

**TRABAJO PROFESIONAL**

**DE:**

**INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

**QUE PRESENTA:**

**HUMBERTO NÁJERA GÓMEZ**

**CON EL TEMA:**

**“COMPUESTOS BIOACTIVOS EN EL CULTIVO DE CALLOS DE  
OLIVO (*Olea europea* L.) CULTIVAR CORNICABRA”**

**PERIODO DE RESIDENCIA:  
ENERO A JUNIO DEL 2016**

**DIRECTOR DEL PROYECTO  
DR. FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ MICELI**

**TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS**

**JUNIO 2016**

## INDICE

1 RESUMEN .....	3
2 ANTECEDENTES .....	3
3 JUSTIFICACIÓN .....	4
4 OBJETIVOS .....	6
5 PROBLEMAS A RESOLVER.....	7
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
7 RESULTADOS .....	16
8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	27
9 CONCLUSIONES.....	34
10 RECOMENDACIONES .....	35
11 COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS.....	38
12 BIBLIOGRAFIA.....	38

## 1 RESUMEN

Las plantas producen metabolitos, los cuales poseen múltiples aplicaciones, desde la producción de biocombustibles a partir de su contenido de ácidos grasos hasta la obtención de compuestos antioxidantes. Una alternativa para producir estos compuestos bioactivos de interés se basa en el cultivo in vitro de callos en el olivo (*Olea europaea* L.) cultivar cornicabra. Utilizando segmentos nodales con dos yemas como explantes desinfectados con una solución de Agry-micin® y Captan®, tween 80, etanol y cloro fueron sembrados en medio MS a 1/3 de la concentración. Se observó que el tratamiento con 2 mg/L de TDZ (thidiazurón) permitió la formación de tejido calloso, el cual se mantuvo en resiembra mensual para la posterior inducción y extracción de sus metabolitos.

**PALABRAS CLAVE:** olivo, TDZ, agua de coco, inducción de callos.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de olivo (*Olea europea* L.)

El olivo (*Olea europaea* L.) es una especie emblemática que representa una de las plantas cultivadas más antiguas e importantes de la cuenca mediterránea (Loumou & Giourga, 2003, citado en Chiappetta & Muzzalupo, 2012).

Es considerado el sexto cultivo oleaginoso más importante del mundo, del cual se originan nuevas áreas de producción debido a las propiedades nutricionales beneficiosas del aceite de oliva monoinsaturado y a su alto valor económico. (Chiappetta & Muzzalupo, 2012).

El olivo se utiliza para la producción de aceite y en conservas de frutas (Breton, Warnock & Bervillé, 2012; Muzzalupo, Vendramin & Chiappetta, 2014). Posee un menor uso de la madera para artesanías y las hojas se utilizan como un té de hierbas, debido a su alto contenido en compuestos fenólicos como la oleuropeína y el hidroxitirosol, que son beneficiosos en la nutrición y la medicina (Breton et al., 2012).

La zona tradicional del cultivo de olivo es la cuenca mediterránea y tiene el 95% de los olivares del mundo. Los olivos se extienden a lo largo del área mediterránea y en Grecia, Italia, España, Portugal y Francia. Además, el cultivo se está expandiendo en áreas de Australia, Sur y Norte de América (Argentina, Chile, Estados Unidos), África del Sur e incluso en lugares exóticos, como Hawai (Chiappetta & Muzzalupo, 2012).

### 2.2 Propagación

Los principales métodos utilizados para casi todos los árboles frutales son los esquejes (Xen. Oec. 19.12, citado en Foxhall, 2007), acodos y el injerto.

### 2.2.1 Propagación por esquejes

Es una técnica de propagación asexual en el que toda la planta se origina a partir de una parte de ésta que previamente fue sometida en condiciones para la regeneración de un sistema de raíces (Fabbri et al., 2004).

Los esquejes pueden tomarse todo el año, pero en la práctica se hace de acuerdo con el ciclo de enraizamiento del olivo, teniendo dos puntos máximos anuales de concentración de compuestos de enraizamiento dentro de los tejidos, en abril y septiembre-octubre (Fabbri et al., 2004).

### 2.2.2 Propagación por injerto

El injerto implica poner en contacto dos porciones de tejido procedentes de dos árboles diferentes, de tal manera que sanan y posteriormente crecen como una planta leñosa compuesta. La parte superior de esta unión (el injerto) es corto y posee yemas latentes. La parte inferior o basal del injerto (el portainjerto) se convertirá en el sistema radicular del nuevo árbol. En el olivo, puede haber un portainjerto de semilla, de corte enraizado, de óvulo enraizado o de una planta micropropagada. A excepción del de semilla, las técnicas de propagación dan lugar a patrones clonales, uniformes y constantes en sus características (Fabbri et al., 2004).

Las ventaja del injerto es que los cultivares específicos (y especialmente deseables) se podían reproducir con facilidad y rapidez (Foxhall, 2007).

El injerto de árboles adultos (Topworking): El injerto de plantas adultas se utiliza cuando deben cambiarse a cultivares con mejores características ya que los cultivares actuales son improductivos, o tienen nula resistencia a las enfermedades, y climas adversos; o producen fruta con bajo contenido en aceite o de mala calidad (Fabbri et al., 2004).

## 3 JUSTIFICACIÓN

Se ha intentado aumentar la producción, detección y caracterización de muchos compuestos de importancia económica (Mathew & Deepa Sankar, 2014). En la actualidad, la mayoría de estos compuestos están aislados de plantas silvestres o cultivadas, ya que no pueden producirse por células microbianas o su síntesis química es difícil o económicamente inviable (Namdeo, 2007).

El cultivo de células vegetales representa una fuente potencial renovable de productos medicinales valiosos como aromas, esencias y colorantes. Los avances recientes en biología molecular, enzimología, fisiología y la tecnología de fermentación en cultivos de células vegetales sugieren que estos sistemas se convertirán en una fuente importante para producir fitoquímicos valiosos. (Namdeo, 2007; Rahman & Bari, 2014).

Debido a que las células vegetales son totipotentes biosintéticamente, son capaces de producir los productos químicos que se encuentran en la planta con la ventaja de una rápida proliferación celular y que el ciclo de biosíntesis de metabolitos secundarios puede tener lugar dentro de un período corto de cultivo (Mathew & Deepa Sankar, 2014). Otras ventajas de estos métodos incluyen la síntesis de metabolitos secundarios bioactivos en un medio controlado y proporcionar una fuente continua y fiable de productos naturales (Karuppusamy, 2009).

El cultivo de callos en plantas medicinales bajo condiciones adecuadas permite la producción de metabolitos secundarios significativos o fitofármacos, los cuales incluyen alcaloides, glucósidos, flavonoides, aceites volátiles, taninos, resinas, etc. (Namdeo, 2007).

Una tecnología alternativa atractiva es la estimulación de la síntesis de metabolitos secundarios en cultivos de callos de plantas. Esto se logra a través del uso de elicitores ya que aceleran el tiempo de producción para aumentar el volumen y las concentraciones de productos derivados del cultivo de callos. (Mathew & Deepa Sankar, 2014). Los elicitores son los factores microbianos, físicos o químicos que desencadenan respuestas fisiológicas y morfológicas en las plantas y las células vegetales in vitro (Namdeo, 2007).

La elicitación es un proceso de síntesis inducido o mejorado de metabolitos secundarios de las plantas para asegurar su supervivencia, persistencia y competitividad (Namdeo, 2007). Usando un suministro exógeno de los precursores biosintéticos, puede mejorar la acumulación de compuestos (Karuppusamy, 2009), permitiendo asegurar la producción sostenible de biomasa y de compuestos bioactivos (Jin & Keng, 2013).

La producción de una amplia gama de fitoquímicos valiosos a partir del cultivo de callos o células en suspensión se ha establecido con éxito:

Jin & Keng (2013) establecieron el cultivo en suspensión de callo para la producción de artemisinina, un importante medicamento contra la malaria en *Artemisia annua* L.

Arafeh et al. (2006) indujeron tejido calloso a partir de orégano (*Origanum vulgare* Pésico L.) y el orégano arábigo (*O. syriacum* L.), el cual presentó una producción de aceite prometedor al detectarse timol (desinfectante utilizado en enjuagues bucales y en odontología para preparar cavidades antes del llenado).

Se ha determinado la actividad antibacteriana in vitro del extracto celular a partir del cultivo de callos en suspensión de *Ricinus communis* L. cv. Roktima (Namdeo, 2007) y cv. Shabje (Rahman & Bari, 2014) para la extracción de ricina, la cual es una proteína tóxica con potencial para el tratamiento del cáncer.

También se ha investigado la elicitación para obtener compuestos con potencial farmacéutico a partir de los extractos de callos en especies de plantas medicinales.

Se observó, en el estudio de Mathew & Deepa Sankar (2014) que la elicitación provocada con jasmonato de metilo y quitosano es útil en incrementar el total de alcaloides y terpenos de cultivos celulares en tres especies de *Ocimum*.

En 2013 Mahalakshmi et al. identificaron la composición química y aumento de porcentaje en la producción de alcanos y ácidos grasos utilizando diversas concentraciones de ácido salicílico para la producción de metabolitos secundarios en *Jatropha curcas* a partir de callos.

Astello-García et al. (2013) desarrollaron un protocolo para el establecimiento de cultivos de callos de *Opuntia robusta*, un cactus silvestre con efectos terapéuticos asociado a sus componentes antioxidantes y compuestos fenólicos. La exposición de callo al ácido jasmónico aumentó la concentración en ácidos fenólicos y flavonoides.

Duangporn et al. (2002) han empleado la combinación de oligosacáridos y jasmonato de metilo en cultivos en suspensión de *Juniperus chinensis* en un medio de Schenk y Hildebrandt para aumentar la producción de podofilotoxina, importante precursor de drogas semisintéticas para el tratamiento de cáncer testicular, cáncer de pulmón de células pequeñas y leucemia aguda.

La extracción en los tejidos in vitro es mucho más simple que la extracción de tejidos complejos de una planta (Rahman & Bari, 2014).

Las plantas que producen aceites constituyen un recurso importante por su uso como aceites comestibles, y para la producción de materias primas químicas y grasas especiales. El olivo está entre los cultivos agrícolas más importantes, el aceite esencial y sus derivados tienen múltiples usos en el campo de los alimentos (Ramli et al., 2005).

A partir de cultivos de callos olivo (*Olea europaea* L.) variedad Coratina, Gentile & Uccella (2014) detectaron una producción de biofenoles (hidroxitirosol, tirosol, ácido cafeico y verbascosido) y de biofenoles-secoiridoides (la oleuropeína y ligustrósido), junto con cantidades menores de oleurosidio, y de bioactivos desmetil y deglucosil; comparable al de las drupas, hojas y semillas.

El cultivo in vitro a partir de olivo (*Olea europaea* L.) variedad cornicabra podría ser un nuevo enfoque para la obtención de metabolitos con valor farmacéutico o nutracéutico. El presente estudio promueve la producción comercial de principios bioactivos valiosos a partir del cultivo de callos de olivo mediante elicitación y por lo tanto, la alta producción de metabolitos secundarios se podría utilizar para la explotación a gran escala en las industrias agroquímicas y farmacéuticas.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivos generales

- Evaluar la producción de ácidos grasos, compuestos fenólicos totales, flavonoides en el cultivo de callos de olivo (*olea europaea* L.) cultivar cornicabra.

## 4.2 Objetivos específicos

- Determinar la desinfección óptima para el establecimiento del cultivo *in vitro* de olivo (*Olea europaea* L.) variedad cornicabra.
- Determinar el efecto que posee la conservación de los explantes en refrigeración durante cierto periodo sobre la contaminación en el cultivo de olivo (*Olea europaea* L.) variedad cornicabra.
- Desarrollar un protocolo para la obtención de callos en olivo (*Olea europaea* L.) variedad cornicabra a partir de segmentos nodales con dos yemas.
- Seleccionar el tratamiento de fitohormonas adecuado para suplementar al medio MS a 1/3 de concentración para maximizar el número de callos en el cultivo de segmentos nodales con dos yemas de olivo (*Olea europaea* L.) variedad cornicabra.

## 5 PROBLEMAS A RESOLVER

Problemas internos propios de la investigación:

- 1) Inicialmente, al igual que en estudios previos, la micropropagación de olivo ha presentado dificultades para establecerse *in vitro* debido a las altas tasas de contaminación, tanto de origen fúngico como bacteriano. Es por esto que el principal problema a resolver fue encontrar el método de desinfección adecuado que permitiera reducir o eliminar la contaminación del cultivo sin que al mismo tiempo el método no resultara ser tan dañino para el explante.
- 2) El segundo problema fue encontrar un medio de cultivo que permitiera promover únicamente la regeneración de callos de los segmentos nodales en olivo mediante la elección de la concentración adecuada de sales, antioxidantes, fuente de carbono y de la mejor hormona de crecimiento vegetal.
- 3) El mantenimiento del callo también presentó dificultades debido a que al cabo de un periodo corto de cultivo (3 semanas), el medio en el que permanecía sembrado el explante se volvía líquido, por lo que la estrategia empleada fue programar resiembras más frecuentes.
- 4) Por último, era necesario contar con una cantidad considerable de callo para las posteriores determinaciones de los compuestos bioactivos, sin embargo, como había

baja obtención de callos por parte del material vegetal, fue preciso recolectar explantes en varios periodos.

Problemas a resolver en los ámbitos científicos y tecnológicos para la innovación de calidad:

- 1) El desarrollo en el sector educativo y productivo es insuficiente, por lo que es necesario elevar la calidad en la educación superior en el estado mediante el fortalecimiento de la investigación a nivel licenciatura con el fin de fomentar la innovación tecnológica.
- 2) La investigación de calidad, ya sea básica o aplicada, es aún muy escasa en el estado de Chiapas. Es necesario hacer del desarrollo científico y tecnológico, pilares para el progreso económico y ambiental sostenible. Para lograrlo se debe impulsar proyectos, como en esta investigación, dirigidos a la obtención de compuestos de interés mediante el uso de materias renovables.
- 3) No hay tanta facilidad para transformar e innovar desde una perspectiva de desarrollo humano, lo cual es una limitante en la búsqueda de la generación y aplicación del conocimiento para contribuir en la solución de problemas. Al llevar a cabo esta investigación, se promueve la capacitación y formación de recursos humanos de alto nivel científico, además de promover la difusión de la ciencia y tecnología en nuestro estado.
- 4) Los productos oleaginosos puede usarse y transformarse proporcionándole valor agregado al impulsar la generación y aprovechamiento de energías alternativas, ya que la obtención de callos y sus extractos de ácidos grasos representa potenciales fuentes de energía (biocombustibles).
- 5) La promoción del uso y aprovechamiento de energías renovables permiten una sustentabilidad energética que traerá beneficios económicos y ambientales.
- 6) El cultivo *in vitro* no solo permite la conservación, cuidado y desarrollo de una planta de interés comercial, sino que amplía sus fronteras al proporcionar beneficios a través de los subproductos que se pueden derivar del cultivo vegetal en un marco de sustentabilidad.

De acuerdo con Solís Candelaria (2015), quien evaluó tres tipos de explantes (hoja, tallo y segmento nodal con dos yemas), el explante que mejor responde en el cultivo de olivo en medio MS es el que proviene de los segmentos nodales con dos yemas (66.6% de brotes) por lo que éstos se eligieron para la inducción de callos.



## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Obtención del material biológico

El material biológico, originario de diversas partes de España, fue facilitado por el productor Mauricio Nafate, quien posee interés comercial en el establecimiento del cultivo de olivo en Chiapas.

Experimento 1. Desinfección con Nanoplata siguiendo la metodología de Solís Candelaria (2015), y evaluación de diferentes hormonas vegetales para la inducción de callos

Se recolectaron explantes de cuatro variedades de olivo (*Olea europaea* L.) y se seleccionó a la variedad cornicabra (**Figura 6-1**) para la inducción de callo dado que en el estudio de Solís Candelaria (2015) se obtuvo un mayor número de explantes asépticos con dicha variedad (20%) debido a que la eficiencia del protocolo de desinfección aplicado fue dependiente de la variedad y además demostró tener una mejor respuesta generando tres brotes por explante a diferencia de las otras variedades evaluadas en medio MS en presencia de 2 mg/L de zeatina, 2 mg/L BAP y 25 ml/L de agua de coco.

Los parámetros para asegurar una adecuada colecta y selección de las plantas fueron que estuvieran libres de patógenos y con ausencia de marchites; en cuanto al tamaño, se tomaron ramas laterales de entre 10-15 cm de largo a partir de plantas jóvenes. Cada rama contenía alrededor de 20 segmentos nodales con yemas.

Las muestras de las cuatro variedades se colectaron en el mes de Noviembre del 2015, se etiquetaron y fueron guardadas en refrigeración en una bolsa de plástico alrededor de 5 días para posteriormente preparar la muestra y aplicar el método de desinfección para su correspondiente cultivo *in vitro*.



**Figura 6-1.** Recolección de explantes de olivo (*Olea europaea* L.) variedad cornicabra

## Experimento 2. Desinfección evaluando diferentes tiempos de exposición con Nanoplata

Se recolectaron los explantes a partir de la planta madre de olivo variedad cornicabra de 6 años de edad en el mes de Febrero del 2016, siguiendo los mismos parámetros de la colecta realizada en el experimento 1.

## Experimento 3. Optimización del protocolo de desinfección, establecimiento aséptico del cultivo y obtención de callos

Las muestras de la variedad cornicabra fueron colectadas de la misma planta madre del experimento 2 en el mes de Abril del 2016, asegurando que dicha planta no fuera regada tres días previos a la recolección con el fin de prevenir el ataque de patógenos y evitar en mayor medida la posible contaminación de los explantes debido a que la humedad favorece este resultado indeseable.

A partir de las ramas laterales, se tomaron con tijeras de podar los brotes vigorosos recién formados con una longitud de 10 cm aproximadamente conteniendo alrededor de 10 segmentos nodales con yemas.

Al recolectar se tomó en cuenta la calidad fitosanitaria (sin manifestación de enfermedades) y calidad fisiológica (se escogió el tejido más verde y vigoroso con ausencia de características no deseadas como señales de oxidación o lesiones) de la planta madre.

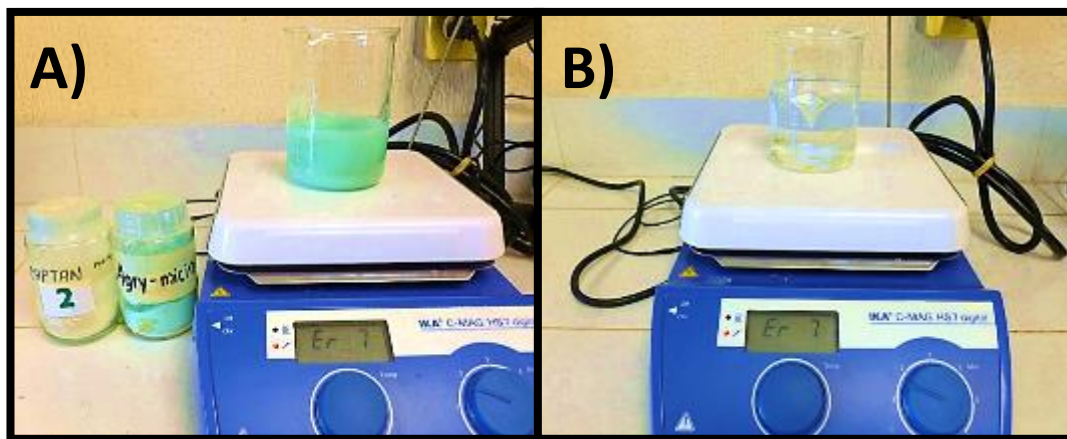
### 6.2 Desinfección de segmentos nodales con dos yemas.

Para todos los experimentos, se realizó la desinfección en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Los segmentos nodales con dos yemas de olivo variedad cornicabra fueron cortados a 1 cm aproximadamente, retirándose las hojas, empleando todos los segmentos nodales de la rama. Los explantes fueron inoculados de manera vertical en cada experimento.

## Experimento 1. Desinfección con Nanoplata siguiendo la metodología de Solís Candelaria (2015), y evaluación de diferentes hormonas vegetales para la inducción de callos

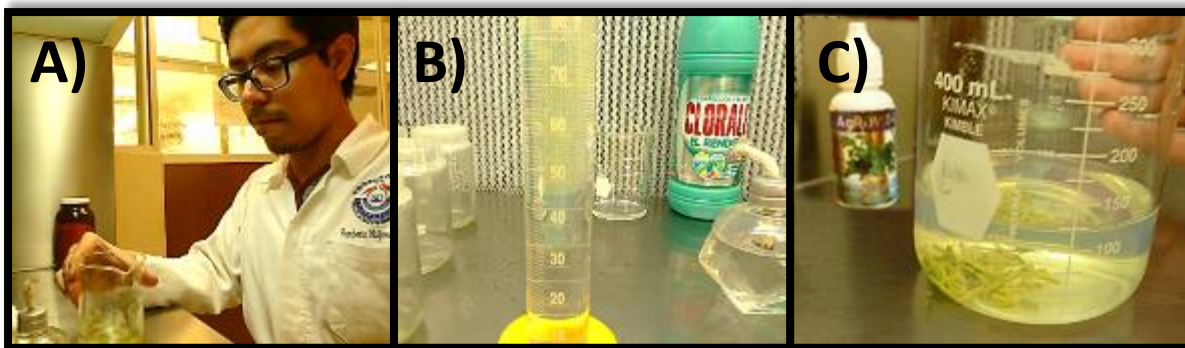
De acuerdo a lo reportado en Solís Candelaria (2015), los explantes derivados de olivo presentaron altas tasas de contaminación, por lo tanto se implementó el mejor tratamiento de desinfección que consistió en dos etapas.

En la primera, el material vegetal se lavó con agua de grifo y se desinfectó sumergiendo los segmentos nodales en una solución de Agry-micin® (3g L<sup>-1</sup>) y Captan® (1.25 g L<sup>-1</sup>) por 10 minutos en agitación constante, posteriormente, éstos fueron colocados en una solución de ácido cítrico y ascórbico 100 mg L<sup>-1</sup> por 5 minutos en agitación, después los explantes fueron lavados con detergente comercial (Salvo®) y enjuagados con agua destilada. Enseguida, los explantes fueron trasladados en 100 mL de agua con 5 gotas de tween 80 donde se mantuvieron en agitación constante por 10 minutos, finalmente, los explantes fueron tratados nuevamente en una solución de Agry-micin® y Captan® durante 10 minutos, concluido este tiempo fueron enjuagados.



**Figura 6-2.** Tratamiento en la primer etapa de desinfección de explantes de olivo (*Olea europaea* L.), **A)** Agry-micin® (3g L<sup>-1</sup>) y Captan® (1.25 g L<sup>-1</sup>) por 10 minutos; **B)** Ácido cítrico y ascórbico 100 mg L<sup>-1</sup> por 5 minutos

En la segunda etapa, los explantes de olivo se desinfectaron en una campana de flujo laminar (**Figura 6-2**) para mantener un ambiente aséptico durante la siembra en el medio de cultivo. Primero, los explantes fueron transferidos a un frasco estéril y se adicionó alcohol al 70% por 5 minutos en agitación constante, después fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio (Clorox®) al 30% durante 30 minutos en agitación constante, por último se colocaron en una solución de nanopartículas de plata (100 mg L<sup>-1</sup>) por 30 minutos en agitación constante. Entre cada tratamiento se enjuago 3 veces con agua destilada estéril.



**Figura 6-3.** Tratamientos de la segunda etapa en la desinfección de explantes en olivo (*Olea europaea* L.), **A)** alcohol al 70% por 5 minutos; **B)** hipoclorito de sodio (Clorox®) al 30% durante 30 minutos; **C)** solución de nanopartículas de plata (100 mg L<sup>-1</sup>) por 30 minutos

Para la preparación de la solución de nanopartículas de plata se adicionó una gota de AgROVIT en 100 mL de agua destilada estéril dentro de la campana de flujo laminar.

De acuerdo a la información técnica del microbicida AgROVIT, cuatro gotas del producto equivalen a 50 mg/L de nanopartículas de plata, es decir, una gota equivale a 12.5 mg/L de nano plata. Para determinar la concentración de la solución, se realizó la siguiente conversión:

$$\begin{array}{r} 12.5 \text{ mg de nanoplata} \text{ ----- } 1\text{L de solución} \\ X \text{ ----- } 0.1 \text{ L de solución} \end{array}$$

Despejando la incógnita de X (concentración) = 1.25 mg/L de nanopartículas de plata.

Siempre se utilizó esta concentración para todos los tratamientos que manejaron nanopartículas de plata.

#### Experimento 2. Desinfección evaluando diferentes tiempos de exposición con Nanoplata

Una vez recolectados, los explantes fueron desinfectados y cultivados in vitro a lo largo de tres días comenzando con el día de la recolección.

Sin embargo, debido a la alta tasa de contaminación presentada en el experimento anterior, se planteó un nuevo experimento para aumentar la tasa de desinfección. La nanoplata ha mostrado ser un agente con gran acción en la descontaminación de los tejidos vegetales por lo que se varió los tiempos de exposición de nanoplata en los explantes (**Cuadro 6-1**).

**Cuadro 6-1** Tratamientos con diferentes tiempos de exposición con nanoplata probados para la desinfección de explantes de segmentos nodales con dos yemas de olivo (*Olea europaea* L.), variedad cornicabra

TRATAMIENTOS	ETAPAS DE LA DESINFECCIÓN	
	Etapa 1. Fuera de la Campana de flujo laminar	Etapa 2. Dentro de la Campana de flujo laminar
Control	Método 1	Método 2
1	Método 1+ nanoplata (20 min)	Método 2
2	Método 1	Método 2+ nanoplata (25 min)
3	Método 1+ nanoplata (20 min)	Método 2+ nanoplata (25 min)
4	Método 1+ nanoplata (15 min)	Método 2+ nanoplata (20 min)

Donde:

**Método 1:** El procedimiento se llevó a cabo fuera de la campana de flujo laminar y consistió en la inmersión de los explantes en una solución de Agry-micin® (3g L<sup>-1</sup>) y Captan® (1.25 g L<sup>-1</sup>) por 10 minutos, inmersión en una solución de ácido cítrico y ascórbico 100 mg L<sup>-1</sup> por 5 minutos, lavado con detergente comercial (Salvo®), inmersión en 100 mL de agua con 5 gotas de tween 80 por 10 minutos y finalmente, inmersión en una solución de Agry-micin® y Captan® durante 10 minutos.

**Método 2:** Después de aplicar el Método 1, los explantes se desinfectaron en una campana de flujo laminar, se sumergieron en alcohol al 70% por 5 minutos y en una solución de hipoclorito de sodio (Clorox®) al 30% durante 30 minutos.

Cabe destacar que durante cada inmersión se mantuvo en agitación constante y una vez finalizado ese tiempo, los explantes se enjuagaron con agua destilada en el Método 1 y con agua destilada estéril en el Método 2.

### Experimento 3. Optimización del protocolo de desinfección y obtención de callos

Para el establecimiento *in vitro* el material vegetal fue llevado al laboratorio, donde los segmentos nodales se cortaron a 1 cm de longitud aproximadamente, retirándose las hojas. A pesar de que se obtuvo un 100% de desinfección en el experimento 2 para todos los tratamientos, casi ningún explante desinfectado logró sobrevivir y formar tejido calloso.

Además, la supervivencia de los explantes también se pudo ver afectada porque los tratamientos del experimento 2 fueron severos y dañinos para el tejido, por lo que se buscó optimizar el método de desinfección de los explantes. En el experimento 2 se observó que

ningún tratamiento presentó contaminación, de hecho se le atribuye a la nanoplata la baja tasa de sobrevivencia y nula respuesta de los explantes. Por tanto, el tratamiento control (sin nanoplata) es suficiente para garantizar la desinfección sin necesidad de emplear un agente tan agresivo para el tejido vegetal. El planteamiento de este experimento fue ver si se podría reducir el tiempo de exposición de cloro que se emplea en la etapa 2 de desinfección en el tratamiento control y adicional a esto, demostrar si el grado de contaminación se ve afectado por el tiempo en que el explante permanece refrigerado para su posterior cultivo.

Se manejaron tres tratamientos con 15 repeticiones y tres explantes por unidad experimental. El primer tratamiento (T1) de este experimento permitió realizar la desinfección y siembra el mismo día de la colecta de los explantes. Para llevar a cabo la desinfección, se trabajó con el tratamiento control previamente mencionado en el experimento 2, el cual consistió en aplicar los métodos 1 y 2. El segundo tratamiento (T2) fue idéntico al primer tratamiento pero la desinfección en el método 2 se llevó a cabo cambiando el tiempo final de exposición de cloro, utilizando 20 minutos en lugar de 30. La desinfección y siembra del tercer y último tratamiento (T3) se llevó a cabo 5 días después de la colecta empleando 20 min de cloro como en el tratamiento anterior.

### 6.3 Evaluación de los tratamientos para la inducción de callos

Experimento 1. Desinfección con Nanoplata siguiendo la metodología de Solís Candelaria (2015), y evaluación de diferentes hormonas vegetales para la inducción de callos

Una vez implementado el protocolo de desinfección se procedió a la evaluación de la fase *in vitro* para la inducción de callos en los segmentos nodales con dos yemas de *Olea europaea* L. variedad cornicabra sembrados en el medio de cultivo MS elaborado a 1/3 de la concentración, complementando con 5 mg/L de antioxidantes (Ácido cítrico y ascórbico) y suplementados con diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento dependiendo del tratamiento, el porcentaje de contaminación fue evaluado cada 15 días.

Se trabajaron con 4 tratamientos (**Cuadro 6-2**), el primero se suplementó con 2 mg L<sup>-1</sup> de Zeatina más 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 25 mL L<sup>-1</sup> de agua de coco previamente filtrada para remover impurezas. Los otros tres tratamientos manejaron diferentes concentraciones de TDZ (0.5, 1 y 2 mg L<sup>-1</sup>). Los experimentos se realizaron con 1 explante con 10 repeticiones, realizando 4 tratamientos de diferentes concentraciones de hormonas, es decir teniendo un total de 40 explantes.

Los cultivos duraron 15 semanas y se mantuvieron en resiembra cada 4 semanas.

**Cuadro 6-2** Diferentes tratamientos probados para inducción de callos en explantes de segmentos nodales con dos yemas de olivo (*Olea europaea* L.) variedad cornicabra

Tratamientos	Zeatina (mg/mL)	BAP (mg/mL)	Agua de coco (mL/L)	TDZ (mg/mL)
1	2	2	25	0
2	0	0	0	0.5
3	0	0	0	1
4	0	0	0	2

#### Experimento 2. Desinfección evaluando diferentes tiempos de exposición con Nanoplata

Después de haber llevado a cabo los distintos tratamientos de desinfección, los segmentos nodales con dos yemas de *Olea europaea* L. variedad cornicabra fueron cultivados en medio MS a 1/3 de la concentración suplementado con 2 mg/L de TDZ y 5 mg/L de antioxidantes (Ácido cítrico y ascórbico), ya que ésta concentración resultó ser el mejor tratamiento en la inducción de callos del experimento 1.

Los experimentos se realizaron con 1 explante por unidad experimental con 10 repeticiones, realizando 4 tratamientos de diferentes métodos de desinfección más un tratamiento control, teniendo un total de 50 explantes. El porcentaje de contaminación fue evaluado a los 15 días.

Los cultivos duraron 15 semanas y se mantuvieron en resiembra mensual hasta la 12va semana, a partir de la cual se resiembra después de tres semanas.

#### Experimento 3. Optimización del protocolo de desinfección y obtención de callos

Posterior a la desinfección, los segmentos nodales con dos yemas fueron cultivados en medio MS a 1/3 de la concentración suplementado con 2 mg/L de TDZ y 5 mg/L de antioxidantes (Ácido cítrico y ascórbico).

Se trabajaron con 3 tratamientos de desinfección, con 10 repeticiones y se utilizó dos segmentos nodales por unidad experimental. El porcentaje de contaminación fue evaluado a los 15 días, mientras que el porcentaje de sobrevivencia fue evaluado a los 45 días.

Inicialmente los cultivos fueron sembrados las primeras 2 semanas en el medio antes mencionado pero sin TDZ para evaluar el periodo de esterilidad. Posteriormente, los cultivos se mantuvieron en resiembra mensual hasta la 12va semana, a partir de la cual se resiembra después de tres semanas. Los cultivos tuvieron una duración de 15 semanas.

El diseño estadístico utilizado fue un ANOVA simple con  $p \leq 0.05$  para evaluar las respuestas y determinar el tratamiento adecuado para la inducción de callos y el mejor tratamiento para la desinfección de los explantes. Todos los datos fueron comparados estadísticamente por la prueba LSD de Fisher ( $\alpha=0,05$ ) para determinar la significación de las diferencias entre los valores medios, utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.II. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar (SE).

## 7 RESULTADOS

7.1 Experimento 1. Desinfección con Nanoplata siguiendo la metodología de Solís Candelaria (2015), y evaluación de diferentes hormonas vegetales para la inducción de callos

### 7.1.1 Evaluación de la contaminación y desinfección

Durante esta etapa se evaluó la contaminación (tanto bacteriana como fúngica) de los segmentos nodales con dos yemas de *Olea europaea* L. variedad cornicabra, a partir del protocolo de desinfección propuesto por Solís Candelaria (2015) que estuvo dividido en dos etapas.

Para evaluar los datos registrados en la fase de contaminación microbiológica, se realizó un cuadro de contingencia (**Cuadro 7-1**), en él se indicó el porcentaje de desinfección y contaminación a lo largo de las cuatro semanas que duró el monitoreo de los explantes.

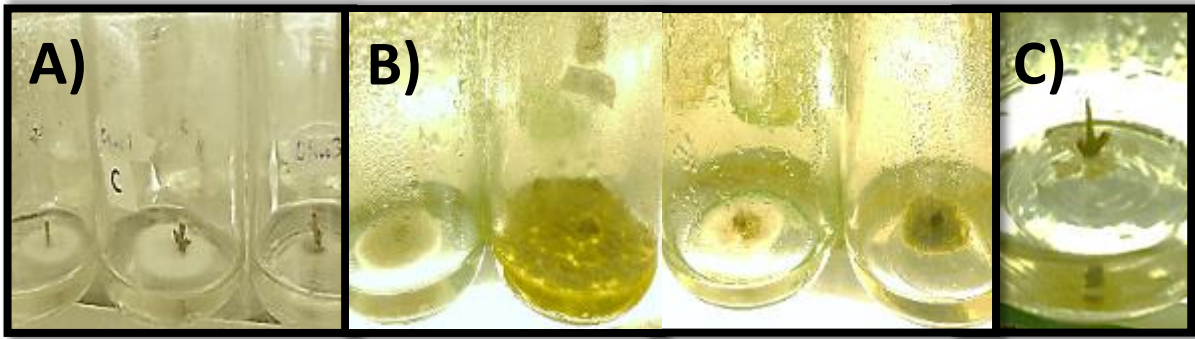
Predominó la contaminación fúngica, la cual presentaba diferentes morfologías coloniales (**Figura 7-2**), lo que en un inicio se consideró que se trataba de hongos endófitos. La manifestación de la contaminación persistió hasta la cuarta semana de evaluación, después de este periodo se le dio seguimiento al resto de los cultivos asépticos para valorar la inducción de callo.

El porcentaje de desinfección fue disminuyendo al pasar las semanas, finalmente alcanzó un 45% de desinfección a la 4ta semana. En la (**Figura 7-3**) se puede observar el progreso de la contaminación y desinfección semanalmente hasta alcanzar las cuatro semanas de evaluación. Dada la necesidad aumentar el grado de desinfección, se implementó el experimento 2 manejando diversos tiempos de nanoplata con el supuesto de que este agente es determinante para mejorar la desinfección.

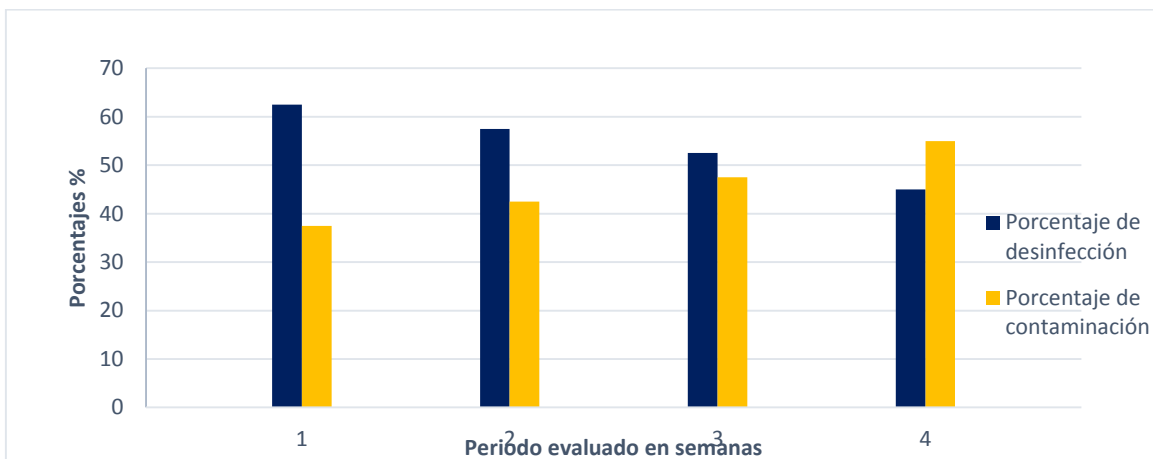
**Cuadro 7-1** Porcentajes de contaminación y desinfección durante un período de evaluación de 4 semanas en segmentos nodales con dos yemas de olivo (*Olea europaea* L.) variedad cornicabra

TIPO DE RESPUESTA	PERIODO EVALUADO			
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
# Frascos Desinfectados	25	23	21	18
Porcentaje De Desinfección	62.5 %	57.5 %	52.5 %	45 %
# Frascos Contaminados	15	17	19	22
Porcentaje De Contaminación	37.5 %	42.5 %	47.5 %	55 %





**Figura 7-2.** Contaminación fúngica a lo largo del monitoreo de explantes en olivo (*Olea europaea* L.), **A)** Contaminación a la primer semana de cultivo; **B)** Contaminación a la segunda semana de cultivo, predomina la contaminación fúngica; **C)** Contaminación a la tercer semana de cultivo



**Figura 7-3.** Gráfico del porcentaje de contaminación y desinfección durante 4 semanas de cultivo

#### 7.1.1.1 Inducción de callos

Tras aplicar el ANOVA para un nivel de significancia de 5%, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los 4 tratamientos. Se logró evidenciar que el tratamiento 4 resultó ser un factor significativo ( $p < 0.05$ ) con respecto a los tratamientos 1 y 2, ya que el promedio del porcentaje de callos obtenido del tratamiento 4 fue significativamente mayor, excepto con el tratamiento 3. Los tratamientos 3 y 4 no producen un porcentaje de callos diferente, es decir, no hubo diferencia estadística significativa entre ambos tratamientos.

En el (Cuadro 7-2) se muestran los promedios para el porcentaje de inducción de callos obtenidos por los cuatro tratamientos aplicados, los cuales estaban suplementados con

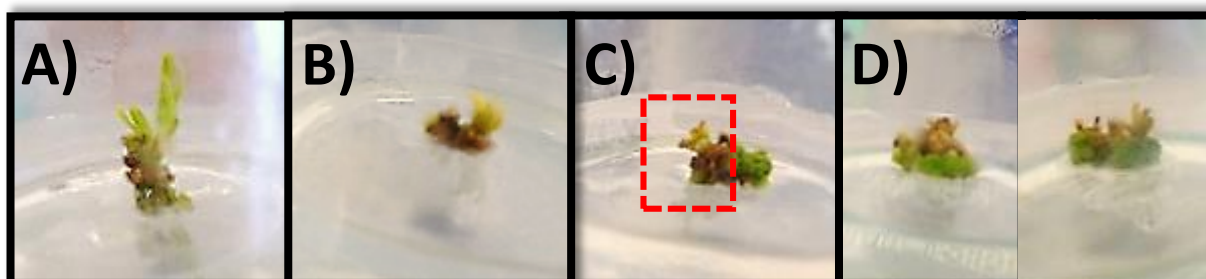
diferentes reguladores de crecimiento. La aplicación del método LSD de Fisher permitió determinar que el mayor porcentaje de inducción de callos fue del tratamiento 4 a diferencia de los tratamientos 1 y 2, aunque no presentó diferencia con el tratamiento 3. Sin embargo, de acuerdo a las observaciones (**Figura 7-4**), el tratamiento 3 comenzó a inducir brotes después de la callogénesis en algunos casos, mientras que en el tratamiento 4 persistió la etapa de callos en cada resiembra. Este hecho contribuyó a decidir que el tratamiento 4 era más apropiado para la inducción de callos.

Por lo tanto, para inducir una respuesta de 75% de callos (**Figura 7-5**) en explantes de olivo variedad cornicabra basta con aplicar 2 mg/L de TDZ (tratamiento 4), pues con 1 mg/L de TDZ (tratamiento 3) algunos callos tienden a formar brotes y con los tratamientos 1 (0.5 mg/L de TDZ) y 2 (2 mg L<sup>-1</sup> de Zeatina más 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 25 mL L<sup>-1</sup> de agua de coco) no habría callogenésis.

**Cuadro 7-2** Tratamientos implementados con una metodología de LSD de Fisher ( $\alpha=0,05$ ) para el porcentaje de inducción de callos en olivo (*Olea europaea* L.) variedad cornicabra evaluados a la 8va semana de cultivo

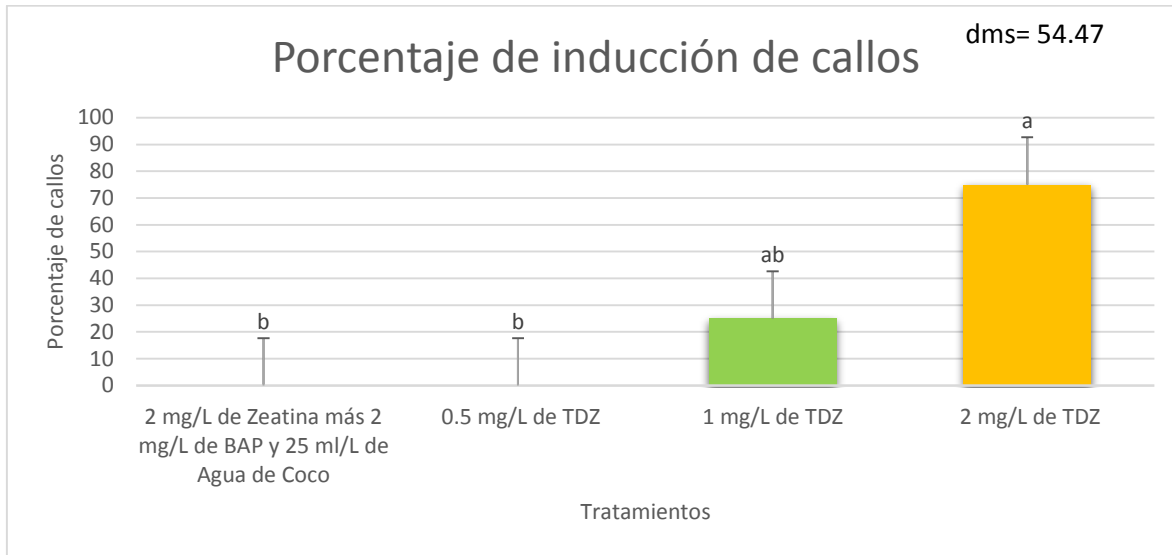
Tratamiento	Porcentaje de inducción callos promedio <sup>1</sup>	Porcentaje de inducción de brotes promedio <sup>1</sup>
2 mg/L de Zeatina más 2 mg/L de BAP y 25 ml/L de Agua de Coco	0 ± 0 b	50 ± 57 a
0.5 mg/L de TDZ	0 ± 0 b	25 ± 50 a
1 mg/L de TDZ	25 ± 50 ab	25 ± 50 a
2 mg/L de TDZ	75 ± 50 a	0 ± 0 a

<sup>1</sup>El porcentaje de callos promedio con letra diferente es significativamente diferentes, según la prueba LSD de Fisher ( $\alpha=0,05$ ). Los promedios se muestran con el límite de confianza al 95%.



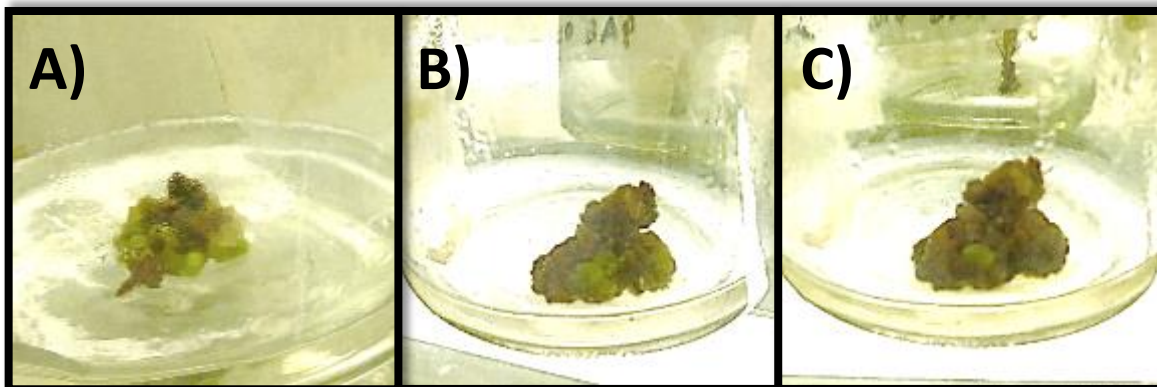
**Figura 7-4.** Diferentes respuestas obtenidas en la semana 10 de cultivo de segmentos nodales con dos yemas en olivo (*Olea europaea* L.) variedad cornicabra, **A)** Obtención de 50% de brotes en el tratamiento suplementado con 2 mg/L de Zeatina más 2 mg/L de BAP y 25 ml/L de Agua de Coco; **B)** Obtención de 25% de brotes en el tratamiento suplementado con 0.5

mg/L de TDZ; **C)** Obtención de 25% de callos en el tratamiento suplementado con 1 mg/L de TDZ; **D)** Obtención de 75% de callos en el tratamiento suplementado con 2 mg/L de TDZ



**Figura 7-5.** Análisis de varianza para el porcentaje de inducción de callos promedio, LSD de Fisher ( $\alpha=0,05$ ) mediante el programa Statgraphics. Letras iguales no hay diferencia significativa

Los callos obtenidos de este experimento fueron monitoreados semanalmente para ver su evolución (**Figura 7- 6**). A partir de la 8va semana comenzaron a aparecer la formación de callos de coloración verdosa, sin embargo este estado fisiológico no persistió por un periodo prolongado ya que a partir de la semana 14 el callo se oscureció hasta causar la muerte del explante en la semana 15. Cabe señalar que el medio de cultivo en el que se encontraba el callo (suplementado con 2 mg/L de TDZ) comenzaba a cambiar de estado, pasando de solido a liquido en 3 semanas, siendo necesario las resiembras consecutivas.



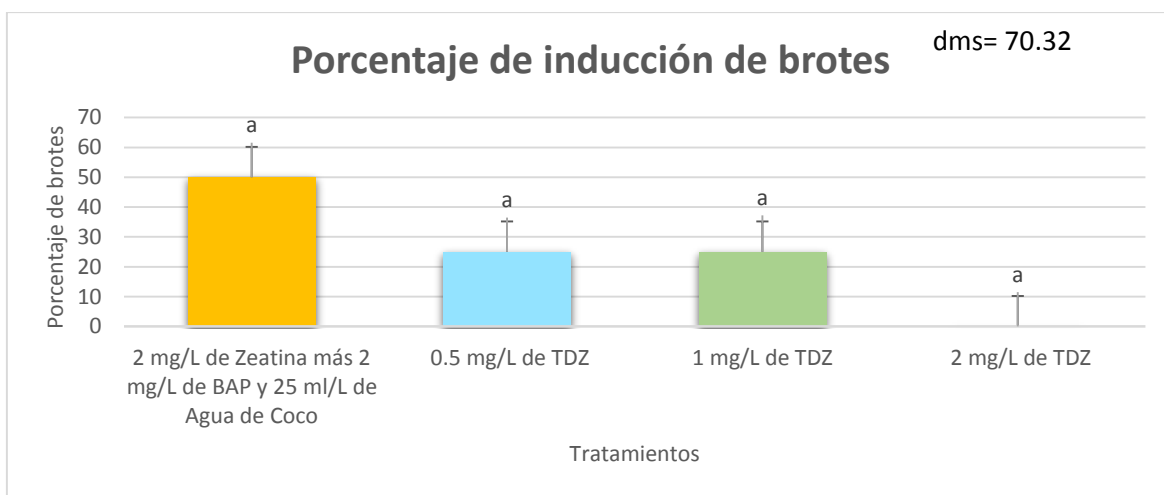
**Figura 7- 6.** Seguimiento del desarrollo de los callos del tratamiento 4 (suplementado con 2 mg/L de TDZ) en olivo (*Olea europaea* L.) variedad cornicabra, **A)** callo en la semana 10 de

cultivo; **B)** oscurecimiento del callo en la semana 14 de cultivo; **C)** necrosis del callo en la semana 15 de cultivo

### 7.1.1.2 Inducción de brotes

Los tratamientos no presentaron una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) debido a que el ANOVA, con un nivel de confianza del 95.0%, indicó que ningún porcentaje de inducción de brotes fue diferente a los otros (**Figura 7-7**). El porcentaje más alto fue del tratamiento 1 (suplementado con 2 mg/L de Zeatina más 2 mg/L de BAP y 25 ml/L de Agua de Coco) con un 50% de inducción de brotes, pero al compartir una misma letra, los porcentajes de todos los tratamientos son homogéneos.

Puesto que el valor-P es mayor que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95.0% de confianza.



**Figura 7-7.** Análisis de varianza para el porcentaje de inducción de brotes promedio, LSD de Fisher ( $\alpha=0,05$ ) mediante el programa Statgraphics. Letras iguales no hay diferencia significativa

7.2 Experimento 2. Desinfección evaluando diferentes tiempos de exposición con Nanoplata

### 7.2.1 Evaluación de la contaminación y desinfección

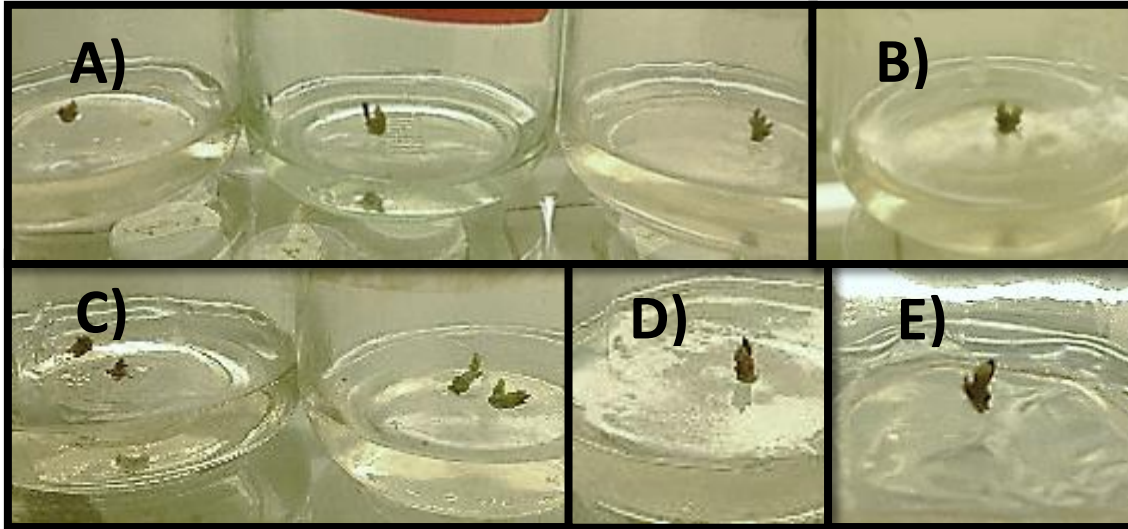
Tal y como se aprecia en el (**Cuadro 7-3**), todos los valores del porcentaje de desinfección son iguales (100%), es decir, no hay significancia en el efecto de desinfección de los tratamientos en comparación con el control, por lo que un análisis estadístico posterior es innecesario.

En este experimento se logró incrementar el porcentaje de desinfección obtenido en el experimento 1 (45%) hasta alcanzar el 100% (**Figura 7-8**).

**Cuadro 7-3** Tratamientos utilizados para la desinfección de segmentos nodales con dos yemas de olivo (*Olea europaea* L.) variedad cornicabra con una metodología de LSD de Fisher ( $\alpha=0,05$ ) para el porcentaje de desinfección evaluado en la 4ta semana de cultivo y el porcentaje de explantes sobrevivientes evaluado en la 6ta semana de cultivo

TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN	% de desinfección <sup>1</sup>	Total de frascos utilizados	# Sobrevivientes	% Sobrevivientes <sup>1</sup>
Control	100 a	10	4	40 ± 51 a
T1	100 a	10	1	10 ± 31 b
T2	100 a	10	1	10 ± 31 b
T3	100 a	10	0	0 ± 0 b
T4	100 a	10	0	0 ± 0 b

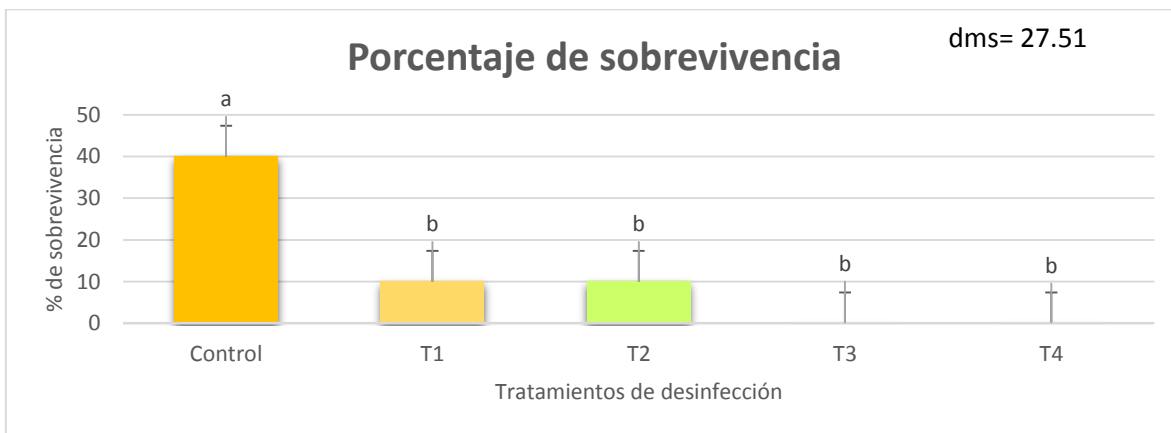
<sup>1</sup>El porcentaje de desinfección promedio con letra diferente es significativamente diferentes, según la prueba LSD de Fisher ( $\alpha=0,05$ ). Los promedios se muestran con el límite de confianza al 95%.



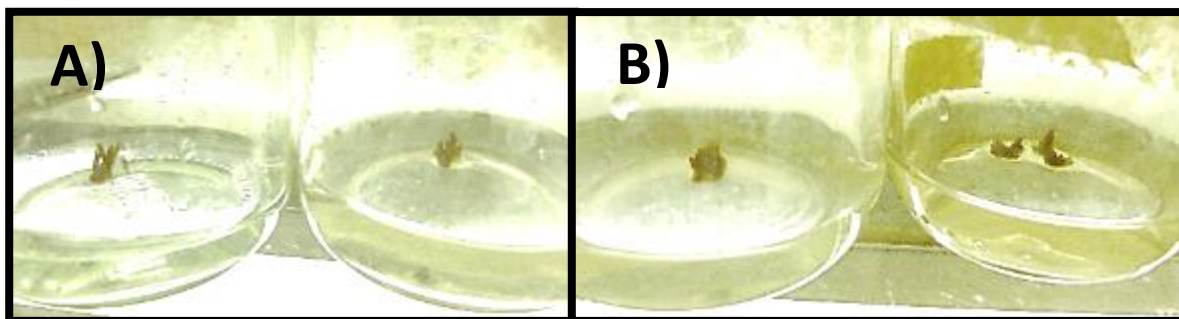
**Figura 7-8.** Tratamientos con 100% de desinfección del experimento 2 evaluados en la 4ta semana de cultivo, **A)** Control; **B)** Tratamiento 1; **C)** Tratamiento 2; **D)** Tratamiento 3; **E)** Tratamiento 4

### 7.2.2 Evaluación de la sobrevivencia de los explantes

El análisis ANOVA muestra que todos los tratamientos ofrecieron un porcentaje promedio de sobrevivencia diferente al obtenido por el control ( $p < 0.05$ ), es decir, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las promedios de los porcentajes de sobrevivencia del control con respecto a los cuatro tratamientos, con un nivel del 95.0% de confianza (**Figura 7-9**). No existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos a diferentes tiempos de exposición de nanoplata. Esto implica que los tratamientos de desinfección que incluyeron nanoplata en el protocolo reducen el porcentaje de sobrevivencia de los explantes a lo observado con el control, el cual permitió un 40% de sobrevivencia (**Figura 7-10**).



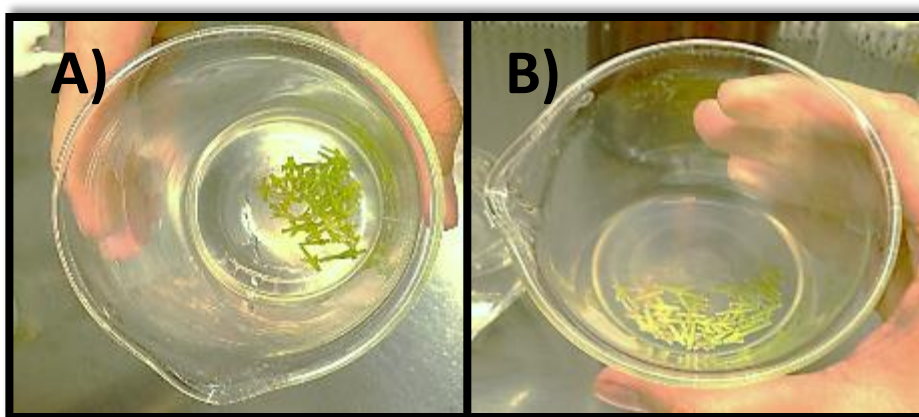
**Figura 7-9.** Análisis de varianza para el porcentaje de sobrevivencia promedio, LSD de Fisher ( $\alpha=0,05$ ) mediante el programa Statgraphics. Letras iguales no hay diferencia significativa



**Figura 7-10.** Tratamientos del experimento 2 evaluados en la 6ta semana de cultivo que mostraron sobrevivencia, **A)** Control con 40% de sobrevivencia; **B)** Tratamiento 1 con 10% de sobrevivencia

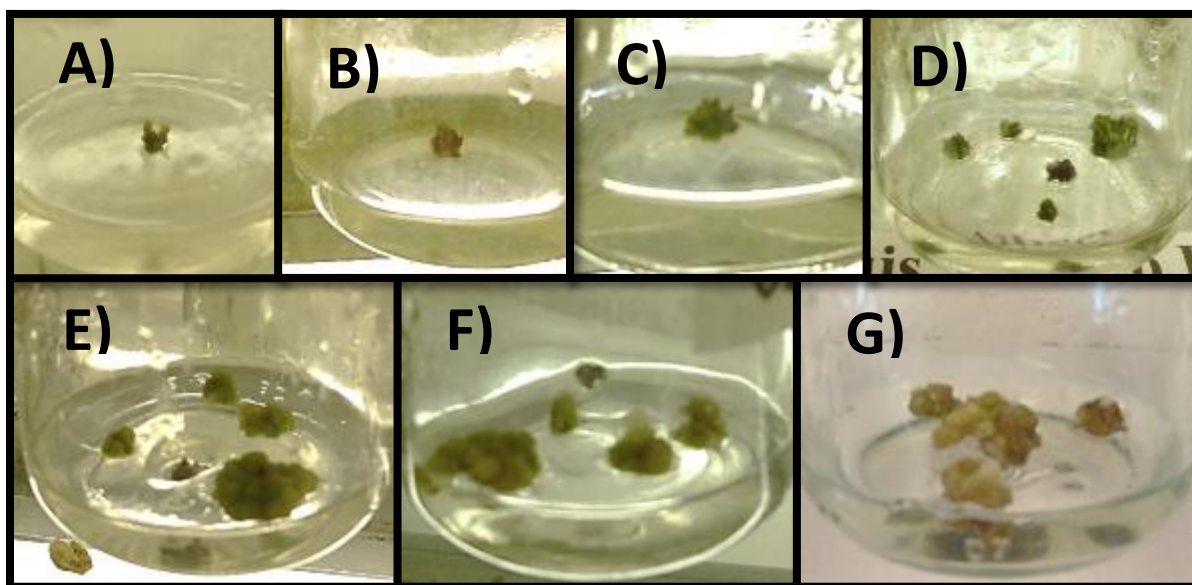
Estos análisis permitieron concluir que, en términos del porcentaje de desinfección obtenido, todos los tratamientos resultaron ser igual de eficaces que el control. Desde un punto de vista económico, para realizar la desinfección es conveniente usar el tratamiento control porque en él se omite el uso del microbicida AgROVIT, a diferencia de los otros tratamientos que lo empleaban para someter a los explantes en una solución de nanoplata. Al descartar el uso del microbicida AgROVIT nos ahorraríamos el costo del producto y el protocolo se llevaría a cabo en menor tiempo al eliminar el paso extra de la desinfección en nanoplata.

Además, la eficacia de la nanoplata tiene un lado negativo ya que expone a los explantes a un daño superficial del tejido lo que reduce la sobrevivencia del explante (**Figura 7-11**). De hecho, el único valor que ofrece una diferencia estadística significativa en el porcentaje de sobrevivencia de los explantes es el del control, por lo que este valor respalda que la mejor opción es utilizar el tratamiento control para realizar la desinfección.



**Figura 7-11.** Efecto de las nanopartículas de plata sobre los explantes antes y después de finalizar el proceso de desinfección, **A)** explantes antes de sumergirlos en nanoplata; **B)** los explantes se vuelven más opacos una vez terminado los 20 minutos de desinfección con nanoplata

El seguimiento semanal de la inducción de callos en este experimento (**Figura 7-12**) mostró la aparición del callos desde de la 8va semana de cultivo. Debido a que el experimento anterior ocurrió un cambio de estado del medio volviéndose líquido, se suspendió el uso de 2 mg/L de TDZ después 2 meses de cultivo, por lo que las resiembras posteriores se llevaron a cabo en el medio de cultivo sin regulador. Sin embargo después de 11 semanas, el medio continuaba volviéndose líquido y el desarrollo del callo se detuvo en la semana 12. En la semana 14 el color del callo cambio de verde a café y alcanzo la necrosis en la semana 15.



**Figura 7-12.** Monitoreo del desarrollo de callo derivado del experimento 2 evaluados en diferentes periodos de cultivo, **A)** 3er semana de cultivo; **B)** 6ta semana de cultivo; **C)** 8va semana de cultivo; **D)** 10ma semana de cultivo; **E)** 11va semana de cultivo; **F)** 13va semana de cultivo; **G)** 14va semana de cultivo

### 7.3 Experimento 3. Optimización del protocolo de desinfección y obtención de callos

#### 7.3.1 Evaluación de la contaminación, desinfección y sobrevivencia

En este protocolo, el cultivo se mantuvo a prueba de esterilidad por 2 semanas sin TDZ y posterior a esto, se resembró en medio suplementado con 2 mg/L de TDZ para evaluar en la 6ta semana la sobrevivencia de los explantes (**Figura 7-13**).

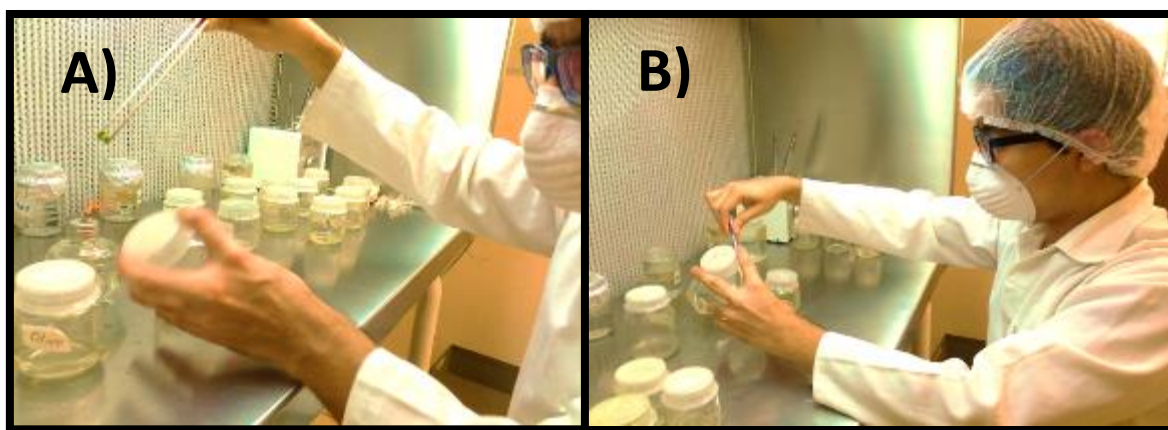
La contaminación que se evaluó a las 2 semanas fue exclusivamente fúngica (**Cuadro 7-4**). A pesar de que el tratamiento 2 tuvo el mayor porcentaje de contaminación (26.67%), este no presentó diferencia estadística significativa con el porcentaje promedio del tratamiento 3 (6.67%), sin embargo estos valores son un indicativo que el tiempo de refrigeración del explante puede contribuir de manera negativa en el cultivo al propiciar un ambiente de



contaminación, posiblemente en un periodo prolongado de refrigeración aumente la probabilidad de contaminación.

Luego de aplicar el ANOVA al 5% de nivel de significación se encontró que el tratamiento 1 fue significativo ( $p < 0.05$ ) con el tratamiento 2 en el porcentaje promedio de desinfección, aunque no hubo diferencia al compararlo con el promedio que se obtiene a partir del tratamiento 3. La siembra de explantes se llevó a cabo el mismo día de la recolección para los tratamientos 1 y 3, lo único diferente fueron los 30 y 20 minutos de exposición en hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) al 30% respectivamente. Al no haber una diferencia estadística significativa, el mejor tratamiento resulta ser el 3 porque permite ahorrar tiempo en el proceso de desinfección.

Así mismo, no hubo diferencia estadística significativa entre los tratamientos 2 y 3 para el porcentaje promedio de desinfección, sin embargo, el porcentaje de desinfección del tratamiento 2 (73.33%) fue menor que el tratamiento 3 (93.33%) a un mismo tiempo de exposición en hipoclorito de sodio (20 min) y a 5 días de refrigeración para la siembra en el caso del tratamiento 2, y para el tratamiento 3 la siembra se hizo el mismo día de recolección. Es probable que a mayor tiempo de refrigeración del explante antes de la siembra, mayor será el riesgo de contaminación.



**Figura 7-13.** Mantenimiento de los explantes del experimento 3 evaluados en diferentes periodos de cultivo, **A)** Siembra por 2 semanas y en ausencia de TDZ para la prueba de esterilidad; **B)** Resiembra cada 4 semanas con 2 mg/L de TDZ

Finalmente, para la evaluación en la 6ta semana del porcentaje de sobrevivencia de los explantes que generaron respuesta se encontró que el valor de P es mayor que 0.05, por lo que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de los 3 tratamientos con un nivel del 95.0% de confianza. Cabe mencionar que los tratamientos no eran muy diferentes entre sí, pero los promedios del tratamiento 1 (40%) y 3 (46.66%) sobresalen por ser los más altos; es una señal de la importancia en realizar el cultivo *in vitro* tan pronto como se obtiene el explante. Sin embargo, estos porcentajes son muy bajos para los fines de este proyecto, probablemente no todos los segmentos nodales del cultivar

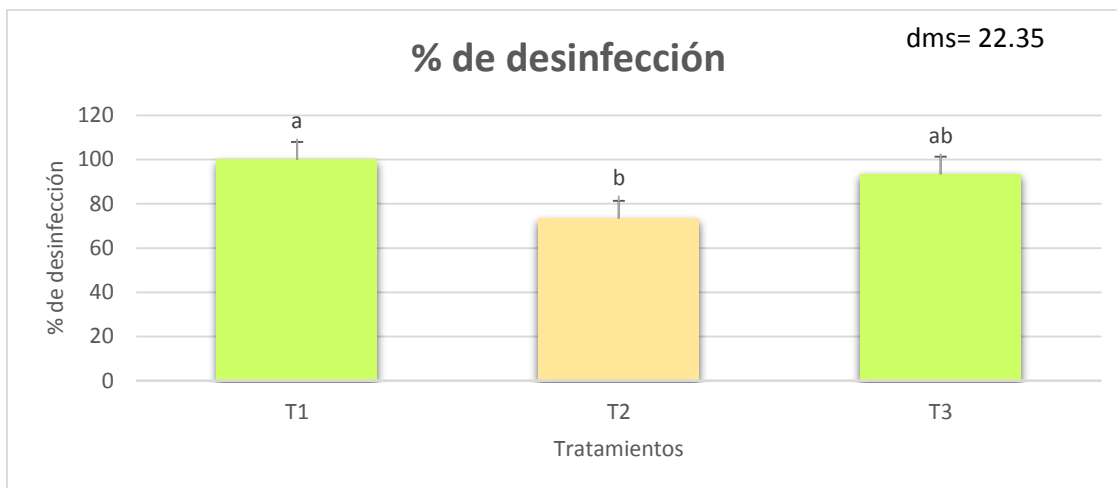
cornicabra tienen la capacidad de generar tejido calloso, por lo que hay que ser más selectivo en la ubicación que el segmento nodal tiene en la rama.

La sobrevivencia del explante es el rasgo más importante, porque de esto depende la cantidad de callos a obtener, pero ningún tratamiento mostró una diferencia significativa. Después en orden de importancia le sigue el porcentaje de desinfección, los tratamientos 1 y 3 que se cultivaron el mismo día de la recolección de muestra consiguieron las tasas de desinfección más altas pero tampoco presentaron una diferencia estadística significativa (**Figura 7-14**). La única diferencia entre estos tratamientos fue el tiempo de exposición de hipoclorito de sodio al 30%, 30 minutos para el tratamiento 1 y 20 minutos para el tratamiento 3. Como no hay evidencia estadística para concluir cuál de los tratamientos es el adecuado para alcanzar la óptima desinfección, se elige al tratamiento 3 como el mejor ya que permite obtener los resultados deseados en menor tiempo de exposición de cloro (solo 20 min) dentro de la campana de flujo laminar, esto reduce el daño en la superficie de los segmentos nodales, aumentando la oportunidad de conseguir una mayor respuesta en inducción de callos.

**Cuadro 7-4** Tratamientos utilizados para la desinfección de segmentos nodales con dos yemas de olivo (*Olea europaea* L.) variedad cornicabra variando el tiempo de exposición de cloro al 30% y variando el tiempo de siembra después de la recolección de explante, para determinar el porcentaje de desinfección evaluado en la 2da semana de cultivo y el porcentaje de explantes sobrevivientes evaluado en la 6ta semana de cultivo

TRATAMIENTOS	RESPUESTA			
	Porcentaje de contaminación por bacteria	Porcentaje de contaminación por hongo	Porcentaje de desinfección	Porcentaje de sobrevivencia de explantes que generaron respuesta <sup>1</sup>
T1 siembra el día de recolección cloro 30 min	0	0 ± 0 b	100 ± 0 a	40 ± 49 a
T2 siembra a 5 días de recolección cloro 20 min	0	26.67 ± 45 a	73.33 ± 45 b	23.33 ± 43 a
T3 siembra el día de recolección cloro 20 min	0	6.67 ± 25 ab	93.33 ± 25 ab	46.66 ± 50 a

<sup>1</sup>El porcentaje promedio de contaminación por hongo, desinfección y sobrevivencia de explantes con letra diferente es significativamente diferentes, según la prueba LSD de Fisher ( $\alpha=0,05$ ). Los promedios se muestran con el límite de confianza al 95%.



**Figura 7-14.** Análisis de varianza para el porcentaje de desinfección promedio, LSD de Fisher ( $\alpha=0,05$ ) mediante el programa Statgraphics. Letras iguales no hay diferencia significativa

## 8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las plantas leñosas, incluyendo la mayoría de los árboles frutales, tienen dificultades para establecer *in vitro* debido principalmente a la oxidación y la contaminación de los explantes (Marques Pinheiro et al., 2013).

El cultivo *in vitro* en otras especies leñosas, como el neem está limitado por la contaminación bacteriana, la oxidación fenólica, bajas tasas de crecimiento y multiplicación, la sensibilidad al bajo intercambio de gases, y la acumulación de etileno dentro de los frascos de cultivo (Rodrigues et al., 2012).

Rodrigues et al. (2012) lograron la desinfección de los segmentos nodales con una yema axilar de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). Los explantes fueron sumergidos en agua destilada y se desinfectaron por inmersión en 70% (v/v) de alcohol etílico durante 1 minuto, seguido de una solución que contiene 5% de hipoclorito de sodio y tres gotas de Tween 20 en 100 mL por 5 minutos y finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Un segundo paso de desinfección se implementó en la campana de flujo laminar por inmersión de los tejidos nuevamente en 70% (v/v) de alcohol etílico durante 1 min y un posterior triple enjuague con agua desionizada esterilizada.

La propagación *in vitro* de especies de *Olea europea* es aún limitada, el problema se agrava por la variación intraespecífica en las respuestas de cultivo de tejidos entre diferentes cultivares (Ali et al., 2009).

Se ha reportado los porcentajes de contaminación para segmentos nodales de olivo usando diferentes métodos de desinfección.

En el trabajo de Marques Pinheiro et al. (2013), después de 30 días de cultivo en medio OM (medio de olivo), se produjo la contaminación del 15% y el 8.8% en los explantes sembrados del cultivar Arbequina y María de la Fe, respectivamente. Observaron que en Arbequina, el 33.3% del total de la contaminación fue causada por hongos, mientras que el 66.7% fue por bacterias. En María de la Fe, del total, 28.6% de la contaminación fue por hongos y 71.4% por bacterias. En este estudio, los explantes se desinfectaron en una solución de Agrimicina y Mancozeb (1 g L<sup>-1</sup>), luego en una solución de ácido ascórbico (100 mg L<sup>-1</sup>) y ácido cítrico (150 mg L<sup>-1</sup>) y finalmente en campana de flujo laminar se sumergieron en alcohol al 70% (1 min) seguido por hipoclorito de sodio (2,5% de cloro activo) con dos gotas de Tween 20 (15 min).

De acuerdo con Rkhis et al. (2011), quienes desarrollaron un protocolo *in vitro* para la micropropagación de olivo cultivar Oueslati, desinfectaron los segmentos nodales comenzando con un lavado con agua del grifo (30 min), posteriormente fueron tratados en campana de flujo laminar mediante la inmersión en hipoclorito de sodio al 12% (8 minutos), y finalmente se lavaron 3 veces con agua destilada estéril.

Yakoub-Bougdal et al. (2007) optimizaron la producción de plantas *in vitro* de *Olea europea* var. Chemlal. Los segmentos nodales fueron desinfectados completamente con una solución de cloruro de mercurio (0,5 g L<sup>-1</sup>) durante 5 minutos, y se trasladaron rápidamente en alcohol al 70%. Después se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

En el cultivo de *O. europaea* L. cultivar Arbequina, Donini et al. (2008) observaron que a los 21 días de evaluación, los segmentos nodales cultivados en los medios MS, MO y WPM mostraron un alto porcentaje de contaminación fúngica (92.95%, 75.71% y 67.56%, respectivamente) y nula contaminación bacteriana (2.37%, 1.33% y 0.32%, respectivamente) a pesar de que las plantas madre fueron rociadas previamente con Agrimicina (estreptomycin) y el fungicida Cercobin a dosis de 2.4 y 0.7 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Los explantes se desinfectaron con la inmersión en 70% de etanol por 1 minuto seguido por una solución de hipoclorito de sodio (2,5% de cloro activo) con una gota de Tween 20 durante 15 minutos y con tres lavados en agua destilada estéril en una campana de flujo laminar.

El cultivo *in vitro* de brotes de olivo (*Olea europaea* L.) variedad Nebbia mostró dificultad para el establecimiento por la contaminación de patógenos. Para superar el problema, Zacchini & De Agazio (2004) expusieron los segmentos nodales con o sin yemas axilares (lavados previamente con agua de grifo por 30 minutos) a cuatro procedimientos de esterilización diferentes. Debido a que los procedimientos con 70% de etanol, seguido de hipoclorito de sodio al 15%, fueron insatisfactorios, se complementaron con el uso de cloruro de mercurio al 0.1%, seguido de hipoclorito de sodio al 15%, lo cual permitió un buen

porcentaje de sobrevivencia de explantes (25%), especialmente cuando se suministran antibióticos (0,5 g dm<sup>-3</sup> carbenicilina y 0,1 g dm<sup>-3</sup> cefotaxima) al medio de cultivo (86%).

Los porcentajes de desinfección para los segmentos nodales en olivo reportados por Solís Candelaria (2015) fueron de un 60 % para la variedad cornicabra y 40% para la variedad manzanilla. Al implementar el mismo protocolo que consistió en dos etapas de desinfección (dentro y fuera de la campana de flujo laminar) se esperaba tener los mismos porcentajes, en este caso en el experimento 1 la variedad cornicabra presentó 45% de desinfección. En este trabajo la mayor parte de la contaminación fue ocasionada por hongos, similar a lo reportado por Solís Candelaria (2015) ya que toda la contaminación fue de origen fúngico.

Se ha observado que las nanopartículas de plata favorecen en alto grado la desinfección, de hecho se observó que es un agente que afecta en gran medida la superficie de los explantes ya que adquieren una coloración más pálida al finalizar su inmersión en nanoplata.

La finalidad del experimento 2 era aumentar la desinfección, modificando el protocolo del experimento 1 y probando diferentes tiempos de inmersión en nanopartículas de plata, siendo el tratamiento control el mismo protocolo pero sin la aplicación de este agente desinfectante.

El efecto de la nanoplata en el experimento 2 permitió la desinfección al 100%, sin embargo, el control también obtuvo el mismo porcentaje por lo que no hubo diferencia estadística significativa.

Este resultado no parecía coherente con el experimento previo (45% de desinfección) que utilizaba inmersión de 30 minutos de nanoplata con respecto al tratamiento control del experimento 2 (100% de desinfección) que omitía la nanoplata.

Sin embargo la diferencia entre ambos experimentos radica en la forma de recolección y conservación del explante. Para el experimento 1, se colectaron explantes de cuatro variedades diferentes y se guardaron en refrigeración juntas en una misma bolsa de plástico hasta su posterior cultivo *in vitro* (alrededor de una semana después). Esto representa dos problemas, primero, si algún explante tenía algún grado de contaminación, había gran riesgo de que se contagiara el explante de la variedad cornicabra al haber estado en contacto y segundo, el espacio donde se guardaron el conjunto de explantes podría no estar en condiciones de higiene adecuadas, lo que provocaría contaminación. En cambio, el experimento 2 no enfrentó esas mismas circunstancias ya que el explante fue colectado individualmente y fue guardado en refrigeración para ser cultivado en un lapso menor a tres días después de la recolección.

Además, no solo se eligió el tratamiento control del experimento 2 como el mejor en cuanto a la desinfección, sino que también el porcentaje de sobrevivencia (40%) presentó diferencia estadísticamente significativa con los tratamientos que incluían nanoplata en su protocolo. Esto se debe a que al eliminar cualquier tiempo de exposición a las nanopartículas de plata, se reduce el daño al tejido en el proceso de desinfección.

Rodrigues et al. (2012) observaron una variabilidad notable en las respuestas *in vitro* entre las 10 plantas donantes de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) provenientes de invernadero. Después de 25 días de cultivo en medio MS, los porcentajes de supervivencia del explante oscilaron entre el 43.8% y el 87.5%, y sólo cinco plantas mostraron porcentajes superiores a 70%.

Muchos trabajos han inducido brotes y callos usando distintas concentraciones de reguladores de crecimiento en segmentos nodales de olivo.

Marques Pinheiro et al. (2013) observaron que en medio OM más 20  $\mu\text{M}$  de zeatina tiene una influencia positiva en el desarrollo de los brotes en explantes de dos cultivares de *O. europaea*, Arbequina y María de la Fe, siendo este medio estadísticamente superior ( $p < 0,05$ ) que el medio OM suplementado con 20  $\mu\text{M}$  de zeatina y 10  $\mu\text{M}$  de GA<sub>3</sub>.

La micropropagación *in vitro* de olivo (*Olea europaea* L. Oueslati) realizada por Rkhis et al. (2011), se llevó a cabo sobre segmentos nodales en Medio de olivo (Rugini, 1984) adicionando 30 g L<sup>-1</sup> de manitol y 8 g L<sup>-1</sup> de agar. Rkhis et al. (2011) evaluaron el efecto de la composición del medio en la proliferación de brotes durante la fase de multiplicación. La mejor propagación se alcanzó utilizando un medio que consistió en una combinación 1:1 de los macronutrientes de los medios MS y medio de olivo, junto con los micronutrientes y vitaminas del medio de olivo suplementado con zeatina (1 y 2 mg L<sup>-1</sup>), lo cual indujo las tasas de multiplicación más altas, con un promedio de más de 9 brotes después de 90 días de cultivo.

Yakoub-Bougdal et al. (2007) obtuvieron la mejor brotación a partir de explantes (segmentos nodales) otoñales de *Olea europaea* var. Chemlal cultivados en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con Bacto-agar (8 g L<sup>-1</sup>) con adición de citoquininas: 2 mg L<sup>-1</sup> BAP (6-bencilaminopurina) o 2 mg L<sup>-1</sup> de KIN (cinetina).

Para determinar el medio de cultivo y la concentración de zeatina adecuada para el establecimiento *in vitro* de olivo var. Arbequina, Donini et al. (2008) evaluaron los segmentos nodales en medio de olivo (Rugini, 1984), MS (Murashige y Skoog, 1962) y medio WPM (Lloyd y McCown, 1980) enriquecido con diferentes concentraciones de zeatina (0, 2 y 4 mg L<sup>-1</sup>). A los 45 días de cultivo observaron diferencias entre los medios de cultivo, y el WPM proporcionó el promedio más alto para el número de brotes, seguido por el medio de olivo.

Los resultados de Ali et al. (2009) indicaron que el medio de olivo es significativamente superior al medio WPM (Woody Plant Medium) mediante la proliferación de un mayor número de brotes por explante (0.84) en el cultivo *in vitro* de olivo variedad Moraiolo. La mejor interacción de ambos medios con citoquininas se produjo cuando se utilizó 3.0 mg L<sup>-1</sup> zeatina en combinación con 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP produciendo un número máximo de brotes de 2.05 por explante en medio de olivo, mientras que el medio WPM produjo sólo 1.50 brotes por explante a la misma concentración de citoquininas. Ali et al. (2009) observaron que el

uso combinado de zeatina y BAP resultó mejor que el uso individual de estos reguladores de crecimiento.

Para la obtención de brotes, García et al. (2002) cultivaron brotes uninodales (a través de la germinación de embriones) de *Olea europaea* L. var Manzanillo durante 60 días en medio de olivo, con 1 mg L<sup>-1</sup> de zeatina y suministrados con 3 concentraciones diferentes de sacarosa o manitol (7.5, 15 o 30 g L<sup>-1</sup>). Los explantes con dos yemas respondían sólo con el manitol ya que estimulaba ambas yemas a brotar. En consecuencia, la longitud total de ambos brotes y el número total de nodos por explante fue mayor que en los explantes con una sola yema. Esto es notable porque oliva se caracteriza por una fuerte dominancia apical *in vitro*, con una escasa formación de brotes secundarios axilares, lo que limita el potencial de micropropagación. Claramente la tasa de multiplicación de los explantes se reforzó por el uso de manitol.

(Zacchini & De Agazio, 2004) trabajaron en olivo (*Olea europaea* L.) cultivar Nebbia (recogieron en invierno de siete árboles cultivados en el campo de cincuenta años de edad) y los segmentos nodales con o sin la escisión de la yema apical se colocaron en dos medio de proliferación durante 1 mes. La proliferación de yema apical se obtuvo en medio de olivo con 36 g dm<sup>-3</sup> manitol y 4.56 µM zeatina de manera satisfactoria. Los explantes cultivados en medio OM mostraron una mejor tasa de proliferación que en medio MS. La escisión de la yema apical promovió una notable mejora en contraste con los explantes que poseían yemas axilares en ambos medios, lo que confirma que esta técnica puede mejorar la capacidad proliferativa de brotes en olivo. La fuerte dominancia apical de los explantes se supera cuando son privados de la yema apical. Esta técnica fuerza la brotación de yemas axilares.

Rodrigues et al. (2012) analizaron el efecto de tres medios de cultivo el medio MS (Murashige y Skoog 1962), JADS (Correia et al., 1995), y el medio WPM (Lloyd y McCown 1981) suplementados con 6-benciladenina (BA), quinetina (KIN), ácido naftalenacético α- (NAA), 3% (w/v) de sacarosa, 1.0 g L<sup>-1</sup> PVP (polivinilpirrolidona) y 0.6% (w/v) de agar; así como el uso de membranas de politetrafluoroetileno (PTFE), en los cultivos *in vitro* de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). Los segmentos nodales cultivados en frascos sellados con membranas de 0,45 micras de PTFE en medio MS con 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de KIN, y 0.05 mg L<sup>-1</sup> NAA, producen el mayor número de brotes (4.04). Esto indica que el uso de matraces con membranas para ventilación es beneficioso para la propagación *in vitro* de esta planta, lo que reduce la aparición de clorosis y senescencia de la hoja. Esto puede ser debido al aumento en el intercambio de gases, sin dejar acumulación de gas de etileno en el interior.

Se ha implementado una estrategia denominada “Sistema de regeneración doble” para lograr la embriogénesis somática en dos cultivares de olivo, Canino y Moraiolo (Rugini & Caricato, 1995); y en manzana (Rugini & Muganu, 1998).

Consiste en la regeneración de brotes adventicios a partir de peciolo de las hojas provenientes de brotes en crecimiento *in vitro*, a continuación, se subcultivan las hojuelas en un medio adecuado hasta la aparición de masas pro-embriónicas (Rugini & Caricato, 1995;

Rugini & Muganu, 1998). Cuando se han obtenido los embriones, el ciclo de la embriogénesis somática se puede mantener indefinidamente (Rugini & Caricato, 1995).

Lambardi et al. (1999) llevaron a cabo un estudio sobre la ontogenia de la embriogénesis somática secundaria en olivo (cv. Canino). En este sistema, las masas morfogénicas se desarrollaron a partir de tejidos maduros (pecíolos de brotes regenerados), y se originaron los embriones primarios. Mediante subcultivo, a partir de los embriones primarios fue fácil obtener el ciclo embriogénico somático de alta eficiencia.

Rugini & Caricato (1995) desarrollaron un sistema cíclico de embriogénesis somática a partir de las masas morfogénicas derivadas de pecíolos de brotes en dos cultivares de olivo (Canino y Moraiolo) sembrados en medio modificado de olivo más 0.5  $\mu\text{M}$  de 6dimethylaminopurina, más 0.44  $\mu\text{M}$  6-bencilaminopurina más 0.25  $\mu\text{M}$  de ácido 3-indolbutírico y 0.42 mM de cefotaxima. El rejuvenecimiento adquirido por los brotes, ya sea directamente de los tejidos de los pecíolos o indirectamente a partir de callos del pecíolo, resultó ser esencial para la posterior inducción de la embriogénesis somática. Los ciclos continuos de embriones sucesivos se han mantenido durante más de dos años en la oscuridad, ya que la luz inhibe la inducción de embriones. Dichos embriones somáticos han permitido la obtención de plantas.

Rugini & Muganu (1998) obtuvieron una fuente de callos morfogénicos durante 1 año al utilizar hojas con pecíolos (hoja primaria) de brotes micropropagados (mantenidos por más de 3 años) de manzana (*Malus x domestica* BorkH.) variedad Golden Delicious, clon B. La técnica requiere una segunda generación de brotes adventicios producidos a partir del cultivo primario de hojas también producido a partir de cultivos de brotes establecidos.

De acuerdo con el protocolo de Rugini & Muganu (1998), después de 3 semanas de cultivo surgieron, de las hojas primarias (incubadas en oscuridad a 23°C por 30 días), yemas adventicias que dieron lugar a callos amarillos y compactos tanto en el pecíolo como en la hoja. Posteriormente, se formaron brotes adventicios, de los cuales derivaron pequeñas hojuelas con pecíolos (hojuelas secundarias). El 70% de las hojuelas secundarias produjo callo después de 12 días en cultivo en la oscuridad y desarrollaron dos tipos de callo, (a) amarillento, homogéneo, compacto y de textura suave y (b) como en (a) pero cubierto con una capa de células hinchadas, dando a la superficie una apariencia esponjosa blanca. La regeneración de brotes a partir de hojas primarias y la obtención de callos en hojuelas secundarias ocurrió en medio A (1/2 MS + 3 mg / L de TDZ la adición de 2% de sacarosa y 0,3% de phytigel).

De acuerdo con **Solís Candelaria (2015)**, el tratamiento compuesto por 2 mg L<sup>-1</sup> de Zeatina más 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 25 mL L<sup>-1</sup> de agua de coco; permitió obtención de callos en olivo (*Olea europaea* L.) variedad cornicabra pero en este trabajo predominó la obtención de brotes (50%). Sin embargo no hubo diferencia estadística significativa con respecto a los otros tratamientos.



Esto puede deberse a que los compuestos de agua de coco vienen en concentraciones pequeñas y no son uniformes por lo que la acción de este componente puede variar.

Se demostró que el mejor tratamiento para inducir una respuesta de 75% de callos en segmentos nodales con dos yemas de olivo variedad cornicabra es con el medio MS a 1/3 de la concentración suplementado con 2 mg/L de TDZ (tratamiento 4).

Rkhis et al. (2011) trabajaron en el cultivo in vitro de segmentos nodales en olivo (*Olea europaea* L. Oueslati) y observaron que los explantes mostraron bajo crecimiento durante los primeros 30 días de cultivo en un medio enriquecido con 1, 2 ó 4 mg L<sup>-1</sup> de zeatina, sus curvas de crecimiento asumieron una forma exponencial en el segundo mes, lo que indicó que el crecimiento máximo se alcanzó durante este período. Por último, la tasa de crecimiento se estabilizó después de 70 días de cultivo y llegar a ser, evidentemente baja después de 90 días. Después de 10 semanas de cultivo, los explantes desarrollaron brotes, 3,0-5,0 cm de longitud, que posteriormente se dividieron en explantes nodales con 1 par de brotes y se subcultivaron dos veces bajo la misma cultura y las condiciones ambientales durante 90 días cada uno.

Marques Pinheiro et al. (2013) reportaron que después de 15 días de cultivo, se observó el inicio de la oxidación en los cultivares de *O. europaea*, Arbequina y María de la Fe. Después de 30 días de cultivo, comenzó la morfogénesis in vitro y se observó la aparición de la producción de callos verdes en tan sólo una repetición del cultivar María de la Fe en medio de OM más 20 µM de zeatina cuando se utilizaron las tapas rígidas sin membranas porosas. Sin embargo, de los dos tipos de sellado usado (tapa rígida sin orificio y la membrana porosa), tapas con membranas porosas llevaron a valores superiores estadísticamente para Arbequina en comparación con María de la Fe.

En el día 45 de cultivo Donini et al. (2008) evaluaron el material con respecto al porcentaje de supervivencia, indicado por el color verde del segmento nodal de olivo var. Arbequina. La baja tasa de supervivencia y de establecimiento se debió al alto porcentaje de contaminación y no en relación con el medio de cultivo utilizado. Sin embargo, se establecieron todos los explantes sobrevivientes pero esto no siempre es un indicativo de la propiedad de supervivencia.

La aparición del tejido calloso a partir de la 8va semana de cultivo, coincide tanto en el experimento 1 como el experimento 2. En ambos experimentos, la proliferación del callo persistió por poco tiempo, en la semana 14 ocurre un oscurecimiento del tejido y en la semana 15 el callo muere.

En el experimento 1 los cultivos estuvieron suplementados con 2 mg/L de TDZ durante las 15 semanas y al observarse que el medio de cultivo se volvía líquido cada 3 semanas a partir de la 11va semana, se implementó la estrategia de retirar el regulador después de 2 meses (experimento 2). Este efecto se ve reflejado en el experimento 2, sin embargo el problema de

cambio de estado del medio no mejoró y debido a que el callo dejaba de proliferar en la semana 12, se decidió que la mejor opción es mantener el regulador todo el tiempo de cultivo.

Esto permitió descartar la posibilidad de que el TDZ estuviera teniendo un efecto negativo en el estado del cultivo, por lo que seguramente el cambio de estado se debió a la liberación de metabolitos, en su mayoría fenoles por parte del callo, lo cual favoreció el cambio del pH del medio volviéndolo líquido.

## 9 CONCLUSIONES

Aunque al principio todo indicaba que la contaminación era el mayor problema a superar, en realidad se debió a otros factores relacionados con la recolección y manejo del explante, ya que si no se tiene cuidado, contribuyen a la contaminación. Se debe considerar seleccionar una planta madre libre de patógenos y cuidar que los explantes sean brotes recién formados. Guardar en un periodo prolongado los explantes en refrigeración promueve a la contaminación cuando el lugar donde se guardan dichos explantes no está completamente desinfectado, por lo que es preferible sembrarlos tan pronto como sean recolectados.

Se comprobó la acción desinfectante que tiene las nanopartículas de plata al garantizar el 100% de desinfección de los explantes pero no es conveniente dado que el porcentaje de sobrevivencia es nulo.

Se determinó que el 100% de desinfección en los explantes se logra siguiendo el protocolo inicial (manteniendo dos etapas de desinfección fuera y dentro de campana) pero eliminando el uso de la nanoplata y reduciendo el tiempo de exposición de hipoclorito de sodio al 30% a solo 20 minutos de inmersión, lo que permite garantizar una sobrevivencia de los explantes del 46.66%.

En este estudio el porcentaje de desinfección supera los límites aceptables en comparación con otros métodos utilizados para establecer el cultivo in vitro del olivo por lo que se sugiere el uso del protocolo de desinfección desarrollado en este trabajo.

El tratamiento que mostró una mejor inducción de callos (75% de inducción de callos) en el cultivo de olivo (*Olea europaea* L.) variedad cornicabra es suplementando el medio MS a la 1/3 de concentración con 2 mg/L de TDZ. Para prevenir fenolización de los explantes es suficiente con adicionar al medio 5 mg/L de ácido cítrico y ascórbico.

No hubo un tratamiento estadísticamente significativo para la inducción de brotes pero el que mayor porcentaje dio (50%) fue el que estuvo suplementado con 2 mg/L de Zeatina más 2 mg/L de BAP y 25 ml/L de Agua de Coco.

La aparición de contaminación se presentó máximo hasta las 2 semanas de cultivo, y a partir de la sexta se puede evaluar la sobrevivencia de los explantes. En la octava semana se puede apreciar los explantes que inducirán callos y finalmente en la 15ava ocurre la muerte del explante.

El TDZ no afecta la estabilidad del medio de cultivo, la conversión del medio sólido a líquido se debió a la secreción de fenoles derivados del callo, por lo que es necesario realizar resiembras cada 3 semanas después de los primeros 2 meses de cultivo.

## 10 RECOMENDACIONES

Ensayar otros cultivares de olivo u otras especies leñosas con importancia comercial mediante protocolos similares de desinfección e inducción de callo y evaluar si presentan alta respuesta para que posteriormente sean utilizados como materia prima en un proyecto para la extracción de metabolitos secundarios. La micropropagación de especies de olivo es limitada, entre otras dificultades, por la variación intraespecífica en las respuestas de cultivo de tejidos entre diferentes cultivares (Ali et al., 2009). El protocolo desarrollado en este trabajo no puede garantizar el mismo tipo de respuesta con respecto a otras variedades de olivo ya que cada cultivar posee características genotípicas diferentes, sin embargo los métodos aquí presentados pueden servir como punto de partida para proponer un protocolo particular para la desinfección de explantes e inducción de callos.

La investigación futura de la propagación *in vitro* de olivo debe incluir el estudio de las tapas de cerrado de los frascos ya que permiten mayor intercambio de aire y puede tener efectos positivos sobre la morfogénesis, las tasas de propagación, aclimatación, la reducción de la senescencia e hiperhidricidad tal y como ocurre en el estudio de Rodrigues et al. (2012).

Es recomendable trabajar con pocas variedades de una planta para desarrollar un cultivo *in vitro* ya que al poseer un genotipo diferente éstas pueden tener requerimientos diferentes y por lo tanto, mostrar un comportamiento diferente en función de las hormonas y el método de desinfección empleados. En caso de evaluar varios cultivares, lo ideal es separarlos desde el momento de la recolección ya que si alguno posee algún grado de contaminación que fue imposible detectarlo a simple vista, podría haber un contagio si los explantes se llegan a poner en contacto hasta el momento de su siembra.

El método de selección de la planta madre es importante, es preferible que sea una planta joven y se debe evitar que presente algún síntoma de enfermedad. También se recomienda no regar la planta madre por lo menos tres días antes de la recolección para reducir la incidencia de la contaminación.

Hay que considerar el periodo bajo el cual fue recolectado el explante ya que el estado fenológico de la planta madre, de donde fueron obtenidos, puede influenciar el grado de respuesta durante el cultivo *in vitro*.

Sería interesante evaluar diferentes periodos de recolección de explante de olivo para saber cuál es el periodo optimo y a partir de ahí llevar a cabo las pruebas con reguladores de crecimiento para potenciar las respuestas favorables en los explantes

Se debe cuidar la forma en cómo se recolecta el explante, es adecuado tomar brotes recién formados y evitar recoger el tejido más viejo y gruesos, ya que hay menos probabilidad de obtener respuesta. Es importante tomar la suficiente cantidad de explantes a emplear para evitar almacenar el material vegetal sobrante para una posterior siembra, ya que hacer esto le resta vigorosidad a los explantes y provoca mayor riesgo de contaminación si no se guarda apropiadamente en un lugar desinfectado. Se recomienda usar el explante lo más pronto posible desde la recolección, pero en caso de no ser así, es importante guardarlo en refrigeración en un contenedor individual o en bolsas de plástico siempre y cuando se mantenga aislado de otro tipo de material vegetal y conservando limpio el sito de refrigeración.

Es recomendable inspeccionar el material destinado para la preparación del medio de cultivo antes de usarse en el laboratorio, por ejemplo que los frascos y tapas se encuentren en buenas condiciones y que dichas tapas embonen bien en los frascos.

Gracias al experimento 2, se consiguió la desinfección del 100% de los explantes. En el experimento 3 se trató de optimizar el método ya que se deseaba que los explantes tuvieran una mayor sobrevivencia. El mejor tratamiento que se seleccionó fue el que empleaba 20 minutos en exposición de cloro. Este tratamiento no afecta tanto al explante aunque presento contaminación fúngica mínima de 6.67 %, se sugiere aumentar el tiempo de exposición con la solución de Agry-micin® (3g L<sup>-1</sup>) y Captan® (1.25 g L<sup>-1</sup>) en la fase de descontaminación fuera de campana.

La manipulación del material en la campana es importante ya que si no se cuidan ciertos aspectos puede haber contaminación y es difícil determinar si ésta proviene de la planta o debido al factor humano o ambiental. Dentro de la campana de flujo laminar es indispensable contar con agua destilada estéril, ya sea para preparar soluciones o para enfriar algunos utensilios. Hay que verificar que el agua que se emplea para dicho fin esté limpia y que su uso dentro de la campana sea dentro de un intervalo de tiempo adecuado después de su esterilización ya que si se excede, podría ser un vehículo que facilite el acarreo de microorganismos. Es recomendable manejar poco material dentro de la campana de extracción, de no hacerlo se interrumpiría la correcta circulación del flujo de aire al ser obstaculizado por el material dentro y esto evita la limpieza adecuada del ambiente interno.

Dado que es difícil determinar cuál explante es el indicado para dar lugar a una determinada respuesta, resulta útil sembrar de 5 a 10 explantes por frasco para obtener el mayor número de respuestas favorables posibles.

Es importante monitorear semanalmente la evolución del cultivo ya que el tipo de respuesta que puede presentar es variable, en éste cultivar a la 5ta semana empieza a haber un cambio de coloración que conlleva a la muerte de los explantes.

Marques Pinheiro et al. (2013) observaron que 30 días de permanencia en el mismo medio de cultivo influyeron en el aumento del porcentaje de oxidación en explantes in vitro de variedades de olivo Arbequina y María de la Fe.

En este trabajo la sobrevivencia del explante decayó en la 5ta semana por lo que se recomienda implementar la estrategia de Marques Pinheiro et al. (2013) por medio del subcultivo de explantes de cultivar Arbequina y María de la Fe cada 15 días en el mismo medio de cultivo, con la concentración de  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  PVP (polivinilpirrolidona), el cual previene la oxidación de los explantes.

Se recomienda que la fuente de explantes derive de brotes generados previamente in vitro, por lo que la inducción de brotes sería adecuado llevarlo a cabo en tubos de ensayo (20x15 mm) con 8 mL de medio de cultivo como alternativa para realizar el cultivo in vitro en olivo.

En este caso en particular que se tenía como finalidad obtener callos es recomendable evaluar el grado de contaminación por parte del explante mediante una prueba de esterilidad de 2 semanas pero siempre respetando el contenido del medio de cultivo para inducción de callos sin excluir la hormona principal (TDZ), ya que se observó que al hacer una prueba de esterilidad de 2 semanas sin TDZ hubo formación de brotes en algunos explantes.

Se recomienda continuar con ensayos que permitan establecer un protocolo eficiente para la regeneración de brotes tanto en esta como en otras variedades, utilizando el cultivo de segmentos nodales con dos yemas. El agua de coco 25 mL/L permitió la generación de brotes aunque también, algunos explantes formaron callo y a partir de éste dieron origen a un brote (via embriogénesis directa), podría ser pertinente evaluar la interacción de diferentes concentraciones de agua de coco con TDZ con la finalidad de reducir un poco la concentración de esta hormona y depender un poco más del agua de coco con el objetivo de reducir costos. Existe un potencial en encontrar una mejor combinación de reguladores de crecimiento y establecer la concentración óptima que promueva la formación de brotes.

Para un adecuado mantenimiento del cultivo de olivo, es necesario recordar que el callo comienza a aparecer en la 8va semana y en la 9na el medio se empieza a volver líquido por lo que se debe resembrar. A partir de ese momento, cada 3 semanas será necesario realizar resiembras a causa de dicho comportamiento en el medio.

## 11 COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS

1. Trabajo en equipo propiciando un ambiente de cooperación en el laboratorio y diálogo entre compañeros con el fin de intercambiar experiencias valiosas que permitan lograr una mayor oportunidad de éxito a lo largo de la residencia.
2. Desarrollo de la capacidad emprendedora y de innovación, actuando con iniciativa ante las dificultades y retos que se presentaron durante la residencia para proponer soluciones, potenciando con calidad el compromiso y desempeño en la práctica profesional.
3. Prevenir y dar solución a problemas que suelen presentarse dentro de la práctica de la ingeniería bioquímica, particularmente los relacionados con la manipulación de tejido vegetal garantizando trabajar bajo control en equipos como lo es la campana de flujo laminar.
4. Aplicar métodos relacionados con el campo de acción de la ingeniería bioquímica para aprovechar los recursos bióticos, utilizando material de origen vegetal para satisfacer necesidades en sectores como el biotecnológico y el farmacéutico.
5. Realizar investigación científica y tecnológica en el campo de la ingeniería bioquímica y difusión de resultados a través de la generación del informe técnico de residencia.
6. Desarrollo de proyectos enfocados en la conservación y propagación de plantas con interés comercial empleando los conocimientos de cultivo de tejidos vegetales.

## 12 BIBLIOGRAFIA

Ali, A., Ahmad, T., Abbasi, N. A., & Hafiz, I. A. (2009). Effect of different media and growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of olive cultivar 'Moraiolo'. **Pakistan Journal of Botany**, v.41, n.2, p.783-795.

Arafeh, R. M., Shibli, R. A., Mahmoud, M. A., & Shatnawi, M. A. (2006). Callusing, cell suspension culture and secondary metabolites production in Persian oregano (*Origanum vulgare* L.) and oregano (*O. syriacum* L.). *Jordan J Agric Sci*, 2, 274–282.

Astello-García, M. G., Robles-Martínez, M., Barba-de la Rosa, A. P., & del Socorro Santos-Díaz, M. (2013). Establishment of callus from *Opuntia robusta* Wendl., a wild and medicinal cactus, for phenolic compounds production. *African Journal of Biotechnology* 12: 3204–3207.

Breton, C. M., Warnock, P., & Bervillé, A. J. (2012). Origin and history of the olive. En I. Muzzalupo (Ed). *Olive germplasm: the olive cultivation, table olive and olive oil industry in Italy* (pp. 3–22). InTech, Rijeka, Croatia.

Chiappetta, A., & Muzzalupo, I. (2012). Botanical description. En I. Muzzalupo (Ed). Olive germplasm: *the olive cultivation, table olive and olive oil industry in Italy* (pp. 34-49). Croatia.

Donini, L. P., Schuch, M. W., Ribeiro, M. d. F., de Souza, J. A., & Soares, G. C. (2008). In vitro establishment of olive tree cultivar 'Arbequina' for micropropagation starting. *Ciencia Rural*, 38(6), 1769-1772. doi:10.1590/s0103-84782008000600045

Duangporn Premjet, Kazutaka Itoh & Sanro Tachibana. (2002). Enhancement of Podophyllotoxin Production by Biogenetic Precursors and Elicitors in Cell Suspension Cultures of *Juniperus chinensis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5: 1267-1271.

Fabbri, A., Bartolini, G., Lambardi, M., & Kailis, S. G. (2004). Olive propagation manual. CSIRO Publishing, Canberra.

Foxhall, L. (2007). Olive cultivation in ancient greece: *seeking the ancient economy*. Oxford.

García, J. L., Troncoso, J., Sarmiento, R., & Troncoso, A. (2002). Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, p.95-100.

Gentile, L., & Uccella, N. A. (2014). Selected bioactives from callus cultures of olives (*Olea europaea* L. Var. Coratina) by LC-MS. *Food Research International*, 55:128–136. doi: 10.1016/j.foodres.2013.10.046.

Jin, Ch'ng Song, & Keng, Chan Lai. (2013). Factors Affecting the Selection of Callus Cell Lines and the Preparation of the Cell Suspension Culture of *Artemisia annua* L. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*; Vol 23, No 2; 157-163.

Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1222-1239.

Lambardi, M., Caccavale, A., Rugini, E., & Caricato, G. (1999). Histological observations on somatic embryos of olive (*Olea europaea* L.). *Acta Hort.* 474: 67-70.

Loureiro, J., Rodriguez, E., Costa, A., & Santos, C. (2007). Nuclear DNA content estimations in wild olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sylvestris* Brot.) and Portuguese cultivars of *O. europaea* using flow cytometry. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v.54, p.21-25.

Mahalakshmi, R., Eganathan, P., & Parida, A. K. (2013). Salicylic acid elicitation on production of secondary metabolite by cell cultures of *Jatropha Curcas* L. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; 5(4): 655-659.

Marques Pinheiro, M. V., Martins, F. B., Xavier, A., & Otoni, W. C. (2013). Gas exchange affects *in vitro* morphogenesis of two olive cultivars (*Olea europaea* L.). *Revista Arvore*, 37(1), 19-29.

Mathew, R., & Deepa Sankar, P. (2014). Comparison of major secondary metabolites quantified in elicited cell cultures, non-elicited cell cultures, callus cultures and field grown plants of *Ocimum*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.

Muzzalupo, I., Vendramin, G. G., & Chiappetta, A. (2014). Genetic biodiversity of Italian olives (*Olea europaea*) germplasm analyzed by SSR markers. *Sci. World J.* 2014, 1–12. doi: 10.1155/2014/296590

Namdeo, A. G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacogn. Rev.* 1, 69–79.

Rahman, M. A., & Bari, M. A. (2014). Callus induction and cell culture of castor (*Ricinus communis* L. CV. Shabje). *Journal of Bio-Science*, [S.I.], v. 20, p. 161-169. Available at: <<http://www.banglajol.info/index.php/JBS/article/view/17738>>.doi:<http://dx.doi.org/10.3329/jbs>

Ramli, U. S., Salas, J. J., Quant, P.A., & Harwood, J. L. (2005). Metabolic control analysis reveals an important role for diacylglycerol acyltransferase in olive oil but not in oil palm lipid accumulation. *FEBS J.* 272, 5764-5770. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04964.x>

Rkhis, A. C., Maalej, M., Drira, N., & Standardi, A. (2011). Micropropagation of olive tree *Olea europaea* L. 'Oueslati'. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35(4), 403-412. doi:10.3906/tar-1002-741

Rodrigues, M., Costa, T. F., Festucci-Buselli, R., Silva, L., & Otoni, W. (2012). Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. DOI: 10.1007/s11627-011-9398-8 (Online First™, 23 September 2011).

Rugini, E., & Caricato, G. (1995). Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) "Canino" and "Moraiolo". *Plant Cell Rep.* 14, 257-260.

Rugini, E., & Muganu, M. (1998). A novel strategy for the induction and maintenance of shoot regeneration from callus derived from established shoots of apple [*Malus x domestica* BorkH.] cv. golden delicious. *Plant Cell Reports* 17, 581-585



Rugini, E., & Gutiérrez-Pesce, P. (2006). Genetic improvement of olive. **Pomologia Croatica**, v.12, p.43-74.

Solís Candelaria, A. (2015). Micropropagación de especies comerciales de olivo (*Olea europea* L.) vía organogénesis (Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica). Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Yakoub-Bougdal, S., Cherifi, D., & Bonaly, J. (2007). Optimization of the production of vitroplants of *Olea europea* var. Chemlal. *Cahiers Agricultures*, 16(2), 125-127. doi:10.1684/agr.2007.0079