

Establecimiento *in vitro* de cuatro variedades de olivo cultivadas a campo (*Olea europea* L.)

Turina, C. A. y Bima, P.

RESUMEN

Las plantaciones de olivo (*Olea europea* L.) presentan problemas sanitarios que comprometen la producción y pueden mitigarse con el saneamiento vegetal mediante la obtención de plantas cultivadas *in vitro*. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo de establecimiento *in vitro* de material vegetal proveniente de plantas adultas cultivadas a campo. Se evaluaron cuatro métodos de desinfección y la respuesta de los explantos a las citocininas 6-benciladenina (BA) y zeatina, fuentes de carbono (sacarosa y manitol), al carbón activado (0 y 1 g.L⁻¹) y el efecto de las épocas de recolección de material vegetal. El uso de ultrasonido, durante la desinfección, permitió obtener valores de establecimiento adecuados (44 %). El BA mejoró la brotación (36 % vs. 24%), al igual que el manitol (75 % vs. 20 %). El agregado de carbón activado no influyó en la sobrevivencia y brotación. Se observaron diferencias entre las épocas de recolección, influenciadas, además, por la variedad. La primavera fue, para todas las variedades, la época más favorable para la recolección de estacas; se obtuvieron los mayores porcentajes de brotación, desde un 21 a un 62 %, y los menores porcentajes de contaminación, siendo Frantoio y Manzanilla las variedades menos afectadas.

Palabras clave: ultrasonido, zeatina, 6-benciladenina, manitol, carbón activado.

Turina, C. A. and Bima, P. 2017. *In vitro* establishment of four olive varieties grown in the field (*Olea europea* L.). Agriscientia 34 (II): 59-68

SUMMARY

Plant sanitation through *in vitro* culture helps addressing sanitary issues that affect olive production (*Olea europaea* L.). Our goal was to develop a protocol for *in vitro* establishment of plant material obtained from adult plants grown in the field. We tested four methods of disinfection, the explants response to two cytokinins (BA, zeatin), two carbon sources (sucrose, mannitol), and activated charcoal (0 y 1 g.L⁻¹), and the impact of the season in which materials were collected. The use of ultrasound during disinfection allowed satisfactory establishment rates (44 %). BA improved sprouting (36 % vs. 24 %), and so did mannitol (75 % vs. 20 %). The addition of activated charcoal did not show

statistically significant effects on both survival and sprouting. We observed variations depending on the season of collection and the plant variety. Spring was –for all varieties– the most favourable time to collect explants: the highest sprouting rates (21 % to 62 %) and the lowest contamination levels were obtained, Frantoio and Manzanilla being the varieties least affected by contamination.

Key words: ultrasound; zeatin; 6-benzyladenine; mannitol; activated charcoal.

C. A. Turina: *Becaria SeCyT Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Laboratorio de Biotecnología vegetal, Córdoba, Argentina.* P. Bima: *Laboratorio de Biotecnología vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Correspondencia a: ceciliaturina@gmail.com*

INTRODUCCIÓN

El olivo (*Olea europea* L.) es una especie frutal importante en el mundo, tanto por la superficie implantada, como por la calidad de su aceite. En la provincia de Córdoba, Argentina, es el cultivo frutal con mayor superficie; según los últimos datos oficiales, la producción estimada es de unas 8000 toneladas anuales (INDEC, 2004).

Como consecuencia de la introducción de cultivares provenientes del extranjero, se comenzaron a detectar problemas sanitarios de plagas y enfermedades (Oriolani *et al.*, 2008). Uno de los problemas más serios, que compromete la producción, es el causado por el hongo *Verticillium dahliae* Kleb. Así mismo, en las plantaciones se reconoce la existencia de individuos que presentan un mejor comportamiento frente a condiciones adversas, cuya preservación y multiplicación resultan de sumo interés.

La biotecnología ofrece una herramienta fundamental en los programas de saneamiento y propagación de especies vegetales que se multiplican en forma agámica; permite superar algunas dificultades experimentadas con las técnicas convencionales de propagación y obtener plantas libres de patógenos (Ahmed *et al.*, 2001; Khan, Raced y Carwash, 2002; Fabbri, Bartolini, Lambardi y Kailis, 2004).

El establecimiento aséptico *in vitro* de explantos procedentes de plantas leñosas, adultas y cultivadas directamente a campo presenta problemas, debido a la presencia de microorganismos contaminantes, oxidación, necrosis y falta de reactividad (Rugini y Baldoni, 2005; Hernández y Gonzáles, 2010). El método de desinfección utilizado depende, en general, de varios factores que incluyen la fuente de explantos, la edad de la planta madre y el genotipo (Lazo Javalera *et al.*, 2016).

Al iniciar el cultivo *in vitro* de plantas cultivadas a campo es necesario ajustar el proceso de desinfección para lograr un protocolo eficiente que permita obtener una cantidad óptima de explantos estériles y con bajo nivel de toxicidad para el usuario. En olivo se han propuesto tratamientos con hipoclorito de calcio o de sodio, a diferentes concentraciones, solos o en combinación con cloruro de mercurio (HgCl) o benomil (Lambardi y Rugini, 2003; Chaari Rkins, Maalej, Drira y Atandardi, 2011; Leva, Saadegui y Petruccelli, 2013). Sin embargo es necesario establecer protocolos que aseguran un buen porcentaje de explantos desinfectados. El uso de lavadoras de ultrasonido puede mejorar el proceso de desinfección como demostraron Vilchez *et al.* (2011) en *Xanthosomasa gittifolium* (L.) Schott.

Además, la eficiencia de esta etapa depende del prendimiento de los explantos desinfectados; se ha estudiado el efecto de la fuente de hidratos de carbono, sacarosa y manitol durante la etapa de multiplicación *in vitro* (Leva, Petruccelli y Bartolini, 1994; Leva *et al.*, 2013), aunque no sus efectos en la brotación de yemas axilares de explantos provenientes de plantas adultas cultivadas a campo.

Con relación a los reguladores de crecimiento, la zeatina es la citocinina que produce la máxima brotación en el olivo (Rugini, 1984). Al ser una hormona de origen natural, su elevado costo encarece los protocolos de micropropagación masiva (Silva, 2017). Hay investigaciones que proponen combinaciones de reguladores de crecimiento con los fines de reemplazar la zeatina (Grigoriadou, Vasilakakis y Eleftheriou, 2002; Peixe, Raposo, Lourenco, Cardoso y Macedo, 2007; Peyvandi *et al.*, 2009). Pero no todas las variedades de olivo responden de igual manera a estas combinaciones por lo que no pueden ser consideradas de uso general (Rugini, 2004). En este sentido, Man-

gal, Sharma, Sharma y Kumar (2014) establecen como óptima la combinación de 1 mg.L⁻¹ de IBA y 1mg.L⁻¹ de kinetina.

La fecha de recolección de los explantos también influye en el éxito del establecimiento *in vitro*, siendo determinante en la adaptación a las condiciones de cultivo. En general, las épocas de activo crecimiento (primavera, verano) son las mejores, con valores bajos de contaminación (Rodrigues *et al.*, 2003; Parada Ponce y Villegas, 2009).

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar para cuatro variedades de interés de olivo un protocolo de establecimiento *in vitro* de explantos procedentes de plantas madres adultas cultivadas a campo, para lo cual se plantea determinar la eficiencia del uso de lavadoras de ultrasonido en la desinfección superficial de explantos en combinación con las técnicas y agentes desinfectantes tradicionales; evaluar el efecto de BA, del carbón activado y de la fuente de carbono agregados al medio de cultivo, sobre la sobrevivencia de los explantos y definir la mejor época de recolección de material para el inicio del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Estacas de 10 a 15 cm de largo de plantas adultas, de las variedades Frantoio, Arauco, Manzanilla, Arbequina y Oblonga, se recolectaron de plantaciones a campo y se guardaron en bolsas de polietileno dentro de una conservadora con frío a los fines de disminuir la temperatura y evitar su deshidratación hasta su procesamiento en el laboratorio donde se eliminaron las hojas y se seccionaron en estacas uninodales (explanto), de la porción comprendida entre el segundo y cuarto entrenudo.

Ensayo de desinfección de explantos provenientes de campo

Para la desinfección se plantearon cuatro tratamientos combinando tiempos y técnicas de

lavado y exposición a agentes desinfectantes del material recolectado en otoño. El proceso de desinfección comenzó con el lavado de las estacas con agua y detergente durante 60 min en agitación, con un recambio a los 30 min, o bajo agua corriendo, durante 60 min. Posteriormente se colocaron en una mezcla desinfectante (Md), compuesta por fungicidas y un bactericida (Tabla 1), en agitación constante por 60 min o durante 20, 30 min, en lavadora de ultrasonido. Como último paso, las estacas se sumergieron en soluciones de alcohol al 70 % por un minuto y luego de hipoclorito de sodio al 1,5 % de producto activo durante 15 min, en agitación o en ultrasonido según tratamiento (Tabla 2). Posteriormente se realizaron dos enjuagues en frascos con agua destilada con ácido ascórbico (150 mg.L⁻¹) esterilizados y se dejaron en reposo en un tercer frasco con la misma preparación, por media hora.

El medio de cultivo utilizado para el establecimiento *in vitro* fue el *Olive Medium* (medio de oliva, en adelante OM) descrito por Rugini (1984) suplementado con zeatina 0,5 mg.L⁻¹ y 30 g.L⁻¹ de sacarosa.

Tabla 1. Componentes y concentraciones de p.c. de la mezcla desinfectante utilizada en la desinfección de explantos de olivo para su establecimiento *in vitro*.

Componente	Concentración de p.c.
Mancozeb	2,5 g.L ⁻¹
Amixtar top	1 ml.L ⁻¹
AGRY-GENT PLUS®	2,5 g.L ⁻¹

Ensayos de fuente y concentración de citocininas

Para comparar el efecto de dos citocininas en el establecimiento *in vitro* de los explantos introducidos en la época de otoño de las variedades, Arauco, Arbequina, Frantoio y Manzanilla, se suplementó el medio de cultivo (OM de introducción: macronutrientes a la mitad de su concentración) con 0.5 mg.L⁻¹ de zeatina o 0.05, 0.1 y 0.2 mg.L⁻¹ de BA.

Tabla 2. Tratamientos según tiempo y técnica de lavado, tiempo y técnica de exposición a Md, tiempo y técnica de exposición a hipoclorito de sodio.

Tratamiento	Lavado		Mezcla desinfectante		Hipoclorito de Sodio	
	Tiempo	Técnica	Tiempo	Técnica	Tiempo	Técnica
1	60´	Agitación	60´	Agitación	15´	Agitación
2	60´	Agua corriendo	60´	Agitación	15´	Agitación
3	60´	Agitación	20´	Ultrasonido	15´	Ultrasonido
4	60´	Agitación	30´	Ultrasonido	15´	Ultrasonido

Ensayos de fuentes de carbono y carbón activado

Este ensayo se realizó en primavera con la variedad Oblonga. Se suplementó el medio de cultivo con dos fuentes de carbono, sacarosa o manitol, en tres concentraciones: 30, 45 y 60 g.L⁻¹, en presencia o ausencia de carbón activado (0 y 1 g.L⁻¹). El medio de cultivo utilizado fue el OM de introducción con 0,2 mg.L⁻¹ de BA.

Ensayos de época de introducción

El estudio de la influencia de la época de recolección de material a campo, se realizó por tres años consecutivos (2013-2014, 2014-2015 y 2015-2016), tomando estacas de las plantas de los olivares en tres épocas dentro de cada período: otoño, primavera y verano. En otoño la colecta de material a campo fue realizada antes de la caída de la primera helada; en primavera, después de la caída de la última helada del año y en verano, luego de que llovieran aproximadamente 100 mm.

El método de desinfección utilizado fue el que mostró los mejores resultados en el ensayo de establecimiento de los explantos introducidos.

El medio de cultivo utilizado fue el OM de introducción, suplementado con 0,2 mg.L⁻¹ de BA y 30 g.L⁻¹ de manitol. Se adicionó al medio 1 mg.L⁻¹ de carbón activado.

Para todos los ensayos, el pH de los medios de cultivo se ajustó en 5,7 y se solidificaron con 7 mg.L⁻¹ de agar-agar, luego fueron fraccionados en tubos de ensayo, a razón de 10 ml/tubo. Para su esterilización, se autoclavaron por 20 min a 121 °C y 1 atm de presión.

Se sembró un explanto por tubo ($n=24$ por cada tratamiento), introduciendo en el medio un tercio de su longitud conservando la polaridad. La boca del tubo se selló con polietileno termocontraíble.

Los tubos sembrados se mantuvieron en cámara de cría, por un período de 35 días, a una temperatura de 28 °C - 24 °C (día/noche), la primera semana en oscuridad y luego con fotoperiodo de 16 horas de luz (40 mmol m⁻²/S).

Análisis estadístico

Las variables a evaluar en los explantos introducidos a los 28 días posteriores a la fecha de introducción fueron, porcentaje de contaminación debido a hongos, bacterias, levaduras; porcentaje de oxidación (estacas y yemas totalmente oscuras); porcentaje de sobrevivencia (explantos con

más de un tercio de su superficie verde) y a los 35 días posteriores a la fecha de introducción fue el porcentaje de brotación (yemas con el primer par de hojas expandidas).

Con el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017) se analizaron los resultados obtenidos mediante un modelo lineal generalizado mixto. El test de comparación utilizado fue DGC con un nivel de significación menor o igual a 0,05 (Di Rienzo, Guzman y Casanoves, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo de desinfección de explantos provenientes de campo

El primer paso en la micropropagación de cualquier especie es el establecimiento aséptico del cultivo, en el caso de especies leñosas, es particularmente difícil, no solo por la carga de microorganismos sino también por la mayor predisposición a la oxidación y muerte de explantos en esta etapa del cultivo *in vitro* (Otero y Docampo, 1998; Roussos y Pontikis, 2001; Wendling y Xavier, 2001; Lambardi, Ozudogru y Roncasaglia, 2013). Esto es particularmente complejo cuando se trata de ejemplares selectos de plantaciones perennes a campo, donde el material inicial utilizado para el establecimiento *in vitro*, está expuesto a diferentes condiciones ambientales, con mayor carga de agentes contaminantes en su superficie que la de cultivos protegidos en invernaderos. (George, 1993; Hernández y Gonzáles, 2010). Algunos autores (Roussos y Pontikis, 2002; Santos *et al.*, 2003; Chaari Rkins, 2011; Leva *et al.*, 2013) han propuesto, para explantos provenientes de plantas adultas de olivo cultivadas a campo, tratamientos de desinfección con lavados de 30 min bajo agua corriente seguidos de inmersiones de 3 a 10 min en hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones (10 y 25 %), solo o en combinación con benomil (1 g.L⁻¹ de producto concentrado, en adelante p.c.) pero, en estos trabajos, no se muestra el éxito de los procesos de desinfección. En la bibliografía se nombran diversos agentes con mayor o menor grado de toxicidad y con gran aleatoriedad de resultados (Otero y Docampo, 1998; Zachinni y Agazio, 2004). Para lograr alta eficiencia en la propagación a escala es necesario generar un protocolo que se ajuste a diversas variedades y con el menor nivel de toxicidad posible para el usuario. Por esta razón se plantea el uso de lavadoras de ultrasonido en la desinfección superficial de los explantos, en combinación con las técnicas tradicionales.

Para el análisis estadístico se tomaron los datos

de las cuatro variedades conjuntamente. De esto surge que el uso de ultrasonido tuvo un efecto estadísticamente significativo en los resultados obtenidos para las variables contaminación y oxidación (Tabla 3). También, el tiempo de exposición de los explantos a la Md, influyó en la eficiencia de la desinfección. De la suma de efectos surge que el tratamiento 4, con 22 % de explantos contaminados, es el que mejor se ajustó con diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$), respecto de los otros, y que en el tratamiento 2 fue donde se observó la mayor proporción de contaminación (56 %). El uso del ultrasonido en el proceso de desinfección de los explantos permitió reducir de manera relevante los valores de contaminación y obtener el mayor porcentaje de sobrevivencia: 44 % (Tabla 3), al igual que Vilchez *et al.* (2011) observara en Ocuño blanco (*Xanthosomasa gittifolium* (L.) Schott). También Aller, Fernandez-Gomez y Diez (1978), citado por Gaba *et al.* (2006) describe el éxito de la desinfección con ultrasonido en la eliminación de bacterias externas en cultivo de meristemas de raíz de bulbos de cebolla. Los valores de contaminación obtenidos se pueden considerar óptimos si se tiene en cuenta que se reportan porcentajes de contaminación de 3 % a 90 %, para plantas adultas mantenidas a campo, en *Prunus* (Hammerschlag, 1982; Rodrigues *et al.*, 2003; Couto, Ucker y Pedroso de Oliveira, 2004), *Annona muricata* L. (Maldonado, Villalobos y De Sierralta, 2001) y olivo (Otero y Docampo, 1998; Zachinni y Agazio, 2004; Donini *et al.*, 2008).

Respecto de la sobrevivencia de los explantos introducidos, se observaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre variedades y no entre tratamientos siendo Arauco y Manzanilla las de mejor respuesta respecto de Arbequina y Frantoio (Figura 1).

En cuanto a los valores de oxidación los más altos fueron los de los tratamientos 3 y 4 con valores cercanos al 30 % con diferencias significativas ($P \leq 0,05$) respecto del resto de los tratamientos. Si bien, el uso de ultrasonido puede provocar daños o estrés en los tejidos, estos son mínimos, con relación al efecto sobre los microorganismos como ha demostrado Gaba *et al.* (2006).

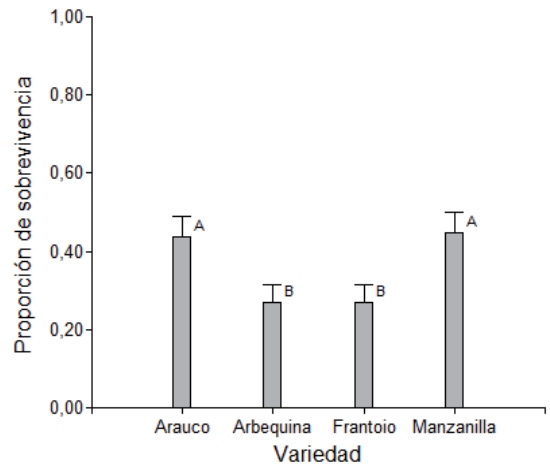


Figura 1: Proporción de sobrevivencia de explantos de las variedades Arauco, Arbequina, Frantoio y Manzanilla independientemente del tratamiento de desinfección. *Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$)

Ensayos de fuente y concentración de citocininas

Un componente indispensable en los medios de cultivo *in vitro* son los reguladores del crecimiento. En la micropropagación del olivo, se reporta que la zeatina es la citocinina que produce la máxima brotación. Ha sido utilizada por la mayoría de los autores en concentraciones que van desde 4,56 a 45,62 μM (Lambardi y Rugini, 2003). Debido al elevado costo de adquisición de la zeatina, es necesario sustituirla en los protocolos de producción masiva. Hay investigaciones que proponen otras fuentes de citocininas en reemplazo de la zeatina durante el establecimiento *in vitro* (Grigoriadou *et al.*, 2002; Peyvandi *et al.*, 2009), pero no se detallan los resultados de sobrevivencia o brotación de los explantos.

Al final de la etapa de establecimiento *in vitro* se estimaron las proporciones de sobrevivencia y brotación, con respecto a los explantos introducidos, y se analizaron mediante un modelo lineal generalizado mixto, en el que se puede observar que la variable sobrevivencia responde a la variedad y no al tipo ni concentración de hormonas, mientras que

Tabla 3: Porcentaje de explantos sobrevivientes, contaminados y oxidados durante el establecimiento *in vitro* de variedades de olivo (*Olea europea*) recolectados en otoño, según tratamiento de desinfección.

Tratamiento	% Sobrevivencia	% Contaminación	% Oxidación
1	34	44 \pm 6 ^A	13 \pm 4 ^A
2	36	56 \pm 6 ^A	5 \pm 2 ^B
3	27	36 \pm 5 ^A	26 \pm 5 ^A
4	44	22 \pm 4 ^B	24 \pm 5 ^A

*Letras diferentes indican diferencias estadísticas dentro de cada columna ($P \leq 0,05$)

en la brotación, el modelo muestra diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre tipo y concentración de hormonas, siendo el BA el regulador más efectivo en las concentraciones de 0,05 y 0,2 mg.L^{-1} , con un porcentaje de brotación de 30 y 36 % respectivamente (Figura 2).

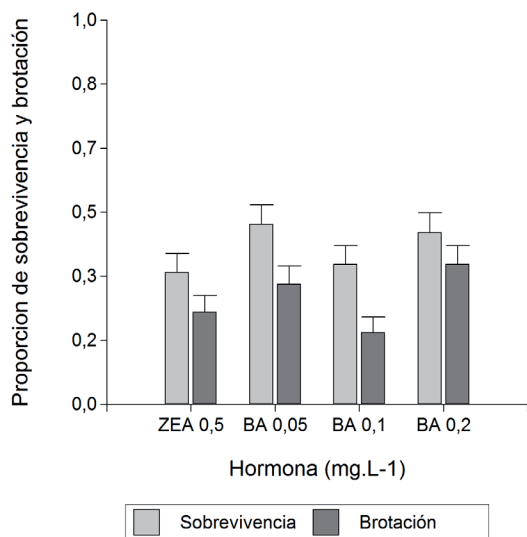


Figura 2: Proporción de sobrevivencia y brotación de explantos establecidos *in vitro* de las variedades Frantoio, Arauco, Manzanilla y Arbequina, según el efecto de dos citocininas, zeatina (0,5 mg.L^{-1}) y BA (0,05, 0,1 y 0,2 mg.L^{-1}).

*Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$)

En comparación con los resultados de Peixe *et al.* (2007) que muestra porcentajes de brotación cercanos al 55 % cuando utiliza una concentración de 0,5 mg.L^{-1} de BAP y 95 % con 0,5 mg.L^{-1} de zeatina, el porcentaje de brotación obtenido en el presente trabajo es inferior, inclusive cuando se utilizó 0,5 mg.L^{-1} de zeatina (20 %). Esto puede deberse a varios factores, entre ellos, la edad de las plantas donantes de explantos, pues las utilizadas en el presente ensayo tienen más de 20 años; la variabilidad genética, ya que se realizó en cuatro variedades, y la época de recolección desfavorable, otoño (Lambardi y Rugini, 2003; Rache-Cardenal, Rojas-Pinzon y Pacheco-Maldonado, 2008).

Ensayos de fuentes de carbono y carbón activado

En cuanto a la fuente de carbono, se ha demostrado que el manitol es uno de los principales carbohidratos del metabolismo del olivo y mejora la tasa de multiplicación, la calidad general y uniformidad de los explantos además de reducir la formación de callo basal (Leva *et al.*, 1994; Lambardi

y Rugini, 2003). No obstante, no se reporta el efecto de la fuente de carbono sobre la brotación de explantos provenientes de plantas madres adultas mantenidas a campo.

Como resultado del análisis estadístico, realizado mediante un modelo lineal generalizado mixto, se pudo observar que no existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para la variable sobrevivencia de explantos, los porcentajes se mantuvieron cercanos al 55 %, excepto para el tratamiento manitol sin CA que mostró un porcentaje de sobrevivencia del 17 %, debido a contaminación de los explantos en el establecimiento *in vitro*. Si se obtuvieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos para la variable brotación; los explantos que fueron introducidos en el medio con manitol tuvieron valores de brotación de 75 y 78 % mientras que, en los tratamientos con sacarosa, fueron del 20 % (Figura 3).

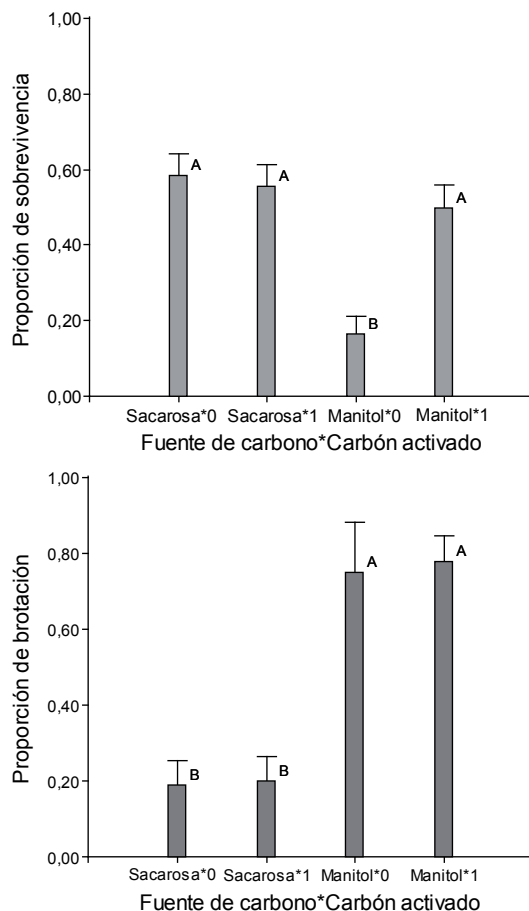


Figura 3: Proporción de sobrevivencia (arriba) y brotación (abajo) de explantos de la variedad Oblonga, introducidos en primavera, en respuesta a dos fuentes de carbono (sacarosa y manitol) y a la presencia o ausencia de 1 g.L^{-1} de carbón activado.

*Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$)

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Leva *et al.* (2013) demostrando que la brotación *in vitro* del olivo está influenciada por el tipo de azúcar utilizado. Tal como afirma Pruski, Kozai, Lewis, Astatkie y Nowak (2000), la fuente de carbono afecta fuertemente el crecimiento y la fisiología de los explantos durante todas las etapas de cultivo *in vitro*. Conde, Silva, Agasse, Conde y Gerós (2011) sugieren que la función del manitol en la tolerancia al estrés por sal o sequía es principalmente como un osmorregulador y osmoprotector contra el daño oxidativo. De acuerdo con esto el manitol puede contribuir a reducir el estrés osmótico provocado por el medio de cultivo y favorecer la brotación.

Con respecto al efecto de las diferentes concentraciones (30, 45 y 60 g.L⁻¹), de ambas fuentes de carbono (sacarosa y manitol), los resultados obtenidos no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) para las variables sobrevivencia y brotación de explantos en la etapa de establecimiento *in vitro* del cultivo (datos no mostrados), a diferencia de lo expresado por Leva *et al.* (1994) donde sí obtuvieron diferencias en la respuesta del cultivo a tres concentraciones diferentes, siendo la de 34 g.L⁻¹ la mejor, tanto de sacarosa como manitol.

Otro componente del medio de cultivo que permite mejorar la sobrevivencia de las plantas es el carbón activado pues, disminuye la concentración de metabolitos tóxicos y exudados fenólicos en el medio de cultivo por la adsorción irreversible de estos compuestos inhibidores (Thomas, 2008). Sin embargo, como puede observarse en la Figura 3 el agregado de 1 g.L⁻¹ de carbón activado en el medio de cultivo no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) para las variables sobrevivencia y brotación de explantos introducidos. Estos resultados coinciden con los de Rugini (1984).

Ensayos de época de introducción

Dentro de los factores que afectan el éxito del establecimiento *in vitro* se cita la importancia el estado fisiológico del material inicial (Murashige y Skoog, 1974; Gonzales *et al.*, 2005). Por esto cobra importancia la época de recolección.

Al concluir los tres períodos de evaluación de cada época de recolección los resultados obtenidos para las variables contaminación, oxidación y establecimiento se analizaron mediante un modelo lineal generalizado y mixto.

Teniendo en cuenta los resultados de las cuatro variedades conjuntamente (Figura 4), con respecto a la variable contaminación, la primavera resultó

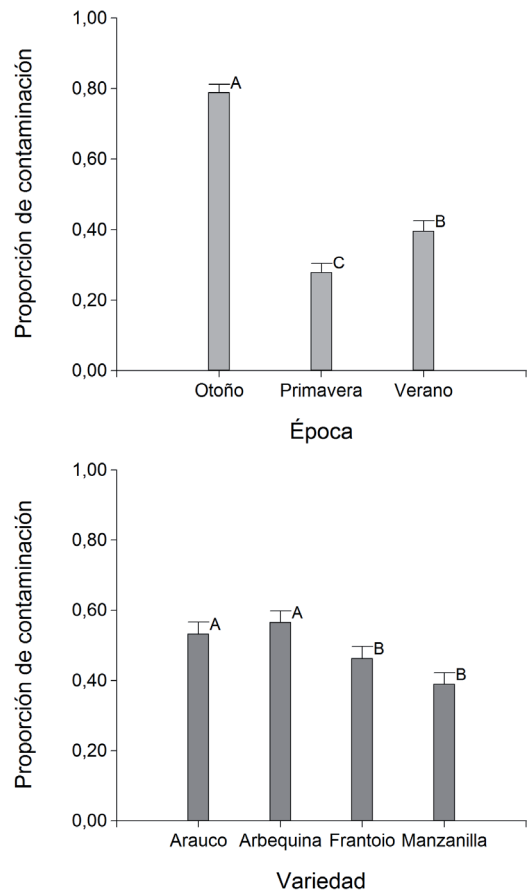


Figura 4: Proporción de contaminación de explantos según época de recolección a campo (arriba) y según variedad en la época de primavera (abajo) en el establecimiento *in vitro* de las variedades de olivo Frantoio, Arauco, Manzanilla y Arbequina por tres años consecutivos.

*Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$)

la mejor época para obtener el material de campo (26 %), con diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) respecto del verano y del otoño (39 % y 80 % respectivamente). Esto corrobora lo observado en los ensayos de desinfección realizados con material recolectado en otoño y por otros autores en el cultivo de papaya (Litz y Conover, 1977) y manzano (Hutchinson, 1982), pues el nivel de contaminación varía en las diferentes épocas del año. En general, la recolección de material a campo en primavera permite obtener brotes nuevos con menor carga de agentes contaminantes en su superficie (George, 1993).

Si se comparan los resultados de explantos contaminados para cada variedad, del material recolectado en primavera, se puede observar que existen diferencias estadísticamente significativas

($p \leq 0,05$) entre las cuatro variedades. De acuerdo a la prueba DGC, las variedades Arbequina y Arauco, son las más afectadas por la contaminación durante el establecimiento de 59 % y 55 % respectivamente (Figura 4). Esto puede deberse a las diferencias morfológicas entre los diferentes genotipos: Arbequina y Arauco, se caracterizan por tener brotes con tres a cinco entrenudos cortos, muy cercanos a la madera del año anterior, lo que favorece la presencia de una mayor carga de microorganismos en los brotes nuevos y, como consecuencia, mayor probabilidad de contaminación de los explantos a introducir. En cambio, las variedades Frantoio y Manzanilla emiten brotes vigorosos de 15 a 20 cm con entrenudos largos en los que la sección a introducir (tercer y cuarto par de yemas) está alejada de la madera de un año. Estos resultados concuerdan con lo observado por Rivero Maldonado (2001), en estacas recolectadas de plantas de seis años de edad de guanábano (*Annona muricata* L.) donde, a medida que la porción del explanto a introducir se acercaba a la madera del año anterior el porcentaje de contaminación era más alto.

Frecuentemente, el establecimiento del cultivo *in vitro* de tejidos procedentes de plantas leñosas, se ve impedido por la oxidación de los tejidos (Hernández y González, 2010); sin embargo, en este trabajo la oxidación de los explantos detectada, en los tres años del ensayo, no se considera un inconveniente para el éxito de esta etapa debido a que los porcentajes obtenidos apenas superaron el 16 % siendo la variedad Manzanilla la más afectada (Figura 5).

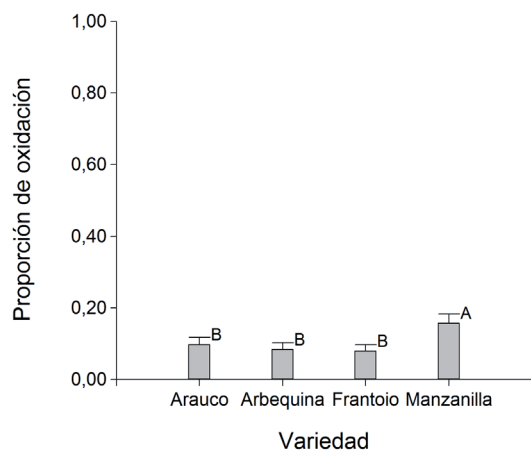


Figura 5: Proporción de explantos oxidados en el establecimiento *in vitro* de las variedades de olivo Arauco, Arbequina, Frantoio y Manzanilla recolectadas en tres años consecutivos, independientemente de la época del año.

*Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$)

En cuanto al porcentaje de brotación con relación a la época de recolección, las diferencias fueron estadísticamente significativas, resultando la primavera la mejor época de recolección con un porcentaje del 42 % contra un 29 % y 10 % para verano y otoño respectivamente (Figura 6). A su vez, dentro de la época de primavera, la variedad Frantoio se destacó con un 62 % de estacas brotadas, seguida por Manzanilla, Arbequina y Arauco con 50, 40 y 20 % respectivamente (Tabla 4).

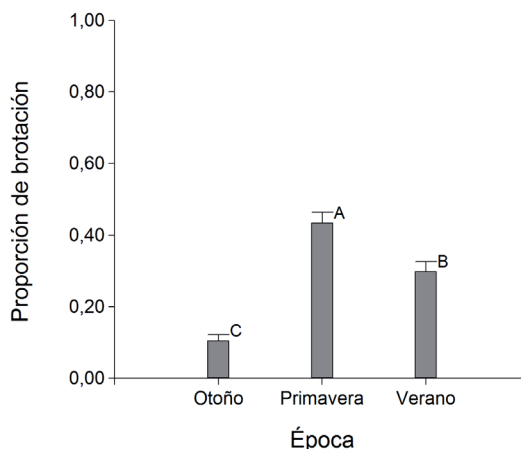


Figura 6: Proporción de explantos brotados *in vitro* de olivo según época de recolección para las variedades Arauco, Arbequina, Frantoio y Manzanilla por tres años consecutivos.

*Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$)

Tabla 4: Porcentajes de brotación de explantos de olivo introducidos *in vitro* según variedad y época de recolección del material inicial para las variedades Arauco, Arbequina, Frantoio y Manzanilla en tres años consecutivos.

Variedad	Otoño	Primavera	Verano
Arauco	10±3 ^C	21±5 ^C	17±4 ^C
Arbequina	15±4 ^C	40±6 ^B	26±5 ^C
Frantoio	11±3 ^C	62±6 ^A	35±6 ^B
Manzanilla	6±3 ^C	50±6 ^B	42±6 ^B

*Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$)

CONCLUSIONES

Si bien, en algunos aspectos hay diferencias entre genotipos, en el presente trabajo se logró establecer un protocolo eficiente para la desinfección y el establecimiento *in vitro* de estacas de árboles adultos de cuatro variedades de olivo recolectadas en campo. Se determinó que la recolección del material inicial debe realizarse en la primavera, cuando se observan brotes vigorosos y presentan menor carga de contaminantes. Además es fundamental la utilización de ultrasonido en cada etapa

de la desinfección. Para todas las variedades de olivo estudiadas, en este trabajo, el manitol es la fuente de hidratos de carbono más efectiva para la brotación *in vitro* y el BA, reemplaza a la zeatina, en una concentración de 0,2 mg/L.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, Z., Akhter, F., Haque, M. S., Banu, H., Aahman, M. M. y Faruquzzaman, A. K. M. (2001). Novel Micropropagation System. On Line *Journal of Biological Sciences*, 1(11), 1106-1111.
- Aller, P., Fernandez-Gomez, M. E. y Diez, J. L. (1978). RNA synthesis in root meristems of *Allium cepa* bulbs. 1. Sonication as a method to eliminate contaminating bacteria. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, 89, 29-40.
- Conde, A., Silva, P., Agasse, A., Conde, C. y Gerós, H. (2011). Mannitol transport and mannitol dehydrogenase activities are coordinated in *Olea europaea* under salt and osmotic stresses. *Plant Cell Physiol*, 52, 1766-1775.
- Couto, M., Ucker, R. y Pedroso de Oliveira, R. (2004). Establecimiento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp. *Rev. Bras. Frutic.*, 26, 561-563.
- Chaari Rkins, A., Maalej, M., Drira, N. y Atandardi, A. (2011). Micropropagation of olive tree *Olea europaea* L. 'Oueslati'. *Turk J Agric For* 35, 403-412.
- Di Rienzo, J. A., Guzmán, A. W. y Casanoves, F. (2002). A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of agricultural, biological, and environmental statistics* 7(2), 129-142.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, I., Tablada, M. y Robledo, C. W. (2017). InfoStat, versión 2017, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Fabbri, A., Bartolini, G., Lambardi, M. y Kailis, S. (2004). *In vitro* propagation of the olive. En Fabbri, A., Bartolini, G., Lambardi, M. y Kailis, S. (Eds.). *Olive Propagation Manual*. Australia, SCIRO Publishing.
- Gaba, V., Kathiravan, K., Amitha, S., Singer, S., Xiaodi, X. y Ananthakrishnan, G. (2006). The use of ultrasound in plant tissue culture. En Dutta Gupta, S. y Ibaraki, Y. (Eds). *Plant tissue culture engineering*. Holanda, Springer.
- George, E. F. (1993). Equipment and procedures. En George, E. F. (Eds). *Plant Propagation by Tissue Culture. Part I*. Reino Unido, Exegetics Ltd.
- Gonzales, M. E., Hernandez, M. M., Mazorra, L. M., Santana, N., Rodriguez, Y. y Mireya, C. (2005). Influencia de la época del año en la respuesta *in vitro* del caféto *coffea canephora* P. var. Robusta. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1(VII), 5-14.
- Grigoriadou, K., Vasilakakis, M. y Eleftheriou, E. P. (2002). *In vitro* propagation of the greek olive cultivar "Chondrolia Chalkidikis". *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 71, 47-54.
- Hammerschlag, F. (1982). Factors affecting establishment and growth of peach shoots *in vitro*. *HortScience*, 17, 85-86.
- Hernández, Y. y Gonzales, M. E. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultrop*. 31 (4). Recuperado en junio de 2017 de: http://scielo.sld.cu/scielo?script=sci_arttext&pid=S02585936201000400015&lng=es&nrm=iso.
- Hutchinson J. F. (1982). *In vitro* propagation of Apple using organ culture. En Fujiwara A. (Eds.). *Plant Tissue Culture*. Japon. Jpn. Assoc. Plant Tissue Cult.
- INDEC (2004). Resultados del Censo Nacional Agropecuario 2002. Argentina. Recuperado en junio de 2017 de: http://www.indec.gov.ar/cna_index.asp
- Khan, M. R., Raced, H. y Carwash, A. (2002). Development of aseptic protocols in olive (*Olea europaea* L.) cv. Pantaloon. *Plant Sci.*, 1, 220-221.
- Lambardi, M. y Rugini, E. (2003). Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.). En Mohan Jain S. y Katsuaki I. (Eds.). *Micropropagation of woody trees and fruits*. . Holanda, Springer.
- Lambardi, M., Ozudogru, E. A. y Roncasaglia, R. (2013). *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea* L.) by nodal segmentation of elongated shoots. *Methods Mol Biol.*, 110(13), 33-44. (DOI: 10.1007/978-1-62703-074-8_3).
- Lazo-Javalera, M. F., Troncoso-Rojas, R., Tiznado-Hernández, M. E., Martínez-Tellez, M. A., Vargas-Arispuro, I., Islas-Osuna, M. A. y Rivera-Domínguez, M. (2016). Surface disinfection procedure and *in vitro* regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds. *SpringerPlus*, 5(1), 453.
- Leva, A. R., Petruccelli, R. y Bartolini, G. (1994). Manitol *in vitro* culture of *Olea europea* cv maurino. *Acta Hort.*, 356, 43-46.
- Leva, A. R., Sadeghi, H. y Petruccelli, R. (2013). Carbohydrates modulate the *in vitro* growth of olive microshoots. I. The analysis of shoot growth and Branching patterns. *J. Plant Growth Regul.*, 32, 53-60.
- Litz, R. E. y Conover, R. A. (1977). Tissue culture propagation of some foliage plants. *Proc. Fla. State Hort Soc.*, 90, 301-303.
- Mangal, M., Sharma, D., Sharma, M., Kumar, S. (2014). *In vitro* regeneration in olive (*Olea europaea* L.) cv, 'Frontio' from nodal segments. *Indian J Exp Biol.* 52(9), 912-6.
- Maldonado, G. R., Villalobos, M. R. y De Sierralta, S. L.

- (2001). Tipo de explante en el establecimiento *in vitro* del guanábano (*Annona muricata* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 18(4), 258-265.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1974). Plant propagation through tissue culture. *Ann Plant Physiol.*, 25, 135-136.
- Oriolani, E. J. A., Otero, L., Matías, A. C., Nieto, A. M., Perez, B. A. y Roca, M. (2008). Manual de reconocimiento de enfermedades y plagas en olivo. Buenos Aires. Ediciones INTA.
- Otero, M. L. y Docampo, D. M. (1998). Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Arbequina from juvenile cuttings. *Phyton*, 63 (1/2), 133-140.
- Parada Ponce, D. M. y Villegas Monter, A. (2009). Propagación *in vitro* del híbrido almendro por durazno H1. *Rev. Fitotec. Mex.*, 32(2), 103-109.
- Pastorini Donini, L., Wulff Schuch, M., de Farias Ribeiro, M., Almeida de Souza, J. y Campos Soares, G. (2008). Establecimiento *in vitro* de oliveira cv. "Arbequina" para início da micropropagação. *Cienc. Rural*, 38(6), 1769-1772.
- Peixe, A., Raposo, A., Lourenco, R., Cardoso, H. y Macedo, E. (2007). Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 113, 1-7.
- Peyvandi, M., Farahani, F., Noormohamadi, Z., Banihashemi, O., Hosseini, M. y S. Mazinani, S., Ataee, (2009). Mass production of *Olea europea* L. (cv. Rowghani) through micropropagation. *General and Applied Plant Physiology*, 35 (1-2), 35-43.
- Pruski, K., Kozai, T., Lewis, T., Astatkie, T. y Nowak, J. (2000). Sucrose and light effects on *in vitro* cultures of potato (*Solanum tuberosum* L.), chokecherry (*Prunus virginiana* L.) and Saskatoon Berry (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) during low temperature storage. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 63, 215-221.
- Rache-Cardenal, L., Rojas-Pinzon, E. y Pacheco-Maldonado, J. (2008). Revigorización y clonación de yemas adultas de árboles de olivo: establecimiento *in vitro* de microinjertos. *Bioagro*, 20(1), 57-65.
- Rivero Maldonado, G. del C. Ramirez Villalobos, M. del C. y León de Sierralta, S. (2001). Tipo de explante en el establecimiento *in vitro* del guanábano (*Annona muricata* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 18, 258-265.
- Rodrigues, C., Posser, C. A., De Luces, G. R., Fachinello, J. C. y Baptista, J. (2003). Establecimiento e multiplicação *in vitro* de *Prunus* sp. em diferentes meios de cultivo. *Rev. Bras. Frutic.*, 25, 131-133.
- Roussos, P. A. y Pontikis, C. A. (2001). Phenolic Compounds in Olive Explants and their Contribution to Browning During the Establishment Stage *in vitro*. *Gartenbauwissenschaft*, 66(6), 298-303.
- (2002). *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Koroneiki. *Plant Growth Regulation*, 37, 295-304.
- Rugini, E., (1984). *In vitro* propagation of some olive (*Olea europea sativa* L.) cultivars with different root ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae*, 24, 123-134.
- Rugini, E. y Baldoni, L. (2005). *Olea europaea* olive. En Litz R. E. (Eds.): *Biotechnology of Fruit and Nut Crops.*, Cambridge, CABI Publishing.
- Palacios Allende, P., Lancioni, G., García Araya, T., Salazar Coloma, G. y Biondi, B. M. (2008). La familia Pentatomidae en cultivos del estado de Sinaloa. En Righetti, C. y De Mateo, G. (Eds.). *Plagas agrícolas en México*. Sinaloa, Mulligan Inc.
- Santos, C. V., Brito, G., Pinto, G. y Fonseca, E. M. A. C. (2003). *In vitro* plantlet regeneration of *Olea europaea* ssp *maderensis*. *Scientia Horticulturae*, 97, 83-87.
- Silva, D. F. D. (2017). Improvements in the micropropagation of the olive tree (*Olea europaea* L.). 93 p. Tese (Doutorado em Botânica Aplicada)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Thomas T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26, 618-631.
- Vilchez, J., Albany, N., Martinez, L., Molina, M., Alvarez, C., Leal, E. y Bermudez, L. (2011). Establecimiento *in vitro* de ocumo blanco (*Xanthosomasa gittifolium* (L.) Schott). *Ver. Fac. Agron. (LUZ)*, 28(1), 434-444.
- Wendling, I. y Xavier, A. (2001). Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. *Floresta e Ambiente*, 8(1), 187-194.
- Zacchini, M. y De Agazio, M. (2004). Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation. *Biologia Plantarum*, 48(4), 589-592.