | Pág. |
|--|-------------|
| CUADRO 1: Composición del medio de cultivo Woody..... | 84 |
| Plant Medium (1981) | |
| CUADRO 2: Análisis de Varianza de Longitud de Brote a | 93 |
| los 15 días de introducción | |
| CUADRO 3: Prueba de significancia de Tukey de longitud..... | 95 |
| de Brote versus Tratamientos a los 15 días de introducción | |
| CUADRO 4: Análisis de Varianza de Longitud de Brotes a..... | 96 |
| los 30 días de introducción | |
| CUADRO 5: Prueba de significancia de Duncan de..... | 98 |
| Longitud de Brotes a los 30 días de introducción | |
| CUADRO 6: Análisis de Varianza de longitud de brotes a..... | 99 |
| los 15 días en medio de multiplicación | |
| CUADRO 7: Análisis de Varianza de Número de brotes a | 101 |
| los 30 días en medio de introducción | |
| CUADRO 8: Análisis de Varianza de Número de Yemas a..... | 103 |
| los 30 días de introducción | |
| CUADRO 9: Prueba de significancia de Tukey de Número..... | 106 |
| de Yemas a los 30 días de introducción | |

RESUMEN

El olivo ocupa el 41 % del área cultivada de la región Tacna y de los cuales el 96 % es variedad Sevillana, asimismo se viene realizando una propagación vegetativa tradicional.

El presente trabajo de investigación, utilizó yemas uninodales del banco de germoplasma de olivo del IRGAB (EX INPREX) de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

Se empleó el diseño completamente al azar, aplicando concentraciones 0,5 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l, 3 mg/l y 4 mg/l de BAP con 4 repeticiones, se efectuó el ANVA y la prueba de Tukey, dando como mejor resultado 2 mg/l de BAP correspondiente al T3, según prueba de Tukey, posteriormente en la etapa de multiplicación donde no se encontró significancia estadística.

ABSTRACT

The olive tree has 41 % of the cultivated area from Tacna region and of which 96 % is Sevillana variety, also a traditional vegetative propagation has been carried out.

The present study, used uninodal buds of the olive germplasm bank of the IRGAB (EX INPREX) of the National University Jorge Basadre Grohmann.

A completely randomized design was used, applying concentrations of 0.5 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l, 3 mg/l and 4 mg/l BAP with 4 replicates, ANVA and Tukey's test , Giving as best resulting 2 mg/l BAP corresponding to T3, according to Tukey's test, later in the multiplication stage where no statistical significance was found.

INTRODUCCIÓN

La Región de Tacna, en la actualidad tiene 15 940 ha de olivo cultivadas hasta Setiembre del 2015 (DRSAT-DAAT, 2015).

Tacna cuenta con 37 921 hectáreas cultivadas, de las cuales 15 504 (41 %) se destina al olivo y el 98 % de estas, se cultivan en la Irrigación La Yarada. En 2013, de las 15 504 ha cultivadas, 10 987 fueron cosechadas, mientras que la diferencia está en crecimiento. Del total de olivos sembrados, el 96 % pertenece a la variedad Sevillana, mientras que el resto es de Ascolana y otras. (DRSAT-DAAT, 2013).

El olivo es una especie que posee una extraordinaria capacidad de regeneración, esto permite que la mayoría de las variedades cultivadas se multipliquen muy bien por sistemas sencillos de propagación vegetativa. El contenido de este trabajo se encuentra estructurado en cinco capítulos de la siguiente manera:

El capítulo I, está compuesto por el planteamiento y formulación del problema, objetivos (general, específicos), justificación e importancia del problema. Dentro de este capítulo se trata de plantear y formular de

una manera correcta el problema existente, Identificar los objetivos, y demostrar la importancia que tiene el estudio sobre la micropropagación in vitro del olivo con el uso del medio WPM y BAP y las limitaciones del mismo.

El capítulo II, es la fundamentación teórica; el cual contiene los conceptos referidos a orientaciones teóricas y conceptuales del estudio, conceptos básicos, los enfoques teóricos técnicos, se presenta el marco de referencia de la investigación.

El capítulo III, se plantean las hipótesis general, específicas, las variables consideradas en el presente estudio y la operacionalización de variables.

El capítulo IV, corresponde a la metodología de la investigación dentro del cual se manifiestan los métodos técnicas e instrumentos utilizados para la recolección, procesamiento, análisis e interpretación de la información obtenida de las evaluaciones realizadas en el laboratorio.

El capítulo V, es el tratamiento de los resultados incluyendo las técnicas aplicadas en la recolección de la información, Instrumentos de

medición, los resultados de la investigación por medio del experimento realizado en el laboratorio y la discusión de los resultados.

Finalmente las conclusiones de la investigación y al mismo tiempo se dan las recomendaciones respectivas, las referencias bibliográficas y finalmente incluyen los anexos.

CAPÍTULO I:

EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

1.1.1. El olivo en Tacna

Las condiciones climáticas de la región Tacna permiten un excelente desarrollo fenológico del cultivo del olivo brindándole el valor ecológico relacionado a horas del sol y frío indispensables para lograr una buena producción y la obtención de un producto de calidad. Estas condiciones han convertido a Tacna en la primera región productora de aceituna con 11 469 ha, con un rendimiento promedio de 10 058 kilogramos por ha, una producción de 115 351 T registradas en el año 2014 y una exportación de 24 803 T (DRSAT-DAAT, 2014).

1.1.2. Problemática

En la actualidad, el olivo es propagado mediante dos sistemas las cuales son la sexual (obtención de plantones mediante la germinación de

semillas) y la asexual (uso de tejidos vegetativos para propagar plantones).

La propagación sexual se realiza actualmente usando semillas de las variedades como Empeltre, Cornicabra, etc. para la obtención de plantas como portainjerto, las cuales son injertadas con la variedades Sevillana y Ascolana que son las más comerciales, según la oferta de plantones para la renovación de plantaciones y nuevas extensiones agrícolas.

La propagación vegetativa, inicialmente fue muy utilizada mediante el uso de vástagos, óvulos o zuecas. En los últimos años se viene utilizando la técnica del estaquillado semileñoso, utilizando directamente la variedad comercial como planta franca, en otros casos el estaquillado de patrones que después son injertados.

Estos dos sistemas de propagación tienen diferentes problemas, en campo tales como en la propagación sexual existe mucha heterogeneidad en la vigorosidad de la planta, rendimiento, precocidad, resistencia, etc.

Así mismo es importante resaltar que para ambos existe un problema en común que es la fitosanidad, existiendo principalmente el problema de la presencia de virus (hoja de hoz) por la que la oferta de plantones en la región de Tacna no son de calidad.

El problema simple es la presencia de campos con heterogeneidad y problemas sanitarios (virosis) lo cual no se puede eliminar con los sistemas antes señalados.

La propagación vegetativa reproduce fielmente las características de la planta madre, por lo que este método se emplea en la multiplicación de especies, la propagación sexual por su inherente variabilidad de la descendencia no es recomendable.

Sin embargo acarrea problemas, urgentes a resolver los cuales son:

El uso de técnicas tradicionales de propagación implica el uso de demasiado material vegetal, y al proceder de la regeneración de viejos olivares o nuevas plantaciones resulta difícil encontrar la cantidad necesaria a partir de plantaciones existentes.

En los últimos años, una importancia especial se le ha asignado a la propagación por medio de estaquillado herbáceo, sin embargo esta eventual solución aún no ha permitido controlar las enfermedades virósicas que ocasionan una producción de baja calidad.

En los estudios realizados por Chávez (2001), cuando realizó una investigación colaborativa a nivel de campo con el título: “Hacia la identificación y control integrado de hoja de hoz en los cultivos de olivo de Tacna y Arica”, donde los resultados de esta investigación muestra una disminución gradual y significativa del rendimiento comercial del olivo por efecto de esta enfermedad, así mismo los análisis preliminares de ADN de los extractos de las hojas enfermas con síntomas de hoja de hoz muestran que el microorganismo patógeno causante de esta enfermedad sería un VIROIDE transmitido mayormente de planta a planta mediante injertos y podas. Así mismo se da una alternativa de control, que es la utilización de yemas y plántulas generadas dentro de un programa de micropropagación masal aplicando el sistema de cultivo in vitro de tejidos libres de patógenos.

La práctica de la micropropagación in vitro implica un proceso de generación de protocolos o adaptación y adopción de tecnologías, que

permitirán obtener plantas fitosanitariamente sanas, homogéneas y de ser el caso de altos rendimientos, seleccionando una planta madre elite de la cual obtendremos sus características genéticas, con lo cual daríamos solución a la presencia de virus, a los bajos rendimientos y un estado fenológico homogéneo.

1.2. Formulación y sistematización del problema

1.2.1. Formulación del problema

¿Cuál será la cantidad adecuada de BAP para la micropropagación de olivo var. Sevillana bajo condiciones in vitro en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal?

1.2.2. Sistematización del problema

¿Cuánto será el porcentaje de respuesta de las yemas nodales de olivo variedad Sevillana al medio WPM bajo condiciones de Laboratorio de Biotecnología Vegetal?

¿Cuál será la respuesta de las yemas nodales de olivo variedad Sevillana al medio WPM con 5 concentraciones de BAP: 0,5 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l, 3 mg/l y 4 mg/l?

1.3. Delimitación de la investigación

Para delimitar la estructura de la investigación se estima:

- **Espacio geográfico:** el espacio geográfico materia del análisis es el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna, ubicado en el “Fundo Los Pichones”
- **Sujetos de observación:** los sujetos o unidades de observación son el olivo variedad Sevillana.
- **Tiempo:** la información presentada se encuentra referida al lapso de tiempo de la experimentación comprendida entre 16 de octubre del 2013 y 17 de noviembre de 2015.

1.4. Justificación

La investigación se llevó a cabo debido a la creciente demanda por aceituna de mesa para exportación y el incremento de áreas oliveras en la provincia de Tacna, esto nos conlleva a obtener gran cantidad de plantas sanas de olivo, que sean de altos rendimientos, homogéneas en el campo, las cuales puedan ser obtenidas sin maltratar a la planta madre seleccionada.

La obtención de plántulas libre de virus y fitopatógenos podría brindar una oferta de plantones de calidad y certificados.

Es así también que en el área de la investigación se está dejando de lado el método tradicional, cambiando a otros métodos, obteniendo así plántulas libres de enfermedades y virus que constituyen un factor limitante en el proceso de propagación y producción.

Utilización de yemas y plántulas generadas dentro de un programa de micropropagación masal, aplicando el sistema de cultivo in vitro de tejidos libres de patógenos, es una de las sugerencias para poder controlar la hoja de hoz (Chávez, 2003).

1.4.1. Ventajas

Pedroza (2008), indica que el uso extendido de la clonación in vitro en algunas especies ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación; las importantes:

- La multiplicación in vitro es más rápida que la multiplicación in situ.
- Es posible propagar especies in vitro que no pueden ser multiplicadas in situ, debido al fenómeno de rejuvenecimiento que solo es posible realizarlo in vitro.
- Permite multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos.
- Es más fácil transportar el material in vitro de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- La posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la que existen pocos individuos.
- El crecimiento de las plantas propagadas in vitro es frecuentemente más vigoroso que las clonadas in situ. Esto se debe, sobre todo, al rejuvenecimiento y al hecho de que las plantas in vitro se encuentran libres de enfermedades.
- Utilizando el cultivo in vitro es posible, en principio, conseguir una multiplicación libre de enfermedades, bien sea por una rigurosa

selección del material inicial o bien por la liberación de enfermedades del material inicial. También resulta posible el transporte de plantas libres de enfermedades en las condiciones in vitro.

- Teniendo en cuenta que se necesita una cantidad de material relativamente pequeña para iniciar el cultivo in vitro, se puede realizar una cuidadosa selección del material antes de iniciar el cultivo.
- La propagación in vitro puede suponer elevados ahorros en combustibles y espacio de invernadero, entre otros. El área requerida para el cultivo de portainjertos y camas de multiplicación queda disminuida en el caso de cultivo in vitro.
- Debido a la existente de condiciones controladas que permiten una gran precisión en el calendario de la producción de esquejes, se puede eliminar el efecto estacional y conseguir una producción homogénea a lo largo del año.
- Se puede lanzar comercialmente un nuevo cultivar más rápidamente utilizando la multiplicación in vitro.
- El cultivo in vitro es especialmente útil para el establecimiento de banco de genes o germoplasmas in vitro.

1.4.2. Desventajas

Pedroza (2008), indica que, es innegable que en algunas ocasiones la clonación in vitro puede tener desventajas, entre las cuales se encuentran las siguientes:

- En algunos sistemas de propagación in vitro la estabilidad genética es débil.
- Las plantas producidas in vitro pueden mostrar características poco convenientes in situ como la excesiva producción de ramas laterales y paso total a la fase juvenil.
- En el caso de las plantas leñosas la inducción de raíces es frecuentemente difícil. En algunas ocasiones, las raíces formadas in vitro pueden resultar no funcionales y necesitar ser reemplazadas in situ por nuevas raíces adaptadas al suelo.
- La transferencia de las plantas desde el tubo de ensayo al suelo es un proceso muy delicado.
- Cuando las plantas que deben ser cultivadas en el exterior han sido clonadas in vitro y después trasplantadas al suelo, existe el peligro de que el clon muera por la acción de patógenos, tan pronto como surja una nueva cepa de microorganismos a la que la planta no sea inmune.

- Se puede perder la capacidad de regeneración por cultivo de callos o de células en suspensión.
- En algunos casos el aislamiento estéril es extremadamente difícil de realizar.
- El clonado in vitro exige una aportación de mano de obra importante, lo que redonda en precios relativamente altos para las plantas micropropagadas.

1.5. Limitaciones

La principal limitación es la escasa investigación en el área local y la escasa bibliografía referente al tema, asimismo solamente se limitó al uso de cinco concentraciones de BAP utilizando olivo variedad sevillana.

1.6. Objetivos

1.6.1. General

- Evaluar la respuesta a la micropropagación in vitro del olivo (*Olea europaea L.*) variedad Sevillana haciendo uso del medio Woody Plant Medium (WPM).

1.6.2. Específico

- Determinar la concentración adecuada de BAP en la micropropagación in vitro de olivo var. Sevillana.
- Obtener plántulas de olivo (*Olea europaea L.*) var. Sevillana mediante micropropagación in vitro en condiciones de laboratorio.

CAPÍTULO II:

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1. Conceptos generales y definiciones

2.1.1. Aspectos generales sobre el cultivo del olivo

A. Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Sub división: Magnoliophytina

Clase: Magnoliopsida

Orden: Scrophulariales

Familia: Oleaceae

Género: *Olea*

Especie: *Olea europaea* L.

Nombre común: olivo

B. Estructuras vegetativas

B.1. El árbol

El olivo cultivado es un árbol de tamaño mediano, de unos 4 a 8 metros de altura, según la variedad. Puede permanecer vivo y productivo durante cientos de años. El tronco es grueso y la corteza de color gris a verde grisáceo. La copa es redonda, aunque más o menos lobulada; la ramificación natural tiende a producir una copa bastante densa, pero las diversas prácticas de poda sirven para aclararla y permitir la penetración de la luz. Caracteres del árbol como la densidad de la copa, el porte, el color de la madera y la longitud de los entrenudos varían según el cultivar. También la forma del árbol es influida en gran medida por las condiciones agronómicas y ambientales de su crecimiento y, en particular, por el tipo de poda; en este sentido, el olivo demuestra una gran plasticidad morfogénica (Barranco, 1999).

El olivo es un árbol polimórfico, con fases juvenil y adulta. Las diferencias entre estas fases se manifiestan en la capacidad reproductora (solamente en fase adulta), en el potencial para el enraizamiento (mayor en la fase juvenil) y en diferencias morfológicas en hojas y ramos. Las

hojas juveniles son más cortas y gruesas, y los ramos con entrenudos cortos. La transición del estado juvenil al adulto no es solamente temporal, a partir de los 5 – 8 años en árboles que se han originado de semillas, sino también espacial, siendo las zonas más cercanas al suelo las más juveniles. Por ejemplo, las varetas que frecuentemente salen de la base del tronco tienen un estado más juvenil que los ramos que se forman en las partes superiores del árbol (Barranco, 1999).

B.2. Tronco

El tronco del olivo es fácilmente reconocible por su corteza oscura profundamente agrietada, presentando normalmente gruesos cordones y agujeros que a veces llegan hasta el centro del árbol. Esto ocurre en ejemplares de cierta edad, pero en árboles jóvenes, el tronco es mucho más liso, de color más claro de contornos regulares. El aspecto general del árbol va a estar muy ligado al tipo de poda cambiando, por tanto, de unas zonas a otras dependiendo asimismo de la variedad (Barranco & Rallo, 1997).

Según regiones y los países el tronco se desarrolla más o menos a una altura de 2 a 3 metros. En Argelia (región Kabylia), la variedad

Chemlal, el injerto se encuentra a la altura de un hombre. Este método de injerto en altura tiene el objeto de salvaguardar el joven injerto del peligro de los animales. Naturalmente, tal formación de los arboles provoca problemas delicados en la recolección de los frutos. En la actualidad y en las plantaciones nuevas, la tendencia es reducir al mínimo el desarrollo del tronco, cuya altura es de 0,40 a 0,60 m de altura. En España (Andalucía) las viejas plantaciones están constituidas con olivos formados a tres pies. El árbol posee tres troncos distintos, que proceden de la plantación en garrote (Casilla, 2004).

B.3. Ramas

Según Barranco & Rallo (1997), clasifica las ramificaciones en:

Ramificaciones primarias

A partir del tronco, se desarrollan unas gruesas ramificaciones que dan forma general al árbol. Su número varía según el tipo de poda y son muy importantes a la hora de regular la producción, con ramos anticipados que se generan al momento de la poda. Cuando el árbol envejece, estas ramas son podadas, e incluso cortadas, para que el

nacimiento de ramas jóvenes mantenga la vitalidad de las ramificaciones fructíferas y por tanto la producción del olivo.

Ramificaciones secundarias

De las ramificaciones primarias surgen otras que, mediante nuevas divisiones, formarán la copa del árbol, siendo las portadoras de las ramificaciones fructíferas.

Ramificaciones fructíferas

Las flores, y por tanto, los frutos de olivo, no se desarrollan sobre cualquier rama, sino que aparecen en los brotes formados durante el año anterior. Estos brotes suelen tener una longitud aproximada de 50 cm de su número y posición depende la cosecha. Un número demasiado bajo causa una cosecha escasa, mientras que si este es muy alto dará lugar a una gran cantidad de frutos de pequeño tamaño.

Otra clasificación de ramas

Según casilla (2004), las ramas principales son ramificaciones destinadas a formar el armazón del árbol.

Así mismo indica que las ramas principales o ramas madres, nacen en el tronco y es en el momento de la primeras podas de formación (rebajes en vivero, poda de formación), cuando comienzan su crecimiento. La forma del árbol y el desarrollo de su vegetación están en función de la buena elección de estas ramas principales. El número de ellas dependerá del modo en que se forme el olivar, por ejemplo para formarlo en vaso siguiendo el vigor varietal, serán precisas de 3 a 5 ramas principales. Si su número es muy elevado la iluminación de la “copa”, puede ser insuficiente perjudicando el estado sanitario de los árboles.

También indica que las ramas secundarias, se desarrollan sobre las principales, formando sus numerosas ramificaciones se llama “copa” del árbol y llevando ramas de hojas y de frutos.

Menciona que, en las podas severas de rejuvenecimiento o de regeneración se procede al rebaje de estas ramas principales. En las partes rebajadas, se desarrollaran a partir de yemas latentes ocultas bajo la corteza, nuevos brotes capaces de reconstruir una nueva vegetación y producir ramas fructíferas.

B.4. Crecimiento de los brotes

Casilla (2004), indica que, las yemas vegetativas brotan en el olivo al principio de la primavera algo más tarde que las flores. El brote experimenta un fuerte crecimiento hasta mitad de diciembre con un intervalo de temperaturas entre 10 y 30 °C, con temperaturas superiores a 35 °C se cierran los estomas y el proceso de la fotosíntesis se detiene al no haber intercambio gaseoso lo que conduce a una parada del crecimiento. Al final del verano y principio de otoño puede ocurrir un segundo flujo de crecimiento. La disponibilidad de agua, junto con las temperaturas adecuadas, señaladas anteriormente, es necesaria para que el crecimiento se produzca, por lo que en ciertos inviernos se puede producir crecimiento de los brotes.

Asimismo sostiene que en los años de carga los brotes tienen que competir con los frutos por los asimilados. Como los frutos son potentes sumideros de asimilados el crecimiento de los brotes y la cosecha del años siguiente, por tanto, se pueden ver reducidos o anulados. Por otra parte, la falta de nutrientes reduce el crecimiento, para prevenir la falta de crecimiento de brotes, además de otras medidas que puedan reducir la intensidad de la vecería, hay que tener el árbol bien nutrido con la fertilización de años anteriores, hay que asegurar la disponibilidad de agua durante todo el primer flujo de crecimiento y realizar la poda en el invierno previo a la gran cosecha para respetar todas las posiciones fructíferas que se produzcan.

B.5. La hoja

Barranco (1999), indica que, las hojas del olivo son persistentes y normalmente sobreviven dos o tres años, aunque también permanecen en el árbol hojas de mayor edad. Son simples, de forma lanceolada y con bordes enteros. El limbo tiene una longitud entre 3 y 9 cm y una anchura entre 1 – 1,8 cm. La nervadura central es muy marcada y las secundarias muy poco aparentes. El peciolo es muy corto, llegando apenas a medio centímetro de longitud. En cada nudo aparecen dos hojas opuestas y los

planos de las hojas de dos nudos consecutivos se disponen entre sí a 90°. Esta disposición se denomina decusada.

Por el haz, la superficie superior, las hojas son de color verde-oscuro y brillan debido a la presencia de una gruesa cutícula. El envés, la superficie inferior, tiene un color blanco-plateado porque está cubierto por una superficie en forma de disco y forman una capa protectora sobre la superficie de la hoja.

B.6. La raíz

Barranco, (1999) dice que, la morfología del sistema radical del olivo depende por una parte del origen del árbol y por otra de las condiciones del suelo. Cuando el árbol nace de una semilla, se forma una raíz principal, que domina el sistema radical durante los primeros años y sin que ocurra la formación de raíces laterales importantes. La mayoría de los árboles comerciales están producidos mediante enraizamiento de estaquillas. En este caso, se forman en la zona basal de la estaquilla múltiples raíces adventicias. Todas o muchas de estas raíces adventicias se comportan como raíces principales múltiples en el árbol. La profundidad y la extensión lateral del sistema radical y el grado de

ramificación dependen del tipo y profundidad del suelo y de la aireación y contenido de agua del mismo.

Menciona también que, la absorción de agua y nutrientes ocurre en las zonas más jóvenes de las raíces, que son las zonas situadas inmediatamente detrás de los ápices radicales. Estas zonas también son las más susceptibles a infecciones por hongos y nematodos. Las raíces jóvenes tienen un estatus dinámico y se renuevan constantemente. La iniciación de nuevas raíces laterales y la velocidad de crecimiento de ellas y de las raíces ya presentes dependen de las condiciones ambientales. Para un olivo en verano en condiciones de secano, las raíces laterales nuevas, las del último grado de ramificación, tienen una longitud de hasta 10 cm, con la mayoría entre 0 y 2 cm.

Asimismo indica que, las raíces más jóvenes son de color blanco y con el proceso de maduración cambian a color marrón debido a la suberización que ocurre primero en tejidos primarios y después en el desarrollo secundario. Las raíces blancas son las más activas en la absorción de agua y nutrientes minerales. Se ha observado actividad de absorción también en las jóvenes raíces marrones, es decir con un poco de suberización, aunque se sospecha que esta actividad es menor que

en las raíces blancas o de la que ocurre en caso de que estas sean escasas.

2.1.2. Bases celulares de la propagación asexual

Hartmann (1980), indica que, la propagación asexual es posible porque cada una de las células de la planta posee los genes necesarios para el crecimiento y desarrollo de la misma, y durante la división celular que ocurre durante el crecimiento y regeneración (mitosis), los genes están replicados en las células hijas.

La mitosis ocurre en porciones o áreas específicas de la planta para producir el crecimiento. Estas son: el ápice de los tallos, el ápice de las raíces, el cambium y las zonas intercalares. También ocurre la mitosis cuando se forma callo en una parte herida de la planta y cuando se inician nuevos crecimientos en porciones del tallo o de la raíz, La mitosis es el proceso básico del crecimiento vegetativo normal, de la regeneración y de la cicatrización de heridas, que hace posible prácticas tales de propagación vegetativa, como la reproducción por estacas, el injerto, el acodo, la separación y la división.

Pierik (1990), indica que, en 1838 Shwann y Schleiden, lanzaron la teoría denominada de la totipotencia, la cual establece que las células son autosuficientes y que en principio son capaces de regenerar una planta completa. Su teoría fue de hecho el núcleo del que nació el cultivo de tejidos y células.

Dicha capacidad depende de dos características fundamentales de las células vegetales, una es la TOTIPOTENCIA, que significa que cada célula vegetal viviente contiene la información necesaria para reconstituir todas las partes de las plantas y sus funciones; la segunda es la DESDIFERENCIACIÓN, que es la capacidad de las células maduras de volver a una condición meristemática y desarrollar un punto de crecimiento nuevo (Hartmann, 1980).

2.1.3. Influencia de la auxina

La auxina es un factor limitante del enraizamiento también en olivo. Trabajo posteriores a los ya reseñados de Hartmann volvieron a poner de manifiesto que todos los cultivares al tratamiento auxínico externo en forma de ácido indolbutírico, AIB (Nahlawi *et al*, 1975).

Las revisiones de Cimato y Fiorino (1980), recogen este importante dato y explican esta metodología de propagación, que se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

Las dosis de auxinas a utilizar, normalmente AIB aunque se ha intentado otros reguladores de crecimiento, han merecido mucha atención y los resultados son muy variables aunque siempre dentro de una respuesta positiva. No obstante, las dosis más empeladas son las comprendidas entre 2 000 y 5 000 ppm, siendo la de 3 000 ppm la más utilizada (Cimato, 1981).

A. Desarrollo anatómico de raíces y ramas en las estacas

A.1. Estacas de tallo

En plantas leñosas perennes, donde hay una o más capas de xilema y floema secundarios, las raíces adventicias en sus estacas de tallo, por lo común, se originan en el floema secundario joven, aunque también pueden originarse de otros tejidos, tales como los radios vasculares, el cambium o la médula (Hartmann, 1980).

En general, el origen y el desarrollo de las raíces adventicias se efectúan cerca y hacia afuera del cilindro central de tejido vascular. Al salir del tallo, las raíces adventicias ya han desarrollado una cofia y los tejidos usuales de la raíz, así como una conexión vascular completa con el tallo en que se originan.

Las raíces adventicias en los tallos se originan endógenamente; es decir, se originan dentro del tejido del tallo y crecen hacia afuera. El tiempo en el cual se desarrollan iniciales de la raíz, después de haber colocado las estacas en la cama de propagación, varía mucho (Hartmann, 1980).

A.2. Callo

Una vez que se han hecho las estacas y se han colocado en condiciones favorables para el enraíce, se forma un callo en el extremo basal de la estaca. Este es una masa irregular de células parenquimatosas en diversos estados de lignificación (Hartmann, 1980).

Si el explanto aislado sólo existen células diferenciadas, es necesario producir una desdiferenciación, antes de que tenga lugar la

división celular, siendo las células parenquimáticas las que generalmente pueden sufrir este proceso. Si un explanto contiene tejido meristemático en el momento de su aislamiento, este se puede dividir de forma inmediata, sin necesidad de que se produzca una desdiferenciación. La desdiferenciación juega un papel muy importante, ya que permite, a las células maduras de un explanto, de una planta adulta, presentar una redefinición. En este proceso, las células adultas son capaces, de forma temporal, de pasar desde su forma adulta a su forma juvenil (rejuvenecimiento). Este rejuvenecimiento puede tener consecuencias muy importantes: las células son inducidas a dividirse de forma intensiva; las células rejuvenecidas, si se comparan con las células adultas, presentan un mayor crecimiento y potencial de división; las células rejuvenecidas son capaces, en circunstancias especiales, de regenerar órganos y/o embriones (Pierik, 1990).

Existen pruebas de que el pH del medio de enraizamiento puede influir sobre el tipo de callo que se produzca, el cual a su vez puede afectar la emergencia de las raíces adventicias de nueva formación. En estudios donde se usaron estacas de álamo de bálsamo (*Populus balsamifera*), se encontró que con un pH de 6,0 las células de callo eran grandes y algo suaves y las estacas enraizaban con facilidad. Con el

aumento de la alcalinidad, la masa del callo se volvió más pequeña hasta que a pH 11, las células de callo eran pequeñas y estaban dispuestas en forma compacta en una estructura maciza calcárea. Esas estacas no mostraron raíces, aunque al seccionarlas se encontraron debajo del callo iniciales de raíz bien formadas (Hartmann, 1980).

Asimismo indica que, una parte cualquiera de una planta colocada en condiciones favorables, tiende a regenerar los órganos que le faltan. Un corte, un traumatismo de cualquier naturaleza es seguido de un proceso regenerativo del tejido celular. A este punto afluyen ciertos elementos actuantes en tanto mayor cantidad, cuanto más joven sea el órgano lesionado. En el caso de las estacas, cuanto éstas han sido debidamente tratadas, lo primero que se observa es la formación de tejido cicatrizal en la parte basal, que se inicia inmediatamente debajo de la corteza y felógeno. Esta cicatrización, tiene como finalidad inmediata proteger los tejidos adyacentes.

2.1.4. Métodos de la propagación del olivo

A. Propagación por medio de Estaquillado semileñoso bajo nebulización.

En este caso el material son ramillas no reproductivas de corta edad a las cuales se les aplican hormonas de origen auxínico (ácido indol butírico), a una concentración de 3 000 ppm, previo tratamiento con una solución fungicida. Una vez realizados los tratamientos se coloca la base de las estacas a 3 – 4 cm bajo el sustrato en la cama de enraizamiento, donde la densidad de plantación varía de 500 a 1 500 estacas por metro cuadrado. Como ventajas se tiene una menor variabilidad genética y disminución del periodo de juvenilidad, pero presentan inconvenientes como: mayor dificultad de obtención de material, costo de la infraestructura necesaria y hormonas de enraizamiento, limitación de la época (tanto por la recolección del material, como por aspectos climáticos), posible traspaso de enfermedades que pueden no expresarse en las plantas madres en ese momento, pero pueden ser latentes (Guerrero, 1988).

B. Micropropagación in vitro

Consiste en la propagación rápida y masal de plantas a partir de porciones muy pequeñas de estas. Esto es posible de lograr por la alta tasa de multiplicación que presentan algunas especies, las nuevas plantas se desarrollan en un ambiente en donde son controladas las condiciones ambientales y nutricionales (Hartmann, 1995). Por las razones anteriormente señaladas, este método es uno de los más atractivos para la propagación de muchas especies, además resulta muy importante para algunos cultivares de olivo que presentan dificultades para ser propagadas vegetativamente (Seyhan y Ozzambak, 1994).

Es por esto que se ha investigado desde 1968, para obtener, de la manera más eficiente y adecuada, el protocolo de propagación in vitro del olivo. Si bien este sistema presenta muchas ventajas, es posible que se produzcan algunos inconvenientes, como por ejemplo que sus características puedan ser modificadas o inducir rejuvenecimientos, esto puede producirse al desarrollar un alto número de subcultivos y/o cultivos por un largo periodo de tiempo con concentraciones elevadas de citoquininas (Garcia, 1990).

C. Germoplasma In Vitro

Los bancos genéticos existen para proteger la diversidad genética, porque en ocasiones la naturaleza misma implica un obstáculo para la distribución de este germoplasma a los fitomejoradores, todo ello tomando en consideración que algunas especies se propagan vegetativamente mientras que otras, rara vez, producen semillas. La existencia del germoplasma en estos bancos se mantiene el día gracias a la labor de exploradores, quienes llevan a cabo la colección de materiales vegetales que puedan tener algún uso y conservar la fuente de variación genética, que ayude a preservar a las especies económicamente importantes. El cultivo in vitro puede contribuir en un futuro próximo a la conservación de germoplasma ayudando a reducir el espacio del almacenamiento y las operaciones de mantenimiento que requieren algunos cultivos en los bancos de germoplasma. El Panel Internacional para la Preservación de Recursos Genéticos de la FAO (International Board for Plant Genetic Resources, IBPGR) ha recomendado su empleo para la preservación de algunos cultivos.

La utilidad de los bancos de germoplasma depende de la evaluación que se ha hecho a las colecciones y de la documentación que

las acompaña. Asimismo, la posibilidad de acceso a la información y su utilidad determinan el valor de germoplasma conservado. La documentación efectiva y el intercambio libre de información son imprescindibles para relacionar la evaluación y el uso del germoplasma (Chang, 1989; Cruz, 2001; Cruz, 2004).

El descubrimiento de la totipotencialidad de las células vegetales y la posibilidad de desarrollar plantas normales y completas a partir de diferentes explantes ha permitido pensar en el establecimiento de bancos de germoplasma utilizando el cultivo de tejidos vegetales. La conservación de los nudos. El almacenaje in vitro sobrepasa numerosos problemas al garantizar condiciones reducidas de crecimiento del germoplasma. Esto se puede lograr por las siguientes dos vías: a) modificación del medio nutritivo; b) modificación del ambiente físico donde se incuban los cultivos. Las condiciones de luz son reducidas a 2 000 lux y 12 h, mientras que la temperatura se mantiene a 15 ± 2 °C.

Los cultivos se pueden mantener por 18 meses bajo estas condiciones sin transferencia a medios frescos, aunque por seguridad este periodo ha sido reducido a 12 meses (Pedroza, 2008).

2.1.5. Enfoques teóricos – técnicos

A. Reguladores de crecimiento

Los reguladores de las plantas se definen como compuestos orgánicos diferentes de los nutrientes, que en pequeñas cantidades fomentan, inhiben o modifican de alguna otra forma cualquier proceso fisiológico vegetal. Las hormonas de las plantas o fitohormonas, son reguladores producidos por la misma planta que en bajas concentraciones regulan los procesos fisiológicos de aquellas. Por lo común las hormonas se desplazan en el interior de las plantas, de un lugar de producción a un sitio de acción. El término “hormona”, empleado correctamente se aplica exclusivamente a los productos naturales de las plantas; sin embargo, el término “regulador” no se limita a los compuestos sintéticos, sino que puede incluir también hormonas. Dicho término cubre un término muy amplio, puede aplicarse a cualquier material que pueda modificar los procesos fisiológicos de cualquier planta. El término regulador debe usarse en lugar de “hormona”, al referirse a productos químicos agrícolas que se utilicen para controlar cultivos. El término puede definirse aún mejor agregándole el nombre del proceso en que influye: por ejemplo, los *reguladores de crecimiento* (es decir sustancias

de crecimiento), que afecta al desarrollo de las plantas, incluye a las auxinas (Rojas, 1993).

Asimismo, Aguirre (2010) señala que, se entiende por reguladores de crecimiento a las hormonas vegetales, las mismas que son sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se translocan a otro donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo o metabolismo del vegetal. El término “sustancias reguladoras de crecimiento” es más general y abarca a las sustancias, tanto de origen natural como sintetizadas en laboratorio que determinan respuestas a nivel de crecimiento, metabolismo o desarrollo en la planta. Las fitohormonas son las moléculas responsables del desarrollo, aunque no se sabe bien cómo actúan en las células. Se conoce que su mecanismo de acción es por interacción con un receptor específico y que su modo de acción, una vez recibida la señal, es por transducción.

También denomina a nivel activo de una hormona a las formas que desencadenan respuestas. Es necesario un control u homeostasis hormonal, el cual es importante para el control del crecimiento y la defensa ante situaciones eventuales como cerrar constantemente los estomas en sequía.

Para ello existen diversos mecanismos:

- Biosíntesis: Es la fabricación de hormonas para aumentar su concentración.
- Degradación catabólica: Es la eliminación de las hormonas para conseguir el efecto contrario.
- Transporte: Se trata de llevar hormonas de zonas de afloramiento a zonas de déficit o de transportarlas al lugar donde se necesita su acción.
- Conjugación: Es la modificación de hormonas. Sirve como paso inicial en la degradación de éstas, para poder almacenarlas, buscando su mayor eficacia en el transporte o para inactivarlas.
- Compartimentación: Sirve para aumentar o disminuir los niveles hormonales.

B. Clasificación de fitorreguladores

Según Pierik (1990), existen propuestas sobre la clasificación de las hormonas vegetales ya que el desarrollo vegetal se encuentra regulado por la acción de sustancias químicas que activan o reprimen determinados procesos fisiológicos. Existen hormonas vegetales

(fitorreguladores) naturales del crecimiento, se agrupan de la siguiente manera:

- **Promotoras conocidas:**

- a) Auxinas (AIA, AIB, ANA, 2,4-D y 2,4,5-T)
- b) Giberelinas
- c) Citoquininas (zeatina, kinetina y BAP)

- **Promotoras probables:**

- a) Florígeno
- b) Antesina
- c) Acido traumático

- **Inhibidores:**

- a) Acido abscísico
- b) Etileno
- c) Acido Jasmónico
- d) Compuesto fenólico

B.1. Auxinas

Aguirre (2010), indica que las auxinas son las primeras hormonas que se descubrieron. Su estructura es un derivado del fenol o el indol, y tienen anillos aromáticos con dobles enlaces conjugados. Todas las auxinas son ácidos. No se sabe el modo de acción pero éste está relacionado directamente con su estructura, ya que si se modifica pierde su función. Las auxinas pueden ser naturales o sintéticas, las principales son:

- Naturales
 - ✓ Ácido indolacético (AIA).
 - ✓ Conjugados del AIA (glicoproteínas, pequeños péptidos).

- Sintéticas
 - ✓ Derivados Indólicos, Acido Indolbutírico (IBA).
 - ✓ Derivados del naftaleno: α -naftalénacético β -naftalénacético (α NAA, β nNAA).

- ✓ Derivados del fenoxiacético y del ácido benzoico: 2,4 diclorofenoxiacético (2,4,D) y 2,6 diclorofenoxiacético (2,6,D).
- ✓ Acido 4 - amino - 3, 5, 6 - tricloropicolinico (Picloram).

Efectos

Aguirre (2010), explica que, los efectos son:

- Crecimiento: Estimulan la elongación celular en tallo o coleoptilos, incrementan la extensibilidad de la pared celular y estimulan la diferenciación del xilema y el floema.
- Tropismos: Responsables del fototropismo y gravitropismo positivo de las raíces.
- Dominancia apical: La yema apical del tallo inhibe el crecimiento de yemas axilares cercanas.
- Abscisión de órganos: Posee un control genético y las auxinas retrasan la caída, aunque el etileno la induce.

- Rizogénesis: Estimulan la formación de raíces laterales o adventicias. Inhiben la elongación de la raíz principal.

El nombre auxina significa crecer y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación. El ácido indolacético (AIA) es la forma predominante, sin embargo, evidencia reciente sugiere que existen otras auxinas indólicas naturales en plantas. Aunque la auxina se encuentra en toda la planta, las más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas de crecimiento activo. Se le encuentra tanto como molécula libre o en formas conjugadas inactivas. Cuando se encuentran conjugadas, la auxina se encuentra metabólicamente unida a otros compuestos de bajo peso molecular. Este proceso parece ser reversible. La concentración de auxina libre en plantas varía de 1 a 100 mg/kg peso fresco. En contraste, la concentración de auxina conjugada ha sido demostrada en ocasiones que es sustancialmente más elevada. Una característica sorprendente de la auxina es la fuerte polaridad exhibida en su transporte a través de la planta. La auxina es transportada por medio de un mecanismo dependiente de energía, alejándose en forma basipétala desde el punto apical de la planta hacia su base. Este flujo de auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia apical. El movimiento

de la auxina fuera de la lámina foliar hacia la base del peciolo parece también prevenir la abscisión (Aguirre, 2010).

A mediados de la década de 1930 y después, los estudios sobre la fisiología de la acción de la auxina demostraron que esa sustancia intervenía en actividades tan diversas de las plantas como el crecimiento del tallo, la formación de raíces, la inhibición de yemas laterales, la abscisión de las hojas y de los frutos, la activación de las células del cambium y otras. El ácido Indol-3-acético (AIA) fue identificado en 1934 como una sustancia de ocurrencia natural que tenía una considerable acción de auxina y pronto se encontró que fomentaba la formación de raíces adventicias. Esta acción del AIA se demostró primero mediante una prueba biológica en que se empleaban epicótilos ahilados de chícharo, bajo un conjunto de condiciones estándar (Hartmann, 1980).

Subsecuentemente, se probó el ácido indolacético sintético respecto a su actividad para fomentar el crecimiento de raíces en segmentos del tallo, y en 1935, varios investigadores demostraron el empleo práctico de este material para estimular la formación de raíces en estacas. Alrededor del mismo tiempo se demostró que dos materiales similares, los ácidos indolbutírico (AIB) y naftalenacético (ANA) aunque

no ocurrían de manera natural, era aún más efectivos para ese propósito que el ácido indolacético que se presentaba en forma natural. En la actualidad está bien aceptado y subsecuentemente se ha confirmado muchas veces que la auxina, natural o en forma aplicada artificialmente, es un requerimiento para la iniciación de raíces adventicias en los tallos y en efecto, se ha demostrado que la división de las primeras células iniciadoras de la raíz depende de la auxina, ya sea aplicada o endógena. En los tallos, aparentemente la formación de iniciales de raíz depende de las auxinas nativas presentes en la planta, más un sinérgico. Estas sustancias juntas conducen a la síntesis de ácido ribonucleico (ARN) que interviene en la iniciación de los primordios de la raíz (Hartmann, 1980).

B.2. Giberelinas

Aguirre (2010), indica que, las giberelinas son hormonas que proceden de una estructura química, no de una función concreta. Su estructura química deriva del ent-giberelano. Es un grupo de hormonas muy heterogéneo, son de muchas formas aunque pocas con función.

Hay 130 distintas repartidas en distintos reinos y especies.

Todas son ácidos, y se denominan GAX, siendo x un número del 1 al 130 en función del orden de descubrimiento.

Efectos

Asimismo menciona que, los efectos de las giberelinas son:

- Estimular el crecimiento de los tallos e hipocótilos, tienen un papel mayor que las auxinas en plantas con crecimiento de entrenudos. En la reproducción estimulan la floración, sobre todo en aquellas plantas con floración por factores ambientales o floración del día largo como las coníferas. No son universales, en algunas especies puede inhibir la floración (Angiospermas leñosas y frutales). Producen partenocarpia. Tienden a producir plantas masculinas en especies dioicas. Provocan la reversión a fases juveniles de la planta. Pueden suplir los fotoperíodos y los termoperíodos necesarios para el crecimiento.
- La germinación es su principal efecto, casi todas las semillas germinan inducidas por GA. Posibilitan la movilización de reservas en la semilla. Sustituyen requisitos ambientales, el AG3 ha demostrado ser bastante activo.

Las giberelinas son un grupo de sustancias de ocurrencia natural, estrechamente relacionadas entre sí, porque fueron aisladas por primera vez en Japón en 1939 y que se conocen en forma principal, por sus efectos de promover el alargamiento de los tallos. En concentraciones relativamente elevadas, de manera consistente han inhibido la formación de raíces adventicias. Existen pruebas de que esta inhibición es un efecto local directo que impide la división temprana de células que intervienen en la transformación de tejidos de tallo maduros a una condición meristemática. Las giberelinas tienen una función en la regulación de la síntesis de ácido nucleico y proteínas y mediante la interferencia en esos procesos puede suprimir la iniciación de raíces (Hartmann, 1980).

B.3. Citoquininas.

Aguirre (2010), señala que, las citoquininas son un grupo más reducido de hormonas que deben su nombre a su función. En conjunto con las auxinas estimulan la división celular.

Derivan de adeninas y las más frecuentes son:

- Naturales

La zeatina N6 (N6-4 Hidroxi, 3 metil, 2 butiril), posee un doble enlace en el centro de la cadena y tiene isómeros cis y trans que parecen ser formas naturales.

No purínicas como el thidiazuon, (TDZ) y el CPPU N-(2-cloro-4-piridil)-N-fenil úrea. Estos compuestos tienen una actividad histoquímica muy alta y son muy eficientes.

- Sintéticas

La quinetina (KIN), N6 Benzylaminopurina (BAP), N6 benciladenina (BA), N6 dimetil alil aminopurina (2ip).

Efectos

Asimismo se indica que los efectos de las citoquininas son:

- Crecimiento: En conjunto con las auxinas, las citoquininas estimulan la proliferación de células meristemáticas, y también estimulan la expansión de los cotiledones tras el primer haz de luz que reciben.

- Dominancia lateral: Estimulan el crecimiento de yemas laterales inhibiendo la apical.
- Diferenciación y morfogénesis: Provocan cambios en la morfología según el tipo de crecimiento. Junto a las auxinas estimulan la formación de raíces y tallos.
- Senescencia: Son anti-senescentes.

Las citoquininas son hormonas de crecimiento de las plantas que intervienen en el crecimiento y la diferenciación celular. Diversos materiales naturales y sintéticos, como la zeatina, la kinetina y la 6-bencil adenina, tienen actividad de citoquinina. Por lo general, la aplicación de citoquininas sintéticas no ha estimulado o impedido la iniciación de las raíces (Hartmann, 1980).

C. Descripción del método de micropropagación in vitro

C.1. Sistemas de micropropagación

En este proceso se puede utilizar dos tipos de explantes “ápices de brotes” y “trozos de órganos”, siendo los primeros los más utilizados en

micropropagación, ya que la progenie que se obtiene es en general, más homogénea.

Cada especie e incluso cada genotipo de la misma especie, puede presentar diferentes requerimientos en cuanto a condiciones ambientales diferentes, puede presentar gran variación en su respuesta. Es por ello que aun, para muchas especies vegetales, se hace necesario investigar en aspectos básicos de su biología, fisiología y procesos complejos de desarrollo que nos ayudan a comprender su comportamiento bajo condiciones in vitro y nos permitan saber que tejido son las más adecuadas (por tipo o edad), en que momento extraerlos de la planta donadora, por último que condiciones ambientales y nutricionales son más favorables.

Al cultivar un ápice de brote o punta meristemática, este material puede seguir dos vías:

- a) Originar un callo (estado histógeno), que es un tejido desorganizado sin diferenciación, por efecto de la aplicación de una fitohormona (por ejemplo auxina) que incentiva su formación y posteriormente el desarrollo de brotes al ser traspasado a un medio

con citoquinina, sin embargo la formación de callos en todo tejido cultivado puede, a veces, inducir a la formación de anomalías genéticas.

- b) Paso directo de una proliferación de brotes ya preformados dentro del ápice. Esta segunda vía, es la más recomendable, debido a que la progenie es muy homogénea. Se logra mediante la aplicación de citoquininas con o sin auxinas.

Posteriormente los brotes originados pueden dividirse para inducir una nueva proliferación, o bien llevarse directamente a una nueva etapa de elongación en un medio nutritivo complementado con auxinas o a veces con giberelinas.

La formación de raíces se induce generalmente cuando los brotes han adquirido un tamaño de aproximadamente 2 a 3 cm. Puede realizarse directamente en un sustrato o inducir en un medio solidificado con agar, para después desarrollarlas en el sustrato. El primer sistema es el más aconsejable para la gran mayoría de las especies, ya que se forman raíces de mejor calidad y de mayor eficiencia. En ambos sistemas

se utilizan auxinas, generalmente el ácido indolbutírico (AIB) para favorecer y acelerar el proceso.

D. Sistemas para obtener plántulas in vitro

- a) Cuando se cultivan trozos de órganos, lo más corriente es que el explante cultivado, como hojas, peciolo, tallos, produzcan un callo. Es difícil que exista el paso directo de la proliferación de brotes, ya que estos tejidos generalmente crecen de yema axilares preformados como sucede en los ápices.

- b) El cultivo de trozos de órganos se han utilizado menos, ya que como es más frecuente que se forme un callo, hay más riesgo de que la progenie sea heterogénea, con posibles aberraciones cromosomales en algunos casos, sin embargo, también hay ejemplos de estabilidad y homogeneidad a través de este sistema.

- c) Un tercer sistema de obtener plántulas o brotes, consiste en inducir la formación de embriones somáticos. Estos corresponden a embriones desarrollados de células somáticas sin la intervención de gametos (sistema asexual). Es muy útil debido a que la producción

de embriones es masiva y se sospecha que la homogeneidad de la progenie es mayor que a través de la formación de brotes por organogénesis, aun cuando esto no ha sido totalmente comprobado. Otra ventaja es que la raíz viene preformada. Estos embriones, al ser recubiertos con sustancias nutritivas y de protección, pueden transformarse en verdaderas “semillas artificiales” que, aun cuando no se han utilizado comercialmente, se presenta como una alternativa de propagación muy interesante para ciertas especies.

E. Etapas de la propagación in vitro

Usualmente el establecimiento in vitro de una planta, de acuerdo a Murashige (1974), se realiza en tres fases (I, II, III), fases a las que Debergh y Maene (1977) adicionan la fase 0 y a la fase III, la subdividen en a y b. Sin embargo, para George y Sherrington (1984) la fase III b la cambian por la fase IV. De esta manera se considera que el establecimiento in vitro de cultivos está dividida en 5 etapas.

- **ETAPA 0: Selección de material vegetal**

Comprende la selección adecuada del inóculo y el acondicionamiento de la planta madre. Esta fase resulta importante por las características que debe tener la planta que servirá para el establecimiento in vitro (Roca ,1991).

- **ETAPA I: Establecimiento del cultivo**

En esta etapa es condición fundamental emplear tejido fresco y mantenerlo vivo y libre de contaminación (microorganismos) así como considerar tres factores que afectan notablemente los resultados:

- La selección adecuada de los reguladores de crecimiento.
- La fórmula nutrimental se debe ajustar al tipo de inóculo.
- Eliminación del fenómeno de oxidación debido a la presencia de fenoles.

En la fase I, el medio de cultivo debe de permitir que el inóculo sobreviva y se establezca para que posteriormente se inicie el proceso de propagación (Gonzales *et al.*, 1999).

- **ETAPA II: Multiplicación**

Es la etapa de multiplicación de brotes, o multiplicación simplemente.

- **ETAPA III: Enraizamiento**

Corresponde al enraizamiento o etapa de pretrasplante; tiene como objetivo producir una planta autotrófica que pueda sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo.

- **ETAPA IV: Aclimatación**

Una vez que se tiene un número apropiado de plantas producidas in vitro, se adaptan al ambiente natural (Roca, 1991).

F. Cultivo de segmentos nodales

Según Pierik (1990), menciona que con este nombre se conoce el aislamiento de una yema, junto con una porción de tallo, para obtener un vástago a partir de la yema. Este es el método más natural de propagación vegetativa de las plantas in vitro, ya que también puede aplicarse in vivo. Cada una de las yemas que se encuentran en las axilas

de las hojas, idénticas a la del ápice del tallo, pueden ser aisladas sobre un medio nutritivo, intentándose así su desarrollo in vitro, realizándose los repicados cuando son necesarios. Cuando se obtiene un número suficientemente grande de vástagos, estos son enraizados y finalmente se realiza la transferencia al suelo. El aislamiento de yema y ápices del vástago, es una técnica, donde en principio no se añaden citoquininas para evitar la dominancia apical. Cuando se aplica este método se deberían tener en cuenta lo siguientes puntos:

- ✓ El aislamiento por este método es prácticamente imposible cuando se trata de plantas en roseta (como las Bromeliaceas, gerbera, etc.) y cuando las posibilidades de infección son altas. En el caso de plantas en roseta se utiliza el método de los vástagos axilares (apartado Método de las yemas axilares).
- ✓ Para reducir las posibilidades de infección, es mejor aislar yemas cerradas. En el caso de que existan infecciones internas, este método es impracticable, siendo necesario acudir al cultivo de meristemas.
- ✓ La velocidad de propagación depende del número de yemas disponibles; si este número es pequeño la velocidad de multiplicación

resultara lenta. Cuando más hojas se inicien, habrá mayor número de yemas disponibles, y, por lo tanto la propagación será más rápida.

- ✓ La dormición, especialmente en las plantas leñosas de los climas templados, frecuentemente presenta problemas. Para romper la dormición se precisa una buena comprensión de los problemas asociados con la misma o con su ruptura. Como ya se indica el material inicial, por sí mismo juega un importante papel en este sentido (posición, edad, época de año en que se produce el aislamiento, etc.). Los factores físicos son también de gran importancia, por ejemplo la composición del medio nutritivo. Las formas de romper la dormición después del aislamiento in vitro, especialmente en el caso de las plantas leñosas, son: los tratamientos por baja temperatura (0 - 5 °C), día largo (16 horas de luz por día), y baja temperatura seguida por días largos. En algunos casos las giberelinas y/o citoquininas pueden estimular la ruptura de la dormición de las yemas. En muchos casos (especialmente con plantas herbáceas), no se necesita ni frío ni días largos para romper la dormición. La etiolación (causada por la oscuridad la baja irradiación) puede producir la ruptura de la dormición de las yemas.

- ✓ Los vástagos juveniles, especialmente en las plantas leñosas, crecen mucho más rápidamente de los vástagos adultos, que por consiguiente necesitan ser rejuvenecidos.

- ✓ Ciertamente no resulta fácil el enraizamiento de vástagos adultos en las plantas leñosas, recomendándose una rejuvenilización inicial.

2.1.6. Material vegetal

Carter (1997), indica que, se presenta como los de mejor resultado los explantes uninodales, sin hojas, pero con peciolo y con sus yemas axilares intactas. Los ápices meristemáticos, que en otras especies son los más utilizados, no son los más recomendables para el caso del olivo, esto se debe a su dificultad de sobrevivencia por el rápido fenómeno de oxidación que presentan.

2.1.7. Tratamiento de las yemas uninodales

A. Desinfección de explantes

Pierik (1990), indica que, la desinfección del material a utilizar es muy importante en el éxito del cultivo y consistente en la eliminación de

todos los microorganismos que posean las plantas madres (principalmente hongos y bacterias). Entre los aspectos que también aparecen como importantes en la desinfección del material esta la presencia de tricomas peltados y la época en que se extrae el material. La desinfección se realiza por medio de la esterilización de los explantes, esto se puede realizar de una o más formas o bien una complementación de estas. A continuación se presentan diferentes formas de realizar una buena esterilización:

- a) Destrucción física de los microorganismos por medio de aire seco y caliente, vapor o irradiación (luz UV o radiación gamma). La esterilización de los medio de cultivo se realiza por medio autoclave. Este aparato esteriliza por medio de vapor a presión, ya que la exposición de los microorganismos a este ambiente por un cierto tiempo puede destruirlos, pero de igual manera produce la ruptura de ciertas sustancias como sacarosa (produciendo fructosa y glucosa), zeatina, vitaminas B1, B2, ácido pantoténico, vitamina C, antibióticos.

- b) Destrucción química de los microorganismos, utilizados compuestos esterilizantes (óxido de etileno, alcohol, hipoclorito, etc.), o antibióticos. Dentro de las sustancias químicas posibles de utilizar

en la desinfección del material se encuentra el hipoclorito de sodio (NaClO), que se caracteriza por poseer generalmente 10 % de materia activa, ser fácil de adquirir, económico y fácil de manipular, pero puede ser tóxico en el material vegetal a concentraciones superiores al 10 %. Además tiene la desventaja que es prácticamente imposible de eliminar por completo con los enjuagues, produciendo oxidaciones de tejidos vivos en contacto con él. La acción germicida del cloro depende de la concentración del ácido hipocloroso no disociado, del tiempo de contacto, temperatura y pH. La acción sobre los microorganismos no está totalmente clara, pero podría deberse a que esta atraviesa la pared de la célula del microorganismo para luego combinarse con los componentes de la célula, especialmente bloqueando las enzimas. En general, no se debe olvidar que los desinfectantes de superficies vegetales son tóxicos para los vegetales, por lo tanto, se ha de minimizar su concentración lo más posible, también el tiempo de exposición de los tejidos.

- c) Pierik (1990), indica que, se da la eliminación física de los microorganismos por filtración y/o lavado. El lavado del material a utilizar, con agua muy limpia antes de comenzar la esterilización es posible que disminuya drásticamente infecciones.

En el afán de hacer más eficiente la esterilización del material con que se trabajara se puede recurrir a técnicas o productos para disminuir la contaminación como por ejemplo la adición de detergentes (Tween 20) al líquido esterilizante, ya que al disminuir la tensión superficial, permiten un mejor contacto entre el desinfectante y el material a desinfectar (Pierik, 1990).

Diferentes investigadores plantean alternativas para el caso de la desinfección del material vegetal de explante de olivo, e incluso algunos han modificado sus propios métodos con el tiempo. A continuación se presentan los distintos métodos posible de ser utilizados; Rugini y Fontanazza (1981), propone las siguientes alternativas: es posible realizar primero un lavado con etanol (95 %) y luego en hipoclorito de calcio (9 %), por 20 minutos; otra alternativa es una esterilización con hipoclorito de calcio (7 %), para luego enjuagar con agua estéril y como tercera opción es posible desinfectar mediante una solución de 2,5 μM HgCl_2 (677 mg/l) mas 30 gotas de Tween 80 por 3 minutos y enjuagar tres veces en agua destilada.

Mencuccini (1995), indica que, una inmersión en hipoclorito de sodio durante 22 a 24 minutos, luego un lavado en etanol por 10 segundos seguido por un lavado en agua estéril.

Sin embargo, Rugini (1990), sugiere primero un lavado en agua estéril (2 a 3 veces), y luego una inmersión de los explantes en una solución con un 13 % de detergente comercial en base a hipoclorito de sodio (6 %), y 350 mg/l de HgCl_2 mas una gota de Tween 20 por 3 a 5 minutos y luego se enjuaga por cerca de 30 min con agua estéril.

Seyhan y Ozzambak (1994), utilizan una solución blanqueadora (10 %) más Tween por 15 minutos enjuagando 4 veces en agua destilada y los explantes se mantienen por 3 horas en agua estéril antes de sembrar.

Otro investigador, Rama y Pontikis (1990), propone la utilización de la solución de hipoclorito de sodio (10 %), (bajo en bromuro) con 0,01 % de Tween 20 por 10 minutos y luego enjuagar con agua destilada.

No obstante, Cañas (1987), propone para la desinfección de semillas dos minutos en una solución de etanol (70 %), acompañado de solución blanqueador al 20 % (1,2 % de hipoclorito de sodio activo), más

algunas gotas de Tween 20 durante 15 a 20 minutos para luego enjuagar tres veces con agua destilada y posteriormente los explantes quedan en agua estéril.

Una vez que se ha desinfectado el material y se ha procedido a inocularlo en los medio de cultivo, pueden ocurrir varias situaciones:

- ✓ Que la contaminación se manifieste en corto tiempo, esta puede producir por una alta tasa de contaminación externa y que la esterilización no es capaz de eliminar. Asimismo Arévalo (1986), concluyó que la tasa de contaminación esta probablemente relacionada con la tasa de crecimiento, alcanzándose las tasas más altas de contaminación durante los meses más severos del invierno, cuando las plantas crecen lentamente, afectando la supervivencia de los explantes cultivados in vitro.

- ✓ En cambio durante la época de crecimiento, estas respondieron mejor al cultivo in vitro. Para el caso del olivo, Garcia (1990), determinó que desde marzo a octubre (para el hemisferio norte) fue la mejor época, ya que en fecha fuera de este rango el grado de contaminación es elevado.

- ✓ Que la desinfección sea exitosa y el material se encuentra sano.

- ✓ Que el cultivo se encuentra aparentemente estéril, esto significa que no siempre sea sano, ya que si la infección está en los tejidos interiores de la planta (vascular o celular), esta solo se manifestara cuando la zona infecciosa es cortada, es decir en los repiques que se efectúan en el transcurso del cultivo y se pone en contacto con el medio. A esto se le denomina infecciones endógenas y son causadas por microorganismos que están presentes en el interior de las plantas y no pueden ser eliminados por esterilización externa.

Pero la contaminación puede tener su origen no solo en el material vegetal sino que puede estar en el ambiente de trabajo aire, suelo, material de laboratorio (Pierik, 1990).

Una de las soluciones que se presentan frente a las infecciones internas es la adición de antibióticos, pero esta puede interferir de manera negativa en el crecimiento y desarrollo del cultivo, además su uso no es fácil, ya que deben ser aplicadas previa una esterilización por filtrado. En general, se menciona que la utilización de antibióticos no tienen gran

éxito y no resulta práctico en producciones comerciales de plantas in vitro (Pierik, 1990).

2.1.8. Medio de cultivo

Si bien el crecimiento y desarrollo de una planta in vitro estaría determinado fundamentalmente por el factor genético (predeterminado para cada especie), la expresión de estos genes va a estar determinado por las condiciones físicas (luz y temperaturas) y químicas (pH, oxígeno, dióxido de carbono, reguladores de crecimiento y vitaminas principalmente), que se crean in vitro. Esto se debe a que los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de una planta, y si estos no se encuentran a disposición de las plantas esta no puede crecer in vivo ni in vitro, además, es necesario recordar que las plantas in vitro son heterótrofas. Estos factores influyen en la mayoría de los procesos que ocurren en la planta (fotosíntesis, respiración, crecimiento, etc.) (Pierik, 1990).

Desde que se comenzó a investigar acerca del medio de cultivo más adecuado al cultivo in vitro de olivo se han postulado varias alternativas, una de las más aceptadas y que ha presentado las mejores

resultados es el Olive Medium (OM), creado por Rugini en 1984, pero dentro de los aspectos negativos el OM, se encuentra el alto costo de algunos componentes del medio, entre ellos zeatina, es por esto que uno de los aspectos que más se ha investigado son otras alternativas de medio de cultivo. Es importante destacar que las concentraciones de zeatina utilizadas dependerán de la etapa en que se encuentre el cultivo, es así que por ejemplo OM para la etapa de establecimiento se utilizan 0,5 mg/l de zeatina, en cambio en la etapa de proliferación 4 mg/l de zeatina (Rugini, 1984).

Dentro de las citoquininas posibles de ser utilizadas para el cultivo in vitro del olivo se encuentra la zeatina, 2 isopentenil adenina (2ip) y Bencil amino purina (BAP) (Cañas *et al.*, 1987).

Entre otras alternativas que se han investigado (el cual tiene un costo mucho menor que el OM, ya que no contiene zeatina, pero los resultados obtenidos al utilizar este medio, no se asemejan a aquellos obtenidos con OM tanto en número de hojas nuevas y distancia de entrenudos. Paralelamente, otras investigaciones realizadas demuestran que existiría una diferencia entre OM y MS para el crecimiento de algunas variedades de olivo cv. Maurino, en donde se obtuvieron mejores

resultados utilizado como medio de cultivo MS con respecto a OM, en donde los explantes presentaron síntoma de clorosis. Sin embargo, habría que añadir que tanto el MS utilizado como OM fueron suplementados con 4 mg/l de zeatina (Garcia, 1990).

2.1.9. Medio Woody Plant Medium (WPM)

A. Componentes del medio de cultivo

Los cultivadores de inmediato deben reconocer los elementos esenciales que toda la planta requiere y que estos no son suprimidos en el medio de cultivo. Los elementos minerales son muy importantes; por ejemplo, el magnesio (Mg), es parte de la molécula de la clorofila; el calcio (Ca), es un constituyente de la pared celular y el nitrógeno (N) es la parte integrante de aminoácidos, vitaminas, proteínas y de ácidos nucleicos. Similarmente, el hierro (Fe), zinc (Zn) y molibdeno (Mo), forman parte de ciertas enzimas; también, el carbono (C), hidrogeno (H), oxígeno (O) y 12 elementos son conocidos como esenciales para el desarrollo de la planta.

Seis elementos son constituyentes de fertilizantes comunes denominados como macronutrientes, y estas son: nitrógeno (N), fósforo (P), calcio (Ca), potasio (K), magnesio (Mg) y azufre (S); también son considerados dentro de este grupo los iones de sodio (Na) y cloro (Cl), aunque el rol de estos en la planta son poco conocidos porque la célula vegetal tolera altas concentraciones de iones de Na y Cl. Aunque el Na no es un nutriente esencial, se utiliza en fertilizantes para incrementar el rendimiento de algunos cultivos. El cloro en pequeñas cantidades es esencial para el crecimiento de la planta pero estas absorben normalmente muchos más que ellas necesitan, sin ningún efecto. Hay evidencias que manifiestan tener un rol sobre la fotosíntesis y en el mantenimiento de la turgencia celular.

Los micronutrientes, generalmente se usan como sales de iodo (I), hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu), molibdeno (Mo), cobalto (Co).

Los primeros elementos son requeridos comparativamente en mayor cantidad y son, por lo tanto, denominados como elementos mayores o macronutrientes; mientras que los del segundo grupo, son necesarios solo en pequeñas cantidades y se les denomina como

micronutrientes o elementos menores. De acuerdo a las recomendaciones usados por la asociación internacional de fisiología de plantas, los elementos requeridos por la planta en concentraciones mayores que 0,5 mmol/l son referidos como macroelementos y aquellos requeridos en concentraciones menores que 0,5 mmol/l son considerados como importantes para el crecimiento. Esencialmente los 18 elementos son considerados como necesarios para el cultivo de tejidos.

Cuando las sales minerales son disueltas en el agua, ellos sufren la disociación e ionización. El factor activo en el medio son los iones de diversos tipos más que los compuestos. Un tipo de medio MS, el ion NO_3 es contribuido por el NH_4NO_3 , así como el KNO_3 ; y el ion K^+ es contribuido por el KH_2PO_4 . Por lo tanto, es útil la comparación entre las dos fuentes que puede ser hecho con diferentes concentraciones de iones. (Mejia, 1994).

2.2. Antecedentes de estudio

Carter (1997), en su investigación Micropropagación de olivo (*Olea europaea* L.) tuvo como objetivo establecer un protocolo para la propagación in vitro de olivo (*Olea europaea* L.) de las variedades

Sevillano, Ascolano y Empeltre provenientes del invernadero frío del Laboratorio de Micropropagación de la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso. El tratamiento de desinfección a seguir se basó en una primera instancia en la utilización de hipoclorito de sodio en la desinfección de tres tipos de explante (una yema, ápice y uninodal), luego las experiencias se centraron en pruebas de desinfección para explante uninodales de olivo, ya que estos fueron los que presentaron mejores resultados. Junto con esto se realizó un pre acondicionamiento para el material vegetal con que se experimentará encontrándose que la mejor concentración de desinfectante a utilizar es de 2,5% de hipoclorito de sodio. Determinando que el medio de establecimiento para explante uninodales de olivo se basó en el medio diseñado por Rugini (1984), pero se modificaron las concentraciones de zeatina que contenía este medio, obteniéndose como la concentración de zeatina óptima a utilizar 0,5 mg/l.

Alvarado (1997), en su trabajo de investigación respuesta de tres variedades de olivo (*Olea europaea* L.) cv. Sevillana, Ascolana y Empeltre a la micropropagación in vitro, donde concluyó que bajo las condiciones desfavorables del medio ambiente por efecto de la contaminación no pudo obtenerse un resultado favorable a lo que se

esperaba, así mismo cualquier parte vegetativa de la planta puede establecerse en condiciones in vitro encontrando su medio nutritivo adecuado para su desarrollo, también recomienda que se realizar ensayos cuantas veces sea necesario para poder pasar de una etapa a otra, también recomienda adicionar carbón activado para contrarrestar los efectos de oxidación fenólica.

Toledo (1998), en su publicación menciona que el mejoramiento genético olivo (*Olea europaea* L.) es empleado tanto por métodos convencionales y no convencionales. Ambos métodos presentan dificultades debido a su periodo juvenil, su alta heterozigocidad de especies y porque la regeneración in vitro de especies a partir de tejidos o callos aún no se ha alcanzado. Indica también que a partir de discos de hojas y de nervadura central no se regeneran brotes. Así mismo que los peciolos son capaz de regenerar tallos, los peciolos obtenidos a partir del 3re nudo apical tienen mayor chance de ser regenerados ($40\pm 2\%$) que los nudos basales ($5\pm 1\%$) sobre medio OM modificado con $10\ \mu\text{M}$ de 2iP + $2,2\ \mu\text{M}$ BAP.

Haberlandt (1902), realizó los primeros estudios para cultivar tejidos vegetales de plantas superiores en medios artificiales, pues se

había propuesto demostrar la teoría de la “Totipotencia” y estudiar fenómenos fisiológicos y morfogénéticos, pero el medio que utilizó era demasiado simple y no tuvo éxito; sin embargo fue muy valiosa la especulación de la presencia de una fitohormona que llamo “traumatina”, también fue el primero en emplear el concepto de callo, para definir una masa amorfa de células.

Mejia (1994), comenta que los peciolos son capas de regenerar tallos. Los peciolos obtenidos a partir del 3er nudo apical tiene mayor chance de ser regenerado ($40 \pm 2 \%$) que los nudos basales ($5 \pm 1 \%$) sobre medio Olive Medium (OM) modificado con $10 \mu\text{M}$ 2iP + $2,2 \mu\text{M}$ BAP.

Farfan (1983), en su investigación utilizó medios clásicos experimentados como: Murashige & Skoog , Gamborg y 3 hormonas: kinetina, 2,4-D y ANA y tuvo como objetivo determinar los medios nutritivos y actividades de crecimiento óptimos para la obtención de plantas de *Passiflora mollissima*.

Concluyó que para la Curuba los medios probados tuvieron un rango hormonal de 0,1 a 1 mg/l de kinetina, en combinación con 2,4-D (0 a 2 mg/l), los mismos que no ofrecieron resultados significativos.

Mosquera *et al.*, (1993), en su investigación para regeneración in vitro de curuba utilizó explantes obtenidos de plantas madre obtenidas de semilla y mantenidas durante 6 meses en invernadero. Los mejores resultados se lograron al emplear 25 ml de medio de cultivo con una relación 7-5 mg/l de 2,4D-BAP, alcanzando un crecimiento promedio de 21,65 veces respecto del tamaño original del nudo. El crecimiento se estabilizó a los 30 días de incubación, sin presentar rizogénesis ni formación de brotes.

CAPÍTULO III:

HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1. Hipótesis Generales y Específicas

3.1.1. Hipótesis general

H₀: no existe diferencias significativas en la respuesta a la micropropagación in vitro de Olivo (*Olea europaea L.*) var. Sevillana haciendo uso del medio Woody Plant Medium (WPM).

H_a: existe diferencias significativas en la respuesta a la micropropagación in vitro de Olivo (*Olea europaea L.*) var. Sevillana haciendo uso del medio Woody Plant Medium (WPM).

3.1.2. Hipótesis específicas

Al menos uno de los tratamientos aplicados en la micropropagación in vitro de Olivo (*Olea europaea L.*) var. Sevillana haciendo uso del medio Woody Plant Medium (WPM) tendrá una respuesta apropiada para su establecimiento in vitro.

3.1.3. Indicadores y variables

Para cuantificar las variables descritas se recurrió al uso de los indicadores siguientes:

Variable dependiente (Y):

- ✓ Longitud de brote
- ✓ Numero de brotes por explante
- ✓ Numero de yemas

Variable independiente (X): fitorregulador BAP

Tratamientos de investigación

- ✓ T1: 0,5 mg/l
- ✓ T2: 1 mg/l
- ✓ T3: 2 mg/l
- ✓ T4: 3 mg/l
- ✓ T5: 4 mg/l

CAPÍTULO IV:

Metodología de la investigación

4.1. Tipo de investigación

Investigación Experimental

4.2. Población y muestra

La población se consideró a todos los explantes introducidos; por los 5 tratamiento se tuvieron 4 repeticiones por cada tratamiento, de los cuales un tubo representó a la una unidad experimental, cada tubo de ensayo cuenta con una yema uninodal de olivo (*Olea europaea L.*) var. Sevillana.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Ubicación del campo experimental

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (LBV) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann (UNJBG).

El Laboratorio de Biotecnología Vegetal se encuentra ubicado geográficamente a una Latitud sur de 17°59'38"; a una longitud Oeste de 74°14'22"; a una altitud de 550 m.s.n.m. ubicado en el Fundo "Los Pichones" de la UNJBG.

4.3.2. Material experimental

El material vegetal utilizado fue la variedad de olivo: Sevillana.

4.3.3. Características de la Variedad utilizada

Sevillana

Árbol de muy buen desarrollo de ramas caídas a los lados, formando de esta manera un árbol arbustivo. Las ramas fructíferas al igual que las otras variedades están bien cargadas de frutos, la mayor

parte de estos se encuentran en la parte terminal de la rama (Tous, 1993).

Hojas grandes, a nivel de la rama las hojas son abundantes, de color verde botella en el haz y blanco verdoso en el envés, presenta un peciolo regular y muy notorio, fruto alargado. Presenta lenticelas en toda la superficie de la aceituna. Es la variedad más difundida en el departamento de Tacna (Casilla, 2004).

Es un cultivar vigoroso apreciado fundamentalmente por el tamaño de sus frutos que alcanzan un peso medio de 12,5 gramos. Su capacidad de enraizamiento es muy baja por lo que comercialmente se propaga por injerto. Se considera tolerante al frío invernal. Su productividad es variable, pues presenta problemas de cuajado que, a veces, mejoran con una buena polinización. El contenido de aceite de sus frutos es muy bajo. Es resistente al repilo y susceptible a tuberculosis (Barranco, 1980).

4.3.4. Diseño experimental

Para el presente trabajo de investigación, se utilizó el modelo del Diseño Completamente al Azar, cuyo modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = es la variable de salida

μ = es la media global

T_i = es el efecto del i – ésimo tratamiento

ε_{ij} = es el error aleatorio

4.3.5. Análisis estadístico

Para el análisis de los tratamientos en estudio se utilizó la técnica del análisis de varianza, usando la prueba F a un nivel de significación de $\alpha = 0,05$ y $\alpha = 0,01$ para la comparación de medias de los tratamientos (niveles de fitorregulador) entre tratamientos se utilizó la prueba de significación de Tukey a una probabilidad $\alpha = 0,05$.

4.3.6. Materiales

Equipos:

- ✓ Cámara de flujo laminar.

- ✓ Autoclave.
- ✓ Estufa.
- ✓ Destilador.
- ✓ Microondas
- ✓ Balanza analítica.
- ✓ Medidor de pH.

Material de vidrio:

- ✓ Tubos de ensayo de 18 mm, de diámetro.
- ✓ Breakers de: 1000 ml, 500 ml, 250 ml y 50 ml.
- ✓ Fiola de: 500 ml y 250 ml.
- ✓ Probetas de: 100 ml, 50 ml y 25 ml.
- ✓ Pipetas graduadas de: 10 ml, 5 ml, 1 ml y 0,1 ml
- ✓ Placas petri.
- ✓ Matraces 250 ml.

Instrumental:

- ✓ Bisturís N° 10.
- ✓ Porta bisturí de mango largo.

- ✓ Pinzas.
- ✓ Tapas de plástico para tubo de ensayo.
- ✓ Algodón.
- ✓ Parafilm.
- ✓ Pipetas
- ✓ Guantes.
- ✓ Mascarillas.
- ✓ Gorros.
- ✓ Papel kraf
- ✓ Piola.
- ✓ Marcadores.
- ✓ Libreta de apuntes.

Desinfectantes y fungicidas:

- ✓ Alcohol de 96° y de 70°.
- ✓ Hipoclorito de sodio.
- ✓ Benomilo
- ✓ Carboxin

Componentes del medio basal:

- ✓ Sales de Woody Plant Medium (WPM)
- ✓ BAP (Bencilaminopurina)
- ✓ Sucrosa.
- ✓ Mioinositol.
- ✓ Phytigel.
- ✓ Tiamina.
- ✓ Glicina.
- ✓ Ácido nicotínico.
- ✓ Piridoxina
- ✓ Agua destilada.

Otros:

- ✓ Ácido ascórbico.
- ✓ Hidróxido de sodio.
- ✓ Ácido clorhídrico.
- ✓ Agua destilada.
- ✓ Papel esterilizado.

4.3.7. Método

A. Preparación de medio

Se realizó la preparación de medio de cultivo (WPM) el cual se esterilizó en un autoclave, para la preparación del medio de cultivo se utilizó sales químicamente puras al 99,9% que constituyen el medio cultivo según Cuadro 1, para el pesado de dichas formulaciones se utilizó una balanza analítica, realizando el procedimiento descrito según manual de buenas prácticas de laboratorio, estas sales fueron disueltas en agua destilada, disolviendo macro elementos y micro elementos, una vez disuelto en un vaso precipitado se debe enrazar en una fiola para obtener el volumen adecuado de medio de cultivo.

Cuadro 1: Composición del medio de cultivo Woody Plant Medium (1981)

| COMPUESTO | Medio de cultivo (mg/l) |
|---|-------------------------|
| MACROELEMENTOS | |
| NH ₄ NO ₃ | 400,00 |
| Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O | 556,00 |
| CaCl ₂ . 2H ₂ O | 96,00 |
| MgSO ₄ . 7H ₂ O | 370,00 |
| KH ₂ PO ₄ | 170,00 |
| K ₂ SO ₄ | 990,00 |
| MICROELEMENTOS | |
| MnSO ₄ . 4H ₂ O | 22,30 |
| H ₃ BO ₃ | 6,20 |
| ZnSO ₄ . 7H ₂ O | 8,60 |
| Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O | 0,25 |
| CuSO ₄ . 5H ₂ O | 0,25 |
| FeSO ₄ . 7H ₂ O | 27,80 |
| Na ₂ EDTA | 37,30 |
| ORGANICOS | |
| Myo-inositol | 100,00 |
| Glycine | 2,00 |
| Thiamine. HCl | 1,00 |
| Pyridoxin. HCl | 0,50 |
| Nicotinic acid | 0,50 |
| Agar | 6000,00 |
| Sacarosa | 20000,00 |

Fuente: Kyte y Kleyn 1996.

Siendo la única variación de cada tratamiento la concentración de fitohormona disuelta.

B. Corrección del pH

A continuación se procedió a la corrección del pH, para ello se utilizó un pHmetro de bulbo, y con ayuda de NaOH y el HCl podemos regular gota a gota obteniendo un pH de 5,8 el cual nos indica la formulación del medio WPM.

A continuación se procedió a disolver el Phytigel que es un gelificante, seguidamente se procede a llevarlo al microondas o a baño maría para su disolución sin dejar que llegue a hervir, una vez disuelto es vertido en los tubos de ensayo para frutales y tapados con papel aluminio, colocados en el autoclave vertical, se procede a esterilizar.

C. Esterilización

Para la esterilización del medio de cultivo, utilizando autoclave vertical, se controla a 121 °C y 15 libras de presión por unos 20 minutos, obteniendo así un medio de cultivo esterilizado, también podemos esterilizar agua destilada para realizar los lavados dentro de la cámara de flujo horizontal.

Así mismo para esterilizar todos los utensilios de metal y vidrio como bisturí, pinzas placas Petri, matraces se realizó en la estufa de esterilización a 180°C por 2 horas según manual de buenas prácticas de laboratorio.

D. Proceso de desinfección para el material vegetal

Utilizando un protocolo de desinfección para material vegetal utilizado en el laboratorio de biotecnología Vegetal (P1), descrito a continuación:

Fase de desinfección fuera de la cámara de flujo laminar:

- ✓ Limpieza del brote, sin hojas y seccionar en yemas uninodales.
- ✓ Se sumerge el material vegetal en fungicida (Benomil) en una concentración de 0,13 g en 100 ml por un lapso de 15 minutos.
- ✓ Se procede a su enjuague con agua destilada.
- ✓ Se sumerge el material vegetal en alcohol de 70° por 3 segundos.

- ✓ Se procede a su enjuague con agua destilada.
- ✓ Se sumerge el material vegetal en lejía en una concentración del 20% por un lapso de 15 minutos.
- ✓ Se procede a lavar con agua destilada 3 veces.

Fase de desinfección dentro de la cámara de flujo laminar utilizando agua destilada esterilizada, material de vidrio y metal estéril:

- ✓ Se sumerge el material vegetal en alcohol de 70°.
- ✓ Se procede a lavar el excedente de alcohol con agua destilada esterilizada.
- ✓ Se sumerge el material vegetal en lejía en una concentración del 20% por un lapso de 2 – 3 segundos.
- ✓ Se procede a enjuagar con agua destilada esterilizada 3 veces.

La manipulación del material vegetal se realiza con pinzas esterilizadas.

Utilizando un protocolo de desinfección propuestos (P2), descrito a continuación:

Fase de desinfección fuera de la cámara de flujo laminar:

- ✓ Limpieza del brote, sin hojas y seccionar en yemas uninodales.
- ✓ Se sumerge el material vegetal en fungicida (Vitavax) en una concentración de 0,13 g en 100 ml por un lapso de 15 minutos.
- ✓ Se procede a su enjuague con agua destilada.
- ✓ Se sumerge el material vegetal en alcohol de 70° por 4 segundos.
- ✓ Se procede a su enjuague con agua destilada.
- ✓ Se sumerge el material vegetal en lejía en una concentración del 20% por un lapso de 20 minutos.
- ✓ Se procede a lavar con agua destilada 3 veces.

Fase de desinfección dentro de la cámara de flujo laminar utilizando agua destilada esteriliza, material de vidrio y metal estéril:

- ✓ Se sumerge el material vegetal en alcohol de 70°.
- ✓ Se procede a su enjuague con agua destilada esterilizada.

- ✓ Se sumerge el material vegetal en lejía en una concentración del 20% por un lapso de 2 – 3 segundos.
- ✓ Se procede a eliminar el excedente lavando con agua destilada esterilizada 3 veces.

La manipulación del material vegetal se realiza con pinzas esterilizadas.

E. Introducción de la yema uninodal en el medio de cultivo

Cumpliendo con todos los procedimientos del manual de cultivo de tejidos, realizamos cortes de los bordes superiores e inferiores para eliminar la parte dañada del tejido expuesto al protocolo de desinfección.

Seguidamente colocaremos una yema uninodal por tubo de ensayo con mucho cuidado de no hacerla caer y tratando de no introducir las yemas en el medio de cultivo, seguidamente taparemos con el papel aluminio y sellaremos con film adhesivo quedando herméticamente estéril.

A continuación rotulamos y los llevaremos al cuarto del cultivo, donde se encuentra en condiciones mínimas necesarias para su crecimiento.

CAPÍTULO V:

TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

5.1. Técnicas aplicadas en la recolección de la información

En esta investigación, se procedió a obtener toda la información necesaria de cómo se lleva a cabo todos los procesos en la investigación experimental, recolectando la información durante el desarrollo y crecimiento del material experimental.

5.2. Resultados

5.2.1. Número de unidades contaminadas

Se realizó mediante la observación de la presencia de agentes contaminantes en los explantes al tiempo de una semana de la introducción al sistema in vitro.

Después de una semana de haber sido introducido al cultivo in vitro la yema uninodal se presentó 18 casos de contaminación de 100 casos utilizando protocolo propuesto 1 descrito en el punto D. Proceso

de desinfección para el material vegetal), dando un resultado de 18% de contaminación presente en el ensayo.

Así mismo se utilizó un protocolo utilizado en laboratorio (P2 descrito en el punto D. Proceso de desinfección para el material vegetal), el cual se evaluó a la semana de haber sido introducido, presentándose 16 casos de contaminación de 30 casos, resultando un 53% de contaminación.

Culminado los ensayos de desinfección se recomienda la utilización del protocolo propuesto (P1) dado que se presenta menos casos de contaminación para el medio WPM utilizando la *Olea europaea* L. variedad Sevillana.

5.2.2. Longitud de brote

Cuadro 2. Análisis de Varianza de Longitud de Brote a los 15 días de introducción.

| F.V. | GL | SC | CM | Valor F | F α 0,05 | F α 0,01 |
|-------------|----|---------|----------|---------|--------------------|--------------------|
| TRATAMIENTO | 04 | 0,02781 | 0,006953 | 3,48* | 3,06 | 4,89 |
| Error | 15 | 0,02997 | 0,001998 | | | |
| Total | 19 | 0,05778 | | | | |

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro, de Análisis de Varianza de longitud de brote a los 15 días de realizada la introducción señala que se encuentran diferencias estadísticas con un nivel de confianza del 95%.

También nos señala que el valor P es menor que 0,05 entonces quiere decir que si hay significancia estadística, y por lo menos uno o más tratamientos son significativos con respecto a otros valores.

Utilizando los grados de libertad de tratamiento 4 y de error 15, graficamos dándonos la Fcal 3,056.

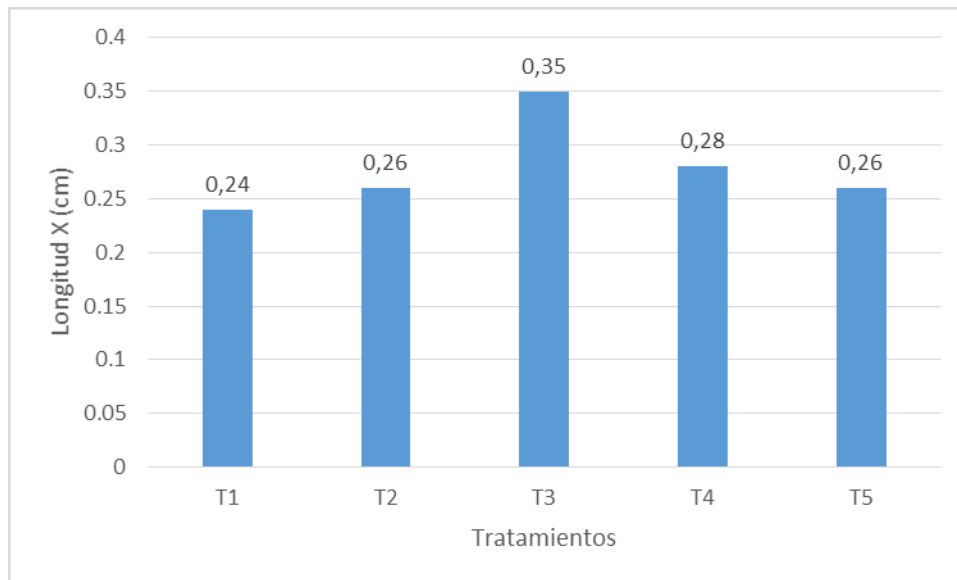


Gráfico 1: Longitud promedio de brotes por explante (cm) a los 15 días, Tacna 2016.

Fuente: Elaboración propia

Viendo la tabla valores crítico de la distribución F observamos que F_{Tabulada} es 3,06 similar al dado por el paquete estadístico 3,056, entonces comparamos:

$$F_{\text{tabulada}} = 3,06 \text{ y } F_{\text{calculada}} = 3,48$$

Entonces decimos: si la F_{cal} es mayor que la F_{tab} entonces si existen significancia estadística con respecto a los tratamientos. Ya que la F_{cal} se encuentra en la región de rechazo de la Hipótesis nula.

Cuadro 3. Prueba de significancia de Tukey de longitud de Brote a los 15 días de introducción.

| OM | Tratamientos | Promedio | Significancia |
|----|--------------|----------|---------------|
| 1 | T3 | 0,3462 | A |
| 2 | T4 | 0,2788 | A B |
| 3 | T5 | 0,2635 | A B |
| 4 | T2 | 0,2575 | A B |
| 5 | T1 | 0,2371 | B |

Fuente: Elaboración propia

Como se encontró que existen diferencias significativas al 5%, agrupando la información y utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%, y obteniendo un CV de 16,15% procedemos a realizar la prueba de Tukey.

Donde las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

El T3 es el que mostro mayor diferencia significativa con respecto al T1, pues presenta menor promedio el crecimiento del brote.

CUADRO 4. Análisis de Varianza de Longitud de Brotes a los 30 días de introducción.

| F.V. | GL | SC | CM | Valor F | F α |
|-------------|----|---------|----------|---------|------------|
| | | | | 0,05 | 0,01 |
| TRATAMIENTO | 4 | 0,03571 | 0,008928 | 4,41 * | 3,06 |
| Error | 15 | 0,03036 | 0,002024 | | 4,89 |
| Total | 19 | 0,06607 | | | |

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro, de Análisis de Varianza de longitud de brote a los 30 días de realizada la introducción señala que se encuentran diferencias estadísticas con un nivel de confianza del 95%.

También nos señala que el valor p es menor que 0,05 entonces quiere decir que si hay significancia estadística, y por lo menos uno o más tratamientos son significativos con respecto a otros valores.

Utilizando los grados de libertad de tratamiento 4 y de error 15, graficamos dándonos la Fcal 3,056

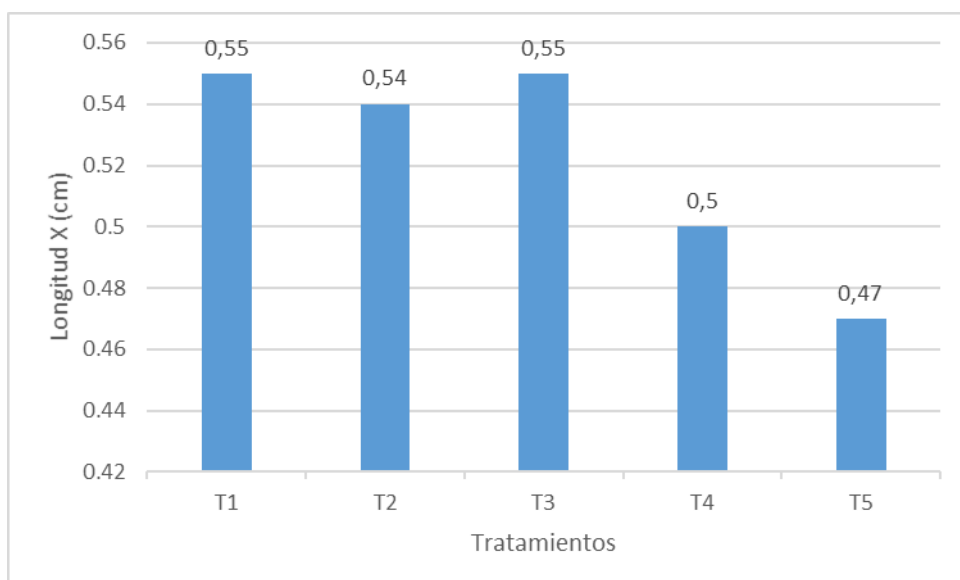


Gráfico 2: Longitud promedio de brotes por explante (cm) a los 30 días, Tacna 2016.

Fuente: Elaboración propia

Viendo la tabla valores crítico de la distribución F observamos que F_{Tabulada} es 3,06 similar al dado por el paquete estadístico 3,056, comparamos:

$$F_{\text{tabulada}} = 3,06 \text{ y } F_{\text{calculada}} = 4,41$$

Entonces decimos: si la F_{cal} es mayor que la F_{tab} entonces si existen significancia estadística con respecto a los tratamientos. Ya que la F_{cal} se encuentra en la región de rechazo de la Hipótesis nula con un nivel de significancia al 5%.

Obteniendo un CV de 10,67% procedemos a realizar la prueba de Duncan para realizar la recomendación correspondiente en cuanto a longitud de brote a los 30 días.

CUADRO 5. Prueba de significancia de Duncan de Longitud de Brotes a los 30 días de introducción.

| OM | Tratamiento | Promedio | Significancia 0,05 |
|----|-------------|----------|--------------------|
| 1 | T3 | 0,47 | A |
| 2 | T2 | 0,45 | A B |
| 3 | T1 | 0,44 | A B |
| 4 | T4 | 0,38 | B C |
| 5 | T5 | 0,36 | C |

Fuente: Elaboración propia

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

El T3 es el que mostró mayor diferencia significativa ya que presenta una media de 0,47 cm a diferencia de 0,36 cm que presenta el T5.

CUADRO 6. Análisis de Varianza de longitud de brotes a los 15 días en medio de multiplicación.

| F.V. | GL | SC | CM | Valor F | F α |
|-------------|----|--------|---------|---------|------------|
| | | | | 0,05 | 0,01 |
| TRATAMIENTO | 4 | 0,2449 | 0,06123 | 2,45 NS | 3,06 |
| Error | 15 | 0,3742 | 0,02495 | | 4,89 |
| Total | 19 | 0,6191 | | | |

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro, de Análisis de Varianza de N° de Yemas a los 15 días en el medio de multiplicación señala que se encuentran diferencias estadísticas con un nivel de confianza del 95%.

También nos señala que el valor p es mayor que 0,05 entonces quiere decir que no hay significancia estadística entre los tratamientos.

Utilizando los grados de libertad de tratamiento 4 y de error 15, graficamos dándonos la Fcal 3,056

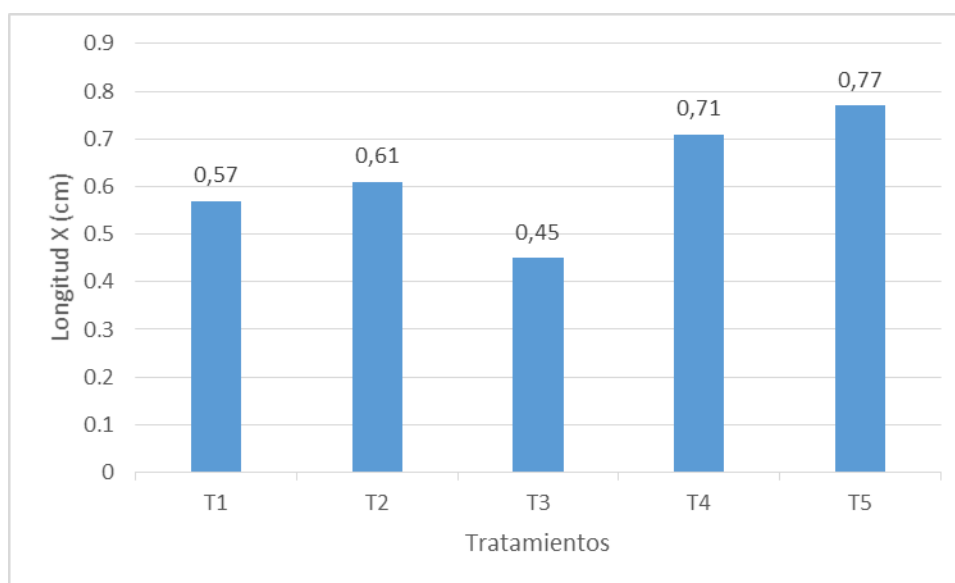


Gráfico 3: Longitud promedio de brotes por explante (cm) a los 15 días en medio de multiplicación, Tacna 2016.

Fuente: Elaboración propia

Viendo la tabla valores crítico de la distribución F observamos que F_{Tabulada} es 3,06 similar al dado por el paquete estadístico 3,056, comparamos:

$$F_{\text{tabulada}} = 3,06 \text{ y } F_{\text{calculada}} = 2,45$$

Entonces decimos: si la F_{cal} es menor que la F_{tab} entonces no existen significancia estadística con respecto a los tratamientos. Ya que la F_{cal} se encuentra en la región de aprobación de la Hipótesis nula.

5.2.3. Número de brote

CUADRO 7. Análisis de Varianza de Número de brotes a los 30 días en medio de introducción.

| F.V. | GL | SC | CM | Valor F | F α | |
|-------------|----|--------|--------|---------|------------|------|
| | | | | | 0,05 | 0,01 |
| TRATAMIENTO | 4 | 0,8250 | 0,2062 | 0,90NS | 3,06 | 4,89 |
| Error | 15 | 3,4306 | 0,2287 | | | |
| Total | 19 | 4,2556 | | | | |

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro, de Análisis de Varianza de Número de Brote a los 30 días de realizada la introducción señala que el valor p es mayor que 0,05 entonces quiere decir que no hay significancia estadística, y que en cuanto al número de brotes no habido influenciado según los tratamientos.

Utilizando los grados de libertad de tratamiento 4 y de error 15, graficamos dándonos la Fcal 3,056

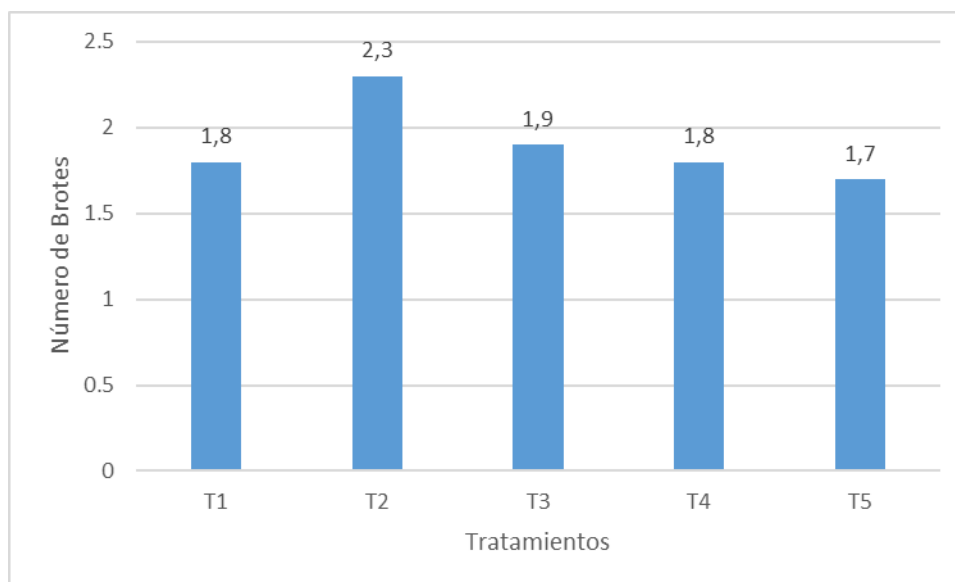


Gráfico 4: Número promedio de brotes por explante a los 30 días, Tacna 2016.

Fuente: Elaboración propia

Viendo la tabla valores crítico de la distribución F observamos que F_{Tabulada} es 3,06 similar al dado por el paquete estadístico 3,056, comparamos:

$$F_{\text{tabulada}} = 3,06 \text{ y } F_{\text{calculada}} = 0,90$$

Entonces decimos: si la F_{cal} es menor que la F_{tab} entonces no existe significancia estadística con respecto a los tratamientos. Ya que la F_{cal} se encuentra en la región de aceptación de la Hipótesis nula.

5.2.4. Numero de yemas

CUADRO 8. Análisis de Varianza de Número de Yemas a los 30 días de introducción.

| F.V. | GL | SC | CM | Valor F | F α | |
|-------------|----|--------|--------|---------|------------|------|
| | | | | | 0,05 | 0,01 |
| TRATAMIENTO | 4 | 11,7 | 2,9250 | 7,98** | 3,06 | 4,89 |
| Error | 15 | 5,5 | 0,3667 | | | |
| Total | 19 | 17,200 | | | | |

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro, de Análisis de Varianza de N° de Yemas a los 30 días de realizada la introducción señala que se encuentran diferencias estadísticas con un nivel de confianza del 95%.

También nos señala que el valor p es menor que 0,05 entonces quiere decir que si hay significancia estadística, y por lo menos uno o más tratamientos son significativos con respecto a otros valores.

Utilizando los grados de libertad de tratamiento 4 y de error 15, graficamos dándonos la F_{cal} 3,056

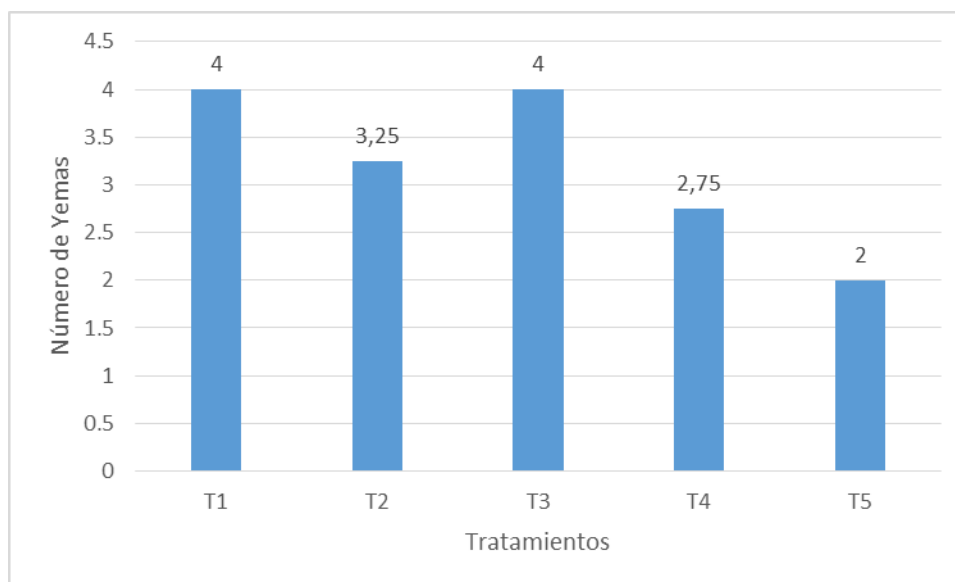


Gráfico 5: Número promedio de yemas por explante a los 30 días, Tacna 2016.

Fuente: Elaboración propia

Viendo la tabla valores crítico de la distribución F observamos que F_{Tabulada} es 3,06 similar al dado por el paquete estadístico 3,056, comparamos:

$$F_{\text{tabulada}} = 3,06 \text{ y } F_{\text{calculada}} = 7,98$$

Entonces decimos: si la F_{cal} es mayor que la F_{tab} entonces si existen significancia estadística con respecto a los tratamientos. Ya que la F_{cal} se encuentra en la región de rechazo de la Hipótesis nula.

CUADRO 9. Prueba de significancia de Tukey de Número de Yemas a los 30 días de introducción.

| Tratamientos | N | Media | Agrupación |
|--------------|---|-------|------------|
| T3 | 4 | 4 | A |
| T1 | 4 | 4 | A |
| T2 | 4 | 3,25 | A B |
| T4 | 4 | 2,75 | B |
| T5 | 4 | 2,00 | B |

Fuente: Elaboración propia

Agrupando información con un nivel de confianza de 95%, y obteniendo un CV de 18,92% procedemos a realizar la prueba de Duncan.

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

El T3 y T1 mostraron mayor diferencia significativa ya que presenta una media de 4 und a diferencia de 2 und que presenta el T5.

5.3. Discusión de resultados

Carter (1997), en su investigación Micropropagación de olivo (*Olea europaea* L.) haciendo uso del medio Olive Medium, tuvo mejor respuesta las yemas uninodales de olivo, esto fue corroborado con la presente investigación ya que la respuesta de las yemas uninodales al medio WPM fue optimo, obteniéndose como una longitud promedio de brotes 0,47 cm.

Junto con esto se realizó un pre acondicionamiento para el material vegetal con que se experimentará encontrándose que la mejor concentración de desinfectante a utilizar es de 2,5 % de hipoclorito de sodio, esta información también fue comparada con el protocolo de desinfección de la presente investigación donde se utilizó una concentración de 20 % de hipoclorito de sodio donde se obtuvo como resultado un 47 % de libre contaminación de tejido vegetal.

Determinando que el medio de establecimiento para explante uninodales de olivo se basó en el medio Olive Medium diseñado por Rugini (1984), pero se modificaron las concentraciones de zeatina obteniéndose como la óptima a utilizar 0,5 mg/l, comparando también con la presente investigación se corrobora que las yemas uninodales tienen

mejor respuesta a la micropropagación in vitro de olivo, y haciendo uso del medio WPM más la concentración óptima de BAP de 2 mg/l tiene una mejor respuesta.

Alvarado (1997), en su trabajo de investigación respuesta de tres variedades de olivo (*Olea europaea* L.) cv. Sevillana, Ascolana y Empeltre a la micropropagación in vitro haciendo uso del medio de cultivo MS, donde concluyó que bajo las condiciones desfavorables del medio ambiente por efecto de la contaminación no pudo obtenerse un resultado favorable a lo que se esperaba, también recomienda adicionar carbón activado para contrarrestar los efectos de oxidación fenólica, con referencia a la presente investigación no se presentó dichos problemas ya que se obtuvo una mejor respuesta a la micropropagación al medio de cultivo WPM.

Mejía (1994), en su publicación indica que a partir de discos de hojas y de nervadura central no se regeneran brotes. Así mismo que los peciolos son capaz de regenerar tallos, los peciolos obtenidos a partir del tercer nudo apical tienen mayor chance de ser regenerados (40 ± 2 %) que los nudos basales (5 ± 1 %) sobre medio OM modificado con 10 uM de 2iP + 2,2 uM BAP, esto se contrasta con el presente trabajo de

investigación, que haciendo uso de Woody Plant Medium (WPM) con una concentración de 2 mg/l y utilizando yemas uninodales, se obtiene como resultado una longitud de brote de 0,47 cm de longitud de brote a los 30 días de la introducción.

En los resultados evidenciaron el efecto positivo del BAP corroborado lo mencionado por Mejia (1994), quien indica que las citoquininas son incorporadas principalmente para la división celular y diferenciación de tallos inhibiendo la dominancia apical.

Toledo (1998), reporta que la micropropagación por nudos está basada en el principio de que el nudo de una planta in vitro, colocando en un medio apropiado inducirá al desarrollo de la yema axilar y originara una nueva plan in vitro.

La condición nutritiva hormonal del medio rompe la dormancia de la yema axilar y promueve su rápido desarrollo (Lizarraga *et al.*, 1992)

CONCLUSIONES

1. Se llegó a evaluar la respuesta a la micropropagación in vitro de Olivo (*Olea europaea* L.) variedad sevillana haciendo uso del medio Woody Plant Medium (WPM) y la elección de un adecuado protocolo de desinfección con 20 % de hipoclorito de sodio.
2. Se llegó a determinar que la mejor concentración de BAP para la micropropagación in vitro de la variedad sevillana es de: 2 mg/l que forma parte del medio Woody Plant Medium (WPM).
3. Se llegó a obtener plántulas de olivo (*Olea europaea* L.) var. Sevillana mediante micropropagación in vitro en condiciones de laboratorio.
4. Se logró controlar la contaminación reduciéndola a un 18 %, haciendo uso de un protocolo de desinfección con 20 % de hipoclorito de sodio.

RECOMENDACIONES

1. Es necesario continuar con las investigaciones, considerando el tratamiento óptimo para masificar la producción de plántulas de olivo.
2. Preliminarmente recomiendo realizar propagación in vitro haciendo uso de BAP con una concentración de 2 mg/l.
3. Debido a la importancia del cultivo, es preciso realizar investigación de la respuesta de los conos meristemáticos de olivo con el medio de cultivo WPM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acebedo, MM., Lavee, S., Liñan J. y Troncoso, A. (1997), In Vitro germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. *Scientia Horticulturae* 69: 207-215.

Adakalic, M., (2003), Técnicas de germinación y forzado de plántulas de olivo. Tesis de Master of Science en Olivicultura y elaiotecnia. Córdoba. España.

Alvarado, J., (1994), Métodos para la germinación y crecimiento forzado de plántulas de olivo. Trabajo profesional fin de carrera. ETSIAM. Universidad de Córdoba. España.

Alvarado, M., (1997), Respuesta de Tres Variedades de Olivo Sevillana, Ascolna y Empeltre a la Micropropagación in Vitro. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

Aguirre, M., (2010), “Riego por goteo en olivo en el partido bonaerense de Coronel Dorrego”. Mendoza.

Arévalo, M., (1986), Establecimiento de un método de propagación in vitro para ejemplares adultos de papaya hembra *Carica pubescens* LENNE ET KOCK (*Carica candamarcensis* HOOKER) Tesis Ing. Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso.

Avidan, B. y Lavee, S., (1978), Physiological aspects of rooting ability of olive cultivars. Acta Hort. 79: 93-101.

Barranco, D., (1999), La olivicultura en el mundo y en España. En: El Cultivo del Olivo. D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (eds). Mundi-Prensa, Madrid; pp: 17- 24.

Barranco, D., (2004), Variedades y patrones. En: El Cultivo del Olivo. D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (eds). Mundi-Prensa, Madrid; pp: 63- 91.

Caballero, J. y Nahlawi, N., (1979), Influencia de los hidratos de carbono y del lavado con agua en el enraizamiento por estaquillado semileñoso del cultivar 'Gordal' de olivo (*Olea europaea* L.). An. INIA Ser. Prod. Veg. 11: 219-230.

Caballero, J. y Del Río C., (1999), Métodos de multiplicación. In:
Barranco D, Fernández E, Rallo L. Eds. El cultivo del Olivo.
Mundi-Prensa. Madrid. 93-112 p.

Caballero, J. y Del Río C., (1994), Propagación del olivo por
enraizamiento de estaquillas semileñosas bajo nebulización.
Comunicación I.D. Agroalimentaria. Consejería de agricultura y
pesca, junta de Andalucía. 23pp.

Caballero, J. y Del Río C., (1999), Métodos de multiplicación. In:
Barranco D, Fernández E, Rallo L. Eds. El cultivo del Olivo.
Mundi-Prensa. Madrid. 93-112 p.

Caballero, J. y Del Río C., (2001), Métodos de multiplicación. En: El
cultivo del olivo. Barranco D, Fernández-Escobar R y Rallo L.
(Eds.). Ediciones Mundi-Prensa y Junta de Andalucía. Madrid.

Caballero, J. y Del Río C., (1994), Propagación del olivo por
enraizamiento de estaquillas semileñosas bajo nebulización.
Comunicación I.D. Agroalimentaria. Consejería de agricultura y
pesca, junta de Andalucía. 23pp.

Caballero, J. y Del Río, C., (1997), Métodos de multiplicación, 89-113.

En: el cultivo del olivo, 2a edición. Barranco, Fernández-Escobar, Rallo, Eds. Junta de Andalucía/Mundi-Prensa, 651pp

Caballero, J. y Del Río, C., (2005), Métodos de multiplicación. En: El cultivo del olivo. Barranco D, Fernández-Escobar R y Rallo L. (Eds.). Ediciones Mundi-Prensa y Junta de Andalucía. Madrid.

Carter, E. (1997), Micropropagacion de olivo (*Olea europaea* L.), Universidad Católica de Valparaiso, Facultad de Agronomía.

Cañas, L., Carramolino, L., Vicente, M., (1987), Vegetative Propagation of the olive tree from in vitro cultured embryos, Plant Science.

Casilla, E. (1999), “El Cultivo del olivo en el Perú”, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann

Cimato, A., Fiorino, P., (1980), Stato attuale delle conoscenze sulla moltiplicazione dell’olivo con la técnica della nebulizzazione. L’Informatore Agrario, XXXVI

Civantos, L., (2004), La olivicultura en el mundo y en España. En: El Cultivo del Olivo. D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (eds). Mundi-Prensa, Madrid; pp: 17-35.

Chang, T. T., (1989), The management of rice genetic resources. Genome 31 (2): 825-831.

Chávez, R., (2001), Hacia la Identificación y control Integrado de Hoja de Hoz en los cultivos de olivo de Tacna y Arica, INIA CHILE

Chávez, R., (2003), Avance en la investigación colaborativa y control integrado de la “Hoja de Hoz” en los cultivos de olivo de Tacna y Arica, Revista Ciencia & Desarrollo N°7: 7-12

Crisosto, C. y Sutter, E., (1985), Role of the endocarp in 'Manzanillo' olive seed germination. Journal of the American Society for Horticultural Science 110 (1): 50-52.

Cruz, C. D., (2001), Programa GENES: Aplicativo Computacional em Genética e Estadística Viciosa: Universidad Federal de Viciosa: 648

Cruz, C. D.; Regazzi, A. J.; Carneiro, P. C. (2004), Modelos Biometricos aplicados ao Melhormento Genetico. 3 ed. Vicoso: Universidad Federal de Vicoso: 480

Demetrios, G., Voyiatzis y Pritsa, T., (1994), the onset and disappearance of relative dormancy of olive embryos as affected by age. Acta Horticulturae 356: 148-151.

Del Río, C., (1988), Influencia de los hidratos de carbono y de la presencia del fruto en el enraizamiento del olivo por estaquillado semileñoso. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, España.

Del Río, C., Caballero, J., (2003), Aptitud al enraizamiento. P 277-308. In: Variedades de olivo en España. Mundi-Prensa, Madrid.

Del Río, C., Caballero, J. y Rallo, L., (1986), La influencia del tipo de estaquilla y del AIB sobre la variación estacional del enraizamiento de los cultivares de olivo 'Picual' y 'Gordal Sevillano'. Olea, 17: 23-26.

Del Río, C., Rallo, L. and Caballero, J., (1991), Effects of carbohydrate content on the seasonal rooting of vegetative and reproductive cuttings of olive. *Journal of Horticultural Science*, 66(3): 301-309.

Del Río, C., Caballero, J., (2005), Aptitud al enraizamiento. P 277-308.
In: *Varietades de olivo en España*. Mundi-Prensa, Madrid.

Diana, G. y Gaetani F., (1979-1980), Germinazioni di semi di olivo en relazione a trattamenti pre-semina e a differenti epoche di recolecta. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Olivicoltura* 6: 81-97.

DIRECCIÓN REGIONAL SUB SECTORIAL AGRARIA TACNA (2015),
Cadena productiva del Olivo en Tacna. Gobierno regional Tacna.

DIRECCIÓN REGIONAL SUB SECTORIAL AGRARIA TACNA (2014),
Cadena productiva del Olivo en Tacna. Gobierno regional Tacna.

DIRECCIÓN REGIONAL SUB SECTORIAL AGRARIA TACNA (2013),

Cadena productiva del Olivo en Tacna. Gobierno regional Tacna.

DIRECCIÓN REGIONAL SUB SECTORIAL AGRARIA TACNA (2011),

Cadena productiva del Olivo en Tacna. Gobierno regional Tacna.

Diamantoglou, S. y Mitrados, K., (1979), Sur la culture in vitro de l'ebryon de l'olivier (*Olea europeae* L. var. *oleaster*). C.R. Acad. Sci. Ser. D 288: 1537- 1540.

Domenech, B., Solana, P., Fernández-Aparicio M., González, J., Porras, A. y Soriano, M., (2000), Influencia de la densidad de plantación en el enraizamiento de estaquillas de olivo de la variedad cornicabra. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola, Ciudad Real, España.

Farfan Lopez, C.,(1983), Cultivo de tejidos meristematicos de tomate (*Lycopersicum esculentum*) ,crisantemo (*Crysantemo* sp.) y

curuba (*Passiflora mollissima* H.B.K. Bailey) ,UPTC , Tunja
,Colombia .

Fernández Serrano, J., Serrano y Amaral, E., (2002), Effect of different hormone treatments on rooting of *olea europaea* cv. 'Galega' vulgar cuttings. *Scientia Horticulturae*, 62: 89-198.

Fontanazza, G., (1996), Olivicultura intensiva mecanizzata. Edagricole.
312p

Fontanazza, G. y Rugini, E., (1981), The rooting of olive cultivars in heated boxes. *Frutticoltura* 43: 39-44.

García – Berenguer, A., Duran, R., (1990), Mineral Media for in vitro Propagation of Juvenile "Picual", *Acta Horticulturae*.

Gonzales,H.,Ramos ,A. Camarillo ,I.,Silos,H.,(1999), Manual de curso: Biotecnología Vegetal (cultivo de tejidos),Primera edición, México, pag.54-55.

Green, P. y Wickens, G., (1989), The *Olea europaea* complex. In: The Davis and Hedge Festschrift: Plant Taxonomy, Phytogeography and Related Subjects. Tan, K (ed.). Edinburgh, University Press, pp: 287-299.

Guerrero, A., (1988), Nueva olivicultura. Ed. Mundi – Prensa. España

Haberlandt, G. (1902), Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien., Math.-Naturwiss. Kl., Abt., 1(111), 69–92.

Hartmann, H., Loreti, F., (1965), Seasonal variation in the rooting of olive cuttings. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 87, 194–198.

Hartmann, H., Kester, D. y Davies, F., (1990), Plant propagation. Principles and practices. Fifth edition. Part II. Seed Propagation pp. 55-165.

Hartmann, H., Kester, D., Davies, F. y Geneve, R., 1997), Plant propagation. Principles and practices 6th edition. XII, 770p.

Hartmann, H. y Kester, D., (1987), Propagación de plántulas en propagación de plantas. Parte II. Compañía Editorial Continental, S.A., México. pp. 75-219.

Istanbouli, A., Arban, M. y Kasbi, A., (1987), Reproducción rápida de olivos a partir de semillas. *Olivae* 16: 30-33.

Istanbouli, A., Arban, M. y Kasbi, A., (1987), Reproducción rápida de olivos a partir de semillas. *Olivae* 16: 30-33.

Lagarda, A. y Martin, G., (1983), 'Manzanillo' olive seed dormancy as influenced by exogenous hormone application and endogenous abscisic acid concentration. *Hort Science* 18(6): 869-871.

Lagarda, A., Martin, G. y Kester, D., (1983), Influence of environment, seed tissue, and seed maturity on 'Manzanillo' olive seed germination. *HortScience* 18 (6): 868-869.

Mencuccini, M., (1995), Micropropagazione e Miglioramento Genetico in vitro dell' Olivo: Stato dell' Arte e Prospettive Future. *Rivista di Frutticoltura*.

Mencuccini, M., Corona, C., (1991), Micropropagazione e Miglioramiento

Genetico in vitro dell' Olivo: Stato dell' Arte e Prospettive Future.

Rivista di Frutticoltura.

Mejia, R., (1994), Propagación comercial 312 especies de plantas por

cultivo in vitro, Lima, Perú.

Mosquera Quijano, C., et al., (1993). Micropropagación de nudos de

curuba (*Passiflora mollissima* (H.B.K.) revista de ciencias

agrícolas, Vol.12, Núm.2, pag.20.

Nahlawi, N., Rallo, J., Caballero, J. M. and Eguren, J., (1975), Aptitude

a l'enracinement de cultivars d'oliver en bouturage herbace sous

nebulisation.

Olmo, H., (1946), Correlations between seed and berry development in

some seed varieties of *Vitis vinifera*. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.,

48.

Olmo, H., (1942), Choice of parent influencing seed germination in fruits.

Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 41: 171-175.

Ozkaya, M. y Celik, M., (1999), The effect of rooting environment and combination of auxin polyamine on the rooting ability of Turkish olive cultivars 'Gemlik' and 'Domat'. Acta horticulturae 356: 31-34.

Pampa, A., (2004), Principios de propagación de plantas. Injerto en olivo. [Enlínea]:www.lamolina.edu.pe/Facultad/Agronomía/Horticultura/Propagación/Reprodasexual/apampa-Resumen.Htm.

Peña, R., (2002), Biotecnología, Clonación e Ingeniería Genética. Principios y Aplicaciones al alcance de todos. Perú 2002 300 pp

Pedroza, J., (2008), Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en condiciones in vitro. 320 pp

Pierik, M., (1990), In Vitro Culture of Higher plant. España. 326 pp.

Polanco, S., (2004), Efecto de diferentes dosis de AIB y fecha de recolección sobre la propagación de estacas semileñosas basales y apicales de olivo (*Olea europaea* L.) de la variedad 'Empeltre'. Trabajo fin de carrera. Chile.

- Rallo, L. y Del Río, C., (1990)**, Effect of a CO₂-enriched environment of the rooting ability and carbohydrate level of olive cutting. *Advances in Horticultural Science*, 4: 129-130.
- Roca, W., Mroginski, L. (eds.). (1991)**, Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia. 970 pag.
- Rugini, E. y Fontanazza, G., (1981)**, In vitro propagation of “Dolce Agogia” Olive., *HortScience*
- Rugini, E. y Fedeli, E., (1990)**, Olive (*Olea europaea* L.) as an oilseed crop. In: Bajaj, J.P.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 10: Legumes and Oilseed Crops I. Springer, Berlin.
- Sarmiento, R., Garcia, J. y Mazuelos C., (1990)**, Free amino acids in easy- and difficult-to-root olive varieties. *Acta Hort.* 286: 105–108.
- Santos Antunes, F., (1999)**, Acortamiento del periodo juvenil en olivo mediante técnicas de forzado de crecimiento y elección de genitores. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba.

Scaramuzzi, F., (1957), Studies on the germination power of olive seeds of various ages. Agr. Ital. 56, (Hort. Abstr. 28: 292: 1958).

Sebastiani, L. y Tognetti, R., (2004), Growing season and hydrogen peroxide effects on root induction and development in *Olea europaea* L. (cvs 'Frantoio' and 'Gentile di Larino') cuttings. Scientia Horticulturae. 100: 75–82.

SECH, (1999), Diccionario de Ciencias Hortícolas. L. Rallo, R. Fernández-Escobar (Eds.). Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, 605 pp. Ed. Mundi-prensa. Madrid.

Seyhan, S., Ozzambak, E., (1994), Shoot Multiplication of Some Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars, Acta Horticulturae.

Siura, S., Ugás, R. y Carazas, H., (2006), Cultivo de orégano Programa de Horticultura Universidad Nacional Agraria La Molina 5 pp

Sotomayor-León, E. y Caballero, J., (1989), Harvesting time for seed germination. International Symposium on Olive Growing. Oleae 20:30.

Sotomayor-León, E. y Caballero, J., (1989), Harvesting time for seed germination. International Symposium on Olive Growing. *Oleae* 20:30.

Toledo, J.; N. Espinoza y A. Golmirzaie, (1998), Cultivo de tejidos. Centro Internacional de la papa. Lima – Perú.

Tous, J. y A. Romero (1993), Variedades del olivo, especial referencia a Cataluña. Fundación “la Caixa” España

Voyiatzis, D. y Porlingis, I., (1987), Temperature requirements for the germination of olive seeds (*Olea europaea* L.). *Journal of Horticultural Science* 62 (3): 405-411.

Voyiatzis, D., (1984), The effect of temperature on the breaking of dormancy and the content of endogenous hormones of the seeds of olive (*Olea europaea* L.). Thesis, University of Thessaloniki.

Wareing, P., (1959), Problems of juvenility and flowering in trees. *Journal Linn. Soc. (Bot)* 56: 282-289.

ANEXOS

Anexo 1: Longitud de brote. Primera evaluación

| Tratamiento | r1 | r2 | r3 | r4 | Promedio |
|-------------|------|------|------|------|----------|
| T1 | 0,24 | 0,25 | 0,21 | 0,26 | 0,24 |
| T2 | 0,23 | 0,28 | 0,25 | 0,28 | 0,26 |
| T3 | 0,32 | 0,37 | 0,41 | 0,29 | 0,35 |
| T4 | 0,21 | 0,31 | 0,35 | 0,25 | 0,28 |
| T5 | 0,27 | 0,20 | 0,30 | 0,29 | 0,26 |

Fuente: Elaboración propia

Anexo 2: Longitud de brote. Segunda evaluación

| Tratamiento | r1 | r2 | r3 | r4 | Promedio |
|-------------|------|------|------|------|----------|
| T1 | 0,55 | 0,67 | 0,48 | 0,51 | 0,55 |
| T2 | 0,51 | 0,56 | 0,49 | 0,58 | 0,54 |
| T3 | 0,56 | 0,56 | 0,59 | 0,48 | 0,55 |
| T4 | 0,39 | 0,56 | 0,56 | 0,50 | 0,50 |
| T5 | 0,49 | 0,32 | 0,56 | 0,51 | 0,47 |

Fuente: Elaboración propia

Anexo 3: Número de Brotes

| Tratamiento | r1 | r2 | r3 | r4 | Promedio |
|-------------|----|----|----|----|----------|
| T1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1,8 |
| T2 | 3 | 2 | 2 | 3 | 2,3 |
| T3 | 1 | 3 | 2 | 2 | 1,9 |
| T4 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1,8 |
| T5 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1,7 |

Fuente: Elaboración Propia

Anexo 4: Número de Yemas

| Tratamiento | r1 | r2 | r3 | r4 | Promedio |
|-------------|----|----|----|----|----------|
| T1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4,00 |
| T2 | 3 | 2 | 4 | 4 | 3,25 |
| T3 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4,00 |
| T4 | 3 | 2 | 4 | 2 | 2,75 |
| T5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2,00 |

Fuente: Elaboración Propia

Anexo 5: Anexo 2: Longitud de brote. Medio de multiplicación

| Tratamiento | r1 | r2 | r3 | r4 | Promedio |
|-------------|------|------|------|------|----------|
| T1 | 0,44 | 0,51 | 0,77 | 0,55 | 0,57 |
| T2 | 0,42 | 0,55 | 0,77 | 0,69 | 0,61 |
| T3 | 0,27 | 0,54 | 0,55 | 0,44 | 0,45 |
| T4 | 0,71 | 0,89 | 0,73 | 0,51 | 0,71 |
| T5 | 0,52 | 1,00 | 0,84 | 0,70 | 0,77 |

Fuente: Elaboración Propia

Foto 01: Esterilización de materiales



Fig. 1: Esterilizando material

Foto 02: Extracción de yemas uninodales



Fig. 2: Recolectando material vegetal

Foto 03: Limpieza de yemas

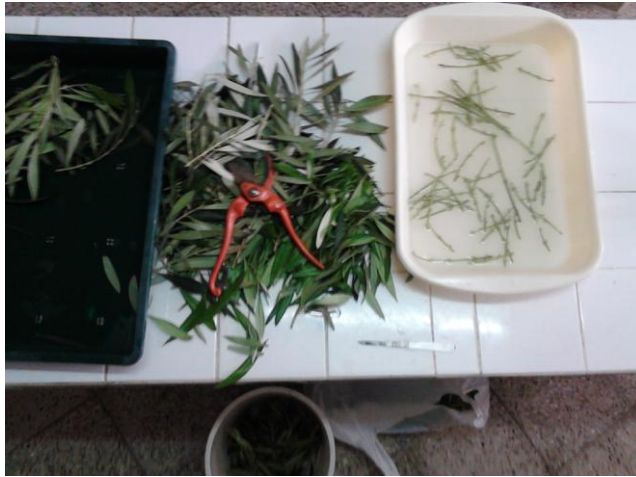


Fig. 3: preparando material vegetal

Foto 04: Protocolo de desinfección externo



Fig. 4: Preparando protocolo externo

Foto 05: Material vegetal en protocolo externo



Fig. 5: Material vegetal iniciando protocolo externo

Foto 06: Protocolo interno



Fig. 6: Preparando protocolo interno con material esterilizado

Foto 07: Material vegetal en protocolo interno



Fig. 7: Material vegetal en desinfección interna



Fig. 8: Material vegetal eliminado exceso de hipoclorito de sodio

Foto 09: Material listo para utilizar



Fig. 9: Tubos de ensayo con medio de cultivo esterilizado



Fig. 10: Cabina de flujo laminar preparada para trabajar

Foto 10: Realizando introducción In vitro de olivo

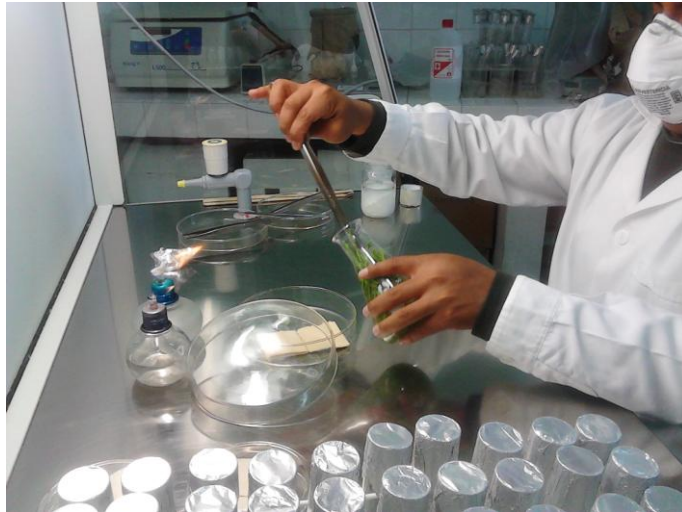


Fig. 11: Material vegetal introducidas in vitro



Fig. 12: Yema uninodal introducida en medio de cultivo

Foto 11: Material in vitro de olivo en crecimiento



Fig. 13: Material in vitro de olivo en crecimiento




Fig. 14: Olivo in vitro en crecimiento

Foto 12: Material vegetal siendo evaluado



Fig. 15: Proceso de evaluación

Foto 13: MÉTODOS DE PROPAGACIÓN DEL OLIVO

| | |
|--|---|
|  |  |
| <p>Método por sueca</p> | <p>Método por óvulo</p> |
|  |  |
| <p>Método por germinación de semilla</p> | <p>Método por estaquillado</p> |
|  | |
| <p>Método por micropropagación in vitro</p> | |

Fuente: Elaboración propia

Fig. 16: Métodos de propagación del olivo