



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN SOCIOECONOMÍA, ESTADÍSTICA E INFORMÁTICA

ECONOMÍA

MORFOGÉNESIS *IN VITRO* DE ECOTIPOS DE OLIVO (*Olea europaea* L.), SU EVALUACIÓN FINANCIERA Y EL MAPEO DE LA CADENA DE VALOR DE LOS PRODUCTOS DEL OLIVO EN CHIMALHUACÁN, ESTADO DE MÉXICO

LORENA PEREA GÓMEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2021

La presente tesis titulada: **Morfogénesis *in vitro* de ecotipos de olivo (*Olea europaea* L.), su evaluación financiera y el mapeo de la cadena de valor de los productos del olivo en Chimalhuacán, Estado de México.**

Realizada por el (la) alumno (a): Lorena Perea Gómez

bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
SOCIOECONOMÍA ESTADÍSTICA E INFORMÁTICA

ECONOMÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A)


DRA. MÁRIA DEL CARMEN LÓPEZ REYNA

ASESOR (A)


DR. JOSE ALBERTO GÁRCIA SALAZAR

ASESOR (A)


DR. GREGORIO ARELLANO OSTOA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, junio de 2021

**MORFOGÉNESIS *IN VITRO* DE ECOTIPOS DE OLIVO (*Olea europaea* L.), SU
EVALUACIÓN FINANCIERA Y EL MAPEO DE LA CADENA DE VALOR DE LOS
PRODUCTOS DEL OLIVO EN CHIMALHUACÁN, ESTADO DE MÉXICO**

Lorena Perea Gómez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2021

RESUMEN

A través de las herramientas biotecnológicas se pudo micropropagar y obtener compuestos químicos de árboles de olivo centenarios. Se estableció un protocolo de propagación *in vitro* de tres ecotipos de olivo centenarios, con ello fue posible obtener plantas revigorizadas. Adicionalmente se disminuyó la oxidación del explante con el uso de L-Cisteína como pretratamiento e incorporado al medio. Así mismo, se estableció un protocolo para inducir callogénesis a partir de cotiledones de olivo para la obtención de fenoles en respuesta a la radiación UV. La radiación UV-C y UV-B incrementó el contenido de compuestos fenólicos en callos de olivo y la biomasa del callo aumentó con la dosis de 5 μ M de BA + 5 μ M de ANA + 0.5 μ M de 2,4-D. Para determinar la rentabilidad de la propagación *in vitro* de árboles de olivo, se realizó un análisis financiero con dos métodos; el tradicional y por opciones reales. Mediante el análisis con opciones reales el proyecto es rentable, el valor del proyecto incrementa y la incertidumbre sobre la decisión de invertir disminuye. Además, dado que el olivo fue introducido a México hace más de 400 años, aún existen árboles que datan de esa época, de los cuales se ha desarrollado una actividad económica entorno a ellos, mediante el mapeo la cadena de valor se pudo conocer más a fondo la situación actual de la producción de aceite y aceitunas en Chimalhuacán, Estado de México. Se concluye que el cultivo del olivo es factible y rentable propagarlo *in vitro*. De igual manera se pueden obtener compuestos fenólicos de agregados celulares de olivo. Desde que fueron introducidos a México hasta la fecha los ecotipos de olivo representan un importante recurso biológico, ecológico, histórico, cultural y económico que requiere ser conservado *in vitro* e *in situ* y promover su cultivo.

Palabras clave: micropropagación, arboles binomiales, biotecnología, productos locales, recurso natural, conservación *in vitro*.

**MORPHOGENESIS *IN VITRO* OF OLIVE TREE (*Olea europaea* L.) ECOTYPES,
THEIR FINANCIAL EVALUATION AND THE MAPPING OF THE VALUE CHAIN OF
OLIVE TREE PRODUCTS IN CHIMALHUACÁN, STATE OF MEXICO**

**Lorena Perea Gómez, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2021**

ABSTRACT

Through biotechnological tools it was possible to micropropagate and obtain chemical compounds from centenary olive trees. An *in vitro* propagation protocol was established for three ecotypes of centenary olive trees, which made it possible to obtain reinvigorated plants. Additionally, the oxidation of the explant was reduced with the use of L-Cysteine as a pretreatment and incorporated to the medium. A protocol was also established to induce callogenesis from olive cotyledons to obtain phenols in response to UV radiation. UV-C and UV-B radiation increased the content of phenolic compounds in olive callus and callus biomass increased with a dose of 5 μM BA + 5 μM ANA + 0.5 μM 2,4-D. To determine the profitability of *in vitro* propagation of olive trees, a financial analysis was carried out using two methods; traditional and real options. Using the real options analysis, the project is profitable, the value of the project increases and reduces the uncertainty in the investment decision. In addition, given that the olive tree was introduced to Mexico more than 400 years ago, there are still trees that date back to that time, which have developed an economic activity around them, by mapping the value chain it was possible to learn more about the current situation of oil and olive production in Chimalhuacán, State of Mexico. It was concluded that olive cultivation is feasible and profitable to propagate *in vitro*. Likewise, phenolic compounds can be obtained from olive cell aggregates. Since they were introduced to Mexico to date, olive ecotypes represent an important biological, ecological, historical, cultural and economic resource that needs to be conserved *in vitro* and *in situ* and cultivation should be promoted.

Key words: micropropagation, binomial trees, biotechnology, local products, natural resource, *in vitro* conservation

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México que gracias a sus impuestos el CONACyT pudo otorgarme el financiamiento para la realización de esta investigación.

Al Colegio de Posgraduados por mi formación académica y profesional.

A los integrantes del Consejo Particular.

A mis amigos (as) y colegas por su apoyo incondicional.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres Gloria y Alberto

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Objetivos	4
Hipótesis	4
CAPÍTULO I. USO DE L-CISTEÍNA Y PVP EN EL ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE YEMAS AXILARES EN ECOTIPOS DE OLIVO CENTENARIOS (<i>Olea europaea</i> L.) DEL VALLE DE TEXCOCO.....	5
1.1 RESUMEN	5
1.2 ABSTRACT	6
1.3 INTRODUCCIÓN	7
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS	9
1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
1.6 CONCLUSIONES	24
1.7 LITERATURA CITADA.....	25
CAPÍTULO II. COMPUESTOS FENÓLICOS EN CALLOS DE OLIVO (<i>Olea europaea</i> L.) BAJO LA EXPOSICIÓN DE RAYOS UV-B Y UV-C	29
2.1 RESUMEN	29
2.2 ABSTRACT	30
2.3 INTRODUCCIÓN	31
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	34
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
2.6 CONCLUSIONES	44
2.7 LITERATURA CITADA.....	44
CAPÍTULO III. EVALUACIÓN FINANCIERA DE LA PRODUCCIÓN <i>IN VITRO</i> DE ÁRBOLES DE OLIVO CON OPCIONES REALES.....	48
3.1 RESUMEN	48
3.2 ABSTRACT	49

3.3 INTRODUCCIÓN	49
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS	53
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
3.6 CONCLUSIONES	63
3.7 LITERATURA CITADA.....	64
CAPITULO IV. MAPEO DE LA CADENA DE VALOR DE LA PRODUCCIÓN LOCAL DE PRODUCTOS DEL OLIVO EN CHIMALHUACÁN, ESTADO DE MÉXICO.....	
4.1 RESUMEN	69
4.2 ABSTRACT	69
4.3 INTRODUCCIÓN	70
4.4 MATERIALES Y METODOS	73
4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	75
4.6 CONCLUSIONES	85
4.7 LITERATURA CITADA.....	86
CONCLUSIONES GENERALES.....	90
ANEXOS	
91	
91	

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.1. Tratamientos antioxidantes y posición del nudo en los tres ecotipos.....	11
Cuadro 1.2. L-cisteína usada como pretratamiento y adicionado al medio de cultivo	14
Cuadro 1.3. Comparación dos medios de cultivo WPM y OM en el ecotipo Huexotla	18
Cuadro 1.4. Número de brotes y nudos de los ecotipos Chimalhuacán y Huexotla a los 60 días	20
Cuadro 1.5. Compuestos fenólicos (MGAG/GMF) de los cuatro tratamientos antioxidantes antes, 0, 24, 92 y 196 h del establecimiento	22
Cuadro 1.6. Porcentaje de sobrevivencia, oxidación y número de brotes del ecotipo Huexotla.....	24
Cuadro 2.1. Tratamientos de reguladores de crecimiento utilizados para la multiplicación de los callos de olivo y sus tiempos de exposición a los diferentes tipos de luz UV-C y UV-B.....	37
Cuadro 2.2. Peso fresco y seco de callo de olivo (<i>olea europaea</i> L.) durante la etapa de multiplicación a los 50 días.....	41
Cuadro 2.3. Fenoles totales (MgAG/gMF) antes, durante y después de la irradiación.....	42
Cuadro 3.1. Valores por etapa del proyecto de las variables utilizadas para la construcción del árbol binomial para la probabilidad de éxito.	58
Cuadro 3.2. Indicadores financieros calculados con la evaluación tradicional	59
Cuadro 3.3. Indicadores financieros estimados con el método de opciones reales	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales	13
Figura 1.2. Porcentaje de oxidación de los tres ecotipos y 3 tratamientos antioxidantes	16
Figura 1.3. A. Formación de callo en la base. B. Hiperhidratación. C. Abscisión de las hojas.	18
Figura 1.4. A. Ecotipo huexotla. B. Ecotipo chimalhuacan.	21
Figura 1.5. Comportamiento de los fenoles totales antes, después, de las 0 a 196 h	22
Figura 2.1. Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales en callos multiplicados <i>in vitro</i> de olivo	39
Figura 2.2. Desarrollo de callo en olivo (<i>Olea europaea</i> L.)	40
Figura 2.3. Índice de crecimiento de callo de olivo (<i>Olea europaea</i> L.) De 0 a 50 días en medio de cultivo om específico para olivo.....	41
Figura 4.1. Localización Chimalhuacan fuente INEGI, (2021) modificado	74
Figura 4.2. Línea de productos.....	80
Figura 4.3. Feria de la aceituna 2019.....	811
Figura 4.5. Mapa de la cadena de valor del producto aceite y aceituna en Chimalhuacán Estado de México.	82

INTRODUCCIÓN GENERAL

El olivo es un cultivo de gran importancia desde el punto de vista agronómico, cultural y nutricional. El origen del olivo se remonta al Neolítico 3000 a 4000 A. C., se cree que se originó en Siria, Asia Menor y Oriente Próximo (Picornell y Melero, 2013). Principalmente el cultivo se distribuye entre las latitudes que van de los 30° a los 45° en ambos hemisferios en un Clima de tipo Mediterráneo caracterizado por inviernos lluviosos y veranos secos (INIFAP, 2017).

A México fue introducido por los españoles hace más de 400 años (Mayorga, 2001) dado el paso del tiempo y el conocimiento actual del ecosistema, se puede decir que estos árboles han evolucionado en condiciones distintas a su lugar de origen y podrían haber desarrollado rasgos adaptativos de importancia agrícola (Muzzalupo, 2014) lo que representa un importante recurso genético fuente de nuevas variedades (Guzmán, *et al.*, 2008). El rescate de estos ecotipos representa un área de oportunidad para aprovechar su potencial productivo mediante técnicas biotecnológicas.

Para tal fin, se requiere conservar este recurso genético. En primer lugar, se necesita desarrollar un protocolo de establecimiento *in vitro* de ecotipos de la región y explorar otras aplicaciones biotecnológicas, determinar la viabilidad económica de propagar a través del cultivo *in vitro* los genotipos de olivo y entender sus orígenes en la región, quienes son los actores que por tantos años se han hecho cargo de la conservación y desarrollo *in situ* de este recurso biológico, y las características de la actividad económica que se ha desarrollado entorno al cultivo.

Este trabajo se conforma de cuatro capítulos, el primero se estableció un protocolo *in vitro* de tres ecotipos de olivo del valle del Texcoco con la finalidad de rescatar el materia genético, se demostró que mediante el cultivo *in vitro* es posible obtener plantas revigorizadas a partir de árboles centenarios. Un problema recurrente en las especies leñosas es la oxidación del explante, el cual se pudo disminuir con el uso de la L-Cisteína como pretratamiento y adicionado al medio.

En el capítulo dos se determinó si hay un incremento en la cantidad de compuestos fenólicos en el callo desarrollado a partir de cotiledones a través del estímulo de luz UV-B y UV-C. Se comprobó que el estrés causado por la luz UV incrementa los compuestos fenólicos de los agregados celulares, sin embargo, aún se requieren hacer estudios bioquímicos y bioensayos más concluyentes.

En el capítulo tres se realizó una evaluación financiera para determinar la rentabilidad de producir árboles de olivo a través del cultivo de tejidos, con dos métodos el método tradicional a través del cálculo del Valor Actual Neto (VAN), Tasa Interna de Retorno (TIR), la Tasa de Actualización (TREMA) y relación Costo Beneficio (B/C), y con el enfoque de opciones reales utilizando árboles binomiales, este último método consideró la volatilidad de precio del producto y la probabilidad de éxito de cada una de las cinco etapas (establecimiento, multiplicación, enraizamiento, aclimatización y vivero) del proyecto. Con el método tradicional la evaluación es negativa, sin embargo, cuando se plantea realizar la inversión por etapas y cada etapa es considerada una opción real, el proyecto resulta rentable.

El capítulo cuatro se hizo un análisis exploratorio-descriptivo sobre la cadena de valor de la producción de aceite de olivo y aceituna en el municipio de Chimalhuacán Estado de México, se pudo determinar que este sistema de producción se remonta a la época colonial, se realiza de manera artesanal por unidades familiares, cada una de las unidades tiene destinitos niveles de participación en la cadena de valor y de producción; esta actividad se desarrolla en una zona suburbana y los árboles de olivo se localizan en patios y predios de casas habitación.

LITERATURA CITADA

- Guzmán. R. J., A., Sánchez, B., López, L., Moreno, L., Casanova, R., Jiménez, A., Morales, Ma., P. Suarez y P. Rallo. 2008. Prospección, caracterización y uso de variedades locales de frutales y otras leñosas. <http://www.cristinaenea.org/haziera/dokumentuak/Manual%20frutales%20locales%20andaluc%C3%ADa.pdf>.
- INIFAP (2017). Perspectivas y situación de la producción de olivo en Guanajuato proyecto: "Impacto productivo de diferentes variedades de olivo y bases para generar un paquete tecnológico, para la producción en el Estado. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Folleto Técnico Núm. 5 ISBN: 978-607-37-0860-9.
- Mayorga C., F. J. 2001. El olivo, eco del Mediterráneo. Revista claridades agropecuarias.1-40. <http://info.aserca.gob.mx/claridades/revistas/094/ca094.pdf>
- Muzzalupo, I. 2014. Agricultural and Food Biotechnologies of *Olea europaea* and Stone Fruit. Roma Italia. Bentham Science Publishers Ltd.
- Picornell B., M. R., y J. M. Molero M. 2013. Historia del cultivo del olivo y el aceite; su expresión en la biblia. Revista de la Facultad de Educación de Albacete. 28:155-181. <http://www.revista.uclm.es/index.php/ensayos>

Objetivos

Establecimiento *in vitro* de ecotipos de olivo de los municipios de Chimalhuacán, Papalotla y Texcoco con el uso de dos antioxidantes L-Cisteína y PVP para el control de la oxidación en los explantes.

Establecer un protocolo *in vitro* para la generación de callos a partir de cotiledones de olivo y posteriormente irradiarlos con luz UV-C y UV-B para determinar si existe un incremento en la producción de compuestos fenólicos.

Analizar la factibilidad financiera de la producción *in vitro* de árboles de olivo mediante el método tradicional con los indicadores financieros Valor Actual Neto (VAN), Tasa Interna de Retorno (TIR), la Tasa de Actualización (TREMA) y relación Costo Beneficio (B/C), y opciones reales con el método binomial.

Mapear la cadena de valor del olivo en el municipio de Chimalhuacán, Estado de México para determinar cuáles son las condiciones actuales en las que se encuentra esta actividad productiva.

Hipótesis

Mediante el uso de herramientas biotecnológicas se pueden propagar y obtener compuestos químicos de árboles de olivo centenarios para mantener una producción sustentable de este cultivo.

La propagación *in vitro* de árboles de olivo es rentable.

Mediante el análisis de la cadena de valor se puede determinar la situación actual de la producción de olivo en Chimalhuacán, Estado de México.

CAPÍTULO I. USO DE L-CISTEÍNA Y PVP EN EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE YEMAS AXILARES EN ECOTIPOS DE OLIVO CENTENARIOS (*Olea europaea* L.) DEL VALLE DE TEXCOCO

USE OF L-CISTEIN AND PVP THE *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF AXYLAR BUDS IN CENTENARIAN OLIVE TREE (*Olea europaea* L.) ECOTYPES FROM THE TEXCOCO VALLEY

1.1 RESUMEN

El establecimiento *in vitro* de especies leñosas está limitado por la alta concentración de fenoles en los tejidos de las plantas, oxidación del explante y recalcitrancia de la especie, la cual, aumenta con la edad de las plantas donantes. El objetivo de esta investigación fue establecer *in vitro* árboles centenarios de ecotipos de olivo del Valle de Texcoco y utilizar la L-Cisteína y PVP como pretratamiento en los explantes o adicionada al medio de cultivo para evitar la oxidación de los tejidos vegetales, por lo que se evaluó la L-Cisteína durante la etapa del establecimiento. Se cultivaron segmentos nodales de tres ecotipos de olivo Chimalhuacán, Huexotla y Papalotla y tres tratamientos antioxidantes (60 y 120 mg·L⁻¹ de L-Cisteína y 250 mg·L⁻¹ de PVP). Posteriormente se evaluaron tres formas de adicionar la L-Cisteína; como pretratamiento en el explante o en el medio o ambos y se cuantificó el contenido de fenoles totales en los explantes, expresado en (mgAG/gMF) a las 0, 24, 92 y 192 horas después de la siembra en el medio de cultivo OM. A los 30 días del establecimiento el menor (32%) porcentaje de oxidación en los ecotipos de Chimalhuacán y Huexotla y el mayor (84%) en el ecotipo de Papalotla. Se usó el medio específico para olivo (OM) (Rugini, 1984) suplementado con 1 µM de 6-Benzil amino purina (BA) se observó que los explantes no presentaron anomalías anatómicas. A los 60 días del establecimiento el número de nudos por explantes fue de 1.5 provenientes de la quinta posición de la rama en los ecotipos de Chimalhuacán y de Huexotla. La L-Cisteína utilizada como pretratamiento con 500 mg·L⁻¹ y adicionada al medio de cultivo 60 mg·L⁻¹ lograron reducir la oxidación al 0% y se estimuló la brotación de los explantes. Los ecotipos de Chimalhuacán, Huexotla y Papalotla colectados en campo sin manejo agronómico, pueden establecerse *in vitro*. Para reducir la oxidación de los fenoles en el tejido

vegetal se recomienda el uso de la L-Cisteína utilizada como pretratamiento en los explantes antes de la siembra e incorporada al medio de cultivo más la incubación en oscuridad por algunos días. Con este protocolo los explantes del ecotipo de Huexotla pudieron superar la etapa de establecimiento *in vitro* en menor tiempo.

Palabras clave: Cultivo de tejidos, antioxidantes, oxidación, compuestos fenólicos, fenolización, conservación *in vitro*.

1.2 ABSTRACT

In vitro establishment of woody species is limited by the high concentration of phenols in plant tissues, explant oxidation and recalcitrance of the species, which increases with the age of the donor plants. The objective of this research was to establish *in vitro* centenary trees of olive ecotypes from the Texcoco Valley and to use L-Cysteine and PVP as a pretreatment in the explants or added to the culture medium to avoid oxidation of plant tissues, and L-Cysteine was evaluated during the establishment stage. Nodal segments of three olive ecotypes Chimalhuacán, Huexotla and Papalotla and three antioxidant treatments (60 and 120 mg-L⁻¹ of L-Cysteine and 250 mg-L⁻¹ of PVP) were established. Subsequently, three ways of adding L-Cysteine were evaluated; as a pretreatment in the explant or in the medium or both, and the content of total phenols in the explants, expressed in (mgAG/gMF) at 0, 24, 92 and 192 hours after sowing in OM culture medium, was quantified. At 30 days after establishment, the lowest (32%) percentage of oxidation was found in the Chimalhuacán and Huexotla ecotypes and the highest (84%) in the Papalotla ecotype. The specific medium for olive (OM) (Rugini, 1984) supplemented with 1 µM of 6-Benzyl amino purine (BA) was used and it was observed that the explants did not present anatomical anomalies. At 60 days after establishment, the number of nodes per explant was 1.5 from the fifth position of the branch in the Chimalhuacán and Huexotla ecotypes. The L-Cysteine used as pretreatment with 500 mg-L⁻¹ and added to the culture medium 60 mg-L⁻¹ managed to reduce oxidation to 0% and sprouting of explants was stimulated. Ecotypes from Chimalhuacán, Huexotla and Papalotla collected in the field without agronomic management can be established *in vitro*. To reduce the oxidation of phenols in the plant tissue, the use of L-Cysteine used as a pretreatment in the explants before sowing and

incorporated into the culture medium plus incubation in darkness for a few days is recommended. With this protocol, the explants of the Huexotla ecotype were able to overcome the *in vitro* establishment stage in less time.

Key words: Tissue culture, antioxidants, oxidation, phenolic compounds, phenolization, *in vitro* preservation.

1.3 INTRODUCCIÓN

El cultivo del olivo (*Olea europaea* L.) fue introducido por los españoles a México en el siglo XVI. Fray Martín de Valencia estableció la primera plantación de olivo en Tulyehualco, durante la época virreinal el cultivo se extendió por el Valle de México, Jalisco y Baja California, con ello dio inicio la producción de aceite y aceituna en la Nueva España. En 1777 la corona española ordenó a los virreyes a no plantar olivos y viñedos, y posterior mente su destrucción, debido a que estaba prohibida la competencia (Delfín, 2004). Los olivos que sobrevivieron a la destrucción actualmente se encuentran en atrios de las iglesias y conventos, muchos de ellos tienen más de 400 años (Mayorga, 2001). Estos árboles que se establecieron en microclimas particulares propiciaron que se expresaran rasgos fenotípicos distintivos, lo que dio como resultado el desarrollo de un nuevo ecotipo (Zacchini y Agazio, 2004), el cual, representa un importante recurso genético fuente de nuevas variedades de importancia agrícola (Guzmán *et al.*, 2008). La conservación *in vitro* de especies vegetales es de importancia para su aprovechamiento económico.

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta biotecnológica que permite la preservación de plantas endémicas o en peligro de extinción, como el caso de los genotipos Laperrine y Nebbiara de olivo (Zacchini y Agazio, 2004; Haddad *et al.*, 2018). Sin embargo, el establecimiento *in vitro* de especies leñosas está limitado por la alta concentración de fenoles en los tejidos de las plantas que producen oxidación del explante, contaminación con hongos y bacterias, además de la recalcitrancia que aumenta con la edad de las plantas donantes (Bonga 2012; Oražem *et al.*, 2016; Assis

et al., 2018). Por lo que se requiere tomar en consideración estos factores para el desarrollo de protocolos específicos para especies leñosas.

En plantas leñosas, la oxidación del tejido vegetal es uno de los problemas más recurrentes durante el establecimiento *in vitro*. Se ha identificado diversos factores que propician la oxidación en los explantes como la variedad, la edad fisiológica y ontogénica, las condiciones nutrimentales, la posición de la rama en el árbol y la tolerancia a altas concentraciones de sulfatos en el medio de cultivo (Concepción *et al.*, 2005; Krishna *et al.*, 2008; Dos Santos *et al.*, 2019; Bayraktar *et al.*, 2020). La oxidación del explante depende de las características de la planta madre.

La oxidación del explante son una serie de reacciones bioquímicas al interior de la célula vegetal. En árboles frutales como el olivo (*Olea europaea* L.), el nogal (*Junglas regia*) y pistacho (*Pistacia vera* L.) se identificó que la oxidación de los explantes es ocasionada por la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO) (Roussos y Pontikis, 2001; Tabiyeh *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2021). La enzima PPO se encuentra en las membranas de los tilacoides y los compuestos fenólicos en las vacuolas (Beckman, 2000) en condiciones normales no existe interacción entre ellas, sin embargo, al ocurrir un daño mecánico, provoca que las membranas celulares se degraden, ocasionando que la enzima PPO y los compuestos fenólicos se pongan en contacto, dando lugar a reacciones de pardeamiento enzimático (Scherer *et al.*, 2006). Estas reacciones provocan que el tejido pierda clorofila y en casos severos la célula active el proceso de muerte celular programada (Laukkanen *et al.*, 2000). Así mismo, se originan productos de las reacciones de oxidación de los compuestos fenólicos, como las quinonas responsables de producir pigmentos insolubles y oscuros que se acumulan en el medio de cultivo e intoxican al explante (Zhao *et al.*, 2021).

En la etapa de establecimiento *in vitro*, se requiere del uso de antioxidantes para reducir la oxidación en el tejido vegetal, principalmente en especies leñosas. La L-Cisteína y polivinilpirrolidona (PVP) se ha utilizado como antioxidantes adicionados al medio de cultivo, su función es inhibir a la enzima PPO, ambos compuestos se estudiarón en (*Eugenia pyriformis*) y el PVP en guayaba (*Psidium guajava*) y olivo (*Olea europaea* L.) (Rugini, 1984; Aguilar *et al.*, 2016; Assis *et al.*, 2018). Así mismo,

está documentado que en el cultivo *in vitro* de cerezo (*Prunus cerasus*) la L-Cisteína promueve el enraizamiento, aumenta el contenido de clorofila en hojas, suscita la biosíntesis de azúcares y la acumulación de prolina (Sarropoulou *et al.*, 2016). De igual manera, tiene un efecto sobre la proliferación, crecimiento de callos y embriones somáticos en Sidempuan (*Salacca sumatrana* Becc.) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) (Asad *et al.*, 2009; Elimasni *et al.*, 2018).

La L-Cisteína se sintetiza en el citosol, plastidios y mitocondrias en la célula vegetal sus funciones son estructurales, catalíticas, reguladoras y metabólicas (Hell y Wirtz, 2008). En *Arabidopsis* se ha observado que las enzimas O-Acetilserina(tiol)lidasas (OASTL) y la Cisteína desulfhidrasa DES1, mantienen la homeóstasis de la cisteína en el interior de la célula en condiciones de estrés (Álvarez *et al.*, 2011) y en la autólisis durante la xilogénesis de *Zinnia elegans* (Ye y Varner, 1996).

Mediante el cultivo *in vitro* se pueden rescatar y propagar ecotipos de olivo. En el presente estudio se utilizaron tres ecotipos de olivo de entre 100 y 300 años con características agronómicas y adaptativas de importancia económica y científica. Por lo que el objetivo de este trabajo es desarrollar un protocolo para el establecimiento del cultivo *in vitro* de tres ecotipos de olivo centenarios del valle de Texcoco, utilizando la L-Cisteína y el PVP como antioxidantes y posteriormente determinar si la L-Cisteína usada como pretratamiento y adicionada al medio de cultivo reduce la oxidación de los compuestos fenólicos.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento 1. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de olivo de tres ecotipos

Material vegetal

En la primavera del año 2020 se colectaron ramas de árboles de olivo centenarios de tres municipios del estado de México Chimalhuacán, Papalotla y Texcoco de Mora. Para su identificación se les nombra ecotipos con el nombre del municipio o localidad. Las ramas colectadas estaban situadas en la parte basal del tronco, se cortaron

aquellas con una longitud de 30 cm de largo y se tomaron segmentos nodales de la tercera, cuarta y quinta posición a partir del ápice.

Desinfestación de material vegetal

Los segmentos nodales de 2 cm se colocaron en una lavadora ultrasónica (Baku modelo BK-9050) (Turina y Bima, 2017) durante 3 min a 50 Watts, sumergidos en agua destilada estéril con 20 gotas de polisorbato 20. Posteriormente en una solución con fungicida comercial benomilo $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 3 min a 50 Watts y se dejaron en esa misma solución durante 10 min. A continuación, se transfirieron a una solución de HgCl_2 al 0.1% durante 3 min. Finalmente, se le dio un enjuague con una solución con $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-Cisteína durante 3 min.

Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales

Los segmentos nodales se establecieron en el medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) (Bayraktar *et al.*, 2020). Al medio se adicionaron 60 y $120 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-Cisteína; y $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de polivinilpirrolidona PVP como antioxidante. El pH se ajustó a 5.7 con KOH o HCl y se esterilizó a 15 PSI a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos. Se incubó en oscuridad durante 10 días a una temperatura de $24 \text{ }^\circ\text{C}$.

Los segmentos nodales fueron incubados en oscuridad durante 10 días. Posteriormente se subcultivarón en el mismo medio (WPM) con $17.8 \text{ }\mu\text{M}$ de 6-benciladenina (BA) y $0.2 \text{ }\mu\text{M}$ de ácido naftalenacético (ANA) durante 60 días con 3 subcultivos e incubados en un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, y una temperatura de $24 \text{ }^\circ\text{C}$.

Descripción de los tratamientos

Para los tratamientos posición del nudo en la rama y tipo de antioxidante se probaron en los tres ecotipos, con 6 repeticiones cada uno y 5 unidades experimentales. La combinación de estos tratamientos dio un total de 27 tratamientos (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1. Tratamientos antioxidantes y posición del nudo en los tres ecotipos

Variable	Ecotipo		
	Chimalhuacán	Papalotla	Huexotla
	250 PVP		
Antioxidante (mg·L ⁻¹)	60 L-Cisteína		
	120 L-Cisteína		
Posición de nudo	3er, 4to y 5to		

Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar de 3x3x3, tres tratamientos antioxidantes, tres posiciones de la rama y tres ecotipos. A los 3, 10, 20 y 30 días se realizó la evaluación de las siguientes variables: porcentaje de contaminación por hongos o bacterias, oxidación del explante: se utilizó una escala 1= explante con oxidación y 2= explante sin oxidación, número de botes y nudos por explante: se contabilizó el número de yemas axilares y nudos por explante.

Análisis estadístico

Se realizaron pruebas estadísticas para comprobar los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Para determinar la normalidad se utilizó el supuesto de transformación de datos utilizando la fórmula $\arcsin\left(\sqrt{\frac{x}{100}}\right)$. Después de que los datos fueron transformados se realizó un análisis de varianza ANOVA una prueba de comparación de medias de Tukey con un $\alpha=0.05$ en el programa RStudio (Versión 1.3).

Experimento 2. La L-Cisteína como inhibidor de la oxidación de los explantes

Material vegetal

Se colectaron en otoño de las 2020 ramas de árboles de olivo centenarios del municipio de Texcoco de Mora, Huexotla, Estado de México. Las ramas eran retoños nuevos ubicadas en la parte basal del tronco, se cortaron ramas de 30 cm de largo, se

tomaron del ápice hacia abajo nudos de la tercera, cuarta y quinta posición con dos yemas axilares de 1 cm de largo.

Tratamiento de desinfestación

Los segmentos nodales se sumergieron en un litro de solución de agua destilada estéril con 20 gotas de polisorbato 20 en una lavadora ultrasónica (Baku modelo BK-9050) (Turina y Bima, 2017) durante 3 min a 50 Watts. Posteriormente en una solución con fungicida comercial benomilo $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 3 min a 50 Watts y se dejaron remojando en esa misma solución durante 10 min. Posteriormente, los segmentos nodales se transfirieron a una solución de HgCl_2 al 0.1% durante 3 min. Para finalizar los segmentos se dividieron en dos partes, a una se le dio el último enjuague con agua destilada estéril con $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ L-Cisteína durante 3 minutos y la otra solo agua destilada estéril por 3 min.

Medio de cultivo

Se establecieron segmentos nodales en el medio de cultivo OM (Olive Medium) (Rugini, 1984) con el 100% de los macro y micronutrientes, suplementado con $40.6 \mu\text{M}$ ácido nicotínico, $2.4 \mu\text{M}$ piridoxina, $1.5 \mu\text{M}$ tiamina, $555 \mu\text{M}$ myo-inositol, $1.1 \mu\text{M}$ ácido fólico, $14.8 \mu\text{M}$ glutamina y $26.6 \mu\text{M}$ glicina, sin reguladores de crecimiento, 20 gr de manitol y 6.5 gr de agar-agar. Los tratamientos con antioxidantes fueron adicionados al medio de cultivo con $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-Cisteína. Todos los explantes establecidos fueron incubados en oscuridad durante 8 días.

Posteriormente se subcultivaron en el mismo medio (OM) con $1 \mu\text{M}$ de 6-benciladenina (BA) e incubados en un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, y una temperatura de $24 \text{ }^\circ\text{C}$.

Obtención de extractos

Se utilizó la metodología propuesta por Roussos y Pontikis, (2001) con algunas modificaciones. Se pesaron 100 mg de muestra (segmento nodal), en un mortero se pulverizó la muestra con nitrógeno líquido, se colocó en un tubo para centrifuga de 1.5

ml y se mezcló con 1 ml de metanol al 100% (v/v) en una relación (1:10). La solución de extracción se sónico en una lavadora ultrasónica (Baku modelo BK-9050) durante 15 minutos, se centrifugó durante 10 minutos a 7 500 rpm, se tomó el sobrenadante y la solución de extracción se almacenó a 4°C en oscuridad.

Cuantificación de fenoles totales

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965), con algunas modificaciones, se mezcló 10 µL de la solución de extracción, con 1490 µL de agua destilada, 200 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu a 1N y 300 µL de una solución de Na₂CO₃ al 20% (p/v), se homogeneizó mediante sonicación durante 1 minuto y se incubó por 30 min a 25 °C para permitir el desarrollo del color.

La mezcla se midió en un espectrofotómetro (Thermo Scientific) con una absorbancia de 765 nm. La lectura de cada muestra será comparada con una curva estándar de ácido gálico (0 a 0.005 mg·L⁻¹). Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico por cada gramo de peso fresco (mgAG/gMF) (Figura 1.1).

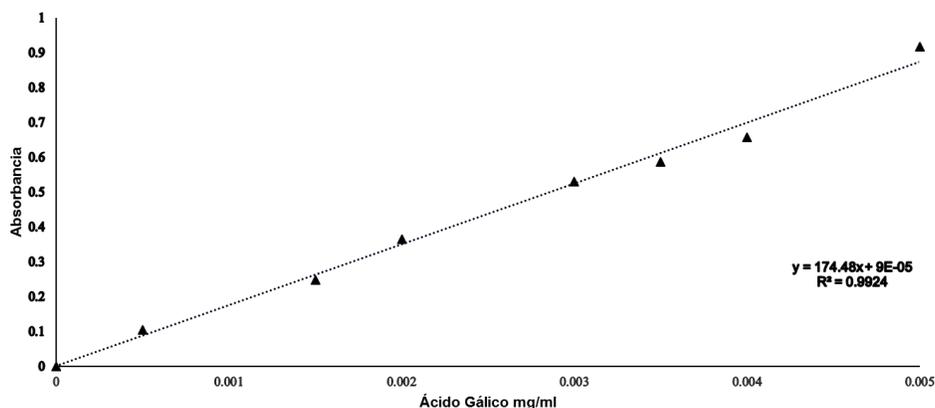


Figura 1.1 Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales

Se obtuvo la ecuación $y=174.48x+9E-05$ correspondiente al modelo lineal para la interpolación de los datos:

Dónde: y: absorbancia de la muestra; x: concentración de compuestos fenólicos mg/ml

Descripción de los tratamientos

Los tratamientos fueron: la combinación de dos procedimientos 1) pretratamiento con $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-Cisteína y lavado con agua destilada estéril al final del proceso de desinfestación, y el 2) el adicionar al medio de cultivo $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-Cisteína dieron un total de 3 tratamientos con un testigo absoluto (Cuadro 1.2). Se utilizaron 40 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue considerando un explante.

Cuadro 1.2 L-Cisteína usada como pretratamiento y adicionado al medio de cultivo

Tratamiento	L-Cisteína	
	Pretratamiento del explante ($500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Medio de Cultivo ($60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
T0	NO	NO
T1	SI	SI
T2	NO	SI
T3	SI	NO

Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos y un testigo absoluto (Cuadro 1.2). Se cuantificaron los fenoles totales antes del establecimiento, después de la desinfestación, a las 24, 92 y 196 h después del establecimiento, se evaluaron las siguientes variables: fenoles totales se expresaron como miligramos de ácido gálico por cada gramo de materia fresca (mgAG/gMF), porcentaje de oxidación del explante se utilizó una escala 1=explante con oxidación y 2= explante sin oxidación. Porcentaje de supervivencia y número de botes y nudos por explante: se contabilizó el número de yemas axilares y nudos por cada explante.

Análisis estadístico

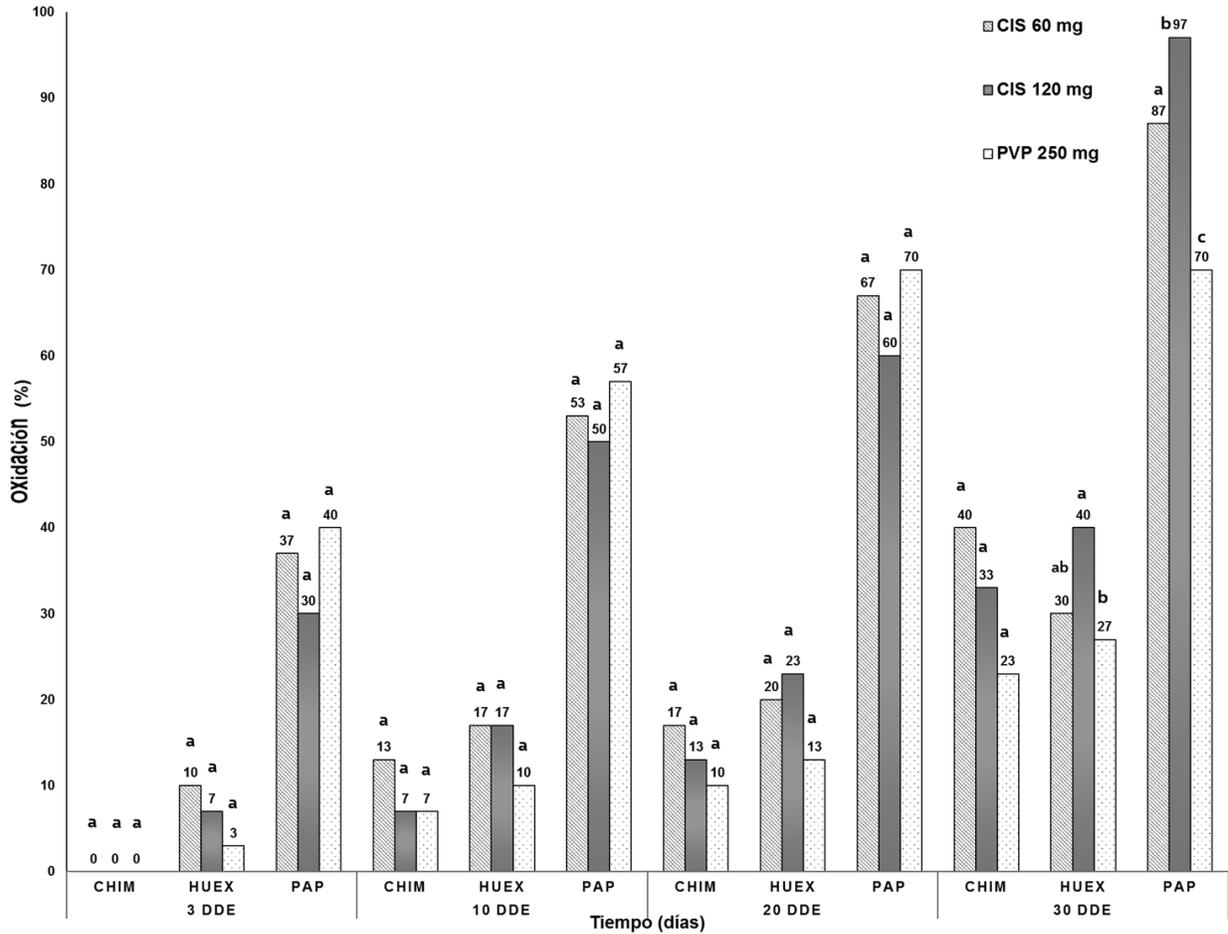
Se realizaron pruebas estadísticas para comprobar los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Para determinar la normalidad se utilizó el supuesto de transformación de datos utilizando la fórmula $\arcsin\left(\sqrt{\frac{x}{100}}\right)$. Después de que los datos fueron transformados se realizó un análisis de varianza ANOVA una prueba de comparación de medias de Tukey con un $\alpha=0.05$ en el programa RStudio (Versión 1.3).

1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de contaminación de los ecotipos Chimalhuacán, Huexotla y Papalotla fue de 0%, 2.2% y 5.5% respectivamente a los 30 días.

Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de tres ecotipos de olivo

Los tres ecotipos evaluados, manifestaron una tendencia a aumentar el porcentaje de oxidación conforme avanzó el tiempo, lo que mostró una interacción significativa entre los sitios de colecta y el tiempo ($p \leq 0.05$). No hubo diferencias significativas a los 3 a 20 días ($p \geq 0.05$) respecto a los tres tratamientos antioxidantes (60 y 120 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de L-Cisteína y 250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP) únicamente a los 30 días después del establecimiento en el ecotipo Huexotla y Papalotla. A los 30 días del establecimiento el menor porcentaje de oxidación fue de 32% correspondientes a los ecotipos Chimalhuacán y Huexotla y el mayor 84% para Papalotla (Figura 1.2).



Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$)

CHIM= Chimalhuacán, HUEX=Huexotla, PAP=Papalotla, DDE=Días después del establecimiento

Figura 1.2. Porcentaje de oxidación de los tres ecotipos y 3 tratamientos antioxidantes

El establecimiento *in vitro* de olivo depende del genotipo, el estado fisiológico de la planta madre y el origen del segmento nodal. En segmentos nodales obtenidos de ramas ubicadas en la parte basal del tronco, el ecotipo Huexotla tuvo mayor porcentaje de establecimiento de segmentos nodales en comparación con los ecotipos Chimalhuacán y Papalotla, sin embargo, después del establecimiento no se observó desarrollo de la yema axilar. Estas ramas son ontogénicamente más jóvenes que las de la periferia del árbol (Concepción *et al.*, 2005).

El establecimiento *in vitro* de diversas variedades de olivo depende del genotipo, la época de recolección de las ramas, las condiciones físico-químicas de la rama, la edad de la planta, el manejo agronómico, el lugar donde se encuentra la planta madre, en

invernadero o en el campo (Turina y Bima, 2017; Haddad *et al.*, 2018; Dos Santos *et al.*, 2019; Bayraktar *et al.*, 2020). Los ecotipos Chimalhuacán, Huexotla y Papalotla colectados en campo sin manejo agronómico, pueden establecerse *in vitro* con características juveniles.

El efecto de La L-Cisteína y el PVP en los ecotipos Chimalhuacán y Huexotla redujo la oxidación de los segmentos nodales, contrario en el ecotipo Papalotla (Figura 1.2). Lo que implica que la oxidación de los explantes está determinada por la variedad (Dos Santos *et al.*, 2019). Estos dos tipos de antioxidantes tienen una función en la reducción de la oxidación. Por un lado, el PVP cuando se incorpora en el medio puede cambiar el potencial redox alrededor del explante, inhibiendo la oxidación del fenol por lo que reduce el pardeamiento del tejido (Chai *et al.*, 2018). Por otro lado, la L-Cisteína interviene en la remoción de quinonas producto de la reacción de oxidación (Leyva *et al.*, 2017).

Resultados similares se han encontrado usando de 0.1 a 5 g·L⁻¹ de PVP para reducir la oxidación en explantes en guayaba (*Psidium guajava* L.), uvaia (*Eugenia pyriformis*), olivo (*Olea europae* L.) y pino virginia (*Pinus virginiana* Mill). (Tang *et al.*, 2004; Concepción *et al.*, 2005; Grappolo *et al.*, 2018; Assis *et al.*, 2018). En el caso de la L-Cisteína Montes-Salazar *et al.*, (2016) utilizaron 25 mg·L⁻¹ de L-Cisteína y 1 g de carbón activado y redujeron al 100% la oxidación de explantes en *Cedrus atlántica*. La L-Cisteína y PVP adicionados al medio de cultivo tienen efecto antioxidante en los tres ecotipos de Olivo.

A los 60 días del establecimiento el mayor porcentaje de establecimiento fue el ecotipo Huexotla 54% y los menores fueron Chimalhuacán 18% y Papalotla 14%. El medio de cultivo WPM se renovó con 17.8 μM BA. A partir de los 30 días después del establecimiento se observó que los explantes de los tres sitios de colecta presentaron

anomalías anatómicas como formación de callo en la base del tallo, hiperhidratación y abscisión en las hojas (Figura 1.3).

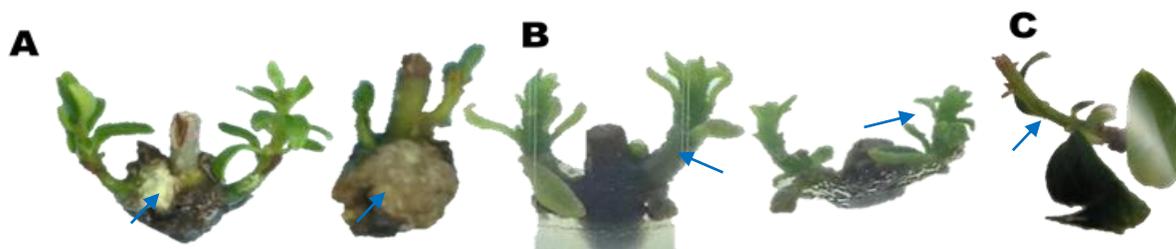


Figura 1.3. A. formación de callo en la base. B. Hiperhidratación. C. Abscisión de las hojas.

Se compararon dos tipos de medio WPM y OM en el ecotipo Huexotla con sus respectivas dosis de BA, estos no mostraron diferencias significativas ($p \geq 0.05$) en cuanto al porcentaje de establecimiento y número de brotes solo en a la formación de callo en la base del tallo en el tratamiento con WPM con $17.8 \mu M$ (Cuadro 1.3).

Cuadro 1.3 Comparación dos medios de cultivo WPM y OM en el ecotipo Huexotla

Medio	BA (μM)	Establecimiento (%)	Número Brotes	Callo base tallo (%)
WPM ¹	17.8	66 a	1.9 a	75 a
OM ²	1	60 a	1.9 a	0 b

Medias con distinta letra en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$)

¹WPM Woody Plant Medium

²OM Medio Olivo

Las variedades de olivo responden de manera diferente al tipo de medio cultivo y a la dosis de reguladores de crecimiento. En la primera etapa del experimento se utilizó el medio WPM en los tres ecotipos se formó callo en la base del tallo, la hiperhidratación y caída de hojas Chimalhuacán y Papalotla a los 30 días del establecimiento (Figura

1.2). Bayraktar *et al.*, (2020) utilizaron el medio de cultivo (WPM) con 17.8 μM de BA y en la variedad Gemlik de olivo y también se observó hiperhidratación en hojas, estos autores determinaron que se debió al tipo de agente gelificante. Los tejidos vegetales en condiciones *in vitro* tienden a absorber más agua por efecto del potencial osmótico que está relacionado con el tipo de agente gelificante (Cardenas y Villegas, 2002). Así mismo, en las variedades Chondrolia Chalkidikis y Leuccino de olivo se observó hiperhidratación por consecuencia del medio cultivo y por la alta concentración de citocininas respectivamente (Antonopoulou *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2002). Por otro lado, Rugini (1984) reporta que la variedad Moraiolo la caída y formación de callo en las hojas se debe a que los explantes son de ramas vigorosas y la formación de callo en la base por la composición del medio de cultivo en el que se utilizaron los medios White, LM y Kong. Por lo tanto, no existe una formulación única para todas las variedades de olivo, cada una de ellas responde de manera diferente (Chaari *et al.*, 2011), por lo que se requieren hacer protocolos específicos. Las causas que provocan anomalías en los tejidos dependen de varios factores como la variedad, las condiciones nutrimentales de la planta madre, la calidad y composición de componentes del medio.

El medio OM (Rugini, 1984) con una dosis de 1 μM de BA no se forma callo en la base del tallo, pero con respecto al número de brotes y nudos se obtuvieron los mismos resultados que con el medio WPM con 17.8 μM de BA, por lo que las concentraciones de BA y tipo de medio de cultivo influyen en la formación de callo en la base del explante. Donini *et al.*, (2008), determinaron que en la variedad Arbequina los medios OM y WPM son los que mejores resultados obtienen para la brotación, pero este autor no reporta formación de callo en la base del tallo.

La posición del nudo en la rama no mostró diferencias significativas ($p \geq 0.05$) en cuanto al número de brotes en los ecotipos Huexotla y Chimalhuacán a los 30 y 60 días después del establecimiento. Respecto al número de nudos por explante si hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el ecotipo Huexotla a los 30 días 1.3 nudos y a los 60 días 1.5 nudos en promedio y en el ecotipo Chimalhuacán solo hubo diferencias a los 60 días con 1.5 nudos por explante. El mayor número de nudos en ambos

ecotipos fueron los de la quinta posición del nudo. Entre los ecotipos Huexotla y Chimalhuacán se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), en relación con el número de brotes y nudos con un promedio 1.8 y 1.6 respectivamente a los 30 y 60 días (Cuadro 1.4).

Cuadro 1.4. Número de brotes y nudos de los ecotipos Chimalhuacán y Huexotla a los 60 días

Ecotipo	Posición nudo	30 días		60 días	
		Brotes	Nudos	Brotes	Nudos
Huexotla ^a	3er	1.7 a	1.2 a	1.6 a	1.3 a
	4to	2.0 a	1.1 a	1.8 a	1.3 a
	5to	1.8 a	1.6 b	1.8 a	1.9 b
	Media	1.8	1.3	1.7	1.5
Chimalhuacán ^b	3er	1.5 a	1.0 a	1.8 a	1.0 a
	4to	1.6 a	1.0 a	1.6 a	1.0 a
	5to	1.6 a	1.0 a	1.4 a	1.5 b
	Media	1.5	1.0	1.5	1.1

Medias con distinta letra en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$)

La posición del nudo en la rama no tiene efecto sobre la brotación de las yemas axilares. De las yemas que brotaron hay más nudos en los explantes provenientes de la quinta posición de la rama en los ecotipos Chimalhuacán y Huexotla. El ecotipo Huexotla fue superior en el número de brotes y nudos por explante resultados similares se encontraron en las subespecies *Maderensis* y *Laperrinei* de olivo al utilizar BA como fuente de citocinina, obtuvieron aproximadamente dos brotes por explante y dos nudos (Santos *et al.*, 2003; Peixe *et al.*, 2007; Haddad *et al.*, 2018), pero en comparación con las variedades *Oueslati* y *Chondrolia Chalkidikis* la zeatina aumentó la tasa de

multiplicación y número de nudos (Chaari *et al.*, 2011; Grigoriadou *et al.*, 2002), pero en las variedades Frantoio, Arauco, Manzanilla y Arbequina mostraron mayor brotación con dosis bajas 1 μM de BA en comparación con la zeatina (Turina y Bima, 2017). Se requiere hacer pruebas con diferentes tipos de medio de cultivo y dosis de reguladores de crecimiento para el establecimiento *in vitro* de cada ecotipo (Figura 1.4).

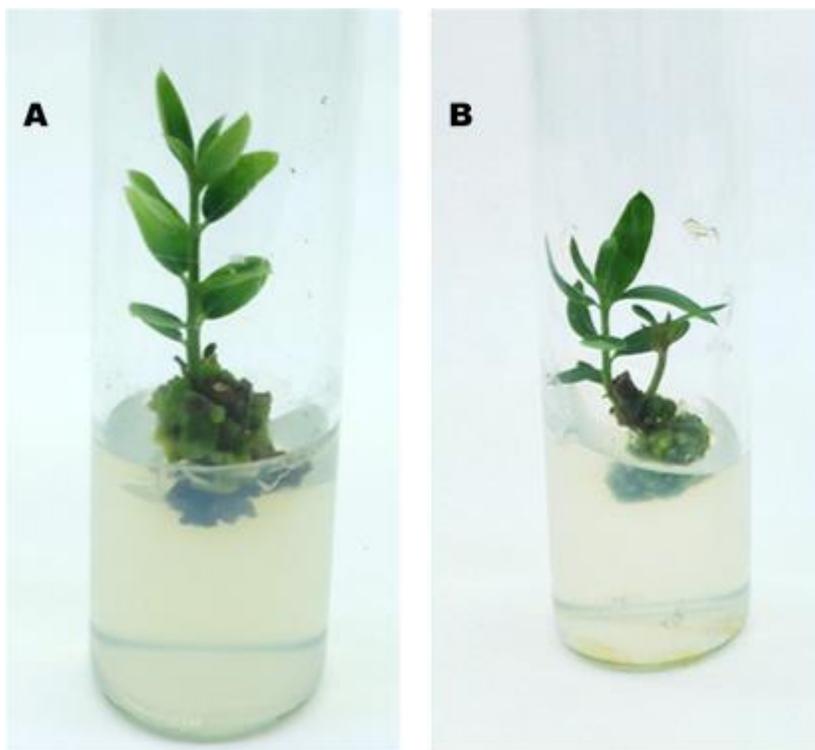


Figura 1.4. A. Ecotipo Huexotla. B. Ecotipo Chimalhuacan.

L-Cisteína como inhibidor de la oxidación de compuestos fenólicos

La interacción entre las formas de usar el antioxidante y el tiempo que transcurrió a partir del establecimiento tuvieron un efecto significativo ($p \leq 0.05$) en la cantidad de fenoles totales (mgAG/gMF) en los explantes. Se observó que los fenoles totales disminuyen después del proceso de desinfestación, a las 24 h del establecimiento mostraron su valor mínimo y a partir de las 92 h se observó una tendencia a aumentar la cantidad de compuestos fenólicos (Cuadro 5) en el testigo y los tratamientos 1, y 3, no obstante, a las 196 h se observó que el tratamiento 3 disminuye la cantidad de estos compuestos (Figura 1.5).

Cuadro 1.5. Compuestos fenólicos (mgAG/gMF) de los cuatro tratamientos antioxidantes antes, 0, 24, 92 y 196 h del establecimiento

Tiempo (h)	Compuestos fenólicos (mgAG/gMF)							
	Tratamientos							
	T0 ¹		T1 ²		T2 ³		T3 ⁴	
Antes	4.16	a	4.16	a	4.16	a	4.16	a
0	3.55	ab	3.59	a	3.55	ab	3.59	b
24	2.38	c	2.77	b	3.00	b	2.89	c
96	3.42	b	3.56	a	3.01	b	3.47	b
192	3.72	ab	3.86	a	2.54	b	3.08	ab

Medias con distinta letra en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$)

¹T0 = sin pretratamiento y sin L-Cisteína en medio de cultivo, ²T1= con pretratamiento y L-Cisteína en medio de cultivo, ³T2= sin pretratamiento y con L-Cisteína en medio de cultivo, ⁴T3= con pretratamiento y sin L-Cisteína en medio de cultivo.

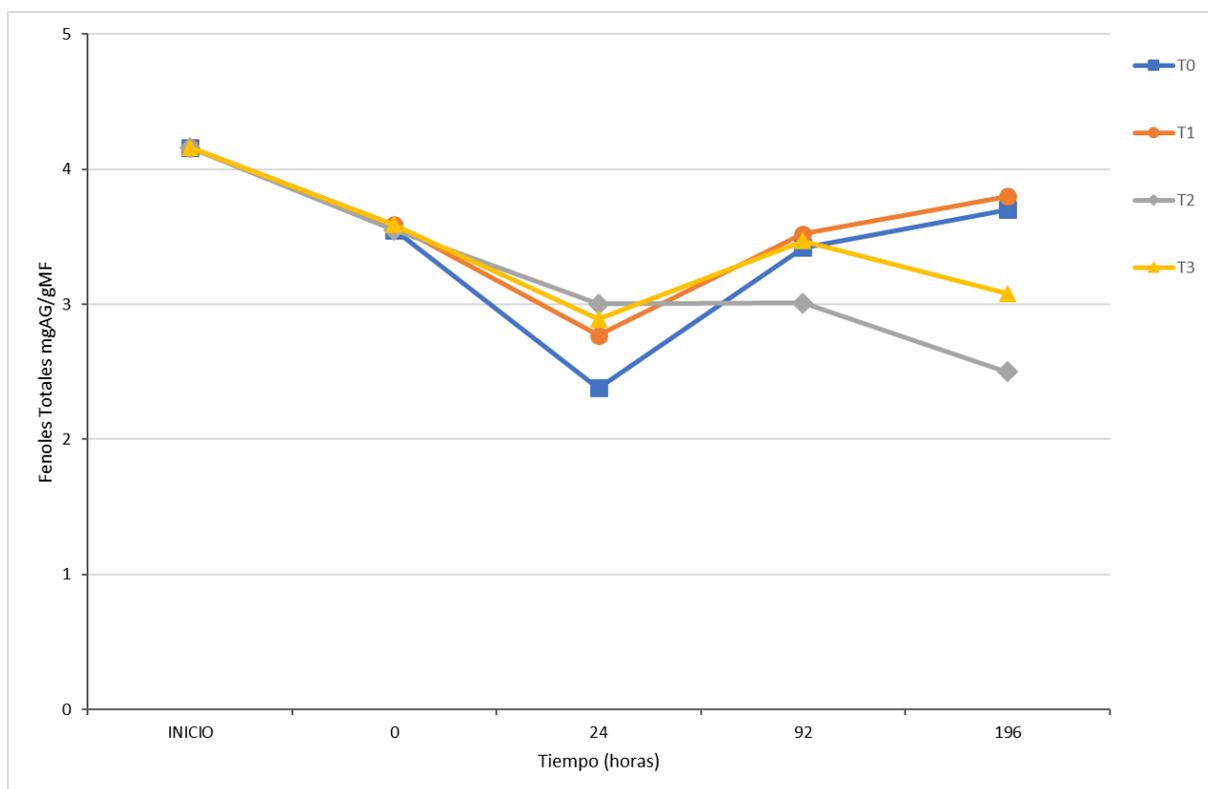


Figura 1.5. Comportamiento de los fenoles totales antes, después, de las 0 a 196 h

Las tres formas de utilizar la L-Cisteína (Cuadro 1.2) en los explantes mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en cuanto al porcentaje de sobrevivencia, oxidación y número de brotes. Los menores porcentajes de oxidación y número de brotes fueron los tratamientos 1 y 3. El mayor porcentaje de sobrevivencia fueron los tratamientos 1 y 3 (Cuadro 1.6).

La cantidad de fenoles totales de las ramas depende del origen, edad y época de colecta. Las ramas utilizadas provenían de retoños del año y de la parte basal del tronco por lo que la cantidad de fenoles totales *in vivo* 4.16 son más bajos en comparación con lo encontrado por (González, 2015) quien analizó la madera de poda proveniente de ramas adultas. (Martín *et al.*, 2013) determinaron que en *Malosorbis florentina* los brotes de la parte basal tienen menor cantidad de compuestos fenólicos que aquellas que provienen de la parte apical de plantas adultas, estas últimas son más difíciles de establecer en condiciones *in vitro*. Roussos y Pontikis (2001) observaron en la variedad Koroneiki de olivo el porcentaje de oxidación de fenoles varía del 30 al 80% dependiendo de la estación del año y el origen del explante, si es de campo es mayor en comparación con los de invernadero. Boudabous *et al.*, (2010) reportaron que los explantes de manzana colectados en otoño-invierno, presentan mayor oxidación de fenoles. La oxidación de los explantes se presenta principalmente si estos provienen de ramas adultas y de la parte apical en *Malosorbis florentin*, la posición y tamaño del nudo en Granada (Martín *et al.*, 2013; Pushpraj y Patel, 2016). Por lo que es recomendable tomar en consideración estos aspectos antes del establecimiento *in vitro* y aumentar las posibilidades de éxito.

La L-Cisteína puede ser utilizada como inhibidor químico de la oxidación en los explantes de olivo. En el ecotipo Huexotla los cuatro tratamientos (Cuadro 1.5) se observó que los compuestos fenólicos disminuyeron después del tratamiento de desinfección y a las 24 horas del establecimiento. El testigo y los tratamientos 1 y 3 mostraron una tendencia en aumentar el contenido de compuestos fenólicos a partir de las 92 horas y se mantuvo constante hasta las 196 horas, lo que indica que el explante tiene la capacidad de regenerarse. En la etapa de establecimiento *in vitro* se provocan daños mecánicos, lo que da origen a una serie de reacciones de oxidación

debido a la enzima polifenol oxidasa PPO (Roussos y Pontikis, 2001; Tabiyeh, *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2021). En callos de *Pinus sylvestris* L. se ha observado que la oxidación del tejido tiene un efecto en el crecimiento y provoca cambios en la estructura celular y muestran poca capacidad de regeneración (Laukkanen *et al.*, 2000). El tratamiento 2 y 3 mostraron una disminución en la cantidad de compuestos fenólicos, se podría deber a las reacciones químicas que transforman los fenoles en otros productos como las quinonas (Zhao *et al.*, 2021).

La L-Cisteína tiene efecto sobre la brotación, esto debido a que este es un aminoácido derivado del azufre y ayudó a la elongación de los explantes (Cuadro 1.6) en los tratamientos 1 y 3. Sotiropoulos *et al.*, (2005) observaron que al agregar L-Cisteína en el medio de cultivo se incrementa el nivel de N, K y Ca en explantes de manzana, lo cual, se ve reflejado en un mayor número de brotes. Por otra parte, Cisne, *et al.*, (2007) observaron en mora (*Rubus glaucus* Benth) la L-Cisteína sufrió una modificación química que pudo intoxicar al explante. En la especie *Terminalia amazonia* la L-Cisteína no redujo la oxidación de los explantes (Exell, *et al.*, 1917). El uso de la L-Cisteína usada como pretratamiento en el explante y en medio pudo aumentar la brotación, cuando se usa como pretratamiento o adicionado al medio o combinado no interfieren en la brotación de las yemas axilares.

Cuadro 1.6. Supervivencia, oxidación y número de brotes del ecotipo Huexotla

Tratamiento	(%)		Número brotes
	Sobrevivencia	Oxidación	
T0 ¹	72 b	28 a	0.7 b
T1 ²	100 a	0 c	1.6 a
T2 ³	61 b	39 b	0.6 b
T3 ⁴	88 a	22 c	1.5 a

Medias con distinta letra en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$)
¹T0 = sin pretratamiento y sin L-Cisteína en medio de cultivo, ²T1= con pretratamiento y L-Cisteína en medio de cultivo, ³T2= sin pretratamiento y con L-Cisteína en medio de cultivo, ⁴T3= con pretratamiento y sin L-Cisteína en medio de cultivo

1.6 CONCLUSIONES

Los ecotipos de Chimalhuacán, Huexotla y Papalotla colectados en campo sin manejo agronómico, pueden establecerse *in vitro*.

El ecotipo Huexotla de olivo tiene capacidad para incorporarse en un programa de propagación para la conservación *in vitro* de la especie. Utilizando el medio OM y 1 μ M de BA.

Para disminuir la oxidación de fenoles en el tejido vegetal se recomienda utilizar la L-Cisteína usada como pretratamiento en el explante antes del establecimiento e incorporados al medio de cultivo incubados en oscuridad por 10 días y los explantes pudieron superar el estrés del establecimiento *in vitro* en un corto período en el ecotipo Huexotla.

1.7 LITERATURA CITADA

- Álvarez N., C. 2011. La cisteína y su contribución a diferentes procesos de señalización en *Arabidopsis thaliana*. Tesis. pp. 1-180. [http://digital.csic.es/bitstream/10261/114603/1/Tesis C Alvarez.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/114603/1/Tesis%20C%20Alvarez.pdf).
- Antonopoulou C., K. Dimassi., I. Therios., and C. Chatzissavvidis. 2018. Does dikegulac affect *in vitro* shoot proliferation and hyperhydricity incidence in olive explants? Horticultural Science, (Prague). 45 (3):125–130. DOI:10.17221/212/2016-HORTSCI
- Assis F. A. d., F.A. Rodrigues., M. Pasqual., G. A. d. Assis., J. M. Q. Luz., F. Janoni., I. d. J. S. Costa., B. N. S. Costa., and J. D. R. Soares. 2018. Antioxidants in the control of microorganism contamination and phenol oxidation in *Eugenia pyriformis*. Bioscience journal, 34(1):49–58. DOI: 10.14393/bj-v34n1a2018-36311.
- Bassan, JS., LRS. Reiniger., BHG. Rocha., CRP. Severo., y AV .Flôres. 2006. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). Ciência Florestal. 16(4):381-390. DOI: 10.1007/0-306-48380-7_2221.
- Bayraktar M., S. Hayta-Smedley., S. Unal., N. Varol., and A. Gurel. 2020. Micropropagation and prevention of hyperhydricity in olive (*Olea europaea* L.) cultivar 'Gemlik'. South African Journal of Botany.128: 264-73. DOI: 10.1016/j.sajb.2019.11.022.
- Beckman C. H. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? Physiological and molecular plant pathology. 57 (3):101–10. DOI: 10.1006/pmpp.2000.0287.

- Bonga J. M. 2012. Recalcitrance in the *in vitro* propagation of trees. Integrating vegetative propagation, biotechnologies and genetic improvement for tree production and sustainable forest management. 37: 39-46. https://www.researchgate.net/publication/272814911_Recalcitrance_in_the_in_vitro_propagation_of_trees
- Boudabous M., M. Mars, N. Marzougui., and A. Ferchichi. 2010. Micropropagation of apple (*Malus domestica* L. cultivar Douce de Djerba) through *in vitro* culture of axillary buds. Acta Botanica Gallica. 157 (3): 513–24. DOI: 10.1080/12538078.2010.10516227.
- Cárdenas L. M. A., y A. Villegas M. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro* - Osmotic potential of culture medium with different compounds for the *in vitro* propagation. Nota científica. Revista. Fitotecnia Mexicana. 25(2):213–217. <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/25-2/13a.pdf>
- Chaari R. A., M. Maalej., N. Drira., and A. Standardi. 2011. Micropropagation of Olive tree (*Olea europaea* L). 'Oueslati'. Turkish Journal of agriculture and forestry. 35 (4): 403-12. DIO: 10.3906/tar-1002-741.
- Cisne C, J. D., I. Muñoz., y H. Reyes. 2007. Reguladores de crecimiento, l-cisteína y ácido ascórbico en el cultivo *in vitro* de mora (*Rubus glaucus* Benth). La Calera. 7(8): 59–64. <http://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/2291>
- Concepción O., L. Nápoles., A. T. Pérez., M. Hernández., N. Peralta., y R. Trujillo. 2005. Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). Relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. Cultivos tropicales. 26 (1):33-39. <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193215916005.pdf>
- Donini L., P., M. W. Schuch., M de F. Ribeiro., JA de. Souza., and G. C. Soares. 2008. Estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. 'Arbequina' para início da micropropagação. Ciência rural. 38 (6): 1769-72. DOI: 10.1590/s0103-84782008000600045.
- Elimasni H., I. Nurwahyuni, and V. Gusvani. 2018. The role of cysteine in improving somatic embryos of salak sidempuan (*Salacca sumatrana* Becc.). Journal of Physics: Conference Series. 1116 (5). DOI: 10.1088/1742-6596/1116/5/052019.
- González F, P. A. 2015. Obtención de extractos con potencial actividad antioxidante a partir de madera de poda de olivo. Tesis. Pp.1-110. http://repositorio.udec.cl/jspui/bitstream/11594/1996/3/Tesis_Obtencion_de_un_extracto_con_Potencial_.Image.Marked.pdf
- Grigoriadou K., M. Vasilakakis, and E.P. Eleftheriou. 2002. *In vitro* propagation of the Greek olive cultivar 'chondrolia chalkidikis'. Plant cell, tissue and Organ culture. 71: 47–54. DOI: 10.1023/A:1016578614454.
- Haddad B., A. Carra., A. Saadi, N. Haddad, F. Mercati., A. S. Gristina., S. Boukhalfa, A. Djillali., and F. Carimi. 2018. *In vitro* propagation of the relict laperinne's olive (*Olea europaea* L. Subsp. *Laperrinei*). Plant biosystems.152 (4): 621–30. DOI: 10.1080/11263504.2017.1306002.

- Hell R. and M. Wirtz. 2008. Metabolism of cysteine in plants and phototrophic bacteria. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. 27: 59–91. DOI:10.1007/978-1-4020-6863-8_4.
- Jiufeng C., Yufei G., Ying D., Lingling K., and Yong Z. 2018. Browning treatment in tissue culture of 'Hongyang' kiwifruit. Series, I O P Conference, and Materials Science. 452:1-5. DOI: 10.1088/1757-899X/452/2/022075.
- Krishna H., R. K. Sairam., S. K. Singh., V. B. Patel., R. R. Sharma., M. Grover., L. Nain., and A. Sachdev. 2008. Mango explant browning: effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. *Scientia horticulturae*. 118 (2):132–38. DOI: 10.1016/j.scienta.2008.05.040.
- Laukkanen H., L. Rautiainen., E. Taulavuori., and A. Hohtola. 2000. Changes in cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree physiology*. 20 (7):467–75. DOI: 10.1093/treephys/20.7.467.
- Martin A. N., M. Papafotiou, and S. N. Vemmos. 2013. Season and explant origin affect phenolic content, browning of explants, and micropropagation of *x malosorbus florentina* (Zucc.) Browicz. *HortScience* 48 (1):102–7. DOI: 10.21273/hortsci.48.1.102.
- Montes-Salazar A., M., G. Sepúlveda-Jiménez., S. Evangelista-Lozano., y M. Rodríguez-Monroy. 2016. Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de *Cedrus atlantica* mediante yemas axilares. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*.7: 2071-78. <http://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/editorial/index.php/agricolas/article/view/140/126>
- Oliveira BA dos S., RM. Moreira., A. Ramm., JB da. Silva., P. Maciejewski., and MW. Schuch. 2018. Polivinilpirrolidona no estabelecimento *in vitro* de Oliveira 'Grappolo 541'. *Revista da 15a Jornada de Pós graduação e Pesquisa*.15:1378–89. <http://revista.urcamp.tche.br/index.php/rcjppg/article/view/2912>
- Oražem P., F. Aco C., and B. Bohanec. 2016. Occurrence of endophytic fungi causing recalcitrance of olive cultivar '*Istrska belica*' during shoot culture establishment. *Arch. Biol. Sci. Belgrade*. 68(1):177-186. DOI: 10.2298/ABS150415140O.
- Peixe A., A. Raposo, R. Lourenço, H. Cardoso, and E. Macedo. 2007. Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. *Scientia horticulturae*.113 (1):1-7. DOI: 10.1016/j.scienta.2007.01.011.
- Perales A., L., H. Silos E., L. L. Valera M., C. Perales S., y S. Flores B. 2016. Propagación *in vitro* de guayaba (*Psidium guajava* L.) a partir de segmentos nodales. *Revista Mexicana de ciencias agrícolas*. 7:375-386. <https://www.redalyc.org/pdf/2631/263145278013.pdf>
- Pushpraj S., and R .M. Patel. 2016. Factors affecting *in vitro* degree of browning and culture establishment of pomegranate. *African Journal of plant science*.10 (2): 43-49. DOI: doi.org/10.5897/ajps2013.1119.
- Roussos P. A., and C. A. Pontikis. 2001. Oxidative browning in 'Koroneiki' olive explants as influenced by oxidative enzyme activities and endogenous phenolic compounds.

Journal of horticultural science and biotechnology. 76 (4): 441–46. DOI: doi.org/10.1080/14620316.2001.11511391.

- Rugini, E. 1984. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia horticulturae*. 24 (2): 123–34. DOI: 10.1016/0304-4238(84)90143-2.
- Santos C.V., G. Brito., G. Pinto., and H.M.A.C. Fonseca. 2003. *In vitro* plantlet regeneration of *Olea europaea* ssp. *maderensis*. *Scientia horticulturae*. 97(1): 83-87. DOI: 10.1016/S0304-4238(02)00148-6.
- Sarropoulou V., C. Chatzissavvidis, K. Dimassi-Theriou, and I. Therios. 2016. Effect of asparagine, cysteine, citrulline, and glutamine on *in vitro* rooting and biochemical constituents in cherry rootstocks. *Biologia plantarum*. 60 (1): 1–12. DOI: 10.1007/s10535-015-0562-6.
- Shaheen A., M. Arshad., S. Mansoor, and Y. Zafar. 2009. Effect of various amino acids on shoot regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *African Journal of Biotechnology*. 8 (7):1214 -1218. DOI: 10.4314/ajb.v8i7.60072.
- Tabiyeh D. T., F. Bernard, and H. Shacker. 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in pistacia vera shoot tips culture. *Acta horticulturae*. 726: 201–3. DOI: 10.17660/actahortic.2006.726.31.
- Tang W., L. C. Harris., V. Outhavong., and R. J. Newton. 2004. Antioxidants enhance *in vitro* plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant cell reports*. 22 (12): 871-77. DOI: 10.1007/s00299-004-0781-3.
- Turina, C. A., and P. Bima. 2017. Establecimiento *in vitro* de cuatro variedades de olivo cultivadas a campo (*Olea europea* L.). *AgriScientia* 34 (2): 59. DOI: 10.31047/1668.298x.v34.n2.19041.
- Ye, Z. H., and J. E. Varner. 1996. Induction of cysteine and serine proteases during xylogenesis in *Zinnia elegans*. *Plant molecular biology*. 30 (6): 1233–46. DOI: 10.1007/BF00019555.
- Zacchini, M., and M. De Agazio. 2004. Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation. *Biologia plantarum*. 48 (4): 589–92. DOI: 10.1023/B:BIOP.0000047156.57328.27.
- Zhao, S., Hongxia W., Kai L., Linqing L., Jinbing Y., Xiuhong A., Pingping L., Linying Y., and Zhihua Z. 2021. The role of JrPPOs in the browning of walnut explants. *BMC plant biology*. 21 (1): 1–12. DOI: /10.1186/s12870-020-02768-8.

CAPÍTULO II. COMPUESTOS FENOLICOS EN CALLOS DE OLIVO (*Olea europaea L.*) BAJO LA EXPOSICIÓN DE RAYOS UV-B Y UV-C

PHENOLIC COMPOUNDS IN CALLUS CULTURES IN OLIVE (*Olea europaea L.*) UNDER RAY UV-B AND UV-C EXPOSURE

2.1 RESUMEN

Los agregados celulares (callos) del olivo generados *in vitro* presentan una alternativa para la producción endógena de fenoles en respuesta a la exposición de radiación UV, debido a la activación de los mecanismos bioquímicos de defensa de las plantas. El Objetivo fue establecer un protocolo *in vitro* para la generación de callos a partir de cotiledones de olivo, que posteriormente fueron estimulados por medio de exposición a radiación UV-C y UV-B para incrementar la producción de compuestos fenólicos. Los cotiledones de olivo se establecieron en un medio OM (Rugini, 1984) al 50 % de concentración de sus macrosales y suplementado con 10 μM de (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético por 21 días para inducir la formación de callo. En seguida se transfirieron a un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% de sus macroelementos para la multiplicación del callo suplementado con dos dosis de reguladores de crecimiento (PGR) como tratamientos: M1 5 μM de Bencil Aminopurina (BA)+5 μM de Ácido Naftalén Acético (ANA)+0.5 μM de Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), M2 0.5 μM de Thidiazuron (TDZ)+1.3 μM de Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y M0 como testigo sin PGR. Después de 30 días los callos fueron irradiados con luz UV-C y UV-B durante dos tiempos de exposición 35 y 300 segundos. Se evaluó el índice de crecimiento del callo de los 0 a los 50 días y el contenido de fenoles totales antes, después y a las 24 horas posteriores a la irradiación. La biomasa de los callos para M1 y M2 fue de 8.9 y 6.3 g en peso fresco respectivamente. La concentración de compuestos fenólicos antes de la irradiación fue para M1 y M2 7.9 y 7.8 (mgAG/gMF). Después de irradiarlos y a las 24 horas se observó un contenido de 9.7 y 9.6 (mgAG/gMF) en los tratamientos M2UV-C-35 y M2UV-B-300 respectivamente. Este trabajo contribuye al conocimiento sobre la inducción de callos y el contenido de compuestos fenólicos en olivo mediante la activación de mecanismos de defensa por radiación UV-C y UV-B. La radiación UV-C y UV-B incrementa el contenido de

compuestos fenólicos en callos de olivo y la dosis de 5 μM de BA+5 μM de ANA+0.5 μM de 2,4-D la biomasa del callo.

Palabras clave: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; callogénesis; compuestos fenólicos; luz UV; biomasa de callo.

2.2 ABSTRACT

Olive cell aggregates (callus) generated *in vitro* represent an alternative for the endogenous production of phenolics through the activation of plant defense mechanisms in response to UV irradiation exposures. The Objective to establish an *in vitro* protocol for the induction of callus from olive cotyledons, which were subsequently stimulated to produce phenolics by exposure to UV-C and B radiation. Olive cotyledons were established on OM medium (Rugini, 1984) at 50% concentration in their macrosalts and supplemented with 10 μM (2,4-D) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid for 21 days to induce callus formation. They were then transferred to MS medium (Murashige and Skoog, 1962) at 50% of their macroelements for callus multiplication supplemented with two doses of growth regulators (PGR) as treatments: M1 5 μM the 6-benzylaminopurine (BA)+5 μM the 1-Naphthaleneacetic acid (ANA)+0.5 μM the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), M2 0.5 μM de Thidiazuron (TDZ)+1.3 μM the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and M0 a control without PGR. After 30 days, the callus growth rate per treatment was evaluated. Total phenolics content was quantified before, after and 24 hours after irradiation with UV-C and UV-B light for two exposure times (35 and 300 seconds). Callus biomass was higher in treatment M1 and M2 with 8.9 and 6.3 g fresh weight respectively. Total phenolics before irradiation in M1 and M2 were 7.9 and 7.8 (mgAG/gMF) respectively. While treatments with 35 seconds of UV-C and 300 seconds of UV-B are what showed an increase in phenolics production immediately after and at 24 hours post-irradiation 9.7 and 9.6 (mgAG/gMF) respectively. This work contributes to the knowledge on the induction and increase of callus biomass (cell aggregates) and the elicitation of total phenolics by activation of defense mechanisms against UV-C and UV-B irradiation. UV-C and UV-B radiation generate the induction of compounds phenolics in olive callus and doses the 5 μM de BA+5 μM de ANA+0.5 μM de 2,4-D increase of callus biomass.

Key words: acid 2,4-diclorofenoxiacetic; callogenesis; fenolic compound; luz UV; callus biomass.

2.3 INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos producidos por las plantas, cuyas funciones principales comprenden aspectos biológicos y ecológicos, y se agrupan en cuatro grupos: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides (Ávalos y Pérez-Urria, 1998). Los compuestos fenólicos son uno de los grupos que más producen las plantas, se sintetizan por medio de dos rutas metabólicas la del ácido shikímico y la del acetato-malo-nato (Martín, 2018).

En olivo (*Olea europaea* L.) se ha identificado la presencia de metabolitos secundarios en distintos órganos de la planta y en los subproductos de la extracción de aceite. En las variedades Koroneiki y Chetoui se identificaron 86 tipos de moléculas derivadas del metabolismo secundario, algunas de ellas asociadas a órganos específicos de la planta como son los flavonoides en las hojas, la oleuroproteína en la raíz y el hidroxitirosol (2-(3,4-dihydroxyphenyl) etanol) en los frutos (Thomas *et al.*, 2015) y fenoles en orujo de la aceituna (Palmieri *et al.*, 2012). Algunos de estos compuestos tienen aplicaciones antimicrobianas, médicas y nutracéuticas. Lim *et al.*, (2016) determinaron que el hidroxitirosol (2-(3,4-dihydroxyphenyl) y la ampicilina inhiben el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus*, Sepporta *et al.*, (2014) observaron que la oleuropeína precursor de los secoiridoides del aceite de oliva tiene actividad anticancerígena y Lalas *et al.*, (2011) comprobaron que los polifenoles y antioxidantes presentes en extractos de hojas de olivo sirven para tratar aceitunas de mesa insípidas para incrementar su valor nutricional. El olivo es un árbol que presenta en sus órganos una abundante cantidad metabolitos secundarios que tienen distintas aplicaciones.

La producción y obtención de metabolitos secundarios de olivo se obtienen directamente de los órganos de la planta o por medio del cultivo de tejidos vegetales, sin embargo, estas técnicas aún requieren ser optimizadas (Lalas *et al.*, 2011). La ventaja de utilizar el cultivo de tejidos es porque la tasa de multiplicación es mayor en órganos, tejidos o células, más uniformidad y una producción sostenida del metabolito

(Gentileab *et al.*, 2013; Jeandet *et al.*, 2016). Por medio del cultivo *in vitro* de callos se pueden obtener compuestos fenólicos, a través de la manipulación de distintos factores, entre los que destacan las dosis altas de reguladores de crecimiento en orquídea del Himalaya (*Habenaria edgeworthii* Hook. F. ex. Collett) (Giri *et al.*, 2012), el estrés osmótico inducido por el aumento en la cantidad de sacarosa en el medio de cultivo en Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) variedad Reyna (Dios-López y Montalvo-González, 2011) y la cantidad y calidad de luz en olivo (*Olea europaea* L.) variedad Arbosana (Mohammad *et al.*, 2019). Otra ventaja de la obtención de metabolitos secundarios es la relativa facilidad para modificar las condiciones de incubación *in vitro* como es el caso de la radiación UV.

La fotosíntesis es un proceso metabólico que realizan las plantas para lo cual necesitan de radiación solar. Este tipo de radiación comprende el rango de longitud de onda de los 400–700 nm denominada radiación fotosintéticamente activa (PAR). Así mismo, las plantas están expuestas a otro tipo de radiación como es la luz ultravioleta, este tipo de radiación se clasifica en UV-A de 320-390 nm, UV-B de 280–320 nm y UV-C menor a 280 nm (Manrique, 2003). Cuando las plantas se exponen a niveles bajos de radiación UV-B estas activan un mecanismo de señalización de UVR8 y un grupo de genes para inducir metabolitos secundarios que sirven de protección contra la radiación UV, no obstante, los niveles altos resultan dañinos porque se produce oxígeno reactivo (ROS) en las mitocondrias y los cloroplastos, y en casos severos la planta puede activar el mecanismo de muerte celular programada (Nawkar *et al.*, 2013). Para prevenir e inhibir la producción de oxígeno reactivo (ROS) la planta cuenta con un mecanismo de defensa conformado por las enzimas superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD), catalasa (CAT) y ascorbato (APx) (Mohammad *et al.*, 2019). El mejor conocimiento de los procesos fotosintéticos de las plantas es un área de oportunidad para la producción de metabolitos secundarios.

La luz y la radiación UV-C y UV-B han sido utilizadas como inductores de compuestos fenólicos, antioxidantes y acumulación de biomasa en células y tejidos cultivados *in vitro* de diversas especies. Ahmad, *et al.*, (2016) mencionan que la luz azul incrementa los compuestos fenólicos y antioxidantes, y la luz blanca la biomasa de callos de *Stevia*

rebaudiana (Bert), Abbasi *et al.*, (2021) indican que la radiación UV-C y distintos fotoperíodos estimulan el metabolismo secundario en callos de *Fagonia indica* L., Nazir *et al.*, (2020) determinaron que la radiación UV-C y la melatonina inducen compuestos fenólicos en albahaca (*Ocimum basilicum* L. var. *purpurascens*). Por otra parte, Karakas y Bozat (2020) observaron que la radiación UV-A a 4°C incrementa el contenido fenólico de callos de *Galega officinalis* L. ruda de cabra. Así mismo, Naranjo-Gómez *et al.*, (2018) demostraron que las plantas cultivadas *in vitro* de *Baccharis antioquiensis* (Asteraceae) la luz UV-A y UV-B tiene efectos promotores sobre la acumulación de metabolitos secundarios en plantas regeneradas vía organogénesis de *Coleus forskohlii*. Así mismo se observó que los callos expuestos a la radiación UV-C desencadenan la señalización y activación de los genes involucrados en la biosíntesis de forskolina GGPP sintasa, CfTPS2 y CfTPS3 y un mecanismo de defensa para disminuir el daño causado por el patógeno *Macrophomina phaseolina* (Gangopadhyay *et al.*, 2016).

La producción de metabolitos secundarios por medio de callo es posible mediante el uso de luz UV. En callos de olivo aún no se reporta el efecto de la luz UV. No obstante, ya se ha identificado en callos de olivo de la variedad Coratina compuestos fenólicos, tales como, hidroxitirosol, tirosol, ácido cafeico, verbascósido, oleuropeína, ligstrosida, oleurosida y demetilydeglucosil, cantidades similares de compuestos fenólicos que se encuentran en semillas, drupas y hojas (Gentile y Uccella, 2014). En otras especies como *H. edgeworthii* los callos tienen una mayor cantidad de compuestos fenólicos que en los tallos (Maadon *et al.*, 2016). Por lo que, utilizar callos es una alternativa para la producción de metabolitos secundarios que se pueden inducir mediante la activación de mecanismos de defensa de las plantas en respuesta a la radiación UV y los productos generados pueden tener aplicaciones cosmeceúticas, farmacéuticos y nutracéuticos (Takshak y Agrawal, 2019).

Por lo anteriormente expuesto el objetivo de esta investigación fue establecer un protocolo para incrementar la biomasa de callo friable a partir de cotiledones de olivo y evaluar la exposición de éstos a los rayos UV-C y UV-B para aumentar la producción de fenoles totales *in vitro*.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se utilizaron semillas de árboles de olivo (*Olea europaea* L.) colectadas en el Parque Ecológico “Los Olivos”, ubicado en Tulyehualco, Xochimilco Ciudad de México.

Método de desinfestación

Las semillas de olivo fueron escarificadas con un cortador de tubo de cobre (marca Pretul modelo COT-P), se retiró el endocarpio, posteriormente se pusieron en agua destilada estéril con $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fungicida N-(triclorometiltio)ciclohex-4-eno-1,2-dicarboximida (CAPTAN) y $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ bactericida agrícola de amplio espectro Sulfato de Gentamicina al 2% + Clorhidrato de Oxitetraciclina al 6%, durante 4 horas en agitación constante. Posteriormente las semillas se remojaron en agua destilada estéril durante 48 horas, pasando ese tiempo, se colocaron en hipoclorito de sodio al 1.5 % (v/v) durante 30 minutos y después en una solución de etanol al 70 % (v/v) por 1 minuto y finalmente se dieron tres enjuagues con agua destilada estéril.

Establecimiento *in vitro* de cotiledones de olivo

En la campana de flujo laminar se retiró con un bisturí el tegumento y albumen de la semilla para extraer el embrión y este fue sembrado en el medio de cultivo medio para olivo (OM) (Rugini, 1984), sin reguladores de crecimiento. Los cultivos fueron incubados en oscuridad durante 15 días.

Después de haber germinado los embriones, se tomaron los cotiledones y se sembraron en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con $1 \text{ gr}\cdot\text{L}^{-1}$ de carbón activado, $155.2 \mu\text{M}$ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para la formación de callo friable durante 21 días.

Proliferación de callos friables

El callo friable fue transferido al medio MS con el 50% de sus macrosales y con dos dosis de reguladores de crecimiento, como tratamientos: M1 ($5 \mu\text{M}$ de BA+ $5 \mu\text{M}$ de

ANA +0.5 μ M de 2,4-D) y M2 (0.5 μ M de TDZ+1.3 μ M de 2,4-D) y M0 el testigo sin PGR.

Índice de crecimiento de Biomasa del callo

Se utilizaron frascos de 100 ml en los cuales se sembraron 500 mg de callos friables con seis repeticiones por tratamiento con y sin reguladores de crecimiento. Cada 10 días se pesaron los callos a partir del día 0 y hasta los 50 días de cultivo. Para calcular el índice de crecimiento se utilizó la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{\text{peso final} - \text{peso inicial}}{\text{peso inicial}} \quad 2.1)$$

Para cuantificar el peso seco primero se pesaron los callos a los 10, 20, 30, 40 y 50 días después del establecimiento, posteriormente se colocaron los callos frescos en una estufa (Modelo Delcho 48) a 70°C durante 24 horas y por último se tomaron dos pesos uno al salir de la estufa y otro una hora después.

Inducción de fenoles en el callo friable mediante radiación UV-B y UV-C

Cálculo de la dosis de radiación

La dosis de radiación se calculó haciendo una aproximación a la cantidad de intensidad de radiación solar en el oriente del Estado de México en $J \cdot cm^{-2}$. Se estimó de acuerdo con los datos registrados por el Sistema de Monitoreo Atmosférico (SIMAT) de la Ciudad de México, el cual monitorea los niveles de radiación solar ultravioleta registrados cada hora y utiliza para su medición el índice de radiación solar ultravioleta (UV). El Índice UV mide la intensidad de la radiación UV en la superficie terrestre y se expresa como un valor superior a cero, que va de 1 a 11+ MED/hora (dosis mínima de eritema sobre hora). Una MED/hora = $0.0583 \text{ Watts} \cdot m^{-2}$.

Para calcular la intensidad de radiación UV se utilizaron los datos registrados en la estación meteorológica Montecillo del año 2019, se calculó el promedio diario acumulado de radiación UV de 11 horas al día durante un año. En este periodo de

tiempo el promedio anual fue 23.83 MED/hora, multiplicando por 0.0583 Watts·m⁻² da un total de 1.38 Watts·m⁻².

La dosis de radiación UV es el producto de la intensidad por el tiempo en que es aplicada y se expresa en kJ·m⁻². Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$D = \frac{I \cdot t}{1000} \quad 2.2)$$

Dónde: *D*: Dosis de irradiación aplicada kJ·m⁻²; *I* = intensidad W·m⁻²; *t* = tiempo (segundos).

Tiempo de radiación UV-C y UV-B

Para calcular la cantidad el tiempo en el que se expondrán a las lámparas que emiten los dos tipos de radiación la UV-B y UV-C, se utilizó la siguiente fórmula propuesta por Christensen y Tiersch, (1994):

$$t = \frac{(E)(d^2)(\pi)}{(n)(W)} \quad 2.3)$$

Dónde: *E*: intensidad de la radiación J·cm⁻²; *d*²: distancia de la muestra cm; $\pi = 3.1416$, *n*: número de lámparas; *w*: rendimiento de lámpara (nm)(W); *t*: duración de la exposición en segundos.

Se utilizaron dos tipos lámparas una de radiación UV-B (marca REPTISUN 5.0 UV-B 26 W 120 V/60Hz 0.32) y para la luz UV-C se utilizó un BIO-RAD con 5 lámparas de luz UV-C, en ambos casos se calculó el tipo de exposición a razón de 4.47 J·cm⁻².

Tratamientos de luz UV-C y UV-B

Experimento 1

Se llevó a cabo un primer experimento donde se utilizaron los callos friables provenientes de los tratamientos de proliferación M1 (5 µM de BA+5 µM de ANA +0.5 µM de 2,4-D) y M2 (0.5 µM de TDZ+1.3 µM de 2,4-D), estos se sometieron a luz UV-C por 35 segundos (Cuadro 2.1).

Experimento 2

En un segundo experimento se utilizaron solo los callos friables de la dosis de reguladores de crecimiento del tratamiento M2 (0.5 μM de TDZ+1.3 μM de 2,4-D) y estos fueron expuestos durante mayor tiempo (300 segundos) a dos tipos de luz UV-C y UV-B (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Tratamientos de reguladores de crecimiento utilizados para la multiplicación de los callos de olivo y sus tiempos de exposición a los diferentes tipos de luz UV-C y UV-B

Experimento	Tratamiento	Reguladores de crecimiento	Radiación	Tiempo (s)
1	M1UV-C-35	BA+ANA+2,4-D ¹	UV-C ³	35 ⁵
	M2UV-C-35	TDZ+2,4-D ²	UV-C	35
2	M2UV-C-300	TDZ+2,4-D	UV-C	300 ⁶
	M2UV-B-300	TDZ+2,4-D	UV-B ⁴	300

¹(5 μM de BA+5 μM de ANA +0.5 μM de 2,4-D); ²(0.5 μM de TDZ+1.3 μM de 2,4-D)

³UV-C menor a 280 nm; ⁴UV-B de 280 a 320 nm; ⁵35 s = 4.47 J·cm²; ⁶300 s = 38.3 J·cm²

Cuantificación de fenoles totales

Extracción de fenoles

Se pesaron 200 mg de muestra (callo friable), en un mortero se pulverizó la muestra con nitrógeno líquido, se colocó en un tubo para centrifuga de 1.5 ml y se mezcló con 1 ml de metanol al 100% (v/v) en una relación (2:10). La solución de extracción se sónico en una lavadora ultrasónica (Baku modelo BK-9050 frecuencia 40 khz) durante 15 minutos, posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 13 500 rpm y se tomó el sobrenadante. De la solución de extracción se almacenó a 4°C en oscuridad.

Cuantificación de fenoles totales

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) con algunas modificaciones, en resumen, se diluyó 1:10 en metanol al 100% (v/v) de la solución de extracción y se tomaron 10 μL de esta solución y se mezcló con 1 490 μL de agua destilada, 200 μL del reactivo de Folin- Ciocalteu a 1N y 300 μL de la solución de Na_2CO_3 al 20% (p/v), se agitó la solución en una lavadora ultrasónica durante 1 min y se incubó por 30 min a 25 °C para permitir el desarrollo del color. Las muestras fueron tomadas antes, después y a las 24 horas posteriormente de los tratamientos.

Las muestras fueron cuantificadas en un espectrofotómetro (Termo Cientific) a una absorbancia de 765 nm. La lectura de cada muestra se comparó con la curva de calibración estándar de ácido gálico (0 a 0.005 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico por gramo de materia fresca (mgAG/gMF).

Diseño experimental

Para calcular la biomasa del callo se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos (concentraciones de reguladores) y seis repeticiones cada uno. Para la cuantificación de fenoles totales producidos con las irradiaciones con luz UV-C y UV-B se tomaron muestras a tres tiempos (antes de la exposición, después y a las 24 horas) con seis repeticiones cada uno.

Las variables evaluadas fueron biomasa del callo por medio del índice de crecimiento, peso fresco y seco. Los fenoles totales se reportaron en mg de ácido gálico por cada gramo de peso fresco (mgAG/gMF) de los dos tipos de radiación UV-C y UV-B.

Análisis estadístico

En los experimentos de multiplicación de callo y de dosis de radiación UV-C y UV-B se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación de medias de Tukey a un $\text{Alpha} = 0.05$ con el programa estadístico RStudio (versión 1.3).

Curva de calibración

Las muestras fueron cuantificadas en un espectrofotómetro (Termo Cientific) a una absorbancia de 765 nm. La lectura de cada muestra se comparó con la curva de calibración estándar de ácido gálico (0 a 0.005 mg·L⁻¹). (Figura 2.1).

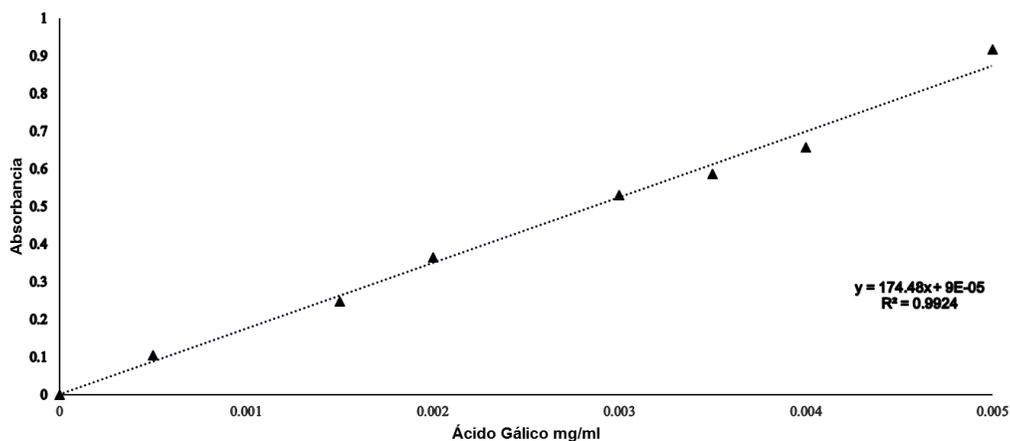


Figura 2.1. Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales en callos multiplicados in vitro de Olivo

Se obtuvo la ecuación $y=174.48x+9E-05$ correspondiente al modelo lineal para la interpolación de los datos:

Dónde: y : absorbancia de la muestra; x : concentración de compuestos fenólicos mg/ml.

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de cotiledones de olivo (*Olea europaea* L.) se obtuvo callo friable, posteriormente los callos fueron transferidos a los tratamientos de proliferación de callo y finalmente se realizó la extracción de compuestos fenólicos (Figura 2.2.)

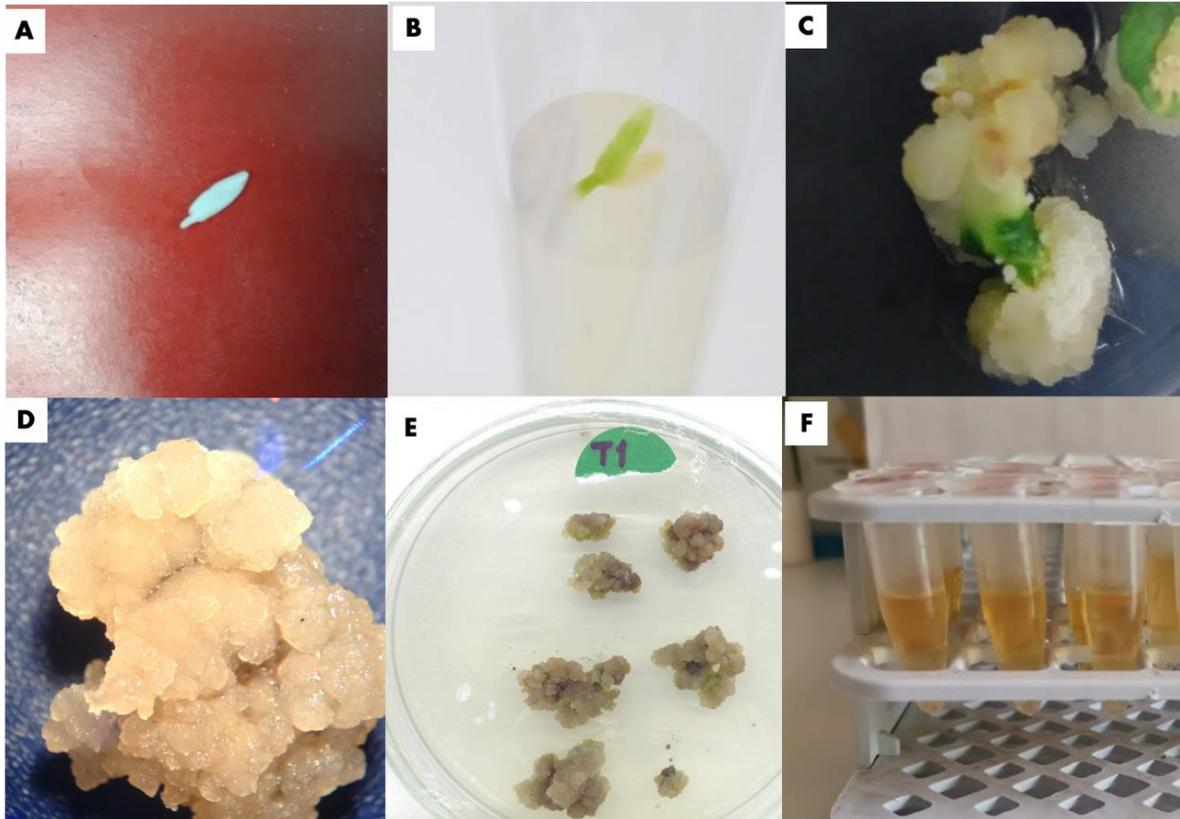


Figura 2.1. Desarrollo de callo en olivo (*Olea europaea* L.). A. Embrión de olivo. B. Embrión germinado 5 días. C. Formación de callo a partir de cotiledones 21 días. D. Callo friable 30 días. E. Callo friable antes del tratamiento con luz UV-C y UV-B. E. Extractos de fenoles de callos.

Existió diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre tratamientos para el peso fresco de callo friable a los 50 días posteriores al establecimiento de los cultivos. El tratamiento M1 registró el mayor peso de callo con 8.9 g, seguido del tratamiento M2 con 6.3 g de callo y por último el testigo M0 (sin reguladores de crecimiento) con 0.4 g de callo (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Peso fresco y seco de callo de olivo (*Olea europaea* L.) durante la etapa de multiplicación a los 50 días

	Concentración (μM)	Peso (g)	
		Fresco	Seco
M0	Sin reguladores	0.4 c ¹	0.02 b
M1	5 (BA) + 5 (ANA) + 0.5 (2,4-D)	8.9 a	0.27 a
M2	1.36 (TDZ)+ 0.5 (2,4-D)	6.3 b	0.19 a

¹Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$)

Se realizaron muestreos de los callos para determinar el peso fresco a los 0, 10, 20, 30, 40 y 50 días de cada tratamiento y con ello se calculó el índice de crecimiento de cada uno. Se observó que los tratamientos M1 y M2 mostraron una tendencia a aumentar la biomasa del callo conforme pasaron los días, mientras que el testigo M0 se mantuvo con peso constante durante el ciclo (Figura 2.3).

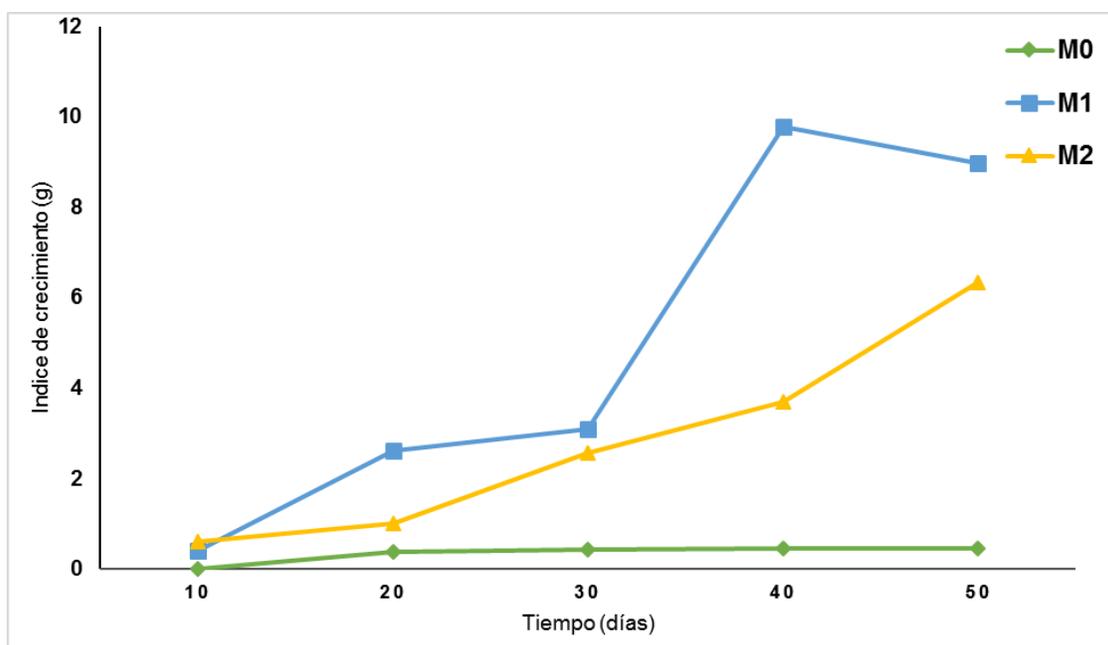


Figura 2.3. Índice de crecimiento de callo de olivo (*Olea europaea* L.) de 0 a 50 días en medio de cultivo OM específico para olivo

Los reguladores de crecimiento promueven el aumento de biomasa en los callos de olivo. El tipo de callo que se formó por acción de los dos tratamientos utilizados en esta investigación fueron morfológicamente friables (Figura 2.1.D), como lo reportó Maadon *et al.*, (2016). El balance hormonal de citocininas y auxinas promovieron en ambos casos el incremento de la biomasa de callo, siendo mayor M1 con 8.9 g en el que se utilizaron 5 μM de BA, 5 μM de ANA y 0.5 μM de 2,4-D en condiciones de oscuridad. Estos resultados fueron mayores a los reportados por Mohammad *et al.*, (2019) en callos provenientes de hoja de la variedad Arbosana de olivo. Así mismo, diversos autores han demostrado que la combinación de las citocininas y auxinas promueven la multiplicación y aumentan la tasa de crecimiento de los callos, por ejemplo, Gentile y Uccella, (2014) en la variedad Coratina de olivo, Avilés *et al.*, (2009) en *Juglans regia* L., Abdelmageed, (2012) en *Michelia champaca* y Haq *et al.*, (2019) en *Bergenia ciliata*.

Se expusieron a radiación UV-C y UV-B durante 35 y 300 s callos de olivo provenientes de dos tratamientos con reguladores de crecimiento y se cuantificó la cantidad de fenoles totales (mgAG/gMF) antes, después y 24 horas después de las irradiados (Cuadro 3). El tratamiento M2UV-C-35 aumentó la cantidad de fenoles después de la irradiación, el tratamiento M2UV-B-300 a las 24 horas y los tratamientos M1UV-C-351 y M2UV-C-300 mantuvieron la cantidad de fenoles iniciales. El tratamiento M2UV-B-300 fue el que produjo una mayor cantidad de fenoles totales (Cuadro 2.3) después de 24 horas a la exposición.

Cuadro 2.3. Fenoles totales (mgAG/gMF) antes, durante y después de la irradiación

Tratamiento	Reguladores de crecimiento	Radiación	Tiempo (s)	mgAG/gMF		
				Antes	Des	24 h
M1UV-C-35	BA + ANA+2,4-D ¹	UV-C ³	35 ⁵	7.9a ⁷	8.2a	8.8a
M2UV-C-35	TDZ + 2,4-D ²	UV-C	35	7.1b	9.7a	8.7a
M2UV-C-300	TDZ + 2,4-D ²	UV-C	300 ⁶	9.4b	7.8a	9.3ab
M2UV-B-300	TDZ + 2,4-D ²	UV-B ³	300	7.0b	6.7b	9.6a

¹ (5 $\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ BA + 5 $\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA + 0.5 $\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D); ² (1.36 $\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ + 0.51 $\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D); ³UV-C menor a 280 nm; ⁴UV-B de 280 a 320 nm; ⁵35 s = 4.47 J·cm²; ⁶300 s = 38.3 J·cm²; ⁷Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, p<0.05).

Efecto de la luz y oscuridad en la producción de compuestos fenólicos. Los callos de olivo fueron incubados en oscuridad durante 30 días antes de ser sometidos a los tratamientos con radiación UV. La cantidad de fenoles totales antes de irradiarse fue de 7.9 y 7.8 (mgAG/gMF) en los tratamientos M1 y M2 respectivamente. Nuestros resultados fueron menores a lo reportado por Arias *et al.*, (2016) quienes compararon el efecto de diferentes colores de luz en la producción de fenoles totales en callos de *Thevetia peruviana* y encontraron que los callos que crecieron en la oscuridad manifestaron un mayor contenido fenólico con 9.4 (mgAG/grMF), pero mayor a lo reportado por Khan *et al.*, (2018) en el cultivo de callos de *Fagonia indica* también cultivado en condiciones de oscuridad con 6.8 (mgAG/grMF) y Quiñones-Galvez *et al.*, (2016) observaron en cultivos celulares de *Theobroma cacao* incubados en las mismas condiciones un aumento en el contenido de estos compuestos. Además, se ha observado que el 2,4-D en el medio de cultivo aumenta el contenido de compuestos fenólicos entre 60 y 70 % en las variedades China y Reyna de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) (Dios-López y Montalvo-González, 2011).

El contenido de compuestos fenólicos en callos está determinado por la especie vegetal, las condiciones *in vitro*, tipo y dosis de radiación UV. Los callos del tratamiento M2UV-C-35 aumentaron después de irradiarlos 2.6 (mgAG/gMF) de fenoles totales, mayor a los callos desarrollados en M1UV-C-35 y M2UV-C-300 (Cuadro 3). Se sabe que la radiación UV-C desencadena la biosíntesis de compuestos fenólicos en varias especies (Naranjo-Gómez *et al.*, 2018); sin embargo, las dosis altas de radiación UV-C disminuyen la cantidad de estos compuestos, como lo observaron Abbasi *et al.*, (2021) en callos de *Fagonia indica* L. Por otro lado, en los callos irradiados con luz M2UV-B-300 se observó un aumento de 2.3 (mgAG/gMF) en el contenido de fenoles totales, después de 24 horas del tratamiento, resultado similar al de los callos del tratamiento M2UV-C-35 (Cuadro 3). Lo cual, sugiere que las células activaron un mecanismo de defensa para protegerse de la radiación (Nawkar *et al.*, 2013). Sin embargo, estos resultados son contrarios a lo reportado por Karakas y Bozat, (2020) donde la luz UV-B produjo una menor cantidad de compuestos fenólicos en callos de ruda de cabra *Galega officinalis* L.

Si se compara la producción de fenoles totales presentes en los callos de olivo, que en promedio fue de 7.8 (mgAG/gMF) en este estudio, con lo encontrado en otros órganos de la planta de la misma especie (*in vivo*), por ejemplo, en las hojas se han encontrado 13.3 (mgAG/gMF) (Abaza *et al.*, 2011), podemos decir que la tendencia es similar *in vitro* que *in vivo*, lo que indica que es factible obtener de los callos estos compuestos, con la ventaja de que su producción es mayor y constante.

2.6 CONCLUSIONES

Los callos de olivo (*Olea europaea* L) expuestos a radiaciones UV-C y UV-B aumentaron la producción de compuestos fenólicos a los tiempos evaluados. No obstante, es necesario realizar más estudios para determinar los mecanismos enzimáticos y moleculares implicados en la producción de metabolitos secundarios inducidos por efecto de la radiación UV-C y UV-B. Además de realizar bioensayos para determinar sus aplicaciones insecticidas, nutracéuticas o farmacéuticas.

2.7 LITERATURA CITADA

- Abaza, L., N. B. Youssef., H. Manai., F. M. Haddada., K. Methenni., and M. Zarrouk. 2011. Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *Grasas y aceites*. 62 (1): 96–104. DOI:10.3989/gya.044710.
- Abbasi, B.H., T. Khan., R. Khurshid., M. Nadeem., S. Drouet., and C. Hano. 2021. UV-C mediated accumulation of pharmacologically significant phytochemicals under light regimes in *in vitro* culture of *Fagonia indica* (L.). *Scientific reports*. 11 (1): 1–16. DOI: 10.1038/s41598-020-79896-6.
- Abdelmageed, A. H. A., Q. Z. Faridah., N. Shuhada K., and A. A. Julia. 2012. Callus induction and plant regeneration of *Michelia champaca* (Magnoliaceae): A multipurpose tree. *Journal of medicinal plants research*. 6 (17): 3338–44. DOI: 10.5897/jmpr12.196.
- Ahmad, N., N. Ahmad., and A. Rab. 2016. Light-Induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*. 154: 51–56. DOI:10.1016/j.jphotobiol.2015.11.015.
- Arias, J. P., K. Zapata ., B. Rojano., and M. Arias. 2016. Effect of light wavelength on cell growth, content of phenolic compounds and antioxidant activity in cell

- suspension cultures of *Thevetia peruviana*. Journal of photochemistry and photobiology B: Biology. 163: 87–91. DOI:10.1016/j.jphotobiol.2016.08.014.
- Ávalos, A., y E. García. 1998. Efecto del PH sobre la proporción de sexos, el crecimiento y la sobrevivencia del guppy *Poecilia reticulata* Peters, 1859. Hidrobiológica 8 (2): 125–32. URL: <https://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/article/view/722/313>
- Avilés, F., D. Ríos., R. González, and M. Sánchez-Olate. 2009. Effect of culture medium in callogenesis from adult walnut leaves (*Juglans regia* L.). Chilean journal of agricultural research. 69 (3): 460–67. DOI: 10.4067/s0718-58392009000300020.
- Christensen, J.M., and T. R. Tiersch. 1994. Standardization of ultraviolet irradiation of channel catfish sperm. Journal of the world aquaculture society. 25 (4): 571–75. DOI: 10.1111/j.1749-7345.1994.tb00827.x.
- Dios-López, A de., y E. Montalvo-González. 2011. Inducción de antocianinas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) *in vitro*. Revista Chapingo serie horticultura. 17 (2): 77–87. DOI: 10.5154/r.rchsh.2011.17.011
- Gangopadhyay, M., S. Gantait., S. Palchoudhury., Md Nasim Ali., C. Mondal., and A. Kumar. P. 2016. UVC-priming mediated modulation of forskolin biosynthesis key genes against *Macrophomina* root rot of *Coleus forskohlii*—A tissue culture based sustainable approach. Phytochemistry letters. 17: 36–44. DOI: 10.1016/j.phytol.2016.06.007.
- Gentile, L., and N. A. Uccella. 2014. Selected bioactives from callus cultures of olives (*Olea europaea* L. Var. *coratina*) by LC-MS. Food research international. 55: 128–36. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.10.046.
- Giri, L., P. Dhyani., S. Rawat., I. D. Bhatt, S. K. Nandi., R. S. Rawal., and V. Pande. 2012. *In vitro* production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *Habenaria edgeworthii*: A rare Himalayan medicinal orchid. Industrial crops and products. 39 (1): 1–6. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.01.024.
- Haq, I.U., G. Khurshid., A. Z. Abbasi, I. Nawaz., T. Naqvi., M. Arfan., M. Maroof S., B.A. Zafar A., J. Hussain., M. Arif A., S.U. Rehman., and R. Ahmad. 2019. Successful callogenesis from leaf and petiole of *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb and antibacterial activity of callus extracts. Pakistan journal of botany 51 (5): 1847–52. DOI: 10.30848/PJB2019-5(11).
- Jeandet, P., C. Clément., L-P. Tisserant., J. Crouzet., and E. Courot. 2016. Use of grapevine cell cultures for the production of *phytostilbenes* of cosmetic interest. Comptes rendus chimie, 19(9): 1062-1070. DOI: 10.1016/j.crci.2016.02.013

- Karakas, F. P., and B. G. Bozat. 2020. Fluctuation in secondary metabolite production and antioxidant defense enzymes in *in vitro* callus cultures of goat's rue (*Galega officinalis*) under different abiotic stress treatments. *Plant cell tissue and organ culture*. 142 (2): 401–14. DOI: 10.1007/s11240-020-01870-x.
- Khan, T., B. H. Abbasi., and M. A. Khan. 2018. The interplay between light, plant growth regulators and elicitors on growth and secondary metabolism in cell cultures of *Fagonia indica*. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*. 185: 153–60. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.06.002.
- Lalas, S., V. Athanasiadis., O. Gortzi., M. Bounitsi., I. Giovanoudis., J. Tsaknis., and F. Bogiatzis. 2011. Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Food chemistry*. 127 (4): 1521–25. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.02.009.
- Lim, A., N. Subhan., J. A. Jazayeri., G. John., T. Vanniasinkam., and H. K. Obied. 2016. Plant phenols as antibiotic boosters: *In vitro* Interaction of olive leaf phenols with ampicillin. *Phytotherapy research*. 30 (3): 503–9. DOI: 10.1002/ptr.5562.
- Maadon, S. N., E. Rosseleena R., I. Ismail., S. Nataqain B., and M. Noor N. 2016. Somatic embryogenesis and metabolic differences between embryogenic and non-embryogenic structures in mangosteen. *Plant cell tissue and organ culture*. 127 (2): 443–59. DOI: 10.1007/s11240-016-1068-4.
- Manrique, R.E. 2003. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Ecosistemas*. 12 (1): 1–11. DOI: <https://core.ac.uk/download/pdf/25641867.pdf>
- Martín G, D. A. 2018. Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de investigación agraria y ambiental*. 9 (1): 81–104. DOI: 10.22490/21456453.1968.
- Mohammad, S., M. A. Khan., A. Ali., L. Khan., M. Shahsawar K., and Z. U. R. Mashwani. 2019. Feasible production of biomass and natural antioxidants through callus cultures in response to varying light intensities in olive (*Olea europaea*. L) Cult. Arbosana. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology* 193: 140–47. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2019.03.001.
- Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473-479. URL: priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/03_Murashige_Skoog1962.pdf
- Naranjo-Gómez, E. J., M. A. Puertas-Mejía., J. C. Mejía-Giraldo., A. Z. Amaya-Nieto., and L. Atehortúa. 2018. Micropropagation of *Baccharis antioquiensis* (Asteraceae) and photoinduction of polyphenols by UV radiation." *Revista de biología tropical*. 66 (2): 754–64. DOI: 10.15517/rbt.v66i2.33406.

- Nawkar, G. M., P. Maibam, J. H. Park., V. P. Sahi., S. Y. Lee., and C. H. Kang. 2013. UV-Induced cell death in plants. *International journal of molecular sciences*. 14 (1): 1608 - 28. DOI: 10.3390/ijms14011608.
- Nazir, M., M. Asad U., S. Mumtaz, A. Siddiquah, M. Shah., S. Drouet, C. Hano., and B. H. Abbasi. 2020. Interactive effect of melatonin and UV-C on phenylpropanoid metabolite production and antioxidant potential in callus cultures of purple asil (*Ocimum basilicum* L. Var *purpurascens*). *Molecules*. 25 (5):1-16. DOI: 10.3390/molecules25051072.
- Palmieri, D., B. Aliakbarian, A. A. Casazza., N. Ferrari., G. Spinella., B. Pane., G. Cafueri., P. Perego, and D. Palombo. 2012. Effects of polyphenol extract from olive pomace on anoxia-induced endothelial dysfunction. *Microvascular research*. 83 (3): 281–89. DOI: 10.1016/j.mvr.2012.02.010.
- Quiñones-Galvez, J., M. Hernández de la T., Y. Quirós M., Y. Capdesuñer R., and R. Trujillo S. 2016. Factores que controlan el contenido de fenoles en el cultivo de callos de *Theobroma cacao*. *Cultivos tropicales*. 37: 118–26. DOI: 10.13140/RG.2.1.4038.1047.
- Rugini, E. 1984. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea* sativa L.) cultivars with different Root-Ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia horticulturae*. 24 (2): 123–34. DOI: 10.1016/0304-4238(84)90143-2.
- Sepporta, M. V., R. Fuccelli., P. Rosignoli., G. Ricci., M. Servili., G. Morozzi., and R. Fabiani. 2014. Oleuropein inhibits tumour growth and metastases dissemination in ovariectomised nude mice with MCF-7 human breast tumour xenografts. *Journal of functional foods*. 8 (1): 269–73. DOI: 10.1016/j.jff.2014.03.027.
- Singleton, V. L. and J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with *phosphomolybdic-phosphotungstic* acid reagents. *American journal of enology and viticulture* 16: 44-158.
- Takshak, S., and S. B. Agrawal. 2019. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*. 193: 51–88. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2019.02.002.
- Thomas, M., I. Khlif., P. Kanakis., A. Termentzi., N. Allouche., M. Halabalaki., and A. L. Skaltsounis. 2015. UHPLC-DAD-FLD and UHPLC-HRMS/MS based metabolic profiling and characterization of different *Olea europaea* organs of koroneiki and chetoui varieties. *Phytochemistry letters*. 11: 424–39. DOI: 10.1016/j.phytol.2014.12.020.

CAPÍTULO III. EVALUACIÓN FINANCIERA DE LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE ÁRBOLES DE OLIVO CON OPCIONES REALES

FINANCIAL EVALUATION OF *IN VITRO* PRODUCTION OF OLIVE TREES WITH REAL OPTIONS

3.1 RESUMEN

Los proyectos para el establecimiento de empresas biotecnológicas son difíciles de evaluar porque se encuentran en escenarios de mayor riesgo e incertidumbre. El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad financiera de un laboratorio comercial de cultivo *in vitro* para la propagación de árboles de olivo (*Olea europaea* L.). El proyecto se evaluó con el método tradicional a través del cálculo del Valor Actual Neto (VAN), Tasa Interna de Retorno (TIR), la Tasa de Actualización (TREMA) y relación Costo Beneficio (B/C), y con el enfoque de opciones reales utilizando árboles binomiales, este último método consideró la volatilidad de precio del producto y la probabilidad de éxito de cada una de las cinco etapas (establecimiento, multiplicación, enraizamiento, aclimatización y vivero) del proyecto. Los resultados obtenidos con el método tradicional indican que el proyecto se debe rechazar pues el valor del VAN fue de MXN\$-1 498 656, la TIR fue de 13%, la TREMA de 25% y la B/C de 0.83. Los resultados de la evaluación con el método de opciones reales indican que cada una de las cinco etapas del proyecto se podría llevar a cabo en los dos escenarios analizados pues el Valor Actual Neto total fue positivo en cada etapa y, además, el valor de la etapa siguiente fue mayor al valor de la anterior. Con este método se pudo determinar el valor real del proyecto y el momento oportuno de abandonarlo; por lo tanto, se recomienda a los inversionistas utilizarlo al momento de tomar decisiones en inversiones de alto riesgo de proyectos biotecnológicos.

Palabras clave: Árboles binomiales, biotecnología, laboratorio comercial *in vitro*, investigación+desarrollo, inversión de riesgo, viabilidad económica.

3.2 ABSTRACT

Projects for the establishment of biotechnology companies are difficult to evaluate because they are in scenarios of increased risk and uncertainty. The objective of this work was to evaluate the financial feasibility of a commercial *in vitro* culture laboratory for the propagation of olive trees (*Olea europaea* L.). The project was evaluated with the traditional method through the calculation of the Net Present Value (NPV), Internal Rate of Return (IRR), the Discount Rate (CRR) and the Benefit Cost Ratio (B/C), and with the real options approach using binomial trees, the latter method considered the price volatility of the product and the probability of success of each of the five stages (establishment, multiplication, rooting, acclimatization and nursery) of the project. The results obtained with the traditional method indicate that the project should be rejected because the NPV value was MXN \$ -1,498,656, the IRR was 13%, the TREMA was 25% and the B/C was 0.83. The results of the evaluation with the real options method indicate that each of the five stages of the project could be carried out in the two scenarios analyzed, since the total Net Present Value was positive in each stage and, in addition, the value of the next stage was greater than the value of the previous one. With this method it was possible to determine the real value of the project and the opportune moment to abandon it; therefore, it is recommended that investors use it when making decisions on high-risk investments in biotechnology projects

Key words: Binomial trees, biotechnology, economic viability, *in vitro* commercial laboratory, research + development, risk investment.

3.3 INTRODUCCIÓN

Actualmente el consumidor mexicano está más informado y preocupado por su salud de ahí que se observa un incremento en la demanda de aceite de olivo. Estudios recientes demuestran que el consumo de aceite de olivo aporta beneficios a la salud, debido a su alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados y compuestos fenólicos, tales como el hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína, que funcionan como antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos y previenen enfermedades cardiovasculares (Tasioula-Margari y Okoger, 2001; Sepporta *et al.*, 2014; Rodríguez-Morató *et al.*,

2015; Sánchez-Rodríguez y Mesa, 2018). De igual manera, los subproductos del olivo como el orujo y los extractos de hojas también tienen propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antimicóticas (Markin, *et al.*, 2003; Palmieri *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2015).

El consumo nacional aparente anual de aceite de oliva en México en 2019 se ubicó en 40 mil toneladas (25 000 t producción de aceite + 15 000 t importaciones de aceite – 800 t exportaciones de aceite), y debido a que es considerado un producto suntuario, accesible y demandado por ciertos segmentos de la población, el consumo de aceite de oliva es bajo en el país, en comparación con el observado en países como Grecia y España (ProChile, 2017); el 90% de los aceites que consume la población mexicana son de girasol, soya y cártamo, y menos de 1% es de olivo (Figuerola *et al.*, 2016).

En 2019 superficie de árboles de olivo (*Olea europaea* L.) en México fue de 7.5 mil ha y en ella se obtuvo una producción de aceitunas de 25 mil t (SIAP, 2019). La producción de México es muy baja compara con el resto de los países, pues en ese mismo año la producción mundial de aceitunas fue de 19 millones de t, y se obtuvo en una superficie de 11 millones de ha, distribuidas en países localizados en la cuenca del Mediterráneo como España, Italia, Marruecos y Turquía (FAOSTAT, 2019).

En 2019 la producción mexicana de aceite de oliva fue de 2.5 mil t (ICEX, 2011), muy inferior al dato observado a nivel mundial de tres millones de t (USDA, 2019). Dicha producción fue insuficiente para abastecer la demanda interna del producto (40 mil t), de ahí que el país tuvo que importar 15 mil t de aceite, con un valor de USD \$ 63 millones y de las cuales el 86% del aceite importado provino de España. En el mismo año México exportó 800 t de aceite hacia los Estados Unidos, Portugal y Belice con un valor de USD \$ 1.6 millones (SIAVI, 2019).

Las causas que explican la baja superficie dedicada al cultivo del olivo datan de la conquista. Los inicios del cultivo del olivo en México se remontan al siglo XVI cuando fue introducido por los españoles; sin embargo, restricciones impuestas por la Corona Española impidieron el crecimiento de la industria del aceite y aceituna (Delfín, 2004). En 1950 se crea la Comisión Nacional del Olivo para promover su cultivo y satisfacer

la demanda interna de aceite de oliva, por lo que se establecieron cuatro mil hectáreas (Saavedra, 1960).

En los últimos 30 años surgieron dos empresas olivícolas, la primera en Tula, Tamaulipas con una superficie de dos mil hectáreas y una planta procesadora de aceite. La segunda está ubicada en El Olivo Ixmiquilpan, Hidalgo, cuenta con 200 ha, produce aceite y aceituna en salmuera de forma artesanal y es está situada en una zona de baja productividad (Sánchez-Escudero y Sánchez-Sánchez, 2018).

La existencia de zonas que cumplen con los requerimientos de suelo y clima para el desarrollo del cultivo del olivo determina que éste tenga un alto potencial productivo en México, de aproximadamente 3.7 millones de ha distribuidas en 25 estados del territorio nacional (SAGARPA,2012).

El cultivo del olivo es una alternativa para establecerlo en zonas tanto de alto como de bajo potencial productivo, puesto que ha mostrado adaptarse distintas condiciones de suelos y climas del país. Por ser un cultivo industrial, requiere la transformación de la aceituna, aunque además permite el desarrollo de una industria entorno al cultivo para la producción de aceite y aceitunas de mesa. Fomentar el consumo de aceite y aceitunas trae beneficios a la salud del consumidor y altas ganancias al productor.

La reproducción de árboles de olivo a nivel comercial se realiza por el método de esquejes, pero últimamente la multiplicación de árboles se hace por medio del cultivo de tejidos (Fabbri *et al.*, 2004). Mediante el cultivo de tejidos se producen plantas de manera exponencial, sanas, uniformes, de alto rendimiento y precocidad (Tegen y Mohammed, 2016). El mercado mundial de plantas cultivadas *in vitro* es de 500 millones a 1 billón de plantas al año (Kitto, 1997) y un valor aproximado de 150 mil millones de dólares (Saurabh y Sharma 2015). Lo que representa un área de oportunidad para invertir en la producción de plantas cultivadas *in vitro*.

Las empresas de cultivo de tejidos pertenecen al sector biotecnológico. Para la obtención de plantas *in vitro* se requieren años de investigación y desarrollo, un capital inicial alto y riesgoso, no hay ingresos inmediatos y los activos son intangibles, por lo

que resulta difícil decidir invertir (ProMéxico, 2014; ProMéxico, 2017). Para el establecimiento de un laboratorio comercial de cultivo *in vitro* de plantas se necesita un protocolo estandarizado y eficiente de la especie a propagar, conocer la tasa de multiplicación y crecimiento, el porcentaje de sobrevivencia y enraizamiento (Tomar *et al.*, 2010), no obstante, si no se tiene esa información o no se realiza en las mismas condiciones reportadas en la literatura, pueden surgir inconvenientes al momento del desarrollo del proyecto. Esta situación genera un tipo de incertidumbre que es difícil de predecir, aunado a que este tipo de proyectos pasan por una serie de etapas específicas, relacionadas entre sí, que no son excluyentes una de otra, cuya duración y probabilidad de éxito es variable (Mascareñas, 2012).

Los proyectos biotecnológicos de reciente creación son difíciles de evaluar porque no es fácil predecir la incertidumbre relacionada con la terminación del proyecto, las constantes innovaciones y el riesgo de tener el éxito comercial esperado, por lo que la decisión del inversionista de invertir o no se torna difícil.

A través del cultivo *in vitro* de plantas a nivel comercial se puede satisfacer la demanda de árboles de olivo, para determinar su viabilidad se requiere hacer una evaluación económica y determinar si es rentable la propagación *in vitro* y con los resultados hacer una recomendación de política pública para la promoción y financiamiento de laboratorios comerciales de cultivo de tejidos.

Actualmente el gobierno de México está fomentando el cultivo árboles frutales, maderables y de especias a través del Programa Sembrando Vida, cuya meta es establecer un millón de hectáreas en 19 estados de la república (DOF, 2019). Derivado de lo anterior, es el momento oportuno para promover el incremento de la superficie de árboles como el olivo cuyo fruto es utilizado en la obtención de aceite de oliva, uno de los productos que presenta una demanda en crecimiento.

Considerando la importancia del aceite de oliva, como alimento funcional que tiene una demanda en crecimiento, la presente investigación tiene por objetivo realizar una evaluación financiera para saber cuál es el valor real de un proyecto de producción *in vitro* de árboles de olivo, y determinar si es viable invertir. Se usaron dos métodos para

realizar la evaluación del proyecto, el primero es el tradicional que consiste en el cálculo del Valor Actual Neto (VAN), Tasa Interna de Retorno (TIR), Tasa Mínima de Retorno TREMA y Relación Costo Beneficio (B/C), el segundo método fue el método de opciones reales con árboles binomiales.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de datos

Se estableció un protocolo de cultivo *in vitro* de olivo en el Laboratorio de Biorreactores de árboles frutales ubicado en el Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados en Texcoco, Estado de México, para recabar información técnica y datos reales para estimar el presupuesto de inversión. Se obtuvieron datos sobre, selección del material vegetal con características agronómicas deseables, desinfestación, control de la oxidación del explante y establecimiento *in vitro*. La información provino de las siguientes fuentes: Rugini, 1984; Grigoriadou *et al.*, 2002; Turina y Bima, 2017. Así mismo, se consultó literatura para determinar tipos de equipos e insumos necesarios (IAEA, 2004); Orellana *et al.*, 2021).

Estimación del mercado potencial

En el estado de Guanajuato se estima que hay 1 370 ha con alto potencial productivo para la producción de árboles de olivo (INIFAP, 2017). Partiendo del supuesto de satisfacer al 15% de los productores y el resto para el Programa Sembrando Vida da un total de 54 800 árboles; esta cifra se tomó como la demanda potencial que se proyecta satisfacer en el quinto año del proyecto.

Etapas del cultivo *in vitro* de plantas

El desarrollo de un protocolo de propagación *in vitro* de acuerdo con Fabbri *et al.* (2004) se conforma de cinco etapas; para fines de esta investigación se engloban de la siguiente manera: etapa I de establecimiento; etapa II de multiplicación; etapa III de enraizamiento; etapa VI de aclimatización y; etapa V de vivero.

Probabilidad de éxito de pasar a la siguiente fase

La probabilidad de éxito se estimó de acuerdo con los resultados obtenidos en el laboratorio de biorreactores de frutales del Colegio de Postgraduados y de los resultados obtenidos por Roussos y Pontikis (2002). Se consideró un porcentaje de establecimiento de 60%, una tasa de multiplicación de 10 nudos por explante, los porcentajes de enraizamiento de 70%, aclimatización de 75% y vivero 80%; además, se consideró un factor de probabilidad de superar cada etapa de 80% debido al nivel de experiencia con la que cuenta el personal.

Evaluación con el método tradicional

Para determinar la rentabilidad con el método tradicional se calcularon los indicadores financieros tradicionales: El Valor Actual Neto (VAN), la Tasa de Rendimiento Mínima Aceptable (TREMA), la Tasa Interna de Retorno (TIR) y la relación Beneficio Costo (B/C).

El Valor Actual Neto (VAN) es un indicador que expresa la sumatoria de los flujos netos anuales actualizados menos la inversión inicial y representa el valor del dinero actual que va a reportar el proyecto en el futuro, con una tasa de interés y un periodo determinado.

$$VAN = -A + \sum_{i=1}^n \frac{Q_i}{(1+k)^t} \quad 3.1)$$

dónde A es la inversión inicial; Q_i es el flujo neto del periodo i ; k es la tasa de actualización o descuento y; n son los años de duración del proyecto.

Los criterios para la toma de decisión son los siguientes: si el VAN es mayor a cero el proyecto es rentable y se debe aceptar, si el VAN es igual a cero la realización del proyecto es indiferente y si el VAN es negativo entonces el proyecto no es rentable y se debe rechazar.

La Tasa de Rendimiento Mínima Aceptable (TREMA) es la tasa que representa una medida de rentabilidad, la mínima que se le exigirá al proyecto de tal manera que permita cubrir la totalidad de la inversión inicial.

$$TREMA = i + f + u \quad 3.2)$$

dónde i es la tasa de interés; f es el índice inflacionario y; u es la utilidad.

La Tasa Interna de Retorno (TIR) es la tasa de descuento que hace que el VAN sea igual a cero. La TIR se determina de la expresión:

$$0 = -A + \sum_{i=1}^n \frac{Q_i}{(1+TIR)^i} \quad 3.3)$$

dónde A es la inversión inicial; Q_i es el flujo neto del año i ; k es la tasa de actualización o descuento y; n son los años de duración del proyecto.

Los criterios para la toma de decisiones son los siguientes: si la TIR es mayor k el proyecto es rentable; si la TIR es igual a k entonces es indiferente la realización del proyecto y; si la TIR es menor a k , el proyecto no es rentable.

La relación costo beneficio (B/C) es la relación entre el beneficio y los costos; muestra la cantidad de dinero actualizado que recibirá el proyecto por cada unidad monetaria invertida. Se determina dividiendo los ingresos brutos actualizados o beneficios entre los costos actualizados.

$$B/C = \frac{\text{Valor actual de los beneficios}}{\text{Valor actual de los costos}} \quad 3.4)$$

Evaluación con opciones reales

La evaluación del proyecto con opciones reales se realizó con el modelo planteado por Mascareñas (2012) para la valoración de un proyecto biotecnológico con opciones reales, con algunas modificaciones. El modelo binomial valora opciones en la que pueden ocurrir dos resultados: excelente o pésimo (Cox *et al.*, 1979). Se determinó el

costo en cada una de las etapas del proyecto, y esta se aplica como medida contingente contra la incertidumbre, en la que el avance del proyecto depende del término de la etapa anterior. Se utilizó un proceso de cálculo recursivo a partir del cálculo del VAN tradicional del proyecto obtenido de calcular los costos de producción por cada una de las etapas en un periodo de 5 años (Cuadro 3.1).

El método de opciones reales consiste en calcular el Valor Actual Neto total (*VAN* total) que consiste en sumar al Valor Actual Neto tradicional más el valor de la opción. El procedimiento para obtener el valor de la opción requiere del cálculo de las siguientes variables: a) Valor del activo subyacente (*S*): es el valor del proyecto que corresponde al valor presente del flujo de efectivo esperado de iniciar el proyecto ahora, corresponde al VAN tradicional, calculado por etapas; Precio de ejercicio de la opción (*k*): la opción de abondo se ejerce cuando no se cumple alguna de las etapas del proyecto; este dato se obtuvo calculando los costos variables de cada etapa del proyecto (Cuadro 1); c) Varianza del valor del activo (σ): la volatilidad provoca que exista incertidumbre asociada con las estimaciones de los flujos de efectivo y el valor presente que mide el valor del activo a la fecha actual, para este caso se consideraron dos tipos de volatilidades para calcular el riesgo, el precio del producto y la probabilidad de que se realice cada etapa del proyecto; d) Precio del producto: se calculó a partir del índice de precios al consumidor de plantas y flores, y se deflactaron con el Índice Nacional de Precios al Consumidor con base en 2019, posteriormente se obtuvo la tasa de crecimiento continua de los precios con el logaritmo natural del cociente del año *t* entre el año anterior (*t-1*). Con estas tasas de crecimiento se calculó la desviación estándar; la volatilidad del precio fue 0.106.

La probabilidad de que se realice la siguiente etapa del proyecto se calculó a partir del modelo de Black & Scholes (Arnold y Shockley, 2001) para determinar la volatilidad asociada a la probabilidad de éxito que se lleve a cabo la siguiente etapa cuyos valores por cada etapa se encuentran en la Cuadro 1; se utilizó la siguiente fórmula:

$$d_2 = N \left[\frac{\ln(VA/X) + (k - (\sigma^2/2) * T)}{\sigma \sqrt{T}} \right] \quad 3.5)$$

dónde VA es el valor actual del proyecto al inicio de la fase; X es el costo de la siguiente fase; k es el costo de oportunidad del capital; σ es la desviación típica anual; T es el tiempo en años y; N es el valor de la distribución normal.

La fecha de expiración de la opción (T) es el período durante el cual la opción es viable, el tiempo estimado fue de 5 años. La tasa libre de riesgo (r) es la tasa de interés real anual libre de riesgo, la cual se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{1+cetes}{1+(\pi^e)^2} = 1 + r \quad 3.6)$$

dónde $cetes$ es la tasa de interés que pagan los certificados de la tesorería; π^e es la inflación esperada y; r es la tasa de interés real.

Los árboles binomiales se construyeron a partir del cálculo del VAN tradicional y se les aplicó los dos factores de riesgo: la volatilidad de los precios (σ igual a 0.106) y la probabilidad de que se realice la siguiente etapa (Cuadro 3.1). Ambos valores se utilizaron para calcular los coeficientes de ascenso y descenso del activo subyacente de la siguiente manera:

$$u = e^{\sigma\sqrt{\delta t}} \quad 3.7)$$

$$d = e^{-\sigma\sqrt{\delta t}} \quad 3.8)$$

dónde u es el coeficiente de ascenso; d es el coeficiente de descenso; e tiene un valor de 2.78; σ es la desviación estándar (volatilidad) y; t es el tiempo.

La probabilidad de riesgo se calculó de la siguiente forma:

$$p = \frac{(1+r)-d}{u-d} \quad 3.9)$$

dónde p es la probabilidad; u es el coeficiente de ascenso; d es el coeficiente de descenso y; r es la tasa libre de riesgo.

El valor de la opción se estimó con la siguiente fórmula:

$$V_0 = \frac{p\mu V_0 + (1-p)dV_0}{1+r} \quad 3.10)$$

dónde V_0 es el valor presente inicial; p es la probabilidad; u es el coeficiente de ascenso; d es el coeficiente de descenso y; r es la tasa libre de riesgo.

Con el resultado del cálculo recursivo de los árboles binomiales se obtuvo el Valor de la Opción (VO) para determinar el Valor Actual Neto total (VAN total) de acuerdo con la Ecuación 11.

$$VAN_{total} = VAN_{tradicional} + VO \quad 3.11)$$

Los datos estimados para realizar el cálculo de los árboles binomiales que consideran la volatilidad de los precios son los u igual a 1.1, d igual a 0.89; una p igual a 0.77 y $1-p$ igual a 0.23. Los datos usados el cálculo de los árboles binomiales para determinar la probabilidad de éxito de realizarse cada etapa se presentan en la Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1. Valores por etapa del proyecto de las variables utilizadas para la construcción del árbol binomial para la probabilidad de éxito.

Etapa	Variables							
	T^1 (años)	P^2 (%)	k^3 (\$)	σ^4	u^5	d^6	p^7	$1-p^8$
I Establecimiento	0.7	40	452,010.5	0.19	1.20	0.82	0.57	0.42
II Multiplicación	0.5	60	602,680.7	0.17	1.18	0.84	0.57	0.42
III Enraizamiento	0.5	50	452,010.5	0.17	1.18	0.84	0.57	0.42
IV Aclimatización	1	55	868,347.3	0.22	1.25	0.80	0.59	0.40
V Vivero	1	60	829,641.2	0.22	1.25	0.80	0.54	0.40

¹Tiempo; ²Probabilidad; ³Costos por etapa; ⁴Volatilidad asociada a la probabilidad de que se realice la siguiente etapa (Ec. 3.5); ⁵coeficiente descenso (Ec. 3.7); ⁶coeficiente ascenso (Ec. 3.8); ⁷ Probabilidad de riesgo (Ec. 3.9); ⁸Valor de la opción (Ec. 3.10).

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del proyecto con el método tradicional

Usando el método tradicional se estimó la viabilidad financiera del establecimiento de una empresa de micro-propagación de árboles de olivo. Los resultados indican que se necesita una inversión inicial del MXN \$ 9,929,805. El valor de los indicadores financieros se presenta en la Cuadro 3.2.

Usando el método de evaluación tradicional el VAN resulta menor a cero; por lo tanto, el proyecto se rechaza. La TIR resultó menor a la tasa de actualización (TREMA) lo que indica que no se alcanzara a pagar el costo del proyecto. La relación B/C indica que por cada peso invertido se pierden 17 centavos. Estos indicadores muestran que el proyecto no es rentable.

Cuadro 3.2. Indicadores financieros calculados con la evaluación tradicional

Indicador	Valor
Valor Actual Neto	-MXN \$ 1 498 656
Tasa Interna de Retorno	13%
Tasa de Rendimiento Mínima Aceptable	25%
Relación Beneficio Costo	0.83

Los resultados anteriores son contrarios a los obtenidos en otras investigaciones. Los resultados de la evaluación financiera tradicional, en donde se calculó el VAN y la TIR, realizada en una bio-fábrica para la propagación *in vitro* con biorreactores de inmersión temporal de *Anthurium andreanum* L. señalan que el proyecto es rentable; cabe mencionar que esta evaluación sólo consideró el costo de operación del proyecto con un tiempo para obtener el producto final menor de un año y partieron de plantas que ya se encontraban establecidas en condiciones *in vitro* (Alamilla-Magaña *et al.*, 2019). Las características de esta biofábrica permiten visualizar que a futuro resulta rentable, aun con el método tradicional, cuando ya se cuenta con la infraestructura necesaria,

un protocolo eficiente, el cultivo tiene una tasa de multiplicación alta y es de rápido crecimiento, lo que reduce el tiempo en obtener un producto.

Sin embargo, cuando el proyecto de cultivo de tejidos es nuevo, se necesita desarrollar protocolos de multiplicación, enraizamiento, aclimatización y endurecimientos específicos o realizar adaptaciones de protocolos ya existentes reportados en la literatura, lo que pudiera modificar los resultados esperados y generar incertidumbre al momento de decidir invertir.

Cuando los proyectos de empresas biotecnológicas, que requieren investigación y desarrollo como el desarrollado en esta investigación, se evalúan utilizando método tradicional, usualmente tienden a subestimar el verdadero valor de la empresa, puesto que el VAN solo asume un riesgo fijo (Ayús y Velásquez, 2012; Casault *et al.*, 2014). Este tipo de proyectos están sujetos a la incertidumbre, de ahí que no sea recomendable valorarlos con los métodos tradicionales; por lo tanto, se recomienda evaluarlos con el método de opciones reales (Rodríguez, *et al.*, 2013)

Evaluación del proyecto con opciones reales

Tomando en consideración que para el desarrollo del producto se necesita pasar por una serie de etapas relacionadas entre sí, de duración variable, de éxito o de fracaso, entonces la implementación de una de las etapas dependerá si se continúa o se abandona el proyecto (Mascareñas, 2012). Se calculó el costo por cada etapa y se determinó que el VAN tradicional es de MXN \$ 1 917 556. A partir de este dato se realizó el cálculo recursivo de árboles binomiales. Se consideraron dos escenarios, uno que contempla volatilidad de los precios y otro que determina la probabilidad de pasar a la siguiente etapa (Cuadro 3.3). Con este modelo se pueden determinar dos tipos de opciones reales la de abandonar o continuar con el proyecto, solo si, se cumple la fase anterior.

Cuadro 3.3. Indicadores financieros estimados con el método de opciones reales

Etapa	Volatilidad precios		Probabilidad de pasar a la siguiente etapa	
	VO ¹	VAN ²	VO ¹	VAN ²
	MXN \$		MXN \$	
I Establecimiento	212 886	1 678 432	149 057	134 007
II Multiplicación	453 261	1 768 137	436 960	788 790
III Enraizamiento	773 860	2 239 406	954 511	1 600 778
V Aclimatización	1 014 310	2 063 519	1 098 277	1 749 271
V Vivero	1 476 224	2 564 139	1 519 341	2 607 256

¹Valor de la Opción; ² Valor Actual Neto total.

Los resultados de la evaluación financiera usando el método de opciones reales se presenta en la Cuadro 3.3. Con el método de opciones reales se considera realizar una inversión inicial parcial para empezar con cada una de las fases. El Valor Actual Neto cuando se considera la volatilidad de los precios en cada una de las fases resultó de MXN \$ 1 678 432 para la etapa I de establecimiento; de MXN \$ 1 768 137 para la etapa II de multiplicación; de MNX \$ 2 239 406 para la etapa III de enraizamiento; de MXN \$ 2 063 519 para la etapa IV de aclimatización y; de MXN \$ 2 564 139 para la etapa V de vivero. Los resultados anteriores señalan que cuando el VAN total es positivo en todas las etapas, lo cual significa que se el proyecto es aceptable en cada una de sus fases.

Cuando se considera la probabilidad de éxito el Valor Actual Neto en cada una de las etapas es de MXN \$ 134 007 en la etapa I de establecimiento; de MXN \$ 788 790 en la etapa II de multiplicación; de MXN \$ 1 600 778 en la etapa III de enraizamiento; de MXN \$ 1 749 271 en la etapa IV de aclimatización y; de MXN \$ 2 607 256 en la etapa V de vivero. Igual que en el escenario anterior, los valores del Valor Actual Neto son positivos y además el valor de la etapa siguiente es mayor a la anterior, por lo que se recomienda invertir en este proyecto.

Los resultados anteriores son similares a los encontrados en otras investigaciones. Vedovoto *et al.* (2013) utilizaron este mismo modelo, de dividir en etapas el proyecto, para determinar el valor con opciones reales en un proyecto de producción de semilla mejorada genéticamente desarrollada en un centro de investigación, el resultado fue un mayor el valor del proyecto con opciones reales en comparación con el VAN tradicional (Vedovoto *et al.*, 2015).

El método de dividir el proyecto en etapas también se ha aplicado para valorar proyectos de tipo farmacéutico, en el desarrollo una vacuna contra *Campylobacter jejuni* en aves de corral. Empleando la metodología de opciones reales se determinó que el proyecto es económicamente más rentable y se cuenta con más información para decidir abandonar o vender la vacuna en alguna una etapa intermedia del desarrollo (Lund y Dejgård, 2016).

Un aspecto a considerar es la capacidad instalada de este proyecto, la cual es baja al compararse con laboratorios comerciales que producen en promedio cinco millones de plantas al año (Prakash, 2001). De igual manera (Zamboni, 1999, citado por Lambardi *et al.*, 2018) menciona que la micropropagación de olivo es rentable siempre y cuando se utilice una variedad de olivo de fácil micropropagación y de crecimiento acelerado, se produzcan al año por lo menos 100 mil olivos más otras 900 mil plantas de diferentes especies, y con ello el costo de una planta de olivo *in vitro* es menor que una propagada por métodos tradicionales. Por lo que un laboratorio comercial de cultivo de tejidos es rentable si en él se produce una gran cantidad de plantas o varios tipos de cultivos.

Los altos costos iniciales para la implementación de este tipo de proyectos aún es una limitante, por lo que se recomienda reducir los costos de producción mediante el uso equipos e insumos más económicos o adecuaciones a las condiciones de cada laboratorio y tipo de especies vegetales (Somasundaram *et al.*, 2016; Naik *et al.*, 2020). En este punto es importante remarcar la importancia del Gobierno en este tipo de proyectos. La inversión inicial debe ser provenir de instituciones financieras públicas, puesto que los flujos de ingresos no se obtendrán en los primeros años.

El método de opciones reales en la evaluación de proyectos brinda a los inversionistas y gerentes mayor flexibilidad y la posibilidad de valorar distintos escenarios para tener mayor certidumbre para la toma de decisiones, de igual manera, con este tipo de análisis se pueden promover políticas a favor de este tipo de inversiones que contribuyan al desarrollo del sector biotecnológico (Erbas y Memis, 2012). Puesto que hay una falta de capital de riesgo e instrumentos financieros para promover la generación de *startups* en el sector biotecnológico en México (Amaro y Morales, 2010).

3.6 CONCLUSIONES

La evaluación económica de un proyecto para el establecimiento de un laboratorio comercial de cultivo *in vitro* de árboles de olivo con una capacidad de producción de 54 800 plantas necesita pasar por cinco etapas que se llevaran a cabo durante cuatro años para obtener el producto final. La implementación del proyecto requiere de una inversión inicial de MXN \$ 9 929 805. Cuando es el proyecto se evalúa con el método tradicional el proyecto no es rentable, pues el VAN resultó negativo, la TIR es menor que la tasa de actualización y la relación beneficio costo indica que por cada peso invertido se pierden 17 centavos.

Usando el método de opciones reales el Valor Actual Neto total en todas las etapas es positivo y, además, el valor de la etapa siguiente fue mayor a la anterior, lo que implica que cada una de las fases se podrían llevar a cabo en los dos escenarios analizados. Los resultados anteriores indica que, a largo plazo, las inversiones para el establecimiento de un laboratorio comercial de cultivo *in vitro* de árboles de olivo garantizan el capital invertido más un margen de ganancia. La evaluación financiera del proyecto con el método de opciones reales ofrece al inversionista un panorama más amplio sobre el valor real del proyecto y le permite tomar la decisión de abandonar el proyecto o bien invertir en la próxima etapa.

3.7 LITERATURA CITADA

- Alamilla, M. J. C., Caamal, V. J. H., Criollo, C. M. A., Vera, L. J. E. & Reyes, M. J. A. (2019). Biofábricas y biorreactores de inmersión temporal: Propagación in vitro de *Anthurium andreanum* L., y su viabilidad económica. *Agroproductividad*, 12(10), 23-29. doi: 10.32854/agrop.vi0.1457
- Amaro, R. M. & Morales, S. M.A. (2010). La biotecnología en México, una aproximación desde los sistemas sectoriales de innovación. *Concyteg*, 5(64), 1224-46. https://www.researchgate.net/publication/333403453_La_Biotecnologia_en_Mexico_una_aproximacion_desde_los_sistemas_sectoriales_de_innovacion
- Arnold, T. & Shockley, Jr. R. L. (2001). Value creation at anheuser-busch: a real options example. *Journal of Applied Corporate Finance*, 14(2), 52-62. doi:10.1111/j.1745-6622.2001.tb00330.x
- Ayús, T. A. L., & Aristizábal, V. R. E. (2012). Las opciones reales como metodología alternativa en la evaluación de proyectos de inversión. *Ecos de Economía*, 16(35), 29-44. doi: 10.17230/ecos.2012.35.2.
- Casault, S., Groen, A. J. & Linton, J. D. (2014). Improving value assessment of high-risk, high-reward biotechnology research: the role of thick tails. *New Biotechnology*, 31(2), 172-78. doi: 10.1016/j.nbt.2013.12.001.
- Cox, J. C., Ross, S. A. & M. Rubinstein. (1979). Option pricing: a simplified approach. *J. Financ. Econ.*, 7(3), 229-263. http://static.stevereads.com/papers_to_read/option_pricing_a_simplified_approach.pdf
- Delfín, G. M. E. (2004). *Los olivares de Tacubaya (México) en la época colonial*. V Coloquio de Tacubaya. Pasado y presente. ENAH-INAH. México, D.F. pp. 1-15. <https://www.historiacocina.com/paises/articulos/mexico.htm>
- DOF (2019). *Acuerdo por el que se emiten los lineamientos de operación del programa sembrando vida*. Diario Oficial de la Federación. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/435247/Lineamientos_de_Operaci_n_del_Programa_Sembrando_Vida.pdf
- Erbas, B. C. & Memis, S. A. (2012). *An economic valuation of a biotechnology R & D project in a developing economy*. 15. doi:10.2225/vol15-issue3-fulltext-3
- Fabbri, A., Bartolini, G., Lambardi, M. & Kailis, S. (2004). *Manual, Olive Propagation*. Landlinks Press. Collingwood, Australia. Pp.1-158. doi: 10.1071/9780643091016
- FAOSAT (2019). *Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database*. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/SC>

- Figuerola, I. G. N., Campos A. R. E., Flores, R. I. P. & Almanza M. (2016). Panorama internacional para el aceite de olivo extra virgen mexicano. *Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa*, 4 (1), 1-10. <https://www.pag.org.mx/index.php/PAG/article/view/437/476>
- Grigoriadou K., M. Vasilakakis, and E.P. Eleftheriou. 2002. *In vitro* propagation of the Greek olive cultivar 'chondrolia chalkidikis'. *Plant cell, tissue and Organ culture*. 71: 47–54. DOI: 10.1023/A:1016578614454.
- IAEA, (2004). *Low cost options for tissue culture technology in developing countries*. International Atomic Energy Agency. Vienna. 1-102. Recuperado de https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/te_1384_web.pdf
- INIFAP (2017). Perspectivas y situación de la producción de olivo en Guanajuato proyecto: Impacto productivo de diferentes variedades de olivo y bases para generar un paquete tecnológico, para la producción en el Estado. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Folleto Técnico Núm. 5. ISBN: 978-607-37-0860-9. <https://docplayer.es/83969365-Perspectivas-y-situacion-de-la-produccion-de-olivo-en-guanajuato.html>
- Instituto Español de Comercio Exterior (ICEX). (2011). Nota sectorial. El mercado del aceite de oliva en México. Obtenido de <http://www.icex.es/icex/es/navegacion-principal/todos-nuestros-servicios/informacion-de-mercados/paises/navegacion-principal/el-mercado/estudios-informes/4550625.html?idPais=MX>
- Kitto, S. L. (1997). Commercial micropropagation. *HortScience*, 32(6), 1012-1014. <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/32/6/article-p1012.xml>
- Lambardi, M. & Rugini, E. (2003). Micropropagation of olive (*Olea europaea* L). S.M. Jain & K. Ishii (eds), *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. (621-646) KLUWER. doi:10.1007/978-94-010-0125-0_21
- Lund, M. & Dejgård, J. (2016). A real options approach to biotechnology investment policy — the case of developing a *Campylobacter* vaccine to poultry. *Preventive Veterinary Medicine*, 128(2016), 58–69. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.04.006
- Markin, D., Duek, L. & Berdicevsky, I. (2003). *In vitro antimicrobial activity of olive leaves. Antimikrobielle wirksamkeit von olivenblättern in vitro*. Blackwell Publishing Ltd. 46:132–36. <https://tahomaclinic.com/Private/Articles2/Olive/Markin%202003%20-%20In%20vitro%20antimicrobial%20activity%20of%20olive%20leaves.pdf>
- Mascareñas, J. (2012). La valoración de un proyecto biotecnológico como una opción real compuesta. Monografías de Juan Mascareñas sobre Finanzas Corporativas. N° 34 ISSN: 1988-1978. 1-21. doi:10.2139/ssrn.2316655

- Naik, R., Bhushan, A., Gupta, R. K., Walia, A. & Gaur, A. (2020). Low Cost Tissue Culture Technologies in Vegetables. *A Review*, 29(9), 66-78. DOI:10.9734/IJBCRR/2020/v29i930226
- Orellana, P., Suárez-Castellá, M., Triana, R., Sarría, Z., Pons, M., León, M. & Pérez, Z. (2008). Métodos y elementos básicos para la planificación de la producción in vitro en biofábricas. *Bioteología Vegetal*, 8(2), 1-9. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/rt/printerFriendly/338/html>
- Palmieri, D., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Ferrari, N., Spinella, G., Pane, B., Cafueri, G. Perego, P. & Palombo, D. (2012). Effects of polyphenol extract from olive pomace on anoxia-induced endothelial dysfunction. *Microvascular Research*, 83(3), 281-89. doi:10.1016/j.mvr.2012.02.010.
- Prakash, J. (2001). Plant tissue culture: concept to commercialisation in south-east asia. *Acta Hort.* 560, 571-574. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.560.117>
- ProChile. (2017). *Aceite de oliva México*. Oficina Comercial de Chile en México. https://www.prochile.gob.cl/wpcontent/uploads/2017/12/pmp_aceite_de_oliva_mexico.pdf
- ProMexico. (2014). *Bioteología en México. Biotechnology*. Secretaria de Economía. Recuperado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/75579/05052014_DS_Bioteologia_ES.pdf.
- ProMéxico. (2017). *Panorama actual de la industria biotecnológica en México*. Secretaria de Economía. Recuperado de <https://ethic.com.mx/docs/estudios/Panorama-Biotecnologia-Mexico.pdf>
- Rodríguez, PHF da., Ferreira, AV de C., Lemme, CF. & Brandão, LET. (2013). Avaliação de empresas start-up por Opções Reais: o caso do setor de biotecnologia. *Gestão & Produção*, 20(3), 511-23. <https://pdfs.semanticscholar.org/394f/20bf94637a8cfaef75655abdd0f05c4e285.pdf>
- Rodríguez-Morató, J., Xicota, L., Fito, M., Farré, M., Dierssen, M. & Torre, R. de la. (2015). Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Journal Molecules*, 20(3), 4655–80. doi:10.3390/molecules20034655.
- Roussos, P.A., & Pontikis, C.A. (2002). In vitro propagation of olive (*Olea europaea* L.) Cv. Koroneiki. *Plant Growth Regulation*, 37(3), 295-304. doi: 10.1023/A:1020824330589.
- Rugini, E. 1984. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from

- developing shoots and embryos. *Scientia horticultrae*. 24 (2): 123–34. DOI: 10.1016/0304-4238(84)90143-2.
- Saavedra, M. M. (1960). El financiamiento para la promoción olivícola de México. *Investigación Económica*, 20(80), 691-731. <http://www.jstor.org/stable/42777962>
- SAGARPA. (2012). *Potencial productivo de especies agrícolas de importancia socioeconómica en México*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 71.
- Sánchez-Escudero, J. & Sánchez-Sánchez, C. D. (2018). El olivo en México. *AgroProductividad*, 6(5), 13-20. <http://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/476/357>
- Sánchez-Rodríguez, E. & Mesa, M. D. (2018). Compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen. *Nutrición Clínica en Medicina*, 12(2), 80-94. doi:10.7400/NCM.2018.12.2.5064.
- Sepporta, M. V., Fuccelli, R., Rosignoli, P., Ricci, G., Servili, M., Morozzi, G. & Fabiani, R. (2014). Oleuropein Inhibits tumour growth and metastases dissemination in ovariectomised nude mice with MCF-7 human breast tumour xenografts. *Journal of Functional Foods*, 8(1), 269-73. doi: 10.1016/j.jff.2014.03.027.
- SIAP (2019). Avance de siembras y cosechas Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- SIAMI (2019). Estadística de importación. Sistema de Información Arancelaria Vía Internet. <http://www.economia-snci.gob.mx/>
- Somasundaram, M. (2016). Cost-effective tissue culture media for large-scale propagation of three commercial banana (*Musa spp.*) varieties Cost-effective tissue culture media for large-scale propagation of three commercial banana (*Musa spp.*) 91 (1), 23–29 doi:10.1080/14620316.2015.1117227
- Tasioula-Margari, M. & Okogeri, O. (2001). Isolation and characterization of virgin olive oil phenolic compounds. *Journal of Food Science*, 66(4), 530-34. doi: 10.1111/j.1365-2621.2001.tb04597.x
- Tegen, H. (2016). The role of plant tissue culture to supply disease free planting materials of major horticultural crops in ethiopia. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 6(1), 122-29. <https://core.ac.uk/download/pdf/234661861.pdf>
- Tomar, UK., Negi, U., Sinha, AK. & Danatu, PK. (2010). An overview of the economic factors influencing micropropagation. *MyForest*. 43: 523-532. https://www.researchgate.net/profile/UttarTomar/publication/236149384_An_Overview_of_the_Economic_Factors_Influencing_Micropropagation/links/0c960516e6b7e44249000000/An-Overview-of-the-Economic-Factors-Influencing-Micropropagation.pdf

- Turina, C. A., and P. Bima. 2017. Establecimiento *in vitro* de cuatro variedades de olivo cultivadas a campo (*Olea europea* L.). *AgriScientia* 34 (2): 59. DOI: 10.31047/1668.298x.v34.n2.19041.
- USDA (2019). Oilseeds: World Markets and Trade. United States Department of Agriculture. <https://www.usda.gov>
- Vedovoto, G. L. & Prior, D. (2015). Opciones reales: una propuesta para valorar proyectos de I+D en centros públicos de investigación agraria. *Contaduría y Administración*, 60 (1): 145-79. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/14407>
- Xie, P.J., Huang, LX., Zhang, CH. & Zhang, YL. (2015). Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) Extracts and their structure. *Journal of Functional Foods*, 16(16), 460-71. doi: 10.1016/j.jff.2015.05.005

CAPITULO IV. MAPEO DE LA CADENA DE VALOR DE LA PRODUCCIÓN LOCAL DE PRODUCTOS DEL OLIVO EN CHIMALHUACÁN ESTADO DE MÉXICO

MAPPING OF THE VALUE CHAIN OF THE LOCAL PRODUCTION OF OLIVE PRODUCTS IN CHIMALHUACÁN, STATE OF MEXICO.

4.1 RESUMEN

Mediante el concepto de cadenas de valor se identificaron los actores y actividades clave e identifico la ventaja competitiva del sistema de producción local de aceitunas y sus derivados en el municipio de Chimalhuacán. El objetivo de esta investigación fue identificar, describir a los actores y actividades clave, las relaciones horizontales y verticales, y las fuerzas del entorno. Se realizó un estudio exploratorio-descriptivo de campo transversal, con la metodología Link 2.0 con algunas modificaciones. Los instrumentos utilizados fueron encuesta, cuestionario semiestructurado a profundidad dirigido a los actores clave y observación no participante. Limitaciones de este estudio el número de productores a los que se pudo contactar. Se determinó que la ventaja competitiva es la diferenciación de los productos aceite y aceitunas en salmuera, referida al vínculo con el territorio, origen histórico de los árboles, saberes tradicionales, proceso productivo orgánico y tradicional. Existe poca integración entre los actores principales debido a la desconfianza e individualismo. Las fuerzas del entorno tales como, autoridades municipales, instituciones de enseñanza e investigación y medios de comunicación han influido favorablemente a preservar esta actividad en el municipio.

Palabras clave: agricultura urbana, producto local, aceite de olivo artesanal, árbol centenario.

4.2 ABSTRACT

Using the concept of value chains, the key actors and activities were identified and the competitive advantage of the local production system of olives and their derivatives in the municipality of Chimalhuacán was identified. The objective of this research was to identify and describe the key actors and activities, the horizontal and vertical

relationships, and the environmental forces. An exploratory-descriptive cross-sectional field study was conducted, using the Link 2.0 methodology with some modifications. The instruments used were a survey, an in-depth semi-structured questionnaire addressed to key stakeholders, and non-participant observation. Limitations of this study were the number of producers that could be contacted. It was determined that the competitive advantage is the differentiation of the oil and olives in brine products, referring to the link with the territory, the historical origin of the trees, traditional knowledge, and the organic and traditional production process. There is little integration among the main actors due to distrust and individualism. Environmental forces such as municipal authorities, teaching and research institutions and the media have favorably influenced the preservation of this activity in the municipality.

Key words: urban agricultural, local product, artisanal oil, olive tree.

4.3 INTRODUCCIÓN

El olivo fue introducido por los españoles en siglo XVI. El sistema de producción del aceite y la aceituna dio inicio en la época colonial. Tacubaya era considerado tierras de indígenas, pero los españoles empezaron a establecer haciendas y fincas con árboles frutales y otras especies, de origen europeo y endémicas, entre ellos el olivo y el maguey. Indígenas y españoles obtenían beneficios económicos de la producción de aceite, aceitunas y pulque. No obstante, la producción de aceite fue afectada por las restricciones de la corona española, quien prohibió la competencia con los productos importados de España. Lo que provocó que la producción de aceite dejara de realizarse (Delfín, 2004).

La producción de aceite y aceitunas en México se retomó nuevamente en las últimas décadas. Actualmente en México se siembran 7.5 mil hectáreas de olivo distribuidas principalmente en los Estados de Baja California Norte, Hidalgo y Tamaulipas (SIAP, 2019). Debido a su gran adaptabilidad y rusticidad, el cultivo del olivo es una alternativa viable en lugares de bajo potencial productivo en México como es el caso reciente del Valle del Mezquital, Hidalgo. (Sánchez-Escudero y Sánches-Sánchez, 2018). O bien, aquellos sistemas de producción de traspatio como el caso de Tláhuac y Xochimilco

Ciudad de México (La jornada, 2018). Cada uno de estos sistemas de producción están inmersos en una cadena de valor, sin embargo, el nivel de integración es desconocido.

(Porter, 1985) define a la cadena de valor como una serie de actividades que debe realizar una empresa para la obtención de un producto, generar beneficios para el consumidor y con ello obtener una ventaja competitiva. Hay dos tipos de ventajas competitivas: la de costos y la de valor. La de costos se refiere a ofrecer un producto a menor costo, y la de valor a brindar un producto con atributos únicos que lo diferencian de la competencia. Una vez determinada la ventaja competitiva se deben generar estrategias para potenciar la ventaja identificada, estas son reducción de costos, diferenciación y concentración. La cadena de valor se conforma por actores que participan en los distintos eslabones, estos son productores, proveedores de insumos, vendedores y consumidores, que comparten un mismo espacio geográfico, histórico, social, cultural y económico, su objetivo final es producir un bien o un servicio para obtener un beneficio económico, al mismo tiempo que contribuyen a la reafirmación de la identidad territorial (Guadarrama *et al.*, 2019).

El análisis de la cadena de valor en los sistemas agrícolas busca añadir valor económico y social a los pequeños productores. Con el mapeo de los actores, del proceso productivo y la identificación de problemas en la cadena, se pueden generar estrategias para seguir promoviendo la actividad, garanticen la incorporación de nuevas generaciones, fomenten el comercio justo, el manejo eficiente de los recursos naturales, la cooperación entre los actores, rediseñar la cadena de suministro, logística y comercialización, y disminuir mermas en el proceso de producción y mercadeo (CODESA, 2010; Arvizu, *et al.*, 2015). No obstante, para lograr integrar a los actores en una red estratégica, estos deben de estar dispuestos a compartir información, superar la desconfianza, cooperar para la formulación de objetivos, metas y planes que beneficien a todos y satisfagan la demanda de los consumidores (CODESA, 2010; Dahlström y Ekins, 2006).

A través del concepto de cadena de valor se ha podido analizar a las empresas rurales, para generar estrategias que mejoren las condiciones actuales de estas. Fernández,

et al. (2014) generaron proyectos municipales para potencializar la producción de caña de azúcar. Así mismo, Andrade (2015) identificó que los pequeños y medianos productores de vino en Baja California tienen una baja competitividad regional, y se implementó la reducción de costos, diferenciación del producto y ampliación del mercado. Por otro lado, Trejo-Telles, *et al.* (2015) consideran que mediante este enfoque se puede determinar el nivel de competitividad y articulación de los actores a nivel horizontal y vertical. Y finalmente Arias y Valenciano, (2017) determinaron que los primeros eslabones en la producción de azúcar son los que generan el desarrollo sostenible y promueven la agricultura familiar.

Otro aspecto importante que se logra mediante el mapeo de la cadena de valor es la valorización de un producto y su contexto, es decir, las personas involucradas en el proceso, el saber-hacer y el producto en sí mismo, en cuanto a la relación que tienen con las tradiciones, la cultura, la historia y el vínculo territorial. Cuando un producto tiene estas características puede ser considerado un producto típico local, lo que implica un mayor valor agregado (Fernandez, *et al.*, 2018). Un producto típico tiene dos características, la primera el territorio donde se produce, que puede ser desde una región hasta un país y la segunda las características que lo hacen único y diferente de otros productos (Chanpredonde, 2012). Sin embargo, son pocos los estudios sobre cadenas de valor de productos locales típicos en una región determinada, producidos en sistemas familiares a pequeña escala.

Una de las ventajas del enfoque de cadena de valor es que se puede aplicar a nivel regional o local, en cuyo caso se hablará de cadenas cortas de valor, las cuales, están conformadas por un conjunto de actores que se relacionan entre sí para ofrecer un bien o un servicio, como las cadenas globales (IICA *et al.*, 2011). Esto es posible debido a que la metodología de cadena de valor puede ser aplicada en distintos contextos en donde se está llevando a cabo el sistema de producción (Kaplinsky y Morris, 2000). Las ventajas de las de cadenas cortas son de tipo social, ambiental y económico, lo que permite la construcción de una visión o de una identidad en relación con el consumo de alimentos (Parker 2005). Esta idea impacta a cierto tipo de consumidores que prefieren comprar alimentos de sistemas tradicionales, provinieres

de circuitos cortos, que garanticen frescura, reducción del tiempo entre la venta y cosecha, y conocimiento de quien y donde se ha producido (LEADER, 2000).

Uno de los principales problemas para la integración es el desconocimiento de los actores principales sobre si se encuentran organizados, el nivel de interacción entre ellos, como son las relaciones horizontales y verticales, que tanto impacta las fuerzas del entorno al sistema de producción y cuál es la ventaja competitiva de los productos. Mediante una representación cualitativa de la cadena de valor se puede identificar obstáculos, retos y oportunidades para su integración (OIT, 2016).

Mediante el concepto de cadenas de valor se puede analizar el sistema de producción de los productos del olivo en el municipio de Chimalhuacán. Por lo que el objetivo de esta investigación es mapear a los actores y actividades clave, y tener un primer acercamiento sobre el nivel de integración horizontal y vertical de los actores, así como determinar cuál es la ventaja competitiva de los productos para contribuir a la integración de la cadena de producción.

4.4 MATERIALES Y METODOS

Localización del lugar de estudio

El estudio se realizó en el año 2021 en el en el barrio Xochitenco Chimalhuacán, Estado de México (Figura 1). El barrio Xochitenco se encuentra a una altitud de 2360 msmm, con un clima semiseco templado (INEGI, 1996) Se ubica entre 98°55'18" de longitud mínima y 98°59'58" de máxima de latitud norte y a los 19°22'27" de mínima y 19°27'48" de máxima de longitud oeste. Limita al norte con el municipio de Texcoco; al sur con los municipios de La Paz y Nezahualcóyotl; al oriente con los municipios de Chicoloapan e Ixtapaluca y al poniente con el de Nezahualcóyotl (INEGI, 2021).



Figura 4.1. Localización Chimalhuacán fuente INEGI, (2021) modificado

Descripción del sistema de producción

Los barrios de San Lorenzo, Xochiaca y Xochitenco, del municipio de Chimalhuacán Estado de México se dedican a la producción de aceite y aceitunas. Actividad que se ha desarrollado desde hace 200 años. Los árboles se distribuyen en entre las casas y los predios, los que tienen una edad aproximada de entre 50 y 400 años. La cosecha se destina al consumo en fresco, la cual, es vendida a la comunidad árabe, judía y libanesa, en la Ciudad de México y el resto lo procesan como aceite “virgen extra” y aceituna en salmuera, los cuales, se procesan de manera artesanal. Las 20 familias que se dedican a elaborar estos productos los comercializan de manera local, en ferias y tianguis de productos orgánicos (La jornada, 2011; A fondo Estado de México, 2014; Goula, 2020).

Metodología

Para realizar el mapeo de la cadena de valor se utilizó la herramienta 1 de la metodología Link 2.0 (CIAT, 2008) para caracterizar a los actores directos e indirectos y las fuerzas del entorno, esta última está representada por las instituciones.

Instrumento

Se realizó una revisión documental y de imágenes audiovisuales, observación no participante, encuesta y entrevista semiestructurada a profundidad (Anexo 1) dirigida a informantes clave.

Tipo de estudio

Se realizó un estudio exploratorio-descriptivo de campo transversal.

Muestra

La selección de la muestra es no probabilística, informantes clave en la cadena de valor. Se entrevistó y encuestó a 2 familias productores de la cadena de valor que se dedican exclusivamente a la producción, transformación y venta de productos.

4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de la cadena de valor del aceite y la aceituna

En el municipio Chimalhuacán Estado de México hay aproximadamente 600 árboles de olivo (datos del censo que se encuentra realizando el INIFAP, no publicados), los que se encuentran distribuidos dentro de los patios de casas habitación, predios y calles, principalmente en los barrios de San Lorenzo y Xochiaca. Algunos de estos árboles fueron plantados hace cuatro siglos. La producción anual es de 30 toneladas de aceituna. Se ha reportado alrededor de 12 variedades de olivo, las más importantes son manzanilla, sevillana, empeltre y gordal. Tradicionalmente son unidades familiares que por herencia se dedican a la producción de aceite y aceituna, debido a que dentro de su propiedad hay árboles de olivo, la producción promedio es de los 100 a 500 kilogramos por árbol, sin manejo agronómico. La producción, acopio, transformación y comercialización se realiza en el mismo municipio.

En este contexto podría ser difícil decir que los actores principales son campesinos o productores de aceitunas propiamente dicho, sin embargo, existen similitudes con los pequeños y grandes productores agropecuarios, primero, en las motivaciones y

segundo, la base material del proceso productivo (Larroa y Rodas, 2008) por lo que los actores principales de este sistema sí son productores o campesinos. Esta designación es importante porque uno de los principales motivos de la falta de integración es que no a todos los actores que participan en este sistema se les considera productores.

En este sistema de producción el recurso natural más importante son los árboles de olivo, estos han podido sobrevivir a intentos de destrucción en el siglo XVII y a la urbanización en las últimas cuatro décadas. El municipio de Chimalhuacán se vio afectada por el fenómeno de la migración y en crecimiento poblacional, esto provocó que la urbanización se diera de manera desordenada y se establecieran asentamientos irregulares (Moreno-Sánchez y Espejel-Mena, 2013) esto último pone en riesgo la existencia de los árboles por la competencia de espacios físicos.

El aprovechamiento de esta especie en la región tiene un menor impacto ecológico, debido a que, este sistema de producción no requiere insumos para su manejo agronómico, pese a que está en una zona suburbana, en comparación con otros lugares del mundo que se considera a la agricultura urbana un sistema de producción no sustentable por el alto costo económico y ambiental para producir (Toumi y Vidal, 2011).

Este tipo de sistema agroalimentario que surgió en este espacio y contexto histórico determinado, cuyas características de proximidad con el consumidor se debió al crecimiento acelerado de la mancha urbana en la zona oriente del estado de México y la coyuntura actual en la que hay una demanda emergente de productos alimenticios sanos e ino cuos, locales, tradicionales o con denominación de origen, en comparación con otros lugares que ha sido promovido dentro de políticas públicas o bien como iniciativas de los mismos productores (Sacco, *et al.*, 2011).

Identificación de actores clave

Productor, transformador y comercializador

Son las familias que tienen dentro de su propiedad o en algún otro predio dentro o fuera del municipio árboles de olivo, además transforma la aceituna en dos productos principales, aceite “virgen extra” y aceitunas en salmuera y además comercializan los productos.

Propietarios de árboles de olivo en Chimalhuacán y otros lugares

Los árboles de olivo que se encuentran en el municipio están dispersos en los patios de casas habitación, predios o calles, cuyos propietarios venden la fruta a las familias que se dedican a transformar la aceituna; ya sea que el dueño la venda ya cosechada o bien los interesados la corten directamente. De igual manera hay productores que requieren mayor cantidad de aceitunas para cubrir su demanda, estos optan además por buscar en otros municipios árboles que se encuentren en producción, en predios particulares o atrios de iglesia, inclusive en otros lugares de la república como son la alcaldía Xochimilco en la Ciudad de México, y en los estados de Hidalgo y Puebla.

Intermediario

El intermediario es aquella persona que tuvo o tiene un familiar que se dedicó a la cosecha, transformación o comercialización de aceitunas y por preservar la tradición, compran aceitunas en salmuera o aceite de olivo para revender principalmente en la Feria de la aceituna actividad organizada por la presidencia municipal.

Identificación de actividades clave

Cosecha y acopio de aceitunas

La cosecha de aceitunas es manual se realiza en agosto y septiembre, por la localización de los árboles principalmente en predios particulares, esta se torna difícil y peligrosa. Los cosechadores se suben al árbol, enredan lazos por las ramas secundarias del árbol, para apoyarse en ellas y pasar de un lugar a otro, cortan las

aceitunas una por una y la depositan en botes de 20 litros y finalmente las trasladan al sitio de acopio o transformación.

Aceite de oliva “Virgen Extra”

La extracción de aceite de olivo a pequeña escala se realiza mediante el uso de molino y una presa artesanal que ha sido diseñada por ellos mismos. Después de cosechadas las aceitunas se lavan y pasan al área de extracción de aceite de oliva, con el molino se tritura la aceituna, se exprime en una prensa, se colecta el extracto de la aceituna, se pasa a una olla para separar el agua, posteriormente se tamiza para quitar impurezas y finalmente se embaza. La producción se realiza semanalmente debido al tiempo en que tarda la prensa en exprimir el aceite y a la demanda del producto. El aceite de la marca Kasbah es “Virgen Extra”, es decir, aceite extraído de la primera presa de las aceitunas. El precio de venta por litro es de \$160 pesos. Otra marca de aceite “don aceituno” ofrece a la venta aceites condimentados o perfumados, con hierbas de olor y especias, las cuales son traídas de otros estados de la república con un costo de \$160 litro.

Aceituna de mesa

Las aceitunas en salmuera son de las variedades gordal, manzanillo y arbequina, pueden ser procesadas verdes o negras. El proceso es el siguiente: se cosechan las aceitunas, se lavan, se colocan dentro de tambos de plástico con la salmuera y se dejan macerar entre 6 y 18 meses para eliminar el sabor amargo de la aceituna, se sacan de los tambos y se lavan con agua potable, y finalmente se embazan con salmuera nueva. Otra presentación son las aceitunas rellenas con almendra, chapulín, nuez o piñón, estas se venden sobre pedido. El precio de venta de las aceitunas en salmuera es de \$45 el embace de plástico de 400 gramos y de las rellenas es de \$90.

Árboles de olivo

La reproducción de los árboles de olivo se realiza por el método de esqueje, consisten en cortar baretas de 20 a 25 cm de largo de la parte periférica del árbol, se les coloca enraizado comercial Acido Indol Butírico (AIB), se colocan en camas con sustrato con

perlita o peet most en nebulización intermitente, durante 3 meses, posteriormente se pasan a una maceta nueva que lleva el sustrato de la cama y de suelo. Con este método se obtienen porcentajes de enraizamiento del 35%. Los árboles de olivo son de la variedad sevillana, gordal, picual, picudo o empeltre. Cabe mencionar que la técnica de propagación de árboles se les fue enseñada por profesores investigadores del Colegio de Posgraduados. Los árboles se venden por pedido y se acuerda un punto de entrega ya sea hasta la parcela final o en un punto medio. Los clientes son productores que quieren establecer nuevas plantaciones en los estados Michoacán Morelos, Guanajuato, Oaxaca y Zacatecas. El precio de venta va de los \$50, \$70, \$120 y \$600 por árbol dependiendo del tamaño. Así mismo, venden árboles de ornato normales o bonsái, el precio depende de la edad y tamaño del árbol.

Subproductos del árbol de olivo

Con las semillas de la aceituna se realizan collares, aretes y pulseras. Estas piezas de bisutería se realizan tallando las puntas de las semillas y con una broca se perfora la semilla. Se componen piezas con diferentes tipos de piedras como la obsidiana, piedra marmoleada, oro laminado y plata. La idea de este para realizar este trabajo en un expo de productos no tradicionales. El precio de venta va de \$25 a \$600. Los insumos necesarios son traídos de la ciudad de México. Con las hojas y tallos tiernos del árbol de olivo obtienen un extracto para la elaboración de shampoo y con el aceite de olivo cremas para la piel. El precio de venta es de \$45 la presentación de 250 ml de shampoo, \$ 70 y \$ 180 la crema facial de 120 y 350 gr.

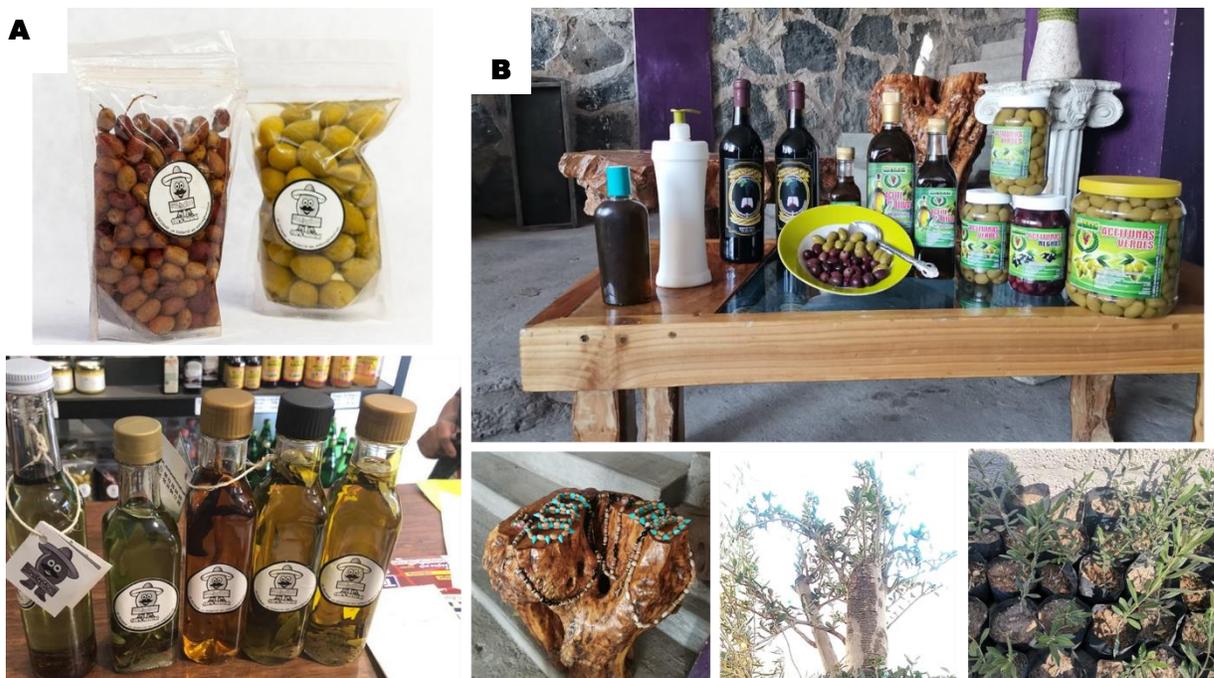


Figura 4.2. A. Línea de productos “Don aceituno” aceitunas en salmuera y aceite de olivo con especias. B. Línea de productos marca “Kasbah” aceitunas en salmuera, aceite “virgen extra”, vino, cremas, shampoo, bisutería con semillas de olivo, bonsái y árboles de olivo.

Comercialización

La comercialización del aceite, aceitunas en salmuera, bisutería, shampoo y los platillos elaborados con aceitunas, se realiza directamente con el consumidor final. La publicidad es de boca en boca y tarjetas de presentación. Los puntos de venta son tienda en domicilio particular, tianguis especializados en productos orgánicos, ferias y expos de productos artesanales (Figura 3). Y la fruta en fresco se entrega directo al consumidor en la ciudad de México.

El precio promedio del aceite y la aceituna comparados con productos similares de importación son análogos, a pesar de que la tendencia de los productos orgánicos o tradicionales tienen mayor precio en comparación con los productos convencionales.



Figura 4.3. Feria de la aceituna 2019

Con la descripción de los actores y actividades clave se pudo mapear la cadena de valor (Figura 4.4). Una de las características de la cadena de valor es que utilizan mano de obra familiar, a excepción de la fase de cosecha.

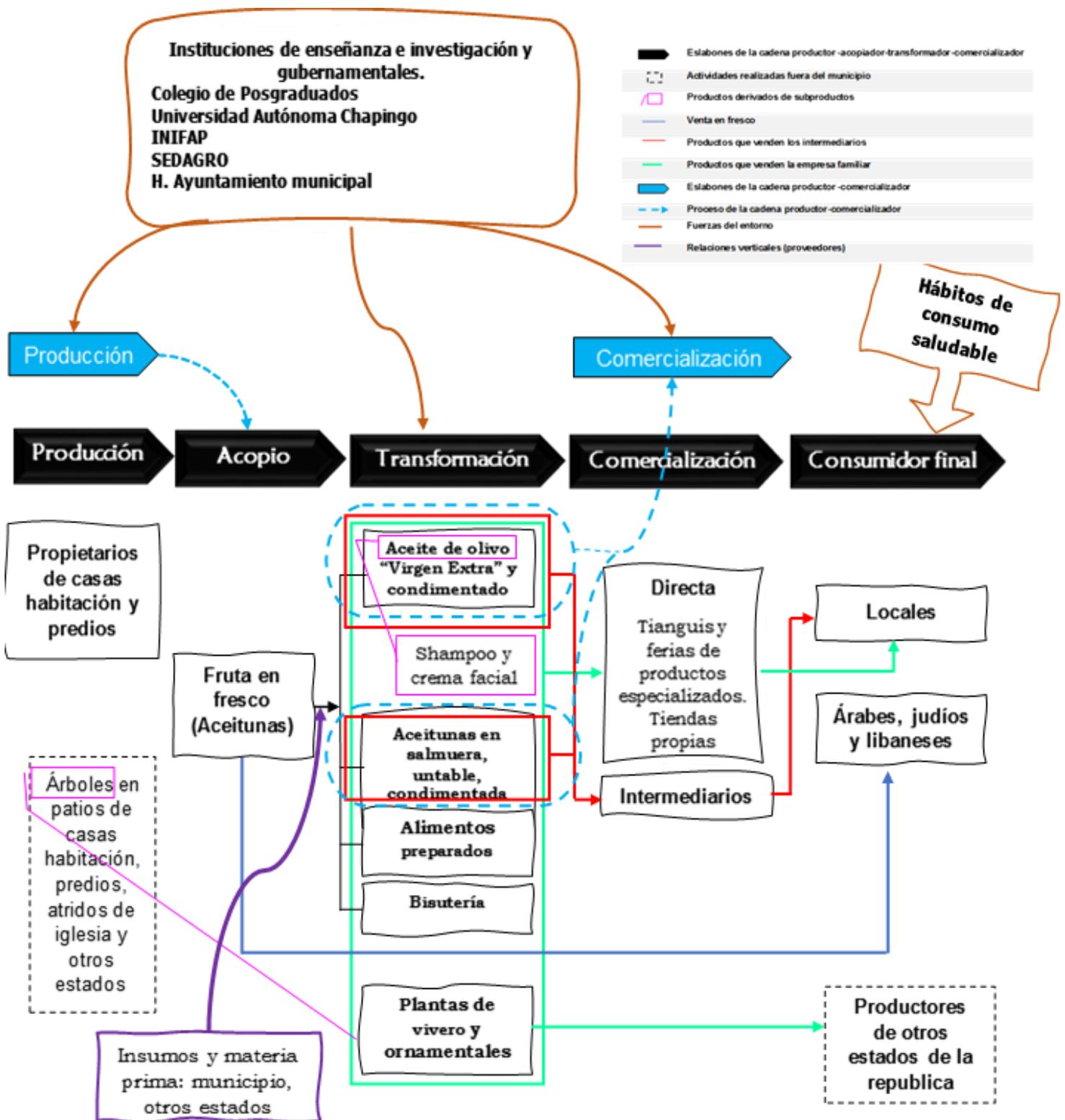


Figura 4.4. Mapa de la cadena de valor del producto aceite y aceituna en Chimalhuacán Estado de México.

Identificar fuentes de ventaja competitiva

Mediante el mapeo de la cadena de valor se puede determinar que la ventaja competitiva de los productos aquí mencionados se es la diferenciación del producto. La ventaja competitiva entendida como las características o atributos que sobresalen con respecto a otros productos similares (Quintero y Sánchez, 2006). La diferenciación del producto está determinada por el valor agregado del producto, el sistema de producción, el lugar y el contexto histórico cultural en que se ha desarrollado esta actividad económica.

La percepción de sí mismos y de los productos, la valorización de los actores, estos hacen referencia al sistema tradicional y orgánico con el que realiza la producción, lo asocian ciertos valores como: el esfuerzo, unión familiar, trabajo, amor a la comunidad, cultura, buena alimentación y salud. Como mencionan (Champredonde y González, 2016) la valorización se da en dos sentidos, la autovaloración del productor en función de la propia capacidad para generar productos con cierta calidad específica y también ser portadores de conocimientos locales específicos. Por parte de los consumidores, implica en conjunto una valoración positiva y un reconocimiento explícito de los productos y de los productores como personas capaces de generar dicho valor, es decir, implica también una valoración externa.

Análisis de la cadena de valor

Dimensión horizontal

Las unidades familiares participan en todos los eslabones de la cadena o solo en la producción y comercialización. Lo que las diferencia son los niveles de producción y comercialización. Entre familias no existe interacción para procesos de transformación, solo cuando comercializan en la feria de la aceituna. Con respecto a los actores que poseen los árboles en alguna de sus propiedades acuerdan la venta previamente con el acopiador.

La falta de relaciones horizontales entre homólogos se debe al individualismo, desconfianza y a la falta de liderazgo, habilidades que no han sido desarrolladas por

parte de los actores principales. Hay ambigüedad con respecto a si una persona que tiene árboles de olivo y no transforma la aceituna, pero compra y vende productos ya transformados se puede autodenominar “productor” o “revendedor ocasional” o solo aquellos que realizan todo el sistema productivo. Lo que ha ocasionado que estos no se puedan organizar, puesto que no se consideran estar en el mismo nivel productivo.

Transformar la cadena productiva a una cadena de valor requiere fortalecer las relaciones horizontales mediante el desarrollo de capacidades en relación a la confianza, la colaboración y unión entre los actores de la cadena, con la intervención de facilitadores de las Organizaciones no Gubernamentales (ONG) o instituciones de enseñanza, para tener un mayor nivel de negociación y decisión con diferentes actores, empresas, ONG, académicos o funcionarios, en diferentes niveles, local, regional, nacional o sectorial (CODESPA, 2010; Larroa y Roas, 2018)

Dimensión vertical

La interacción que hay entre los actores principales y proveedores de insumos, embaces y materia prima se reduce a un intercambio comercial, debido a la baja cantidad de materiales que utilizan anualmente y estos se compran según lo van necesitando.

Fuerzas del entorno

Con respecto a las autoridades municipales la interacción se da solo cuando organiza alguna feria cultural para la venta de productos derivados de la aceituna. Y con las instituciones de enseñanza e investigación, la relación ha sido por un interés académico de parte de las instituciones y a través de ello ha recibido capacitaciones, cursos e invitaciones a exposiciones de productores orgánicos por parte de instituciones de enseñanza e investigación. Las capacitaciones que han recibido han sido en cuanto podas, identificación de plagas, geoposicionamiento de árboles y reforestación en zonas urbanas.

Si bien es cierto, la participación de cada uno de los actores es diferente, pero es indispensable para cubrir la demanda de producto local que se ha logrado por el

esfuerzo y el trabajo de todos. Las autoridades municipales han integrado a los actores involucrados en esta actividad mediante la feria de la aceituna, pero aun así hace falta más apoyo para conservar la actividad y reconocer el trabajo de cada una de las familias que aun preservan los árboles. Las instituciones de enseñanza e investigación han hecho esfuerzos por coadyuvar a la preservación de los árboles y de la producción del aceite y aceituna en el municipio mediante capacitaciones, cursos, censos y talleres. Organizaciones sin fines de lucro y medios de comunicación han realizado reportajes y entrevistas a los actores clave de la cadena de valor para darle difusión a los productos, y sean conocidos a nivel nacional e internacional.

4.6 CONCLUSIONES

En esta primera aproximación se pudo mapear la cadena de valor de los productos derivados de la aceituna, identificar los actores y las actividades clave en el municipio de Chimalhuacán. La cadena de valor corta y simple, la producción es a nivel familiar. Existen familias que intervienen en todos los eslabones, desde la producción hasta la comercialización de los productos, algunas otras intervienen en la producción y comercialización, es decir, tienen árboles en su predio, la fruta la venden a otras familias que transforman el producto y posteriormente les compran aceite y aceitunas en salmuera para comercialízalo de manera ocasional.

El nivel de interacción entre actores se da por un mero intercambio comercial. No hay ninguna organización que los integre y respalde, siendo que el producto que ofrecen tiene el mismo origen. Solo se identificaron dos marcas “Kasbaa” y “Don aceituno”, esta última es la única que tiene registro.

La actividad económica ha perdurado puesto que los actores principales han podido aprovechar los recursos biofísicos y culturales existentes en el territorio. El sistema de producción local permite que exista una proximidad con los consumidores, lo implica un menor número de intermediarios, el consumidor sabe quién, dónde y cómo se producen.

Por lo anterior la cadena de valor actual es operativa y sigue perdurando por tradición y cultura, no obstante, son los esfuerzos conjuntos de los actores en sus distintos niveles de participación, así como las fuerzas del entorno los que han coadyuvado a su permanencia.

Se requiere seguir promoviendo los productos locales por distintos medios de comunicación, planes y programas que inviten a conservar los árboles de olivo y de ser posible seguir plantado más árboles en los lugares donde sea posible en el municipio, promover una visión compartida, figura asociativa que respalde a todos los actores involucradas y una marca colectiva que identifique al producto y el lugar de procedencia.

Por otro lado, se reconoce las limitaciones de esta metodología para poder analizar todo el contexto de esta actividad, en la que se recomienda continuar con un análisis de la cadena de valor en otros aspectos para pasar de la teoría a la acción. De igual manera, hacer un análisis bajo diferentes conceptos teóricos, como el de los sistemas agroalimentarios localizados, desarrollo territorial y proximidad geográfica.

4.7 LITERATURA CITADA

- A fondo Estado de México. 2014. Familia Buendía lleva 200 años produciendo aceitunas y aceite en Chimalhuacán. <https://afondoedomex.com/cultura/familia-buendia-lleva-200-anos-produciendo-aceitunas-y-aceite-de-primera-calidad-en-chimalhuacan/>
- Anjos F., S. d., E. Aguilar C., y N. V. Caldas. 2011. Estrategias de valorización de productos locales en España y Brasil. *Revista de economía agrícola*. 58(1): 23–39. <https://idus.us.es/handle/11441/49450>
- Arias R., J., y J. A. Valenciano S. 2017. La cadena de valor de la panela y el fortalecimiento de la agricultura familiar en Costa Rica. *Revista ABRA*. 37 (55): 1-13. DOI:10.15359/abra.37-55.3.
- Arvizu B., E., Y. Mayett M., J. L. Martínez F., E. Olivares B., y L. Flores M. 2015. Análisis de producción y comercialización hortícola del Estado de Puebla: un enfoque de cadena de valor. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 6(4): 779–92. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n4/v6n4a9.pdf>.
- Champredonde, M. 2012. ¿Qué es un producto típico certificable mediante IG/DO en el contexto latinoamericano?. Ejemplos a partir de casos argentinos.

Perspectivas rurales, Nueva época. 10 (19): 61–82.
<https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/perspectivasrurales/article/view/3379/3239>

Champredonde, M., y J. González C. 2016. ¿Agregado de valor o valorización? Reflexiones a partir de denominaciones de origen en América Latina. *Revista Iberoamericana de viticultura, agroindustria y ruralidad*. 3 (9):147-172.
<https://www.redalyc.org/pdf/4695/469546924008.pdf>

CODESPA. 2010. Cadenas De Valor Humano. Creando vínculos comerciales para la erradicación de la pobreza. Documento técnico. Pp.1-142.
<https://www.codespa.org/aprende/publicaciones/cadenas-de-valor-creando-vinculos-comerciales-para-la-erradicacion-de-la-pobreza/>

Dahlström, K., and P. Ekins. 2006. Combining economic and environmental dimensions: Value chain analysis of UK iron and steel flows. *Ecological Economics*. 58 (3): 507–19. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2005.07.024>.

Delfín G., M. E. 2004. Los olivares de Tacubaya (México) en la época colonial. V Coloquio de Tacubaya. Pasado y presente. ENAH-INAH. México, D.F. pp. 1-15. <https://www.historiacocina.com/paises/articulos/mexico.htm>

García F., F., M. Álvarez H., N. Sánchez M., y N. E. Sánchez M. 2014. La agroindustria azucarera en el mante, Tamaulipas. Estrategias para potenciar la cadena de valor. *Revista Mexicana de Agronegocios*. 35: 922-933. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14131676002>

Goula, especialistas en la industria alimenticia. 2020. El escondido reino de la aceituna en Chimalhuacán. <https://goula.lat/el-escondido-reino-de-la-aceituna-en-chimalhuacan/>

Guadarrama G., L., Y.D. Palmas C., F. Herrera T., y H. Thomé O. 2019. ¿Puede el turismo ayudar a la valorización del dulce típico de leche en Toluca, Estado de Mexico?. Análisis por medio de la cadena de valor. *Revista turismo y sociedad*. 24:161–79.
<https://revistas.uexternado.edu.co/index.php/tursoc/article/view/5652/7049>

INEGI .1996. Chimalhuacán Estado de México: Cuaderno Estadístico Municipal. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Documento técnico. Pp.1-19.
http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/historicos/1334/702825925864/702825925864_1.pdf

INEGI. 2021. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. <https://www.inegi.org.mx/>

INIFAP. 2017. Perspectivas y situación de la producción de olivo en Guanajuato proyecto: Impacto productivo de diferentes variedades de olivo y bases para generar un paquete tecnológico, para la producción en el Estado. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de

Investigación Regional Centro Campo Experimental Bajío Celaya, Guanajuato, México. Folleto técnico. 5: 1-56. <https://docplayer.es/83969365-Perspectivas-y-situacion-de-la-produccion-de-olivo-en-guanajuato.html>

Kaplinsky, R., and M. Morris. 2000. A handbook for value chain research. An important health warning or a guide for using this handbook. Institute for development studies: Brighton, UK. pp 1-105. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/fisheries/docs/Value_Chain_Handbook.pdf

La jornada. 2011. En Chimalhuacán, ya solo 15 familias siembran aceitunas. Pp. 29. <https://www.jornada.com.mx/2011/12/18/estados/029n2est>

La jornada. 2018. Olivos de Tláhuac, amenazados por la urbanización y la falta de agua. <https://www.jornada.com.mx/2018/05/22/capital/027n1cap>

OIT. 2016. Guía general para el desarrollo de cadenas de valor. Organización Integral del Trabajo. Documento técnico. Pp. 1-31. https://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/---ed_emp/---emp_ent/---ifp_seed/documents/instructionalmaterial/wcms_541432.pdf

Parker, G. 2005. Sustainable food? Teikei, co-operatives and food citizenship in Japan and the UK. Centre of Planning Studies, Department of Real Estate and Planning, The University of Reading, UK. Pp 1-29. https://www.researchgate.net/publication/229012217_Sustainable_food_Teikei_Co-operatives_and_food_citizenship_in_Japan_and_the_UK

Porter, M. E. 1998. Competitive Advantage: Creating and Sustaining Superior Performance. The Free. Pp

Quintero J., y J. Sánchez. 2006. La cadena de valor : Una herramienta del pensamiento estratégico. Telos. 8(3): 377-389. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=99318788001>

Riveros H., M. Baquero., A. Lucio-Paredes., L. Andrade., W. Demenus, C. Jácome., and M. Jerez. 2011. Enfoques de asociatividad entre actores del sistema productivo: conceptos, casos reales y metodologías. IICA y CONOPE. 1: 108. <http://repiica.iica.int/docs/B2230e/B2230e.pdf>.

Salvador G., A. 2015. Cadena de valor económico del vino de Baja California, México. Estudios fronterizos, nueva época. 16: 163-93. <https://www.redalyc.org/pdf/530/53039887006.pdf>

Sánchez - Escudero J., y C.D. Sánchez-Sánchez. 2018. El olivo en México. Agro Productividad, 6(5): 13-20. <http://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/476/357>

SIAP.2019. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>

- Springer-Heinze, A. 2008. ValueLinks 2.0 Manual sustainable value chain development. Pp 243. <https://www.valuelinks.org/material/manual/ValueLinks-Manual-2.0-Vol-1-January-2018.pdf>
- Tolentino M., J. M., R. M. Larroa T., MC. Renard H., y M. del C. del Valle R. 2018. Sistemas Agroalimentarios Localizados y prácticas agrícolas tradicionales. Hacia una propuesta política pública para el desarrollo rural. Red de Sistemas Agroalimentarios Localizados, Ciudad de México, México. Pp 1-220. http://ru.iiec.unam.mx/4990/1/Libro_SIAL-y-practicas-agricolas-tradicionales.pdf

CONCLUSIONES GENERALES

Se pudieron establecer *in vitro* ecotipos centenarios de olivo de los municipios de Chimalhuacán, Papalotla y Texcoco del estado de México. Además, es económicamente viable propagarlos mediante cultivo *in vitro*, esto se pudo determinar a través de un análisis financiero con opciones reales.

Se pudo determinar que los agregados celulares de olivo tienen un potencial para obtener compuestos fenólicos con la inducción de luz UV-C y UVB.

Los ecotipos de olivo son un importante recurso genético, ecológico, biológico y agrícola para la región, el cual, representa una alternativa económica viable para aquellas zonas de baja productividad o en sistemas de traspatio.

La conservación de recursos locales *in vitro* e *in situ* de especies vegetales que se han adaptado a las condiciones edafoclimáticas de la región son de importancia que atañe tanto a las instituciones de investigación y a la población.

ANEXOS

A) Presupuesto de inversiones

CONCEPTO	IMPORTE (\$)
ACTIVOS FIJOS	
Equipo de laboratorio	524,567
Cristalería e instrumental de laboratorio	323,437
Cámara de aclimatización	188,516
Vivero	181,400
Equipo de oficina	9,450
Obra civil	26,000
Transporte	80,000
Herramientas de campo	75,696
SUBTOTAL ACTIVO FIJOS	1,409,066
ACTIVOS DIFERIDOS	
Gastos de ad. de activos Intangibles	190,223
Gastos administrativos	18,500
Gastos preoperativos	25,000
Contratos por servicios	1,360
Imprevistos	42,271
SUBTOTAL ACTIVO DIFERIDOS	277,355
CAPITAL DE TRABAJO	8,243,382
TOTAL	9,929,805

B) Indicadores financieros calculo método tradicional

CONCEPTO	Años					VAN
	1	2	3	4	5	
A. BENEFICIOS CON EL PROYECTO (\$)	0	0	0	0	22,515,720	7,377,951
Ingresos por ventas (\$)	0	0	0	0	13,754,800	
Recuperación de capital de trabajo (\$)	0	0	0	0	\$8,243,383	
Valor residual (\$)	0	0	0	0	\$517,537	
B. COSTOS CON EL PROYECTO	2,738,755	2,738,755	2,815,387	2,738,755	7,231,223	8,876,607
Costos variables (\$)	1,906,584	1,906,584	1,906,584	1,906,584	1,906,584	
Costos fijos (\$)	617,048	617,048	617,048	617,048	617,048	
Intereses prestamos (\$)	0	0	0	0	0	
Amortización de deuda (\$)	0	0	0	0	0	
ISR 30% (\$)	0	0	0	0	3,369,351	
PTU 10% (\$)	0	0	0	0	1,123,117	
Depreciación y amortización (\$)	215,124	215,124	215,124	215,124	215,124	
Reinversión (\$)			76,631			
C. FLUJO DE FONDOS	-2,738,755	-2,738,755	-2,815,387	-2,738,755	15,284,497	4,252,844

TREMA	
Concepto	Valor
Riesgo (Inflación)	5%
Utilidad del inversionista	20%
TREMA	25%

INDICADORES DE RENTABILIDAD	
Valor Actual Neto	-\$1,498,656
Tasa Interna de Retorno	13%
Relación Beneficio/Costo	0.83

C) Indicadores financieros con el método tradicional para el cálculo con opciones reales

CONCEPTO	Etapa						VAN
	1	2	3	4	5	6	
A. BENEFICIOS CON EL PROYECTO	0	0	0	0	0	20,562,265	8,015,964
Ingresos por ventas	0	0	0	0	0	13,754,800	
Recuperación de capital de trabajo						6,289,928	
Valor residual						517,537	
B. COSTOS CON EL PROYECTO	1,284,182	817,805	743,766	1,700,519	1,083,137	6,509,105	6,098,408
Costos variables	452,011	602,681	452,011	868,347	829,641	703,053	
Costos fijos	617,048	0	0	617,048	617,048	617,048	
Intereses prestamos	0	0	0	0	0		
Amortización de deuda	0	0	0	0	0		
ISR 30%	0	0	0	0	-434,007	3,730,410	
PTU 10%	0	0	0	0	-144,669	1,243,470	
Depreciación y amortización	215,124	215,124	215,124	215,124	215,124	215,124	
Reinversión			76,631				
C. FLUJO DE FONDOS	-1,284,182	-817,805	-743,766	-1,700,519	-1,083,137	14,053,160	8,423,751

TREMA	
Concepto	Valor
Riesgo (Inflación)	5%
Utilidad del inversionista	12%
TREMA	17%

INDICADORES DE RENTABILIDAD	
Concepto	Valor
Valor Actual Neto	\$1,917,557
Tasa Interna de Retorno	33%
Relación Beneficio/Costo	1.31

ESCENARIO 1 VOLATILIDAD DEL PRECIO

D) Árbol binomial Etapa V Vivero

SUBPERIODOS											
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
											k \$17,941,559 \$17,111,917
									j \$14,346,599 \$13,596,926		
								i \$11,471,964 \$10,787,492			l \$11,471,964 \$10,642,323
							h \$9,173,321 \$8,542,965			m \$9,173,321 \$8,413,111	
						g \$7,335,258 \$6,750,673			n \$7,335,258 \$6,633,918		d' \$7,335,258 \$6,505,616
					f \$5,865,488 \$5,320,362		o \$5,865,488 \$5,214,880			c' \$5,865,488 \$5,098,541	
				e \$4,690,217 \$4,179,737		p \$4,690,217 \$4,084,018			b' \$4,690,217 \$3,978,093		e' \$4,690,217 \$3,860,576
			d \$3,750,436 \$3,270,948		q \$3,750,436 \$3,183,683		a' \$3,750,436 \$3,086,879			f \$3,750,436 \$2,979,181	
		c \$2,998,959 \$2,547,844		r \$2,998,959 \$2,467,847		z \$2,998,959 \$2,378,940			g' \$2,998,959 \$2,279,938		r \$2,998,959 \$2,169,318
	b \$2,398,056 \$1,973,713		s \$2,398,056 \$1,900,051		y \$2,398,056 \$1,817,844		h' \$2,398,056 \$1,726,219			q' \$2,398,056 \$1,624,047	
a \$1,917,557 \$1,519,341		t \$1,917,557 \$1,451,484		x \$1,917,557 \$1,375,268		i' \$1,917,557 \$1,289,667			p' \$1,917,557 \$1,194,126		s' \$1,917,557 \$1,087,915
	u \$1,533,335 \$1,099,205		w \$1,533,335 \$1,028,947		j' \$1,533,335 \$949,262		o' \$1,533,335 \$858,739			t' \$1,533,335 \$757,565	
		v \$1,226,100 \$760,841		k' \$1,226,100 \$688,024		ñ' \$1,226,100 \$604,203			u' \$1,226,100 \$506,497		c'' \$1,226,100 \$396,458
			l' \$980,425 \$491,184		n' \$980,425 \$416,727		v \$980,425 \$329,256			b'' \$980,425 \$220,951	
				m' \$783,977 \$282,397		w' \$783,977 \$209,681			a'' \$783,977 \$123,138		d'' \$783,977 \$0
					x' \$626,891 \$131,449		z' \$626,891 \$68,627			e'' \$626,891 \$0	
						y' \$501,281 \$38,246			f'' \$501,281 \$0		j'' \$501,281 \$0
							g'' \$400,839 \$0			i'' \$400,839 \$0	
								h'' \$320,523 \$0			k'' \$320,523 \$0
									l'' \$256,299 \$0		
											m'' \$204,944 \$0

F) Árbol binomial Etapa III Enraizamiento

SUBPERIODOS										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
										\$8,587,673
										\$8,135,662
									j	\$7,221,933
										\$6,626,118
									i	\$6,073,394
										\$5,621,384
										\$5,107,513
										\$4,561,895
										\$4,295,240
										\$3,843,230
										\$3,612,147
										\$2,986,908
										\$3,037,690
										\$2,585,679
										\$2,554,591
										\$2,069,582
										\$2,148,322
										\$1,696,312
										\$1,806,664
										\$1,339,411
										\$1,519,341
										\$1,067,331
										\$1,277,713
										\$823,018
										\$1,074,512
										\$622,502
										\$903,627
										\$457,813
										\$759,919
										\$307,909
										\$639,065
										\$199,532
										\$537,432
										\$85,421
										\$451,961
										\$45,818
										\$380,084
										\$0
										\$319,637
										\$0
										\$268,804
										\$0

H) Árbol binomial Etapa I Establecimiento

SUBPERIODOS										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
										k \$2,837,354 \$2,385,343
								j \$2,353,241 \$1,888,029		
								i \$1,951,728 \$1,486,151		l \$1,951,728 \$1,499,717
							h \$1,618,721 \$1,161,843		m \$1,618,721 \$1,166,260	
						g \$1,342,533 \$900,556		n \$1,342,533 \$897,923		d' \$1,342,533 \$890,523
					f \$1,113,468 \$690,594		o \$1,113,468 \$682,448		c' \$1,113,468 \$669,778	
			e \$923,487 \$522,943		p \$923,487 \$510,232		b' \$923,487 \$493,299		e' \$923,487 \$471,476	
		d \$765,920 \$390,518		q \$765,920 \$374,535		a' \$765,920 \$353,628		f' \$765,920 \$328,263		
		c \$635,238 \$287,415		r \$635,238 \$269,817		z \$635,238 \$246,902		g' \$635,238 \$217,341		r \$635,238 \$183,228
	b \$526,853 \$208,464		s \$526,853 \$190,876		y \$526,853 \$168,358		h' \$526,853 \$139,169		q' \$526,853 \$99,317	
a \$436,961 \$149,057		t \$436,961 \$132,747		x \$436,961 \$112,462		i' \$436,961 \$87,014		p' \$436,961 \$53,834		s' \$436,961 \$0
	u \$362,406 \$90,881		w \$362,406 \$73,803		j' \$362,406 \$53,441		o' \$362,406 \$29,180		t' \$362,406 \$0	
		v \$300,572 \$47,698		k' \$300,572 \$32,369		ñ' \$300,572 \$15,817		u' \$300,572 \$0		c'' \$300,572 \$0
			l' \$249,288 \$19,390		n' \$249,288 \$8,574		v' \$249,288 \$0		b'' \$249,288 \$0	
				m' \$206,754 \$4,647		w' \$206,754 \$0		a'' \$206,754 \$0		d'' \$206,754 \$0
					x' \$171,477 \$0		z' \$171,477 \$0		e'' \$171,477 \$0	
						y' \$142,220 \$0		f'' \$142,220 \$0		j'' \$142,220 \$0
							g'' \$117,954 \$0		i'' \$117,954 \$0	
								h'' \$97,828 \$0		k'' \$97,828 \$0
									l'' \$81,137 \$0	
										m'' \$67,293 \$0

ESCENARIO 2 VOLATILIDAD DE LA PROBABILIDAD DE PASAR A LA SIGUIENTE ETAPA

I) Árbol binomial Etapa V Vivero

SUBPERIODOS											
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										k \$5,560,222.85 \$4,730,581.61	
									j \$4,998,708.33 \$4,219,815.16		
								i \$4,493,899.91 \$3,762,650.62		l \$4,493,899.91 \$3,664,258.67	
							h \$4,040,070.96 \$3,353,551.24		m \$4,040,070.96 \$3,261,177.80		
						g \$3,632,073.20 \$2,987,546.99		n \$3,632,073.20 \$2,900,823.91		d' \$3,632,073.20 \$2,802,431.96	
					f \$3,265,278.21 \$2,660,176.84		o \$3,265,278.21 \$2,578,758.49		c' \$3,265,278.21 \$2,486,385.05		
				e \$2,935,525.04 \$2,367,436.92		p \$2,935,525.04 \$2,290,998.83		b' \$2,935,525.04 \$2,204,275.75		e' \$2,935,525.04 \$2,105,883.80	
			d \$2,639,072.90 \$2,105,734.00		q \$2,639,072.90 \$2,033,971.53		a' \$2,639,072.90 \$1,952,553.18		f' \$2,639,072.90 \$1,860,179.74		
		c \$2,372,558.81 \$1,871,843.55		r \$2,372,558.81 \$1,804,470.69		z \$2,372,558.81 \$1,728,032.60		g' \$2,372,558.81 \$1,641,309.52		r' \$2,372,558.81 \$1,542,917.57	
	b \$2,132,959.38 \$1,662,872.23		s \$2,132,959.38 \$1,599,620.47		y \$2,132,959.38 \$1,527,858.00		h' \$2,132,959.38 \$1,446,439.66		q' \$2,132,959.38 \$1,354,066.21		
	a \$1,917,556.56 \$1,476,224.10	t \$1,917,556.56 \$1,416,841.34		x \$1,917,556.56 \$1,349,468.45		i' \$1,917,556.56 \$1,273,030.36		p' \$1,917,556.56 \$1,186,307.27		s' \$1,917,556.56 \$1,087,915.32	
		u \$1,723,906.79 \$1,253,820.01		w \$1,723,906.79 \$1,190,568.08		j' \$1,723,906.79 \$1,118,805.42		o' \$1,723,906.79 \$1,037,387.07		t' \$1,723,906.79 \$945,013.63	
			v \$1,549,813.29 \$1,049,099.72		k' \$1,549,813.29 \$981,726.09		n̄' \$1,549,813.29 \$905,287.08		u' \$1,549,813.29 \$818,564.00		c'' \$1,549,813.29 \$720,172.05
			l' \$1,393,301.09 \$859,969.67		n' \$1,393,301.09 \$788,204.12		v' \$1,393,301.09 \$706,781.37		b'' \$1,393,301.09 \$614,407.93		
				m' \$1,252,594.72 \$684,539.42		w' \$1,252,594.72 \$608,089.73		a'' \$1,252,594.72 \$521,345.43		d'' \$1,252,594.72 \$422,953.48	
					x' \$1,126,097.97 \$521,139.12		z' \$1,126,097.97 \$439,680.43		e'' \$1,126,097.97 \$347,204.80		
						y' \$1,012,375.84 \$368,461.37		f'' \$1,012,375.84 \$281,618.71		j'' \$1,012,375.84 \$182,734.60	
							g'' \$910,138.26 \$226,204.90		i'' \$910,138.26 \$133,615.39		
								h'' \$818,225.43 \$97,699.45		k'' \$818,225.43 \$0.00	
									l'' \$735,594.66 \$0.00		
										m'' \$661,308.60 \$0.00	

J) Árbol binomial Etapa IV Aclimatización

SUBPERIODOS										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
										k \$4,280,518 \$3,412,170
									j \$3,848,238 \$3,033,006	
								i \$3,459,613 \$2,694,248		l \$3,459,613 \$2,591,266
							h \$3,110,234 \$2,391,686		m \$3,110,234 \$2,295,003	
						g \$2,796,139 \$2,121,543		n \$2,796,139 \$2,030,774		d' \$2,796,139 \$1,927,791
					f \$2,513,763 \$1,880,431		o \$2,513,763 \$1,795,214		c' \$2,513,763 \$1,698,531	
				e \$2,259,904 \$1,665,312		p \$2,259,904 \$1,585,308		b' \$2,259,904 \$1,494,538		e' \$2,259,904 \$1,391,556
			d \$2,031,681 \$1,473,460		q \$2,031,681 \$1,398,349		a' \$2,031,681 \$1,313,132		f' \$2,031,681 \$1,216,449	
		c \$1,826,506 \$1,302,431		r \$1,826,506 \$1,231,914		z \$1,826,506 \$1,151,910		g' \$1,826,506 \$1,061,141		r \$1,826,506 \$958,159
	b \$1,642,051 \$1,150,035		s \$1,642,051 \$1,083,831		y \$1,642,051 \$1,008,719		h' \$1,642,051 \$923,503		q' \$1,642,051 \$826,820	
a \$1,476,224 \$1,014,310		t \$1,476,224 \$952,158		x \$1,476,224 \$881,640		i' \$1,476,224 \$801,628		p' \$1,476,224 \$710,859		s' \$1,476,224 \$607,877
	u \$1,327,144 \$835,159		w \$1,327,144 \$768,963		j' \$1,327,144 \$693,846		o' \$1,327,144 \$608,595		t' \$1,327,144 \$511,912	
		v \$1,193,118 \$669,174		k' \$1,193,118 \$598,696		ñ' \$1,193,118 \$518,688		u' \$1,193,118 \$427,753		c'' \$1,193,118 \$324,771
			l' \$1,072,628 \$514,896		n' \$1,072,628 \$439,993		v' \$1,072,628 \$354,876		b'' \$1,072,628 \$257,396	
				m' \$964,306 \$371,473		w' \$964,306 \$292,482		a'' \$964,306 \$202,776		d'' \$964,306 \$95,958
					x' \$866,923 \$239,608		z' \$866,923 \$158,922		e'' \$866,923 \$70,165	
						y' \$779,374 \$123,993		f'' \$779,374 \$51,304		j'' \$779,374 \$0
							g'' \$700,667 \$37,514		i'' \$700,667 \$0	
								h'' \$629,908 \$0		k'' \$629,908 \$0
									l'' \$566,295 \$0	
										m'' \$509,106 \$0

L) Árbol binomial Etapa II Multiplicación

SUBPERIODOS										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
										k \$1,642,818 \$1,040,137
								j \$1,523,690 \$957,875		
								i \$1,413,201 \$881,996		l \$1,413,201 \$810,521
							h \$1,310,724 \$812,012		m \$1,310,724 \$744,909	
						g \$1,215,678 \$747,472		n \$1,215,678 \$684,473		d' \$1,215,678 \$612,998
					f \$1,127,525 \$687,958		o \$1,127,525 \$628,813		c' \$1,127,525 \$561,709	
				e \$1,045,763 \$633,084		p \$1,045,763 \$577,557		b' \$1,045,763 \$514,558		e' \$1,045,763 \$443,083
			d \$969,931 \$582,495		q \$969,931 \$530,364		a' \$969,931 \$471,219		f' \$969,931 \$404,115	
		c \$899,597 \$535,860		r \$899,597 \$486,918		z \$899,597 \$431,391		g' \$899,597 \$368,392		r \$899,597 \$296,916
	b \$834,364 \$492,876		s \$834,364 \$446,928		y \$834,364 \$394,797		h' \$834,364 \$335,652		q' \$834,364 \$268,548	
a \$773,861 \$453,261		t \$773,861 \$410,124		x \$773,861 \$361,182		i' \$773,861 \$305,655		p' \$773,861 \$242,655		s' \$773,861 \$171,180
	u \$717,745 \$376,257		w \$717,745 \$330,310		j' \$717,745 \$278,184		o' \$717,745 \$219,049		t' \$717,745 \$151,929	
		v \$665,698 \$301,965		k' \$665,698 \$253,035		ñ' \$665,698 \$197,552		u' \$665,698 \$134,691		c'' \$665,698 \$63,018
			l' \$617,426 \$230,025		n' \$617,426 \$177,998		v' \$617,426 \$119,282		b'' \$617,426 \$54,048	
				m' \$572,654 \$160,233		w' \$572,654 \$105,530		a'' \$572,654 \$46,354		d'' \$572,654 \$0
					x' \$531,128 \$93,277		z' \$531,128 \$39,756		e'' \$531,128 \$0	
						y' \$492,614 \$34,097		f'' \$492,614 \$0		j'' \$492,614 \$0
							g'' \$456,893 \$0		i'' \$456,893 \$0	
								h'' \$423,761 \$0		k'' \$423,761 \$0
									l'' \$393,033 \$0	
										m'' \$364,532 \$0.00

M) Árbol binomial Etapa I Establecimiento

SUBPERIODOS										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
										k \$1,104,519 \$652,509
									j \$1,010,394 \$586,032	
								i \$924,290 \$525,886		l \$924,290 \$472,280
							h \$845,524 \$471,490		m \$845,524 \$421,162	
						g \$773,470 \$422,315		n \$773,470 \$375,066		d' \$773,470 \$321,459
					f \$707,556 \$377,881		o \$707,556 \$333,522		c' \$707,556 \$283,194	
				e \$647,259 \$337,751		p \$647,259 \$296,105		b' \$647,259 \$248,855		e' \$647,259 \$195,249
			d \$592,101 \$301,528		q \$592,101 \$262,431		a' \$592,101 \$218,067		f' \$592,101 \$167,740	
		c \$541,643 \$268,855		r \$541,643 \$232,159		z \$541,643 \$190,523		g' \$541,643 \$143,239		r \$541,643 \$89,633
	b \$495,486 \$239,406		s \$495,486 \$204,983		y \$495,486 \$165,955		h' \$495,486 \$121,684		q' \$495,486 \$71,124	
a \$453,261 \$212,886		t \$453,261 \$180,625		x \$453,261 \$144,120		i' \$453,261 \$102,907		p' \$453,261 \$56,437		s' \$453,261 \$1,251
	u \$414,635 \$158,833		w \$414,635 \$124,787		j' \$414,635 \$86,682		o' \$414,635 \$44,782		t' \$414,635 \$990	
		v \$379,301 \$107,736		k' \$379,301 \$72,760		ñ' \$379,301 \$35,534		u' \$379,301 \$783		c'' \$379,301 \$0
			l' \$346,977 \$60,883		n' \$346,977 \$28,195		v' \$346,977 \$620		b'' \$346,977 \$0	
				m' \$317,409 \$22,372		w' \$317,409 \$491		a'' \$317,409 \$0		d'' \$317,409 \$0
					x' \$290,360 \$388		z' \$290,360 \$0		e'' \$290,360 \$0	
						y' \$265,616 \$0		f'' \$265,616 \$0		j'' \$265,616 \$0
							g'' \$242,980 \$0		i'' \$242,980 \$0	
								h'' \$222,274 \$0		k'' \$222,274 \$0
									l'' \$203,332 \$0	
										m'' \$186,005 \$0

II. INGRESOS

8 ¿Se dedica a otra actividad además de la producción de olivo?
(Si, su respuesta es NO pase a la pregunta 10.)

Y02

- 1) Si
- 2) No

9 En la actualidad ¿Cuál es su principal actividad económica?

Y03

- 1) Jornalero (a)
- 2) Obrero (a)
- 3) Empleado (a)
- 4) Trabajo por su cuenta
- 5) Ama (o) de casa
- 6) Pensionado (a)
- 7) Estudiante
- 8) Otro: _____

10 ¿Cuál es su principal fuente de ingresos?

Y04

- 1) Comercialización de productos derivados del olivo
- 2) Sueldo
- 3) Pensión
- 4) Rentas
- 5) Otros: _____

III. PRODUCCIÓN

11 ¿Qué productos elabora?

Y05

- 1) Extracción de aceite
- 2) Curtido de Aceituna
- 3) Visuteria con semillas de olivo
- 4) Jabones, shampus o cremas
- 5) Alimentos con aceitunas
- 6) Artesanias
- 7) Propagación de árboles
- 8) Venta en fresco
- 9) Otros: _____

- 12 ¿Por qué sigue produciendo aceituna? Y06
- 1) Conservar la tradición familiar
 - 2) Fuente de ingresos económicos
 - 3) Conservar los árboles
 - 4) Darle promoción a la comunidad
 - 5) Por pasatiempo
 - 6) Otros: _____

- 13 ¿Cuántos años o meses lleva dedicándose a esta actividad? X07

- 14 ¿Tiene arboles de olivo en alguna de sus propiedades? Y07
- 1) Si
 - 2) No

- 15 ¿En qué lugar se encuentran? Y08
- 1) Patio de la casa
 - 2) Terreno adjunto a su domicilio
 - 3) Predio diferente de su casa
 - 4) Otro: _____

- 15 ¿Cuántos árboles tiene? X08

- 16 ¿Cuál es la edad aproximada de los árboles?
- | | | |
|--------------|--------------------------|-----|
| 1) 0-20 | <input type="checkbox"/> | X09 |
| 2) 20-40 | <input type="checkbox"/> | X10 |
| 3) 40-60 | <input type="checkbox"/> | X11 |
| 4) 60-80 | <input type="checkbox"/> | X12 |
| 5) más de 80 | <input type="checkbox"/> | X13 |

- 17 ¿Cuántos kilogramos obtuvo en la última cosecha? X14

- 18 ¿Cuál es el nivel de ingresos anuales por la venta sus productos? Y09
- 1) De \$1,000 a \$5,000
 - 2) De \$5,000 a \$10,000
 - 3) De \$10,000 a \$20,00
 - 4) De \$20,000 a \$30,000
 - 5) Superior a \$30,000

- 19 ¿Qué cantidad en kilogramos destino para la elaboración de los siguientes productos?

Productos	kg
Extracción de aceite	
Curtido de Aceituna	
Bisutería con semillas de olivo	
Jabones, shampus o cremas	
Alimentos con aceitunas	
Artesanías	
Propagación de árboles	
Otros:	

- 20 ¿Dónde realiza el proceso de transformación de la fruta? Y10
- 1) Domicilio particular

- 2) En el domicilio de otro (a) productor (a)
- 3) En un molino
- 4) Otros: _____

21 ¿Cuántas personas intervienen la producción? X15

22 ¿Quiénes intervienen en la producción?

- 1) Cónyuge Y11
- 2) Hijos (a) Y12
- 3) Nietos (as) Y13
- 4) Tíos, Primos, Hermanos Y14
- 5) Vecinos Y15
- 6) Otros: Y16

23 ¿Cuenta con el equipo necesario para realizar sus actividades? Y17

- 1) Si
- 2) No

24 ¿A dónde lleva sus aceitunas para extraer aceite? Y18

- 1) Fabrica
- 2) Molino
- 3) Otro

25 ¿Señale en que meses del año realiza las siguientes actividades?

ACTIVIDADES	ENE	FEB	MAR	ABR	MaY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
Poda de árboles												
Fertilización												
Riego												
Cosecha												
Extracción de aceite												
Curtido de aceitunas												
Comercialización												

IV. COMERCIALIZACIÓN

26 ¿A quién le vende sus productos? Y19

- 1) Consumidor Final
- 2) Intermediario
- 3) Otros:

27 ¿Cuál es precio de venta los productos que usted elabora?

Productos	Cantidad	Precio \$
Extracción de aceite		
Curtido de Aceituna		
Bisutería con semillas de olivo		
Jabones, shampus o cremas		
Alimentos con aceitunas		
Artesanías		

Propagación de árboles		
Otros:		

28 ¿Dónde comercializa sus productos?

- 1) Tianguis local
- 2) Tianguis de productos orgánicos
- 3) Feria del olivo y la aceituna
- 4) Domicilio particular
- 5) Tienda
- 6) Internet

<input type="checkbox"/>	Y20
<input type="checkbox"/>	Y21
<input type="checkbox"/>	Y22
<input type="checkbox"/>	Y23
<input type="checkbox"/>	Y24
<input type="checkbox"/>	Y25

V. RELACIONES HORIZONTALES

29 ¿Pertenece a alguna organización?

- 1) Si
- 2) No

<input type="checkbox"/>	Y26
--------------------------	-----

30 Tipo de organización

- 1) Cooperativa
- 2) Sociedad Anónima
- 3) Sociedad civil
- 4) Grupo de trabajo
- 5) Otro

<input type="checkbox"/>	Y27
--------------------------	-----

31 Estaría usted dispuesto a pertenecer a una organización

- 1) Si
- 2) No

<input type="checkbox"/>	Y28
--------------------------	-----

32 De qué tipo sería la más adecuada según su experiencia

- 1) Cooperativa
- 2) Sociedad Anónima
- 3) Sociedad civil
- 4) Grupo de trabajo
- 5) Otro

<input type="checkbox"/>	Y29
--------------------------	-----

33 ¿Considera usted que el estar organizado le traería beneficios?

- 1) Totalmente de acuerdo
- 2) De acuerdo
- 3) Ni de acuerdo, ni en desacuerdo
- 4) Desacuerdo
- 5) Totalmente en desacuerdo

<input type="checkbox"/>	X16
--------------------------	-----

34 ¿Tiene una marca propia?

- 1) Si
- 2) No

<input type="checkbox"/>	Y30
--------------------------	-----

35 Mencione el nombre de su marca _____

36 Su marca está inscrita en el registro público de la propiedad

- 1) Si
- 2) No

<input type="checkbox"/>	Y31
--------------------------	-----

37 ¿Comparte su marca con otra persona? Y32
(Si, su respuesta es NO pase a la pregunta 39.)

- 1) Si
- 2) No

38 ¿Cuántas personas comparte su marca? X17

- 1) 1 a 3
- 2) 4 a 7
- 3) 8 a 10

39 ¿Qué tan de acuerdo estaría en compartir una sola marca que represente a la región para darle mayor valor a los productos? X18

- 1) Totalmente de acuerdo
- 2) De acuerdo
- 3) Ni de acuerdo, ni en desacuerdo
- 4) Desacuerdo
- 5) Totalmente en desacuerdo

40 ¿De dónde obtiene la materia prima (aceitunas) que utiliza para la elaboración de sus productos?

- 1) Árboles propios
- 2) Otros productores del municipio
- 3) De otros municipios
- 4) Otro estado

<input type="text"/>	Y33
<input type="text"/>	Y34
<input type="text"/>	Y35
<input type="text"/>	Y36

41 Sí, usted compra materia prima ¿Qué cantidad en kilogramos compra de cada uno los sitios mencionados?

LUGAR	KG
Otros productores del municipio	<input type="text"/>
De otros municipios	<input type="text"/>
Otro estado	<input type="text"/>

42 Se organiza con otros productores para comercialización Y37

- 1) Si
- 2) No

43 ¿En qué lugares comercializa sus productos de manera conjunta con otros productores? Y38

- 1) Tianguis local
- 2) Tianguis de productos orgánicos
- 3) Feria del olivo y la aceituna
- 4) Domicilio particular
- 5) Tienda
- 6) Internet

44 ¿Cuál es su nivel de confianza con los otros productores? X20

- 1) Alto

- 2) Medio
- 3) Bajo

VI. RELACIONES VERTICALES

45 ¿Dónde compra cada uno de los siguientes materiales?

INSUMOS	
Embaces, frascos, botellas, etc.	
Etiquetas	
Espicias	
Herramientas	
Aditivos	

46 Método de pago de los insumos | Y44

- 1) Crédito
- 2) Efectivo
- 3) Otro

47 ¿Cuál es su nivel de confianza en los proveedores? | X21

- 1) Alto
- 2) Medio
- 3) Bajo

48 ¿Qué tipo de actividades organizan en conjunto con la presidencia municipal?

- 1) Comercialización en ferias | Y45
- 2) Capacitaciones, cursos y talleres | Y46
- 3) Promoción del producto en otros lugares | Y47
- 4) Otros | Y48

49 ¿Qué apoyos recibió el último año del gobierno en turno (federal, estatal o municipal)?

- 1) Económico | Y49
- 2) Promoción producto | Y50
- 3) Herramienta, Maquinaria, equipo etc. | Y51
- 4) Capacitaciones, cursos y talleres | Y52
- 5) Otros | Y53

50 ¿De quién recibe capacitación para mejorar sus productos?

- 1) Gobierno municipal | Y54
- 2) Organización Civil | Y55
- 3) Institución de enseñanza e investigación | Y56
- 4) Otros | Y57

51 ¿Cuál es su nivel de confianza en las autoridades?

- 1) Alto
- 2) Medio
- 3) Bajo

X22

O) Cuestionario para productores

1. ¿Quién trajo los árboles de olivo a Chimalhuacán?
2. ¿Cuál es el significado religioso o histórico que tienen estos árboles?
3. ¿Desde cuándo inicio esta actividad?
4. ¿Quién le enseñó que del olivo se podrían obtener aceite y aceitunas?
5. ¿Cómo es el proceso de producción desde que usted cosecha a hasta que vende su producto?
6. ¿Cómo fue el proceso de desarrollar un producto, empaque, etiquetas, marca etc.?
7. ¿Qué experiencias ha tenido del trabajo en conjunto con el resto de los productores y las autoridades municipales?
8. ¿Considera que por ser olivos centenarios e históricos deberían de tener un mejor precio de venta?
9. ¿Qué características tiene su producto en comparación con el resto de los aceites o aceitunas?
10. ¿Cuáles son las expectativas que ve en la producción de olivo en la región?