

**INFORME FINAL**  
**TECNICO Y DE GESTION**  
**PROYECTO FIA: C96-I-A-016**  
**“ VALIDACION DE LA PROPAGACION DE OLIVOS *in vitro*”**

**Diciembre - 1997**

## I. ANTECEDENTES GENERALES

I.1. TITULO DEL PROYECTO: "Validación de la propagación de olivos *in vitro* "

I.2. AREA TEMATICA: Propagación de olivos

I.3. ENTIDAD EJECUTORA:

Nombre: Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso.

Dirección: La Palma s/N° , Quillota

Teléfono: (33) 310535

Fax: (33) 313222

RUT: 81.669.200-8

I.4. JEFE DE PROYECTO: Mónica Castro Valdebenito

I.5. COSTO TOTAL: \$ 11.677.000

I.6. APOORTE DEL FIA: \$ 6.110.000 ( 52 %)

I.7. PERIODO DE EJECUCION: 02 de diciembre de 1996 al 30 de diciembre de 1997.

## II. RESUMEN EJECUTIVO

A la fecha se han realizado diversos ensayos para lograr la validación del protocolo de propagación *in vitro* de olivo.

Se ha logrado establecer y proliferar material de esta especie, el que actualmente se encuentra en etapa de elongación para su posterior enraizamiento.

Con respecto al diseño e instalación de infraestructura para enraizamiento, ésta cumple con todos los requisitos necesarios para lograr una buena respuesta en enraizamiento de olivo y de otras especies.

Además, se determinaron los parámetros bioclimáticos para llevar a cabo el enraizamiento de olivo.

### III. TEXTO PRINCIPAL

#### 1. RESUMEN DE LA PROPUESTA ORIGINAL

Se planteó obtener material vegetal de las variedades de olivo que tienen las mejores posibilidades de concurrencia al mercado, tanto para producción de aceite como para producción de aceitunas de mesa. Este material vegetal se puede obtener tanto en pequeñas plantaciones establecidas previamente en el país como importándolo desde los países tradicionalmente productores de aceite y aceitunas.

El material vegetal que se obtenga de importación estará restringido de propagarse, mas allá del ensayo, durante dos años, de allí la importancia de obtener el material de procedencia nacional. A partir de la obtención de este material vegetal se procederá a sembrar diferentes secciones de tejido proliferativo en medios de cultivo, sometiéndolo a las condiciones estandarizadas de cultivo de tejidos en laboratorio, evaluando comparativamente cada uno de ellos, hasta obtener un protocolo confiable que permita reproducir la técnica, tanto como sea necesario, para la obtención del número total de plantas que se necesitan.

Simultáneamente, se diseñará una cámara de enraizamiento y aclimatación que permita realizar estas fases de la propagación en forma segura, para lo cual la cámara en cuestión dispondrá de controles electrónicos de las variables temperatura basal, temperatura aérea, humedad relativa y renovación de gases ambientales, además de barreras ambientales y sanitarias.

Por último el proyecto realizará ensayos con diferentes sustratos de enraizamiento y aclimatación que permitan hacer mas confiable y productiva esta fase abaratando costos al disminuir el tiempo de propagación en laboratorio.

Los objetivos generales planteados en el proyecto fueron:

- 1.- Desarrollo de una tecnología nacional de propagación *in vitro* de variedades seleccionadas de olivo, que permita a cualquier laboratorio calificado aplicar la técnica con resultados seguros.
- 2.- Desarrollo de una técnica de enraizamiento *in vitro* e *in vivo* y aclimatación de las plántulas obtenidas en ambas técnicas
- 3.- Diseño y evaluación de la infraestructura necesaria para la ejecución de esta técnica.
- 4.- Evaluación de los ambientes de crecimiento aptos para la aclimatación; tanto aéreos como basales.

## 2. CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO

OBJETIVO	RESULTADOS
<p>1. Obtención de un protocolo de establecimiento y proliferación de las variedades seleccionadas de olivo</p>	<p>Se determinó:</p> <p>1.1 Un preacondicionamiento del material vegetal</p> <p>1.2. Un protocolo de desinfección para cultivo <i>in vitro</i> de explantes de olivo.</p> <p>1.3. Que el explante uninodal era el más adecuado para la micropropagación de olivo.</p> <p>1.4. El medio de establecimiento <i>in vitro</i>.</p> <p>1.5. El manejo del repique de explantes <i>in vitro</i>.</p> <p>1.6. El control del pardeamiento <i>in vitro</i>.</p> <p>1.7. El medio de proliferación <i>in vitro</i>.</p> <p>1.8. La época de obtención del material vegetal.</p>
<p>2. Obtención de un protocolo de enraizamiento <i>in vitro</i></p>	<p>2.1. No se alcanzó a llegar a la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i></p>
<p>3. Obtención de un protocolo de enraizamiento <i>in vivo</i>. Tipificación y elección de los sustratos que cumplan con las condiciones ideales para la fase de aclimatación y enraizamiento de plántulas inducidas <i>in vitro</i>.</p>	<p>3.1. Se planteó un protocolo de enraizamiento <i>in vivo</i>, el que se llevará a cabo próximamente.</p> <p>3.2. Se seleccionaron los sustratos a utilizar en la etapa de enraizamiento y aclimatación.</p>
<p>4. Diseño y evaluación de la infraestructura que asegure la reproductividad de la tecnología (instrumentos,maquinarias,herramientas)</p>	<p>4.1. Se diseñó y evaluó la cámara de aclimatación para llevar cabo el enraizamiento de olivos.</p>
<p>5. Determinación de las variables bioclimáticas para la aclimatación y enraizamiento de las plántulas obtenidas de la propagación <i>in vitro</i>.</p>	<p>5.1.Se determinaron los siguientes parámetros:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Temperatura basal</li> <li>- Temperaturas extremas del aire</li> <li>- Humedad relativa</li> <li>- Régimen de renovación de gases</li> <li>- Humedad foliar</li> <li>- Luminosidad</li> </ul>

## 2.1. Obtención de un protocolo de establecimiento y proliferación de las variedades seleccionadas de olivo

### 2.1.1. Ensayo I: Protocolo de desinfección para cultivo *in vitro* de explantes de olivo:

Para la evaluación de un protocolo de desinfección para cultivo *in vitro* de explantes de olivo se realizaron numerosos ensayos en distintas fechas y tipos de explante. Sus resultados y análisis son presentados a continuación.

#### 2.1.1.1. Ensayo de desinfección 1.

En el presente ensayo se realizó la siembra de distintos tipos de explantes de olivo los que provenían directamente de campo. La variedad no fue identificada. El medio utilizado fue el de establecimiento descrito por RUGINI (1984). En el cuadro 1, se puede apreciar solamente resultados de desinfección, ya que no fue evaluado el porcentaje de brotación. Como contaminación se asumió tanto contaminación exógena como endógena.

Los mejores resultados se obtienen al utilizar concentraciones altas de hipoclorito de sodio para un mismo tipo de explante (uninodal), obteniéndose 77 y 60% de éxito para las concentraciones de 5 y 10% respectivamente. En base a esto se podría recomendar el uso de 5% NaClO por poseer una menor dosis de este producto y obtenerse el mismo resultado. Al comparar el porcentaje de éxito en la desinfección utilizando 1% de NaClO en distintos tipos de explantes (uninodal, una yema y ápice) es posible apreciar que no existe diferencia.

CUADRO 1. Efecto de la desinfección con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio en distintos tipos de explantes de olivo.

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DE ÉXITO A LOS 44 DÍAS	
1 (UNINODAL, 5% NaClO)	77	a
2 (UNINODAL, 10% NaClO)	60	a c
3 (UNINODAL, 1 % NaClO)	0	b
4 (1 YEMA, 1% NaClO)	0	b
5 (ÁPICE, 1 % NaClO)	25	b c

Porcentajes con letras iguales no presentan diferencias significativas de acuerdo al test de inferencia para proporciones con distribución binomial ( $p < 0,05$ ).

### 2.1.1.2. Ensayo de desinfección 2.

En el presente ensayo se realizó la siembra de distintos tipos de explantes de olivo los cuales provenían directamente del campo y la variedad no fue identificada. El medio utilizado fue de establecimiento descrito por RUGINI (1984). En el CUADRO 2 es posible apreciar que a concentraciones bajas de hipoclorito de sodio el éxito en la desinfección es bajo comparado con la mayor supervivencia alcanzada a dosis mayores de hipoclorito de sodio. Esto confirma las características de la desinfección con hipoclorito de sodio planteadas por BIANCANI (1996) y SAN MARTIN (1996), es decir, que las concentraciones de hipoclorito de sodio son directamente proporcionales al éxito posible de alcanzar en la desinfección del material vegetal. En lo referente al tipo de explante, se aprecia que no existe una diferencia significativa entre los distintos tratamientos y los distintos tipos de explantes (uninodal, una yema y ápice) desinfectados, a excepción del tratamiento 8 en donde se aprecia una diferencia, resultando éste el de menor éxito.

Al comparar tratamientos con iguales dosis de hipoclorito de sodio, pero distinto tipo de explante (tratamientos 8, 9 y 10), es posible establecer una diferencia significativa entre los tratamientos 8 (uninodal) y 10 (ápice), obteniéndose mejores resultados trabajando con ápices de plantas de olivo, que con explantes uninodales. Esto puede deberse a que los tricomas peltados que posee el olivo en la superficie evitarían la contaminación de estructuras que se encuentren internas (como por ejemplo el ápice), dificultando la contaminación de éstas porque las partículas quedarían atrapadas en las primeras cubiertas (en este caso las brácteas que cubren el ápice), por el contrario perjudicarían la desinfección de explantes que se encuentran más expuestos a la contaminación (explantes uninodales) en donde los tricomas atraparían las partículas, evitando la acción del hipoclorito de sodio.

CUADRO 2. Efecto de la desinfección con distintas concentraciones de hipoclorito de sodio en distintos tipos de explantes de olivo.

TRATAMIENTOS	PORCENTAJE DE ÉXITO 21 DIAS (%)	
		DÍAS (%)
6 (UNINODAL, 5% NaClO)	10	a b
7 (1 YEMA, 5% NaClO)	20	a b
8 (UNINODAL, 1 % NaClO)	0	b
9 (1 YEMA, 1 % NaClO)	10	a b
10 (ÁPICE, 1% NaClO)	36	a

Porcentajes con letras iguales no presentan diferencias significativas de acuerdo al test de inferencia para proporciones con distribución binomial ( $p < 0,05$ ).

### 2.1.1.3. Ensayo de desinfección 3.

En el presente ensayo se realizó la siembra de explantes uninodales de olivo los cuales provenían directamente de campo y la variedad no fue identificada. El medio utilizado fue MS.

En esta experiencia es posible ratificar experiencias anteriores en donde es posible apreciar que una concentración elevada (tratamiento 12) tiene un mejor efecto en la desinfección de los explantes que concentraciones menores (tratamiento 11). Es importante hacer notar que estos resultados son solo de desinfección (CUADRO 3), ya que en este caso en donde se utilizó como medio Murashige y Skoog (macro y micronutrientes, 8 g/l de agar y pH 5,7), después de un tiempo los explantes sufrieron una necrosis y posterior muerte.

CUADRO 3. Efecto de la desinfección con distintas concentraciones de hipoclorito de sodio en explantes uninodales de olivo.

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DE ÉXITO A LOS 8 DÍAS (%)	
11 (0,25% NaClO)	25	b
12 (0,5% NaClO)	67	a
13 (0,75% NaClO)	50	a b

Porcentajes con letras iguales no presentan diferencias significativas de acuerdo al test de inferencia para proporciones con distribución binomial ( $p \leq 0,05$ ).

### 2.1.1.4. Ensayo de desinfección 4.

En el presente ensayo se realizó la siembra de explantes uninodales de olivo los cuales provenían directamente del campo y las variedades utilizadas fueron: Empeltre, Ascolano, Sevillano y una desconocida. El medio utilizado fue MS.

Este ensayo se realizó para ver la respuesta de distintas variedades a las distintas desinfecciones con hipoclorito de sodio, además se realizaron tratamientos en donde la concentración de hipoclorito fue 0% (tratamiento testigo), para dilucidar el origen de las oxidaciones que se producían en los explantes y se pudo comprobar que si bien el hipoclorito de sodio es difícil de extraer de los tejidos vegetales pudiendo causar daño en éstos, en este caso no fue la causa de las oxidaciones ya que en los tratamientos testigo se observaron los mismos daños, por lo cual es posible deducir que en el medio estaría el problema (CUADRO 4). Al examinar la composición de los medios Murashige y Skoog (macro y micronutrientes, agar 8 g/l y pH 5,7) y OM (de establecimiento) se aprecia que la concentración de compuestos nitrogenados es, en el mejor de los casos el triple, lo que sería la causa de las quemaduras.

CUADRO 4. Efecto de la desinfección con distintas concentraciones de hipoclorito de sodio en explantes uninodales de olivo.

TRATAMIENTO	CONTAMINADOS		SECOS
	VERDES	SECOS	
14 (DESCONOCIDA, 2,5% NaClO)	0	9	4
15 (EMPELTRE, 2,5% NaClO)	3	5	0
16 (ASCOLANO, 2,5% NaClO)	0	15	0
17 (SEVILLANO, 2,5% NaClO)	6	9	0
18 (DESCONOCIDA, 1% NaClO)	2	13	0
19 (EMPELTRE, 1% NaClO)	2	9	0
20 (ASCOLANO, 1 % NaClO)	4	10	0
21 (SEVILLANO, 1% NaClO)	4	10	0
22 (DESCONOCIDA, 0,5% NaClO)	1	14	0
23 (EMPELTRE, 0,5% NaClO)	5	9	0
24 (ASCOLANO, 0,5% NaClO)	5	10	0
25 (SEVILLANO, 0,5% NaClO)	8	7	0
26 (DESCONOCIDA, 0% NaClO)	0	15	0
27 (EMPELTRE, 0% NaClO)	3	12	0
28 (ASCOLANO, 0% NaClO)	0	15	0
29 (SEVILLANO, 0% NaClO)	2	13	0

CONTAMINADOS/VERDES: son aquellos explantes de coloración normal (verde) en que puede presentar tanto contaminación exógena y/o endógena

CONTAMINADOS/SECOS: son aquellos explantes que presentan una coloración café (oxidados y/o secos) que puede presentar tanto contaminación exógena y/o endógena

SECOS: son aquellos explantes que presentan una coloración café (oxidados y/o secos) y que no presentan contaminación exógena, ni endógena.

#### 2.1.1.5. Ensayo de desinfección 5.

En el presente ensayo se realizó la siembra de explantes uninodales de olivo los cuales provenían de plantas que se mantuvieron en invernadero, la variedad utilizada es Sevillano. El medio utilizado fue medio de establecimiento descrito por RUGINI (1984)

Para este caso los resultados son totalmente contrarios a lo que se esperaría a pesar de las desinfecciones realizadas a las plantas madres, esto se debe a que en la superficie el olivo posee tricomas (MARTIN, 1994) lo que dificultaría el efecto de los desinfectantes (CUADRO 5). Es por eso que a partir de este ensayo además de las desinfecciones periódicas a las plantas madres, se procederá a escobillar bajo agua corriente a las ramillas que se utilizarán en la siembra corroborando lo que proponen PIERIK (1990) y SEYHAN (1994), quienes mencionan que efectuando lavados del material a utilizar previo a la desinfección con hipoclorito de sodio mejora la acción de este desinfectante.

CUADRO 5. Efecto de la desinfección con distintas concentraciones de hipoclorito de sodio en explantes uninodales de olivo.

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DE ÉXITO A LOS 33 DÍAS (%)
30(2,5% NaClO)	5 a
31 (1,0% NaClO)	45 b
32 (0,5% NaClO)	90 b

Porcentajes con letras iguales no presentan diferencias significativas de acuerdo al test de inferencia para proporciones con distribución binomial ( $p \leq 0,05$ ).

#### 2.1.1.6. Ensayo de desinfección 6.

En el presente ensayo se realizó la siembra de explantes uninodales de olivo los cuales provenían de plantas que se mantuvieron en invernadero, la variedad utilizada es Sevillano. El medio utilizado fue medio de establecimiento descrito por RUGINI (1984)

A partir de las modificaciones realizadas al proceso de pre-acondicionamiento de las ramillas se aprecia una mejora en las desinfecciones alcanzándose un alto porcentaje de éxito (CUADRO 6). Con esto se puede reafirmar que la sanidad inicial es un aspecto importante para tener éxito en el cultivo *in vitro* de olivo, aspecto planteado por RUGINI (1990), así como en las *Gesneriáceas* en donde utilizando esta técnica disminuía de manera considerable la contaminación (HUGUES, 1981, citado por PIERIK, 1990), y es por ésto que no se aprecia una diferencia entre los distintos tratamientos.

CUADRO 6. Efecto de la desinfección con distintas concentraciones de hipoclorito de sodio en explantes uninodales de olivo.

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DE EXITO 26 DIAS (%)
33 (2,5 NaClO)	65 a
34 (1,0 NaClO)	81 a
35 (0,5 NaClO)	81 a

Porcentajes con letras iguales no presentan diferencias significativas de acuerdo al test de Inferencia para proporciones con distribución binomial ( $p \leq 0,05$ ).

### 2.1.1.7. Ensayo de desinfección 7.

En el presente ensayo se realizó la siembra de explantes uninodales de olivo los cuales provenían de plantas que se mantuvieron en invernadero, la variedad utilizada es Sevillano. El medio utilizado fue medio de establecimiento descrito por RUGINI (1984), pero se modificó la concentración de zeatina (0 mg/l).

De estos resultados es posible apreciar una diferencia entre los tratamientos, alcanzándose mejores resultados mientras más alta es la concentración de hipoclorito de sodio. Esta situación también es mencionada por BIANCANI (1996) en la desinfección de ramillas de chirimoyo. Si bien los porcentajes de éxito no son altos, esto puede deberse a que existen épocas del año en que el material es más propenso a contaminación. Esto ratificaría las épocas en que se obtienen mejores resultados de desinfección (desde agosto hasta abril) para cultivo *in vitro* de olivo (GARCIA-BERENGUER y DURAN, 1990) y flushes de crecimiento vegetativo para papayos (AREVALO, 1986).

CUADRO 7. Efecto de la desinfección con distintas concentraciones de hipoclorito de sodio en explantes uninodales de olivo.

TRATAMIENTO	PPORCENTAJE DE ÉXITO A LOS 8 DIAS (%)
36 ( 0,5 NaClO)	0 a
37 (1,0 NaClO)	14 b
38 (2,5 NaClO)	39 c

Porcentajes con letras iguales no presentan diferencias significativas de acuerdo al test de inferencia para proporciones con distribución binomial ( $p \leq 0,05$ ).

### 2.1.2. Ensayo 2: Tratamientos realizados para encontrar el mejor medio de establecimiento de explantes uninodales de olivo de la variedad Sevillano.

#### Ensayo 2.1. Ensayo de establecimiento.

El presente ensayo fue realizado para encontrar el mejor medio de establecimiento de explantes uninodales de olivo de la variedad Sevillano. Estos explantes provenían de una exitosa desinfección, el medio utilizado en dicha etapa fue OM ( que contenía 0,5 mg/l de zeatina). El porcentaje de brotación alcanzado en este ensayo fue de un 100%. Los datos de este ensayo se presentan a continuación desglosados en dos fechas de medición.

En el presente ensayo no fue posible realizar evaluaciones posteriores, esto debido a que parte de las repeticiones alcanzaron la altura necesaria para ser transferidos a la siguiente etapa del cultivo.

En general, de este ensayo es posible decir que no existe diferencia significativa al utilizar 0,5 mgll de zeatina (tratamiento 1) o 1,0 mgll de zeatina (tratamiento 2), como concentraciones de zeatina para el medio de establecimiento. Por consiguiente sería importante realizar pruebas en donde fuera posible comparar estos tratamientos frente a un testigo, para así poder determinar si es necesaria la utilización de zeatina en el medio de establecimiento para explantes uninodales de olivo.

CUADRO 8: Evaluación de crecimiento promedio de brotes a los 26 días de inoculación en medio de establecimiento.

TRATAMIENTOS	CRECIMIENTO PROMEDIO (cm) DE BROTES A LOS	
	26 DÍAS	35 DÍAS
TRATAMIENTO 1 (0,5 mgll zeatina)	1.25 a	1,55 a
TRATAMIENTO 2 (1,0 mgll zeatina)	1.45 a	1.8 a

Longitud promedio de brotes con letras iguales no presentan diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## Ensayo 2.2. Ensayo de establecimiento.

El presente ensayo fue realizado para encontrar el mejor medio de establecimiento de explantes uninodales de olivo de la variedad Sevillano. Estos explantes provenían de una exitosa desinfección, el medio utilizado en dicha etapa fue OM, pero sin la adición de zeatina. El porcentaje de brotación alcanzado en este ensayo fue de un 100%. Los datos de este ensayo se presentan a continuación desglosados en las tres fechas de medición que se realizaron cada 17 días.

De la primera evaluación realizada es posible apreciar que ya en este nivel se observa una diferencia significativa entre la presencia o ausencia de zeatina en el crecimiento de los explantes, pero así mismo no se observa una diferencia entre las dos concentraciones de zeatina utilizadas (tratamiento 2 (0,5 mgll de zeatina) y tratamiento 3 (1,0 mgll de zeatina). Con respecto a otras características que presentan los explantes es posible apreciar la aparición del fenómeno de vitrificación en algunos tratamientos. En el tratamiento 1 no se aprecia vitrificación en los explantes, pero en los tratamientos 2 y 3 se observa vitrificación alcanzando el 12,5% y 33% respectivamente, por lo que la vitrificación de los explantes podría atribuirse al uso de citoquininas en los medios.

Además, del CUADRO 9 se puede deducir que existe diferencia significativa en el crecimiento de brotes a los 34 días desde que se efectuó la siembra al utilizar en el medio zeatina (tratamiento 2 y tratamiento 3), con respecto al medio que no contenía zeatina (tratamiento 1). Además, es posible concluir que no existe

diferencia significativa en la concentración de zeatina a utilizar en el medio, puesto que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos 2 y 3 a los 34 días de ser evaluados. Con respecto al fenómeno de vitrificación éste no presentó un incremento, alcanzando igual que en la evaluación anterior, un 12% en el tratamiento 2 y un 33% para el tratamiento 3.

De la evaluación realizada a los 52 días de ser establecidos los explantes, algunos de estos han alcanzado la longitud necesaria para ser transferidos a la etapa de proliferación, es posible observar que se mantiene la diferencia apreciada entre el tratamiento 1 y los tratamientos 2 y 3. Con respecto a los resultados apreciados entre el tratamiento 2 y tratamiento 3 es posible afirmar que no existe diferencia significativa entre los tratamientos. Referente a la vitrificación observada en los explantes en las etapas anteriores, ésta no tuvo un incremento.

CUADRO 9. Evaluación del crecimiento promedio de brotes a los 17 días de siembra en medio de establecimiento.

TRATAMIENTOS	CRECIMIENTO PROMEDIO (cm) DE BROTES A LOS		
	17 DÍAS	34 DÍAS	52 DÍAS
TRAT 1 (0 mg/l de zeat)	0,425 a	0.51 a	0.75 a
TRAT 2 (0,5 mg/l de zeat)	0.85 b	1.23 b	1.48 b
TRAT 3 (1,0 mg/l de zeat)	0.95 b	1.45 b	1.63 b

Longitud promedio de brotes con letras iguales no presentan diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

En general, de la etapa de establecimiento es posible concluir que existe diferencia significativa entre los medios que contienen zeatina (tratamientos 2 y 3), y el medio que no contiene zeatina en su composición (tratamiento 1), en las tres evaluaciones realizadas. Así como es posible observar que no existe diferencia significativa entre las distintas concentraciones de zeatina utilizadas (0,5 mg/l de zeatina (tratamiento 2), y 1,0 mg/l de zeatina (tratamiento 3)). Esto es posible atribuirlo exclusivamente a la concentración de zeatina existente en el medio de establecimiento, ya que la concentración de zeatina fue el único constituyente que se modificó en los tratamientos realizados. Esto ratificaría la experiencia de diversos autores tales como: RUGINI (1984), RAMA y PONTIKIS (1990), LEVA, PETRUCCELLI y BARTOLINI (1994), SEYHAN y OZZAMBAK (1994), CAÑAS *et al.* (1987, 1992), BARTOLINI, LEVA y BENELLI (1990), GARCIA-BERENGUER y DURAN (1990), los cuales utilizan zeatina en los distintos medios empleados en el cultivo *in vitro* de olivo o se basan en medios de otros autores que también poseen zeatina. Si bien es cierto que entre sus experiencias las concentraciones de zeatina en algunas ocasiones son distintas, es indispensable la presencia de ésta en las diferentes etapas (establecimiento y proliferación). Acerca del fenómeno de vitrificación observado existirían numerosas causas, entre ellas: utilización de altos niveles de citoquininas, baja irradiancia lumínica y altas temperaturas,

esterilizaciones demasiado intensivas, utilización de algunos tipos de agar y utilización de material joven y tierno. Este se apreció solamente en los tratamientos en donde se utilizó zeatina en la composición de los medios (tratamiento 2 y 3), como única diferencia entre los tratamientos. Es por esto que frente a las múltiples causas a la que es posible atribuir el fenómeno de vitrificación, en este caso una de las más aceptables es la que se refiere a la concentración de citoquininas en el medio de cultivo (HUSSEY, 1986. citado por PIERIK, 1990), ya que otras causas posibles de ser atribuidas son descartadas, como es el caso de esterilizaciones demasiado intensivas, utilización de algunos tipos de agar y utilización de material joven y tierno, por que si fueran éstas las causas, la vitrificación se debió observar en todos los tratamientos.

### 2.1.3. Tratamientos realizados para encontrar el mejor medio de proliferación de explantes uninodales de olivo de la variedad Sevillano.

El presente ensayo fue realizado para encontrar el mejor medio de proliferación de explantes uninodales de olivo de la variedad Sevillano. Estos explantes provenían del medio de establecimiento El porcentaje de brotación alcanzado en este ensayo fue de un 100%.

En el CUADRO 10 es posible observar que si bien el crecimiento promedio de los brotes es similar en los tratamientos 2 y 3, con 2 y 4 mg/l de zeatina respectivamente, la proliferación es mayor en el medio con 2 mg/l de zeatina.

Con respecto a otras características que presentan los explantes es posible apreciar la aparición del fenómeno de vitrificación en algunos tratamientos. En el tratamiento 1 no se aprecia vitrificación en los explantes, pero en los tratamientos 2 y 3 se observa vitrificación alcanzando el 11,5% y 40% respectivamente, por lo que la vitrificación de los explantes podría atribuirse al uso de citoquininas en los medios.

Considerando estas características anteriormente mencionadas sería recomendable el uso de 2 mg/l de zeatina en los medios de proliferación, ya que además de obtener el mayor número de brotes, éstos presentarían un menor porcentaje de vitrificación

CUADRO 10. Evaluación del crecimiento promedio y proliferación de brotes a los 23 días en medio de proliferación.

TRATAMIENTOS	CRECIMIENTO PROMEDIO DE BROTOS (CM)	NUMERO PROMEDIO DE BROTOS
TRAT 1 (0 mg/l zeatina)	0,8 a	1,5 a
TRAT 2 (2 mg/l zeatina)	1,2 b	2,3 b
TRAT 3 (4 mg/lzeatina)	1,1 b	1,6 a

Considerando que la longitud promedio obtenida en la etapa de proliferación fue de sólo 1,2 cm, en el mejor de los casos, se decidió someter este material a un ensayo de elongación que se está llevando a cabo actualmente, ya que con ese largo (1,2 cm), no es posible llevar este material a enraizamiento, ya sea *in vitro* o *in vivo*.

## 2.2. Diseño y evaluación de la infraestructura necesaria para la aclimatación y enraizamiento de plántulas de olivo.

Tal como fue descrito en el informe de avance entregado, el proyecto desarrolló una cámara de aclimatación y enraizamiento, en base a los siguientes principios:

Aislación del ambiente exterior,

Control de la temperatura del sustrato,

Control de la Humedad Foliar, y

Control de la renovación atmosférica,

para cada uno de estos parámetros la cámara cuenta con un controlador electrónico que permite mantenerlo en los niveles deseados.

Debido a la falta de material proveniente de la propagación *in vitro* se probó la cámara con estacas *in vivo* en tres ciclos de propagación, cada uno de los cuales incorporó un ensayo de mezclas de sustratos, dosificación de tratamiento hormonal para el enraizamiento y regulación de los controles ambientales.

Se ensayaron mezclas de sustratos en base a perlita y turba en las siguientes proporciones:

PERLITA	TURBA
1	1
2	1
3	1

De la misma forma se ensayó 3 concentraciones de Acido Indol Butírico (IBA) para el tratamiento inductor del enraizamiento, estas concentraciones fueron 2000, 2500 y 3000 ppm.

También se ensayó la respuesta de 3 diferentes variedades a estos tratamientos, de esta manera los ensayos combinados quedaron de la siguiente forma:

### 2.2.1. Primer ensayo de enraizamiento: Variedad y Concentración de IBA

Se inició el 9 de Junio y empezó el enraizamiento hacia el 24 de Julio efectuándose la evaluación definitiva el 8 de Agosto.

Se realizó una evaluación cualitativa de enraizamiento en 20 repeticiones para cada tratamiento

CUADRO 11. Porcentaje de enraizamiento *in vivo* de tres variedades de olivo, tratadas con tres dosis de ácido indol butírico.

Dosis (ppm)	IBA	SEVILLANO	EMPELTRE	ASCOLANO
2000		10	5	0
2500		30	25	20
3000		50	45	30

### 2.2.2. Segundo ensayo de enraizamiento: Sustrato y concentración de IBA

Se inició el 9 de Junio y empezó el enraizamiento hacia el 24 de Julio efectuándose la evaluación definitiva el 8 de Agosto.

Se realizó una evaluación cualitativa de enraizamiento en 20 repeticiones para cada tratamiento

CUADRO 12. Porcentaje de enraizamiento *in vivo* de olivo variedad Sevillano, tratadas con tres dosis de ácido indol butírico y tres tipos de sustratos.

Dosis de IBA (ppm)	3Perlita:1Turba (v/v)	2Perlita:1Turba (v/v)	1Perlita:1Turba (v/v)
2000	30	20	10
2500	40	20	10
3000	55	30	20

### 2.2.3. Tercer ensayo de enraizamiento:

El tercer ensayo se realizó una vez determinadas las concentraciones de IBA más eficientes y elegida la mezcla de sustrato más adecuada .

Este ensayo consistió en ver la respuesta cualitativa al enraizamiento, sobre 100 repeticiones, de la variedad Sevillano con una concentración de IBA de 3000 ppm y un sustrato de 3 partes de perlita por 1 de turba.

Se inició el ensayo el 29 de Agosto y se realizó la evaluación definitiva el 20 de Octubre con un periodo total de 52 días con un resultado de un 72 % de enraizamiento.

Cabe destacar que para este ensayo se utilizó material vegetal creciendo en invernadero y obtenido de la porción basal de las plantas por lo que se asume se trataba de material juvenil.

2.3. Evaluación de los ambientes de crecimiento aptos para la aclimatación y enraizamiento; tanto aéreos como basales.

A través de los ensayos anteriores se determinó, mediante apreciaciones cualitativas de la especie, la mejor respuesta del material vegetal a los cambios climáticos, variando los controles que se tenían sobre la temperatura del sustrato, la humedad foliar y las renovaciones atmosféricas.

Esta apreciación de mejor respuesta del cultivo se encontró en los parámetros que se muestran en el siguiente cuadro:

CUADRO 13. Parámetros de terminados como ideales para la propagación de olivos

Temperatura del sustrato	25 °C
Renovaciones atmosféricas	30 a 40 renovaciones / hora
Humedad foliar	Sensibilidad sensor en 7 (corresponde aproximadamente a 2,5 micro mhos)
	Tiempo de aspersión por ciclo 10 seg.

Este control de los parámetros anteriores permite mantener el sustrato con un variación de 3 grados sobre la temperatura fijada y la interacción de los controles de humedad foliar y renovación atmosférica permite que la humedad relativa oscile entre 40 y 70% en días soleados y entre 60 y 80 % en días nublados.

Es destacable la importancia de la alta renovación atmosférica que se ha forzado en estos ensayos ya que esto ha permitido erradicar el peligro de ataque fungoso en la zona aérea.

En cuanto a los ambientes basales se ha podido determinar que dentro de los sustratos probados el que ha dado mejores resultados es la mezcla de 3 partes de perlita por 1 de turba, esta mezcla tiene las siguientes características:

pH	: 4,17
C.E.	: 3,28 mmhos
H.R.	: 59,80 %
Porosidad	: 42,08 %

Sin embargo, otros estudios permiten deducir que una C.E. inferior a la mostrada por este sustrato podría ser aún mejor, lo cual se lograría con distintas clases de turbas.

Con respecto a la evaluación de aspectos lumínicos, la cámara de enraizamiento y aclimatación está situada en el interior de un pequeño invernadero cubierto con polietileno de 0,15 mm con filtro U.V. y una malla de semi sombra (de 50% de

sombreamiento), durante el periodo de ensayo de la Cámara se hicieron mediciones de luminosidad la cual se mantuvo entre 10.000 y 20.000 lux durante el día, no observándose ningún indicio de quemadura en el material vegetal que hiciera pensar en una sobre exposición, de manera que podemos deducir que esta luminosidad es aceptable para el proceso.

### 3. ASPECTOS METODOLOGICOS DEL PROYECTO

#### 3.1. Propagación *in vitro* de olivo

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Micropropagación de la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso. La fuente de explantes fueron: material de campo proveniente de San Felipe de las variedades Sevillano, Empeltre, Ascolano y una no identificada, como también plantas de olivo de la variedad Sevillano, material que fue adquirido en un vivero de la zona, y que en este momento se encuentra en el invernadero del Laboratorio de Micropropagación, donde se les realizaron continuas desinfecciones (mezcla Benlate - Captan) para mantener una adecuada sanidad del material (ANEXO).

#### 3.2. Ensayo 1. Protocolo para la elección del mejor explante para cultivo *in vitro* de olivo y desinfección de éste.

Hasta el momento las investigaciones realizadas mencionan al Olive Medium como el que presenta mejores características para el desarrollo de explantes uninodales de olivo.

CUADRO 14: Composición del Olive Medium (OM) descrito por RUGINI (1984).

CONSTITUYENTES (mg/l)	CONCENTRACIÓN EN EL MEDIO
<b>MACRONUTRIENTES</b>	
NH <sub>4</sub> N0 <sub>3</sub>	100
KNO <sub>3</sub>	500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	250
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	40
FeSO <sub>4</sub>	13.9
NAEDTA	18,6
<b>MICRONUTRIENTES</b>	
KI	0.2075
H <sub>3</sub> B0 <sub>3</sub>	1.55
ZnSO <sub>4</sub> 4 H <sub>2</sub> O	2.65
MnSO <sub>4</sub> 4 H <sub>2</sub> O	4.25
CUSO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O	0,006
NaMOO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0.0625
CoCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	0,006
<b>VITAMINAS</b>	
Tiamina HCl	10
Piridoxina	0,125
Acido Nicotínico	0,125
Azúcar	20000
Agar	6000
Myo-Inositol	50

### 3.2.1. Ensayo 1.1.

En el presente ensayo se investigó el éxito de diferentes pruebas de desinfección para los distintos tipos de material a utilizar. Los compuestos y dosis a utilizar fueron extraídos de RUGINI (1984) e indicados en el CUADRO 14, con algunas modificaciones. Para esta experiencia no se contó con un tratamiento testigo (desinfección con 0% de hipoclorito de sodio puesto que según las experiencias este se descartó). De esta manera se probaron las siguientes desinfecciones.

CUADRO 15. Tratamientos realizados para probar el efecto de la desinfección de distintos tipos de explantes de olivo variedad desconocida.

TRATAMIENTO	TIPO DE EXPLANTE	NUMERO DE REPETICIONES	CONCENTRACIÓN DE NaClO (%)
1	UNINODAL	9	5
2	UNINODAL	10	10
3	UNINODAL	10	1
4	1 YEMA	10	1
5	ÁPICE	8	1

La solución desinfectante, además de contener las dosis de hipoclorito de sodio, se le adicionó una gota de Tween 20 y 4 g de Acido cítrico. Los explantes se mantuvieron en esta solución por 10 min. Posteriormente fueron sometidos a un enjuague con agua destilada estéril bajo cámara de flujo laminar. Fueron mantenidos en una solución de ácido ascórbico (400 mg/l) más Acido Cítrico (400 mg/l) estéril hasta el momento de la siembra. Por medio de cortes se obtuvieron los explantes (los cortes se realizaron sumergiendo previamente la hoja del bisturí en una solución de Acido ascórbico (400 mg/l) y Acido Cítrico (400mg/l) para disminuir el grado de oxidación de los tejidos sometidos a cortes). Luego se procedió a inocular un explante por tubo que contiene una alícuota de 10 cc del medio de establecimiento (RUGINI, 1984), y se colocó una tapa de papel aluminio. Después de la siembra se mantuvieron en oscuridad por 15 días en una cámara de crecimiento a una temperatura de 27°C ( $\pm$  2°C).

### 3.2.2. Ensayo 1.2.

En el presente ensayo se investigó el éxito de diferentes pruebas de desinfección de distintos tipos de material a utilizar. Los compuestos y dosis a utilizar fueron extraídos de RUGINI (1984), con algunas modificaciones. Para esta experiencia no se contó con un tratamiento testigo (desinfección con 0% de hipoclorito de sodio puesto que según las experiencias este se descartó). Se probaron las siguientes desinfecciones como lo indica el Cuadro 16.

CUADRO 16. Tratamientos realizados para probar el efecto de la desinfección de distintos tipos de explantes de olivo variedad desconocida.

TRATAMIENTO	REPETICIONES	TIPO DE EXPLANTE	CONCENTRACION
6	10	UNINODAL	5
7	10	1 YEMA	5
8	10	UNINODAL	1
9	10	1 YEMA	1
10	11	ÁPICE	1

La solución desinfectante, además de contener las distintas dosis de hipoclorito de sodio, se le adicionó Tween 20 y 4 g de Acido cítrico y se mantuvieron los explantes en esta solución por 10 min. A los explantes, luego de su desinfección, se les realizó el mismo tratamiento que en el ensayo 1.1.

### 3.2.3. Ensayo 1.3.

En el presente ensayo se investigó el éxito de diferentes pruebas de desinfección para explantes uninodales de olivo. Los compuestos y dosis a utilizar fueron extraídos de RUGINI (1984), con algunas modificaciones. Para esta experiencia no se contó con un tratamiento testigo (desinfección con 0% de hipoclorito de sodio puesto que según las experiencias este se descartó).

CUADRO 17. Tratamientos realizados para probar el efecto de la desinfección de explantes uninodales de olivo variedad no identificada.

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN NaClO (%)	REPETICIONES
11	0.25	12
12	0.5	12
13	0.75	12

A la solución desinfectante además, de contener las distintas dosis de hipoclorito de sodio, se le adicionó Tween 20 y 4 g de Acido cítrico y se mantuvieron los explantes en esta solución por 10 min. A los explantes, luego de su desinfección, se les realizó el mismo tratamiento que en el ensayo 1.1.

### 3.2.4. Ensayo 1.4.

En el presente ensayo se investigó el éxito de diferentes pruebas de desinfección para los explantes uninodales de olivo. Los compuestos y dosis a utilizar fueron extraídos de RUGINI (1984), con algunas modificaciones. Para esta experiencia

no se contó con un tratamiento testigo (desinfección con 0% de hipoclorito de sodio puesto que según las experiencias este se descartó). El Cuadro 5 indica las desinfecciones que se probaron.

CUADRO 18. Tratamientos realizados para probar el efecto de la desinfección de explantes uninodales de olivo de las siguientes variedades: Empeltre, Ascolano, Sevillano y una desconocida.

TRATAMIENTO	VARIEDAD	CONCENTRACIÓN NaClO (%)	REPETICIONES
14	DESCONOCIDA	2.5	13
15	EMPELTRE	2.5	8
16	ASCOLANO	2.5	15
17	SEVILLANO	2.5	15
18	DESCONOCIDA	1.0	15
19	EMPELTRE	1.0	11
20	ASCOLANO	1.0	14
21	SEVILLANO	1.0	14
22	DESCONOCIDA	0.5	15
23	EMPELTRE	0.5	14
24	ASCOLANO	0.5	15
25	SEVILLANO	0.5	15
26	DESCONOCIDA	0.0	15
27	EMPELTRE	0.0	15
28	ASCOLANO	0.0	15
29	SEVILLANO	0.0	15

La solución desinfectante, además de contener las distintas dosis de hipoclorito de sodio, se le adicionó Tween 20 y 4 g de Acido cítrico y se mantuvieron los explantes en esta solución por 10 min. A los explantes luego de su desinfección se les realizó el mismo tratamiento que en el ensayo 1. 1.

### 3.2.5. Ensayo 1.5.

En el presente ensayo se investigó el éxito de diferentes pruebas de desinfección para los explantes uninodales. Los compuestos y dosis a utilizar fueron extraídos de RUGINI (1984), con algunas modificaciones. Para esta experiencia no se contó con un tratamiento testigo (desinfección con 0% de hipoclorito de sodio, puesto que según las experiencias éste se descartó).

CUADRO 19. Tratamientos realizados para probar el efecto de la desinfección de explantes uninodales de olivo de la variedad Sevillano.

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN NaClO (%)	REPETICIONES
30	2.5	20
31	1.0	20
32	0.5	20

A la solución desinfectante, además de contener las distintas dosis de hipoclorito de sodio, se le adicionó Tween 20 y 4 g de Acido cítrico y se mantuvieron los explantes en esta solución por 10 min. A los explantes luego de su desinfección se le realizó el mismo tratamiento que en el ensayo 1.1.

### 3.2.6. Ensayo 1.6.

En el presente ensayo se investigó el éxito de diferentes pruebas de desinfección para explantes uninodales de olivo. Los compuestos y dosis a utilizar fueron extraídos de RUGINI (1984), con algunas modificaciones. Para esta experiencia no se contó con un tratamiento testigo (desinfección con 0% de hipoclorito de sodio puesto que según las experiencias este se descartó).

CUADRO 20. Tratamientos realizados para probar el efecto de la desinfección de explantes uninodales de olivo de la variedad Sevillano.

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN NaClO (%)	REPETICIONES
33	2.5	23
34	1.0	22
35	0.5	21

A la solución desinfectante, además de contener las distintas dosis de hipoclorito de sodio, se le adicionó Tween 20 y 4 g de Acido cítrico y se mantuvieron los explantes en esta solución por 10 min. A los explantes, luego de su desinfección, se le realizó el mismo tratamiento que en el ensayo 1.1.

### 3.2.7. Ensayo 1.7.

En el presente ensayo se investigó el éxito de diferentes pruebas de desinfección para explantes uninodales de olivo. Los compuestos y dosis a utilizar fueron extraídos de RUGINI (1984), con algunas modificaciones. Para esta experiencia no se contó con un tratamiento testigo (desinfección con 0% de hipoclorito de sodio puesto que según las experiencias este se descartó).

CUADRO 21. Tratamientos realizados para probar el efecto de la desinfección de explantes uninodales de olivo de la variedad Sevillano.

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN NaClO	REPETICIONES
36	0.5	55
37	1.0	43
38	2.5	51

A la solución desinfectante, además de contener las distintas dosis de hipoclorito de sodio, se le adicionó Tween 20 y 4 g de Acido cítrico y se mantuvieron los explantes en esta solución por 10 min. A los explantes, luego de su desinfección, se le realizó el mismo tratamiento que en el ensayo 1.1.

3.3. Ensayo 2. Protocolo para la elección del mejor medio de establecimiento para cultivo *in vitro* de explantes uninodales de olivo.

#### 3.3.1. Ensayo 2.1.

En el presente ensayo se determinó el mejor medio de establecimiento. Esto basado en el medio de establecimiento indicado por RUGINI (1984), pero modificándose las dosis de zeatina. Para determinar cuál de los medios fue el más eficiente se trabajó con material proveniente de desinfecciones exitosas (realizadas sobre el medio de olivos (OM) con 0,5 mg/l de zeatina). Estos explantes fueron transferidos bajo cámara de flujo laminar a tubos que contenían 10 cc del medio a testear (previamente autoclavados por 15 min a 120°C). Al ser transferidos al nuevo medio fue renovado el corte basal y humedecido en una solución antioxidante. Luego que los explantes se inocularon en el medio a testear, se mantuvieron en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad a 27°C ( $\pm$  2°C). Las evaluaciones que se realizaron en este ensayo fueron: el porcentaje de brotación y una comparación de los distintos medios a testear en fechas pre-establecidas. Además se determinó si el medio produjo alguna reacción anormal en el explante como cambios de color, quemaduras en las puntas de las hojas y si se produjo el fenómeno de vitrificación.

CUADRO 22: Tratamientos realizados para encontrar el mejor medio de establecimiento en explantes uninodales de olivo de la variedad Sevillano.

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN DE ZEATINA (mg/l)	Nº DE REPETICIONES
TRATAMIENTO 1	0,5	11
TRATAMIENTO 2	1 0	11

### 3.3.2. Ensayo 2.2.

En el presente ensayo se determinó el mejor medio de establecimiento para explantes uninodales de olivo, esto basado en el medio de establecimiento indicado por RUGINI (1984), pero modificándose las dosis de zeatina. El material para este ensayo proviene de desinfecciones exitosas (realizadas sobre el medio de olivos (OM) con 0,5 mg/l de zeatina). El protocolo a seguir para la siembra de los explantes es el mismo realizado en el ensayo 2.1.

CUADRO 23: Tratamientos realizados para encontrar el mejor medio de establecimiento en explantes uninodales de olivo de la variedad Sevillano.

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN DE ZEATINA (mg/l)	Nº DE REPETICIONES
TRATAMIENTO 3	0,5	12
TRATAMIENTO 4	1,0	12

### 3.3.3. Ensayo 2.3

En el presente ensayo se determinó el mejor medio de establecimiento para explantes uninodales de olivo, esto basado en el medio de establecimiento indicado por RUGINI (1984), pero modificándose las dosis de zeatina. El material para este ensayo proviene de desinfecciones exitosas (realizadas sobre el medio de olivos (OM) con 0 mg/l de zeatina). El protocolo a seguir para la siembra de los explantes es el mismo realizado en el ensayo 2.1.

CUADRO 24. Tratamientos realizados para encontrar el mejor medio de establecimiento en explantes uninodales de olivo de la variedad Sevillano.

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN DE ZEATINA (mg/l)	Nº DE REPETICIONES
TRATAMIENTO 1	0	8
TRATAMIENTO 2	0.5	8
TRATAMIENTO 3	1.0	8

### 3.4. Ensayo 3. Protocolo para la elección del mejor medio de proliferación para cultivo *in vitro* de explantes uninodales de olivo.

En el presente ensayo se utilizó el medio basal descrito por RUGINI (1984) pero evaluando tres concentraciones de zeatina: 0, 2 y 4 mg/l. Para esto los explantes fueron transferidos bajo cámara de flujo laminar a tubos que contenían 10 cc del medio a testear. Al ser transferidos al nuevo medio se renovó el corte basal y de humedeció la base en una solución antioxidante. Luego que los explantes se inocularon en el medio a testear, se mantuvieron en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas oscuridad a 27°C .

Las evaluaciones que se realizaron en este ensayo a los 25 días de establecidos los tratamientos fueron: la sumatoria de la longitud de los brotes obtenidos y el número de explantes.

Además se determinó si el medio produjo alguna reacción anormal en el explante como cambios de color, quemaduras en las puntas de las hojas y si se produjo el fenómeno de vitrificación.

CUADRO 25. Tratamientos realizados para encontrar el mejor medio de proliferación en explantes uninodales de olivo de la variedad Sevillano.

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN DE ZEATINA (mg/l)	N° DE REPETICIONES
TRATAMIENTO 1	0	15
TRATAMIENTO 2	2	15
TRATAMIENTO 3	4	15

### 3.5. Obtención de un protocolo de enraizamiento *in vivo*

Caracterización y elección de los sustratos que cumplan con las condiciones ideales para la fase de aclimatación y enraizamiento de plántulas inducidas *in vitro*

### 3.6. Determinación del estado fenológico para realizar el trasplante.

No se pudo determinar las características del material vegetal apto para realizar el trasplante de la condición *in vitro* a la condición *in vivo*, debido al lento desarrollo de las plántulas en la condición *in vitro*.

3.7. Evaluación de un proceso de inducción radical *in vitro* previo al enraizamiento.

No se realizó esta actividad por la misma razón que la anterior.

3.8. Elección de sustratos.

Se realizó una selección de sustratos a través de 2 ensayos en los cuales se evaluó el resultado de enraizamiento en 20 repeticiones con el mismo material e igual concentración de auxinas.

3.9. Se tipificaron 6 mezclas de sustratos de acuerdo con los siguientes parámetros:

A partir de los ensayos para la determinación de sustrato se eligió una mezcla de 3 partes de perlita y una de turba, la que fue tipificada de acuerdo a su porosidad, capacidad hídrica, conductividad eléctrica y acidez.

3.10. Se evaluaron en los 6 sustratos tipificados, una de las variedades de olivo seleccionadas y otra especie testigo que tenga características similares al olivo en cuanto al tiempo de aclimatación pero que no presente dificultades en su propagación, a su vez todos los ensayos serán sometidos a dos tratamientos auxínicos diferentes en su concentración.

Se realizó un ensayo con 6 mezclas de sustratos: 3 que incluían perlita y turba, 1 con perlita y arena, 1 de turba sola y 1 de perlita sola.

Se utilizó la variedad Sevillano de olivos y Ligustrinas para evaluar las características rizogénicas de cada uno. Cada tratamiento tuvo 20 repeticiones.

La evaluación solo se realizó desde el punto de vista cualitativo, es decir, se consideró solamente el porcentaje total de estacas enraizadas.

3.11. Elección de tratamientos auxínicos.

Se seleccionó los productos auxínicos y las dosis de ellos con los que se está evaluando el enraizamiento *in vivo* de las diferentes variedades de olivo.

3.12. Establecimiento en cámara de enraizamiento.

En todos los ensayos se procedió a hacer una evaluación intermedia del proceso de enraizamiento analizando las estacas con una lupa cada 15 días durante el proceso.

3.13. Determinación de las variables bioclimáticas para la aclimatación de las plántulas enraizadas *in vitro* e *in vivo*:

Para la determinación de estas variables se procedió de la siguiente forma:

La variable temperatura del sustrato se mantuvo constante a 25°C durante todos los ensayos ya que se determinó que había suficiente claridad en la bibliografía al respecto.

La humedad relativa se mantuvo entre 40 y 70% producto de la regulación del control de humedad foliar y de una renovación forzada de la atmósfera entre 30 y 40 veces por hora, en este último parámetro se produjo una fuerte variación con respecto a lo programado ya que se aumentó el intercambio gaseoso en más de 10 veces.

Los registros de variables no fueron confiables a través del adquisidor computacional, de manera que se procedió a realizar registros manuales en virtud de los cuales se fueron ajustando los controles de humedad foliar y renovación forzada de atmósfera.

### 3.14. Diseño y evaluación de la infraestructura que asegure la reproductividad de la tecnología (instrumentos, maquinarias, herramientas):

La cámara de enraizamiento y aclimatación se diseñó y fabricó rigurosamente de acuerdo a lo programado.

La base de 1 por 2 m se construyó en fibra de vidrio, la cúpula sobre la base de 1 por 1 por 2 m se construyó con perfiles de aluminio y placas acrílicas dejando 4 ventanas de inspección.

En la base se distribuyó la calefacción basal con una muy densa red de alambre que asegura homogeneidad en la temperatura del sustrato. Esta red de calefacción está controlada por un termostato de bulbo. En el centro de la cúpula se dispuso un extractor y en los costados distales se perforaron 8 toberas de entrada de aire de manera tal que la renovación atmosférica es forzada por el extractor obligando al flujo de entrada a pasar por entre todas las plántulas que estén sometidas al proceso. El extractor está controlado por un temporizador que alterna 6 ciclos de 10 minutos por hora y en cada uno de estos ciclos existe un porcentaje de tiempo de marcha y otro de parada de manera de poder regular el régimen de renovación atmosférica entre 1 y 40 renovaciones por hora distribuida en 6 partes iguales durante la misma.

En los costados de la cúpula, hacia adentro y por sobre las ventanas de inspección, hay dos líneas hidráulicas conectadas a una bomba y donde están distribuidos homogéneamente 4 aspersores a cada lado, estos aspersores emiten una fina neblina con un caudal de 7 l/h cada uno. Los aspersores están controlados por un aparato llamado controlador de humedad foliar, el cual a través de un sensor que simula una hoja, determina cada vez que éstas necesitan agua y manda una orden para que se produzca la inyección, el controlador posee dos comandos: uno de sensibilidad donde se fija el grado de humedad mínimo que el

sensor debe tener y el otro de tiempo donde se fija el tiempo que durará la aspersión cada vez.

Aparte de los mecanismos que controlan las variables ambientales, se integró dentro y fuera de la cámara una serie de sensores de luz, temperatura, humedad relativa, caudal de inyección y percolación total, los que están conectados a un computador para que registre la evolución de estas variables pero los datos que arroja este sistema no son confiables a pesar de que el fabricante del sistema ha corregido numerosas veces su instalación.





## 5. PROBLEMAS ENFRENTADOS

El principal problema enfrentado para cumplir con el objetivo de establecimiento de material de olivo *in vitro* fue el alto porcentaje de contaminación obtenido, lo que ocasionó por una parte un atraso en los tiempos preestablecidos, y por otra parte el no lograr alcanzar a cumplir todos los objetivos planteados inicialmente.

Para solucionar ésto, se adquirió plantas de olivo las que se mantuvieron protegidas bajo un invernadero y con constantes desinfecciones en base a fungicidas y a partir de este material se continuó con los ensayos de desinfección, llegando finalmente a establecer un protocolo de desinfección para este material vegetal.

Por otra parte, esto significó que no se alcanzara a aclimatar material procedente de cultivo *in vitro*, razón por la cual se decidió utilizar estacas para la evaluación de la cámara bioclimática. Sin embargo, se ha planteado un ensayo de enraizamiento de material procedente de cultivo *in vitro*, el que se ha presentado como parte de un ensayo de enraizamiento de estacas, que está llevando a cabo una egresada de nuestra Facultad ( se adjunta copia de la pauta de taller de titulación).

El principal problema enfrentado para la consecución del objetivo de evaluación de las infraestructuras de aclimatación - enraizamiento y los ambientes aptos para la aclimatación, fue las constantes fallas del sistema de medición y registro digital de las variables, el cual se descalibra con frecuencia arrojando datos alejados de la realidad por lo cual fue necesario reforzar el sistema de control de variables a través de instrumentos alternativos.



## 7. DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

7.1. CARTER, E. 1997. "Micropropagación de olivo (*Olea europea* L.) " Taller de Licenciatura, Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso. 44p. Se adjunta fotocopia de la tapa y del resumen.

7.2. CASTRO, M. y CARTER, E. 1997. "Micropropagación de olivo (*Olea europea* L.)" Trabajo presentado en el XLVIII Congreso Anual de la Sociedad Agronómica de Chile, realizado en Arica entre el 26 y el 28 de noviembre de 1997. Se adjunta resumen del trabajo expuesto y el material audiovisual utilizado.

## 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Existe una influencia en la época que se extrae el material vegetal para el establecimiento de olivo *in vitro*. La mejor época es en primavera hasta fines de verano, es decir, en épocas donde se produce crecimiento vegetativo. ✓

La elección del tipo de explante a utilizar también influye en el éxito de la desinfección, para lograr un alto porcentaje de establecimiento; así como la cantidad de material que se puede obtener del stock de plantas que se posea.

El pre-acondicionamiento del material con que se trabajará juega un rol importante en la desinfección de explantes uninodales de olivo, esto debido a que mejora la acción posterior del tratamiento de desinfección con hipoclorito de sodio.

La etapa de desinfección sería una de las etapas críticas para la propagación *in vitro* de explantes uninodales de olivo.

En la etapa de establecimiento y proliferación de explantes uninodales de olivo revierte importancia la composición del medio, siendo un aspecto importante a considerar la presencia de zeatina que posea el medio.

La infraestructura diseñada (cámara bioclimática), cumple con todos los requisitos fijados en el proyecto para lograr una buena respuesta del material vegetal al enraizamiento y su futura aclimatación. Si bien es cierto no se pudo, durante la duración del proyecto, llevar a cabo la prueba de la cámara con material de procedencia *in vitro*, es altamente probable que la respuesta de esta infraestructura sea igualmente adecuada.

Es necesario insistir en el perfeccionamiento de sistemas digitales de registro que permitan conocer con mayor precisión la evolución de cada variable.

La evaluación separada de ambientes de crecimiento aéreos y basales, constituye uno de los objetivos más importantes del proyecto ya que permite protocolizar la fase de enraizamiento y aclimatación de cualquier cultivar.

En este aspecto el proyecto no obtuvo todos los resultados esperados por la falla del sistema de registro de variables, lo cual impidió hacer un análisis más exacto de la evolución de cada una de estas variables, sin embargo se realizaron las mediciones de variables con instrumentos alternos con lo cual se obtuvieron algunos resultados ya detallados en "Cumplimiento de los Objetivos del Proyecto".

Sin embargo podemos resumir los logros en este aspecto, en la necesidad de que una cámara de enraizamiento y aclimatación tenga: un control de temperatura del sustrato, un control de la renovación atmosférica y un control de la lámina de agua

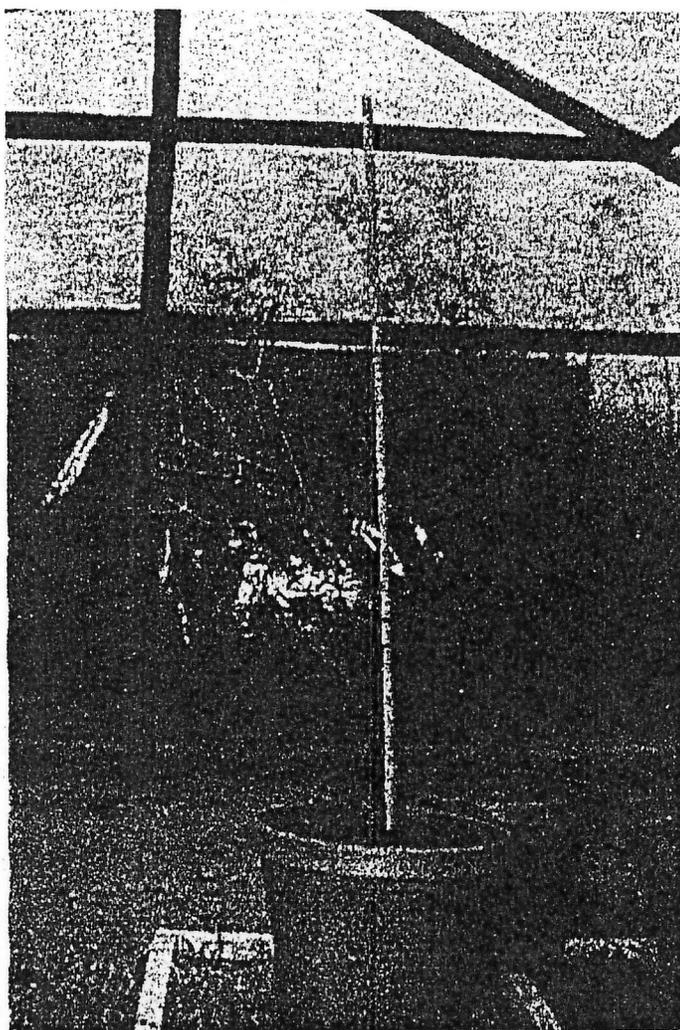
que moja las hojas que se autoajuste según las condiciones de evaporación de la cámara.

Con estos tres controles se podrá obtener un ambiente absolutamente controlado de la fase aérea del proceso, impidiendo por un lado la deshidratación de nuestro material vegetal y por otro lado frenada la proliferación de patógenos en la fase.

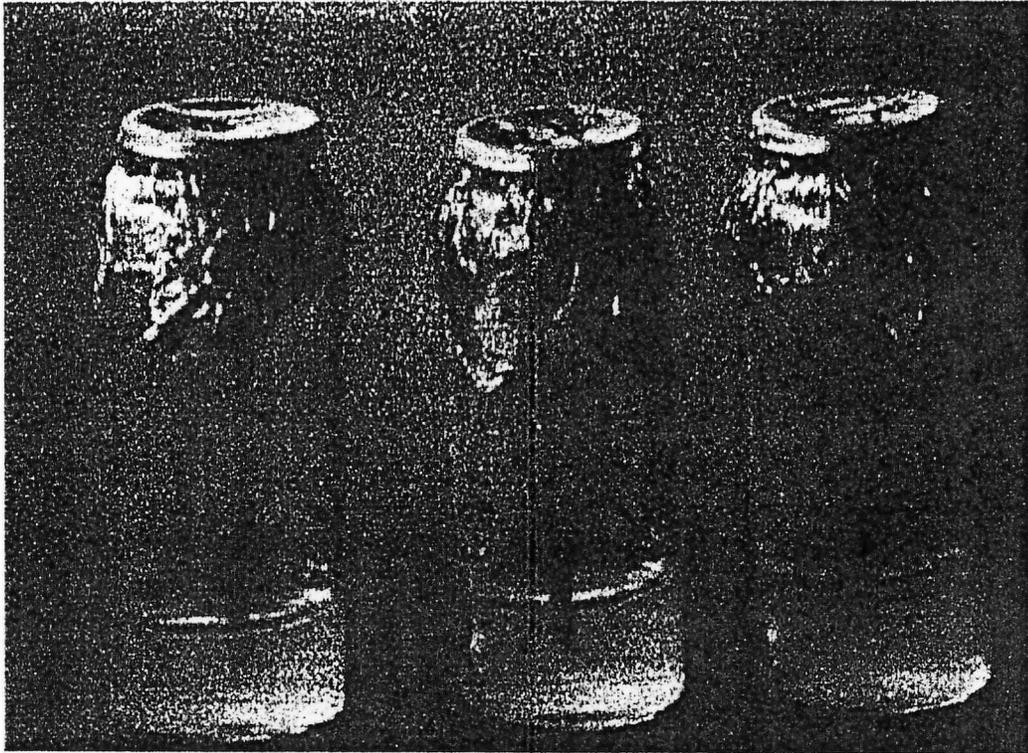
En cuanto a los ambientes radiculares o basales será necesario insistir en la búsqueda de nuevas mezclas que teniendo un elevado grado de retención hídrica tengan a su vez una importante porosidad, tal como la perlita, pero que en la mezcla mantengan una acidez entre pH 5 – 5,5 y una conductividad eléctrica no mas alta de 1,5 mmhos, con la búsqueda de estos parámetros se pretende mantener una alta acidez que limite la proliferación patógena sin afectar el tejido vegetal y una baja conductividad para evitar la toxicidad que una alta concentración de sales acarrea.

## 9. ANEXOS

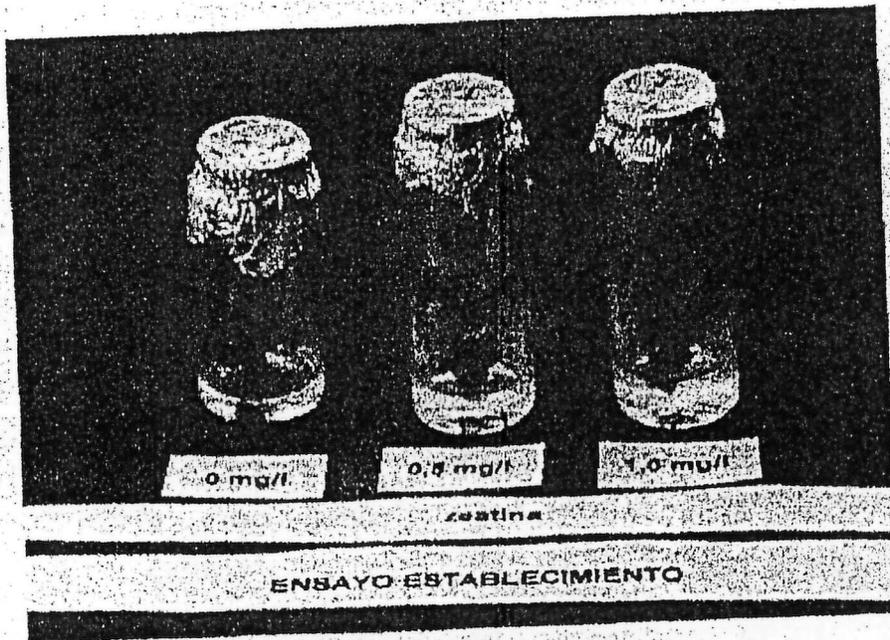
- Plantas madres dentro del invernadero frío, desde donde se obtuvo material vegetal con que se trabajó.
- Explantes uninodales en donde se realizó una exitosa desinfección.
- Explantes uninodales pertenecientes al ensayo de establecimiento.
- Plántula de olivo *in vitro* en etapa de elongación.
- Tapa y resumen taller de titulación
- Resumen trabajo y material audiovisual usado en el XLVIII Congreso Anual de la Sociedad Agronómica de Chile.
- Análisis Fitopatológicos.
- Pauta de Taller.



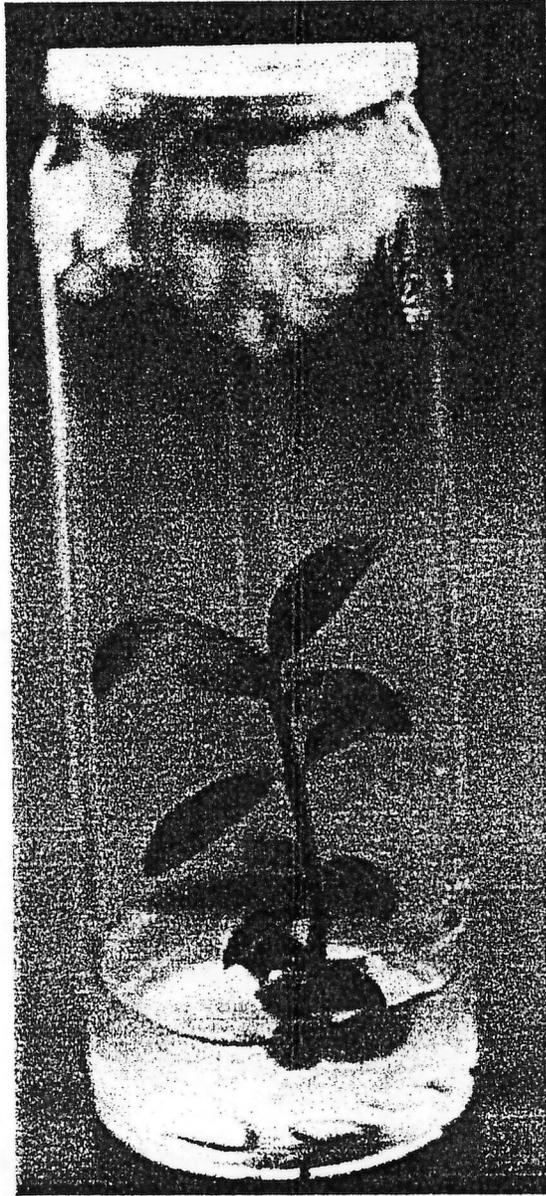
Plantas madres dentro del invernadero frío desde donde se obtuvo el material vegetal con se trabajó.



Explantes unidodales en donde se realizó una exitosa desinfección.



Explantos unidocales pertenecientes al ensayo de establecimiento.



Plántula de olivo *in vitro* en etapa de elongación.

UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO

FACULTAD DE AGRONOMIA

AREA DE FRUTICULTURA



TALLER DE LICENCIATURA

MICROPROPAGACIÓN DE OLIVO  
(*Olea europea* L.)

EVELYN MARÍA CARTER RAMELLI

QUILLOTA CHILE  
1997

## 6. RESUMEN

Esta investigación es la primera etapa de un proyecto que tiene como objetivo establecer un protocolo para la propagación *in vitro* del olivo (*Olea europea* L.).

El material vegetal utilizado para esta investigación fue:

- Material proveniente de campo de las variedades Sevillano, Ascolano y Empeltre.
- Stock de plantas madres de la variedad Sevillano mantenidos en un invernadero frío perteneciente al Laboratorio de Micropropagación de la Facultad de Agronomía de la UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO.

En esta etapa se desarrolló el protocolo para determinar el tipo de explante a utilizar. Los tipos de explantes testeados fueron: uninodales, una yema y ápices.

El tratamiento de desinfección a seguir se basó en una primera instancia en la utilización de hipoclorito de sodio en la desinfección de tres tipos de explantes (una yema, ápice y uninodal), luego las experiencias se centraron en pruebas de desinfección para explantes uninodales de olivo, ya que estos fueron los que presentaron mejores resultados. Junto con esto se realizó un pre-acondicionamiento para el material vegetal con que se experimentará. Encontrándose que la mejor concentración de desinfectante a utilizar es 2,5% de hipoclorito de sodio.

La determinación de un medio de establecimiento para explantes uninodales de olivo se basó en el medio diseñado por RUGINI (1984), pero se modificaron las concentraciones de zeatina que contenía este medio, obteniéndose como la concentración de zeatina óptima a utilizar 0,5 mg/l.

#### 47. □ Micropropagación de olivo ( *Olea europaea* L. ).

Mónica Castro V.<sup>1</sup> y Evelyn Carter R.

<sup>1</sup> Laboratorio de Micropropagación , Facultad de Agronomía. Universidad Católica de Valparaíso. Casilla 4 – D Quillota.

Esta investigación es la primera etapa de un proyecto que tiene como objetivo establecer un protocolo para la propagación *in vitro* del olivo.

El material vegetal utilizado fue : material proveniente de campo de las variedades Sevillano, Ascolano y Empeltre; y plantas madres de la variedad Sevillano, mantenidas en un invernadero frío.

En esta etapa se determinó el tipo de explante a utilizar, para esto se testó 3 tipos de material: uninodal, yema y ápice caulinar.

El tratamiento de desinfección a seguir se basó en una primera instancia en la utilización de hipoclorito de sodio para la desinfección de los 3 tipos de explantes mencionados, luego las experiencias se centraron en pruebas de desinfección para explantes uninodales de olivo, ya que éstos fueron los que presentaron los mejores resultados. Se encontró que la mejor concentración de desinfectante fue 2,5 % de hipoclorito de sodio.

La determinación del medio de establecimiento para explantes uninodales de olivo se basó en el medio descrito por Rugini ( 1984 ), modificándose las concentraciones de zeatina, obteniéndose los mejores resultados con 0,5 mg/l de zeatina.

Financiado por : Proyecto FIA C96 – I – A – 016.

#### 48. □ Inducción floral y producción del Olivo durante el fenómeno El Niño.

Francisco de Sales Tito Salas.

Proyecto Caraveli de Ayuda en Acción. Bella Unión, Arequipa, Perú.

En prevención de las anomalías climáticas causadas por el fenómeno El Niño, que perturban de un modo particular la producción olivícola, debido a la carencia de frío invernal para la inducción floral y a la mayor proliferación de insectos dañinos por las elevadas temperaturas, se planificó un ensayo demostrativo destinado a contrarrestar estos efectos nocivos. En un huerto de seis has. y 600 olivos de la variedad Gordal Sevillana, de 20 años de edad, ubicado a una altitud de 225 m.s.n.m. , en el fundo Chevalier – Bella Unión, se desarrolló un cronograma especial de manejo técnico, a fin de inducir la floración y el cuajado. El plan incluyó cinco aspectos técnicos fundamentales : 1. Agoste forzado de tres meses; 2. Manejo de poda y fertilización; 3. Riego ( el 1º a mediados de Agosto ); 4. Control de plagas; 5. Aplicación de estimulantes y abono foliar. A pesar de la intensidad del actual evento El Niño, los resultados preliminares son promisorios, observándose una satisfactoria producción floral y cuajado de frutos en un 80 % de los árboles tratados.



**MICROPROPAGACION DE OLIVO**  
*(Olea europaea L.)*

Mónica Castro  
Evelyn Carter  
Laboratorio de Micropropagación  
Facultad de Agronomía  
Proyecto FIA: C96-1-A-016

UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO



## PROPAGACIÓN

### SEXUAL:

- Semilla

### ASEXUAL:

- Estacas
- Ovulos
- Vástagos
- Acodo
- Estaquillado semidesoso
- Micropropagación



#### MICROPROPAGACIÓN DE OLIVO

##### ☛Ventajas

##### ☛Explante:

- uninodal
- ápices
- época

##### ☛Desinfección:

- planta madre
- explante, tricomas
- protocolos



#### OBJETIVOS

- ✧ Identificar y validar el tipo de explante a utilizar.
- ✧ Validar y protocolizar una técnica de desinfección.
- ✧ Validar y protocolizar un medio de establecimiento de explantes.



## MICROPROPAGACIÓN DE OLIVO

☛ Medio de cultivo:  
OM (olive medium)  
zeatina



#### **MATERIAL Y MÉTODO**

❖ Laboratorio de  
Micropropagación de la  
Facultad de Agronomía,  
U.C.V.

❖ Material de campo:  
Sevillano, Empeltre, Ascolano.

❖ Material de vivero: Sevillano.



#### MATERIAL Y MÉTODO

☛ **Ensayo 1:**

Protocolo de desinfección, con distintas concentraciones de hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ).

☛ **Ensayo 2:**

Medio de establecimiento con zeatina.



**Efecto de la desinfección con hipoclorito de sodio, en  
explantos de olivo recolectados el 27 de mayo de 1996**

Tratamiento	Porcentaje(%) de éxito a los 44 días
1(uninodal, 5% NaClO)	77 a
2(uninodal, 10% NaClO)	60 a c
3(uninodal, 1% NaClO)	0 b
4(yema, 1% NaClO)	0 b
5(ápice, 1% NaClO)	25 b c

Porcentajes con letras iguales no presentan diferencias de acuerdo al test de inferencia para proporciones con distribución binomial ( $p < 0,05$ )



**Efecto de la desinfección con hipoclorito de sodio, en  
explantos de olivo recolectados el 18 de Junio de 1996**

<b>Tratamiento</b>	<b>Porcentaje(%) de éxito a los 21 días</b>
6(uninodal, 5% NaClO)	10 a b
7(uninodal, 5% NaClO)	20 a b
8(uninodal, 1% NaClO)	0 b
9(yema, 1% NaClO)	10 a b
10(ápice, 1% NaClO)	36 a

Porcentajes con letras iguales no presentan diferencias de acuerdo al test de inferencia para proporciones con distribución binomial ( $p < 0,05$ )



**Éxito de la desinfección con hipoclorito de sodio,  
en Explantos unimodales recolectados el 2 de Enero  
de 1997**

Tratamiento	Porcentaje de éxito a los 8 días
11(0,25% NaClO)	25 b
12(0,5% NaClO)	67 a
13(0,75% NaClO)	50 a b

Porcentajes con letras iguales no presentan diferencias de acuerdo al test de inferencia para proporciones con distribución binomial ( $p < 0,05$ )

**Efecto de la desinfección con hipoclorito de sodio en  
explantos unimodales recolectados el  
26 de febrero de 1997**

<b>Tratamiento</b>	<b>Porcentaje de éxito a los 33 días</b>
2,5% NaClO	5 a
1,0% NaClO	45 b
0,5% NaClO	90 b

Porcentajes con letras iguales no presentan diferencias de acuerdo al test  
de inferencia para proporciones con distribución binomial ( $p < 0,05$ )



**Éxito de la desinfección con hipoclorito de sodio,  
en explantes uninodales recolectados el 5 de abril  
de 1997**

Tratamiento	Porcentaje de éxito a los 26 días
2,5% NaClO	65 a
1,0% NaClO	81 a
0,5% NaClO	81 a

Porcentajes con letras iguales no presentan diferencias de acuerdo al test de inferencia para proporciones con distribución binomial ( $p < 0,05$ )



**Efecto de la desinfección con hipoclorito de sodio,  
en explantes uninodales de olivo recolectados el 20  
de abril de 1997**

Tratamiento	Porcentaje de éxito a los 8 días
2,5% NaClO	39 a
1,0% NaClO	14 b
0,5% NaClO	0 c

Porcentajes con letras iguales no presentan diferencias de acuerdo al test de inferencia para proporciones con distribución binomial ( $p < 0,05$ )



**Evaluación del crecimiento promedio de brotes en medio de establecimiento**

Tratamiento	Crecimiento promedio (cm) de brotes a los	
	26 días	35 días
0,5 mg/l zeatina	1,25 a	1,55 a
1,0 mg/l zeatina	1,45 a	1,80 a

Longitud promedio de brotes con letras iguales no presentan diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey (0,05>p).



**Evaluación del crecimiento promedio de brotes a los 17 días de inoculación en medio de establecimiento**

Tratamiento	Crecimiento promedio (cm) de brotes a		
	17 días	34 días	52 días
0 mg/l zeatina	0,42 a	0,51 a	0,75 a
0,5 mg/l zeatina	0,85 b	1,23 b	1,48 b
1,0 mg/l zeatina	0,95 b	1,45 b	1,63 b

Longitud promedio de brotes con letras iguales no presentan diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey (0,05-p).



#### CONCLUSIONES

☉ Influencia de la época de extracción del material.

Mejor resultado en primavera-verano.

☉ Tipo de explante a utilizar, influye en el éxito de la desinfección.

☉ Preacondicionamiento del material.



#### CONCLUSIONES

❖ Etapa de desinfección es crítica en la micropropagación de olivo.

❖ Importancia de la presencia de zeatina en el medio de establecimiento.



UNIVERSIDAD  
CATOLICA  
DE VALPARAISO

FUNDACION ISABEL CACES DE BROWN

FACULTAD DE AGRONOMIA

Fono 56 33 310524 FAX 56 32 274570

Casilla 4-D Quillota, CHILE

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO  
ANALISIS FITOPATOLOGICO

SOLICITA : Laboratorio de Micropropagación  
DIRECCION : Facultad de Agronomía  
LOCALIDAD : Quillota  
N° REGISTRO : 011  
FECHA ANALISIS : 17 / junio / 1997  
CULTIVO : Trozos de ramas de Olivo  
  
SINTOMATOLOGIA : Plántulas de olivo asintomáticas cultivadas "in vitro"  
  
AISLAMIENTO :  
de Bacterias : Negativo.  
OBSERVACIONES : Se realizaron siembras desde tejido como de medio de cultivo con resultado negativo.

  
**XIMENA BESOAIN C.**  
Ingeniero Agrónomo M.Sc.  
Fitopatóloga

NOTA: El especialista que suscribe no se hace responsable de la representatividad del muestreo, ni de la calidad de la muestra así obtenida.



**UNIVERSIDAD  
CATOLICA  
DE VALPARAISO**

FUNDACION ISABEL CACES DE BROWN

**FACULTAD DE AGRONOMIA**

Fono:56 33 310524 FAX 56 32 274570

Casilla 4-D Quillota, CHILE

**DIAGNOSTICO DE LABORATORIO  
ANALISIS FITOPATOLOGICO**

SOLICITA : LABORATORIO DE MICROPROPAGACIÓN  
DIRECCION : F.A. La Palma, Quillota  
LOCALIDAD : Quillota  
N° REGISTRO : 024  
FECHA ANALISIS : 09 / julio / 1997  
CULTIVO : Frasco de ensayo

**EVALUACION DE SENSIBILIDAD**

Patógeno : Colonia anaranjada

Productos evaluados : Ingrediente activo

---

Streptomicona ( 10 ppm )  
Kasugamicina ( 10 ppm )  
Oxytetraciclina ( 30 ppm )  
Cloranfenicol ( 30 ppm )

---

**RESULTADOS  
BACTERICIDAS**

---

Streptomicona	No sensible
Kasugamicina	Sensible
Oxytetraciclina	Sensible
Cloranfenicol	No sensible

---

OBSERVACIONES : S/O.

  
**XIMENA BESOAIN C.**  
Ingeniero Agrónomo M.Sc.  
Fitopatóloga

NOTA: El especialista que suscribe no se hace responsable de la representatividad del muestreo, ni de la calidad de la muestra así obtenida.



UNIVERSIDAD  
CATOLICA  
DE VALPARAISO

FUNDACION ISABEL CACES DE BROWN

*FACULTAD DE AGRONOMIA*

Fono 56 33 310524 FAX 56 32 274570

Casilla 4-D Quillota, CHILE

**DIAGNOSTICO DE LABORATORIO  
ANALISIS FITOPATOLOGICO**

SOLICITA : Laboratorio de Micropropagación

DIRECCION : F. A. La Palma, Quillota

LOCALIDAD : Quillota

Nº REGISTRO : 024

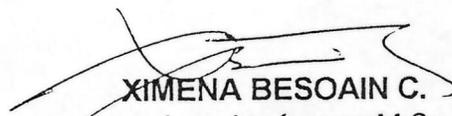
FECHA ANALISIS : 09 / julio / 1997

CULTIVO : Frasco de ensayo

SINTOMATOLOGIA : Medio de cultivo correspondiente a plántula de olivo.

AISLAMIENTO : Se aisló en forma consistente colonia anaranjada, gram negativa y de forma bacilar.

OBSERVACIONES : S/O.

  
**XIMENA BESOAIN C.**  
Ingeniero Agrónomo M.Sc.  
Fitopatóloga

NOTA: El especialista que suscribe no se hace responsable de la representatividad del muestreo, ni de la calidad de la muestra así obtenida.

UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
QUILLOTA

PAUTA TALLER

ENRAIZAMIENTO DE ESTACAS DE OLIVO  
(*Olea europea* L.)  
DE MATERIAL PROVENIENTE DE CAMPO E *in vitro*

TALLERISTA : LORETO RUIZ G.  
PROFESOR GUIA: MONICA CASTRO V.

## INTRODUCCION

En Chile existen alrededor de 3000 hectáreas de olivo, distribuidas entre la I y la VIII región. Sin embargo, la III región es la que concentra alrededor del 40% del total de la superficie, siguiéndole la I Región con un 30%.

En cuanto a producción, el mayor porcentaje de las plantaciones está destinado a la producción de oliva de mesa, y solo un 20% está destinado al aceite de oliva.

Las principales variedades para aceituna de mesa son Sevillano y Azapa, mientras que para aceite lo son las variedades Empeltre y Liguria.

En general la olivicultura en Chile es bastante tradicional, incluso se puede decir que presenta características de marginalidad. Esto se debe a que el olivo es una especie bastante rústica, pues por una parte al ser bastante tolerante a la sequía, ha hecho que se establezca en zonas de secano y en suelos con menores potencialidades y, por otra parte, porque se ha invertido poca tecnología en su cultivo, traduciéndose todo esto en producciones bajas y de pobre calidad.

En el año 1995 el Ministerio de Agricultura inicia el Programa de Desarrollo para la Olivicultura Nacional, el que se enmarca dentro de una política global de transformación y modernización de la agricultura chilena.

En la búsqueda de nuevas opciones productivas, el olivo resulta ser en nuestro país una interesante alternativa productiva, tanto para la producción de aceites finos como de frutos, fundamentalmente por las atractivas perspectivas económicas que posee y además porque Chile cuenta con condiciones edafoclimáticas excelentes para el establecimiento de huertos de alta producción y calidad.

Sin embargo, es indispensable la modernización de los sistemas de producción e industrialización existentes para poder optar a competir con los exigentes mercados internacionales.

Dentro de este contexto, los centros de investigación juegan un rol fundamental en el crecimiento y desarrollo de la olivicultura nacional, ya que son los encargados de buscar las soluciones a las principales limitaciones existentes como son la falta de variedades de buen rendimiento y calidad, malos manejos a nivel de huerto y vivero, tecnología obsoleta para los procesos industriales, entre otros aspectos.

Es por esto que resulta ser de gran importancia el desarrollo de nuevas y más modernas técnicas de propagación del olivo, que estén orientadas a la obtención de plantas de alta calidad y en gran cantidad, producidas dentro de un período relativamente corto que permita satisfacer las crecientes demandas.

## OBJETIVOS GENERALES

- Desarrollar una técnica de enraizamiento de estacas de olivo de material proveniente de campo e *in vitro*
- Obtener estacas enraizadas de olivo bajo condiciones bioclimáticas específicas.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar el efecto de 3 dosis de IBA y de 5 épocas de recolección en el enraizamiento *in vivo* de estacas semileñosas.
- Evaluar el efecto de 3 dosis de IBA en el enraizamiento *in vivo* de microestacas provenientes de material propagado *in vitro*

## **MATERIALES Y METODOS**

El ensayo se realizará en el Laboratorio e Invernadero de Micropropagación de la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso durante el período comprendido entre los meses de Octubre de 1997 y Febrero de 1998.

### **Ensayo 1**

#### **Enraizamiento de estacas semileñosas**

El material vegetal a utilizar corresponde a estacas semileñosas y subterminales de 15 cm de longitud de la variedad Sevillano. Su recolección se llevará a cabo durante 5 meses, realizando una recolección por mes.

Las estacas serán desinfectadas con una solución fungicida compuesta por Captan y Benlate en concentraciones de 1.8 g/l de cada uno de ellos.

Posteriormente las estacas serán sometidas a un tratamiento auxínico consistente en la aplicación de ácido indol-3- butírico (IBA).

Se aplicará 2000 ppm de solución de IBA a un tercio de las estacas, a otro tercio 4000 ppm y al otro tercio no se le aplicará IBA (testigo).

La aplicación de auxina se realizará sumergiendò por 5 segundos la base de las estacas recién cortadas (2 cm) en la solución.

Las estacas serán colocadas en un medio de enraizamiento compuesto por Perlita y Turba (3:1)

## **Ensayo 2**

### **Enraizamiento de microestacas**

Se utilizarán microestacas propagadas *in vitro* de la variedad Sevillano.

El tratamiento auxínico a realizar es el mismo al del ensayo 1.

Las microestacas serán colocadas en el mismo medio de enraizamiento del ensayo 1 y se mantendrán cubiertas con un envase plástico por un lapso de una a dos semanas.

El proceso de enraizamiento, tanto de las estacas del ensayo 1 como de las microestacas del ensayo 2, se llevará a cabo dentro de una cámara bioclimática que cuenta con las siguientes estructuras:

#### 1. Sistema de calefacción basal:

El sustrato se mantendrá a una temperatura constante de 25°C.

#### 2. Sistema de humidificación de las hojas mediante nebulización:

La nebulización se llevará a cabo en forma intermitente y controlada por un sensor de humedad, con el objeto de mantener una alta humedad relativa y de disminuir la temperatura de las hojas.

#### 3. Sistema de renovación de gases ambientales:

El aire será renovado 40 veces por hora.

## DISEÑO ESTADISTICO

El ensayo 1 será realizado con un diseño completamente al azar con arreglo factorial compuesto por 15 tratamientos, con 24 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos resultan de la combinación de tres concentraciones de IBA y 5 fechas de recolección (Cuadro 1).

La distribución de los tratamientos se muestra en el cuadro 3.

El ensayo 2 será realizado con un diseño completamente al azar con arreglo factorial compuesto por 3 tratamientos. Los tratamientos consisten en la aplicación de 3 dosis de IBA (Cuadro 2)

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos del Ensayo 1.

FECHA DE RECOLECCION	DOSIS DE IBA (ppm)	TRATAMIENTO
OCTUBRE	0	1
	2.000	2
	4.000	3
NOVIEMBRE	0	4
	2.000	5
	4.000	6
DICIEMBRE	0	7
	2.000	8
	4.000	9
ENERO	0	10
	2.000	11
	4.000	12
FEBRERO	0	13
	2.000	14
	4.000	15

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos del Ensayo 2.

DOSIS DE IBA (ppm)	TRATAMIENTO
0	A
2000	B
4000	C

Cuadro 3. Distribución aleatoria de los tratamientos del Ensayo 1.

5	6	14	1	8
15	3	9	4	10
7	12	11	2	13

PARAMETROS A EVALUAR :

- Porcentaje de enraizamiento
- Número de raíces
- Longitud de las raíces
- Porcentaje de supervivencia

MEDICIONES:

Se realizarán a los 30, 60 y 90 días después del establecimiento.

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

CABALLERO, J.M; DEL RÍO, C. 1997. Métodos de multiplicación. El cultivo del olivo. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 605 p.

FOUAD, M.M; FAYEK, H.H; EL-SAYED M.E. 1990. Rooting of eight olive cultivars under mist. *Acta Horticulturae*, 286: 57-59

OPITZ, K.W; HARTMANN, H.T. 1975. Division of Agricultural Sciences, California University. N° 2739: 3pp.

WIESMAN, Z; LAVEE, S., 1995. Enhancement of IBA stimulatory effect on rooting of olive cultivar stem cuttings. *Scientia Horticulturae*, 62: 189-198.

WIESMAN, Z; LAVEE, S., 1995. Relationship of Carbohydrate Sources and Indole-3-butyric Acid in Olive Cuttings. *Aust. J. Plant Physiol.*, 22: 811-816.

## 10. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- AREVALO, M. 1986. Establecimiento de un método de propagación *in vitro* para ejemplares adultos de papayo hembra *Carica pubescens* LENNE ET KOCK (*Carica candamarcensis* HOOKER) . Tesis Ing. Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. 74 p.
- BIANCANI, L. 1996. Evaluación de tres protocolos de desinfección, tres protocolos de uso de antioxidantes para el cultivo *in vitro* de chirimoya (*Annona cherimola* Mill) y determinación cuantitativa de los contenido de fenóles en ramillas. Taller de licenciatura Ing. Agr. Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. 112 p.
- CABALLERO, J. 1997. Métodos de Multiplicación. In : Barranco D.; Fernandez-Escobar D.; Rallo, L. eds. El Cultivo del Olivo. Madrid, Mundiprensa. pp. 81-105
- CAÑAS L., AVILA J.; VICENTE M.; BENBADIS A.;1992, Micropropagation of Olive (*Olea europea* L.), Biotechnology in Agriculture and Forestry. 18: 493 - 505.
- CAÑAS L.; CARRAMOLINO L.; VICENTE M., 1987, Vegetative Propagation of the Olive Tree from *in vitro* Cultured Embryos, Plant Science. 50: 85 - 90.
- CASANOVA, G.-, 1997, Diagnóstico actual de la producción olivícola en Chile, Fundación para la Innovación Agraria, Santiago. Seminario InterNaCional olivícola, 7-8 de agosto 1997. pp. 18.
- GARCIA-BERENGUER A.; DURAN R., 1990, Mineral Media for *in vitro* Propagation of Juvenile 'Pícuál', Acta Horticulturae. 286: 61 - 64.
- GUERRERO A., 1988. Nueva Olivicultura. Ed. Mundi-Prensa. España. 269 p..
- HARTMANN H.; KESTER D., 1995, Propagación de Plantas. Compañía Editorial Continental, México, 760 p..
- LEVA, A.R.; PETRUCCELLI, R.; BARTOLINI, G. 1994, Mannitol 'in vitro' Culture of *Olea europea* L. (cv. Maurino), Acta Horticulturae. 356: 43 - 46.
- MARTIN, G. 1994. Botany of the olive. In: Ferguson, L., Steven, G., Martin, G., eds. Olive production manual. Oakland, California, University of California. pp. 19-21. (Publication 353).
- MENCUCCINI, M., 1995. Micropropagazione e Miglioramiento Genetico *in vitro* dell' Olivo: Stato dell'Arte e Prospettive Future. Rivista di Frutticoltura. 12: 73 - 82.

MENCUCCINI, M.; CORONA, C. 1991. Plant Regeneration and First attempt of *in vitro* Genetic improvement of Olive (cv. Moraiolo). *Acta Horticulturae*, 300: 261 - 264

OYANEDEL, E. 1995. Desarrollo de sistemas de micropropagación para dos portainjertos de palto (*Persea americana* Mill.) resistentes a salinidad. Taller de Licenciatura. Ing. Agr. Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía, Quillota. 85p.

PETRIDOU, M.; VOYIATZIS D.G., 1994. The beneficial effect of girdling, auxin, Tween 20 and Paclobutrazol on the propagation of olive by an improve method of mounlayering. *Acta Horticulturae*. 356: 24-27.

PIERIK R; 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. España, Ed. Mundi-Prensa, 326p

RAMA P.; PONTIKIS C. A. 1990. *In vitro* Propagation of Olive (*Olea europea sativa* L.) 'Kalamon'. *Journal of Horticultural Science*. 65 (3), 347 - 353.

RAPOPORT, F. 1997. Botánica y morfología. In: Barranco, O.; Fernandez-Escobar, R. y Rallo L., eds. El cultivo del olivo. Madrid, Mundi-Prensa. pp. 35 - 57.

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 Emryos, *Scientia Horticulturae*. 24: 123 - 134.

RUGINI, E. 1990. *In Vitro* Culture of the Olive: An Overview of the Present Scientific Status, *Acta Horticulturae*. 286: 93 - 96.

RUGINI E.; BAZZOFFIA A., 1988. A Simple *in vitro* Method To Avoid The Initial Dark Period and to Increase Rooting In Fruit Trees. *Acta Horticulturae*. 227: 438 - 440.

RUGINI E.; FONTANAZZA G. 1981. *In Vitro* Propagationn of 'Dolce Agogia' Olive., *HortScience*. 16 (4): 492 - 493.

RUGINI E.; LUPPINO M. 1991, Endogenous Polyamine and Root Morphogenesis Variations Under Different Treatments in Cuttings and in *in vitro* Explants of Olive, *Acta Horticulturae*. 300: 225 - 232.

SALISBURY F.; ROSS C. 1994. Fisiología Vegetal. 4ta ed. Mexico. Grupo editorial Iberoamericana. 759 p.

SAN MARTIN, S. 1996. Propagación *in vitro* de portainjertos de palto (*Persea americana* Mill) cvs. Lula y Velvick resistentes a salinidad: enraizamiento y aclimatación. Taller de licenciatura, Ing.Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 111p.

SEYHAN, S.; ÓZZAMBAK E., 1994, Shoot Multiplication of Some Olive (*Olea europea* L.) Cultivars. *Acta Horticulturae*. 356: 35 -38.

SUTTER, E. 1994. Olive cultivars and propagation. In: Ferguson, L., Steven, G., Martin, G. eds. Olive production manual. Oakland, California, University of California. pp.23-30. (Publication 353).

WIESMAN, Z.; LAVEE, S. 1995. Relationship of carbohydrate sources and indole-3-butyric acid in olive cuttings. *Aust. J. Plant. Physiol.* 22:811-816.

WIESMAN, Z.; LAVEE, S. 1995b. Enhancement of IBA stimulatory effect on rooting of olive cultivar stem cuttings. *Scientia Horticulturae* 62:189-198.