

Optimización de medios de cultivo *in vitro* para la micropropagación de tuna forrajera (*Opuntia ficus-indica* L. Mill.)

Jhoselyn Quelca Helguero; Gino Aguirre Villarroel;
Gladys Gerónimo Fernandez; Lorena Lazarte Camacho

Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Fitotecnia, FCAYP-UMSS

E mail: g.aguirre@umss.edu.bo

Resumen. El trabajo se efectuó en el *Laboratorio de Biotecnología* de la FCAYP-UMSS, evaluando tres medios de multiplicación, cuatro medios de enraizamiento y cuatro tipos de sustrato en tuna forrajera (*Opuntia ficus indica* L. Mill.). El objetivo fue optimizar los medios de cultivo para la multiplicación y enraizamiento de esta especie. En la fase de multiplicación, el mejor medio fue el tratamiento con BAP 1 mg + AG3 0.2 mg + adenina 0.08 mg, logrando con el mismo, 11.45 brotes/explante. Para el enraizamiento, la concentración óptima fue 68.47% de sales de Murashige y Skoog con adición de 0.5 mg de AIA, con la cual se alcanzó un promedio de 4.75 raíces/explante; finalmente en la fase de aclimatación, los cuatro tipos de sustrato (arena; tierra vegetal; cascarilla de arroz y arena + tierra vegetal + cascarilla de arroz) fueron adecuados. El costo estimado de un plantín, con los medios de cultivo óptimos de micro propagación *in-vitro* y tierra vegetal en aclimatación, fue 1.95 Bs. El trabajo se desarrolló de febrero 2017 a marzo 2018.

Palabras clave: Explantes; Hormonas; Reguladores de crecimiento; Sequía

Abstract: Optimization of *in vitro* culture media for the micropropagation of forage prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill.) The work was carried out at the *Biotechnology Laboratory* of the FCAYP-UMSS, evaluating three multiplication media, four rooting media and four types of substrate in forage prickly pear (*Opuntia ficus indica* L. Mill.). The objective was to optimize the culture media for the multiplication and rooting of this species. In the multiplication phase, the best medium was the treatment with BAP 1 mg + AG3 0.2 mg + adenine 0.08 mg, achieving with it 11.45 shoots/explant. For rooting, the optimum concentration was 68.47% of Murashige and Skoog salts with the addition of 0.5 mg of AIA, with which an average of 4.75 roots/explant was reached; finally, in the acclimatization phase, the four types of substrate (sand; topsoil; rice husk and sand + topsoil + rice husk) were adequate. The estimated cost of a seedling, with the optimal culture media for *in-vitro* micropropagation and topsoil in acclimatization, was 1.95 Bs. The work was carried out from February 2017 to March 2018.

Keywords: Explants; Hormones; Growth regulators; Drought

Introducción

El interés creciente en Bolivia por las tunas, en particular *Opuntia ficus-indica* L. Mill, está basado en el amplio grado de adaptación de esta especie al clima y

suelo propios de zonas semiáridas y áridas; por ello es que en este último tiempo, se ha incentivado su cultivo en departamentos con zonas secas, en función a ser una alternativa forrajera para el productor pecuario de estos lugares.

Este desarrollo y enfoque es aún incipiente en el país, a diferencia de otros países de la región en los cuales se tiene un marcado desarrollo del uso forrajero de esta especie, frente al tradicional enfoque de “tuna para fruta”.

Desde este punto de vista, su gran importancia radica en la capacidad que tiene la tuna, de suplir las necesidades de agua y forraje para la ganadería en zonas áridas y semi áridas, afectadas por periodos de sequía y escasez de forraje, cada vez más pronunciados, ligados a el evidente efecto negativo de un proceso de cambio climático cada vez más acentuado, tanto a nivel local, como regional y mundial.

Ante un eventual incremento sostenido de la demanda por esta especie, con ese enfoque forrajero, se plantea el cultivo *in-vitro* de tuna, por las ventajas de una producción masiva de plantas homogéneas, con alta calidad sanitaria, en superficies reducidas, a bajos costos y en tiempos reducidos, con la finalidad de incrementar la población de plantas.

La *Opuntia* spp. se adapta a diferentes condiciones ambientales, así, en el Centro de Investigación en Forrajes “La Violeta” (en Tiquipaya, Cochabamba), las condiciones climáticas son totalmente diferentes al municipio de Pasorapa, donde la precipitación media llega a 200 mm/año, siendo que en “La Violeta” llega a más de 500 mm (Lazarte y Achá 2016).

El objetivo central de este trabajo fue optimizar los medios de cultivo para la multiplicación y enraizamiento de tuna forrajera (*Opuntia ficus indica* L. Mill), a partir de un enfoque central de micropropagación de tuna.

Materiales y métodos

Ubicación. El trabajo de investigación se realizó en el *Laboratorio de Biotecnología Vegetal* perteneciente a la FCAyP de la UMSS, ubicado en la zona “La Tamborada” de la ciudad de Cochabamba. Geográficamente se localiza a 17°24’ de latitud Sur y 66°10’ de longitud Oeste, a 2558 msnm.

Material biológico. El material vegetal utilizado en esta investigación fue explantes de tuna forrajera, ya establecidos en el laboratorio.

Metodología. Dentro de la investigación, se consideraron las fases de:

- Multiplicación
- Enraizamiento
- Aclimatación

a) Fase de multiplicación

Los tres medios de cultivo utilizados en la fase de multiplicación, se definieron a partir de diferentes reguladores de crecimiento y concentraciones de los mismos, conducentes a la micropropagación de brotes; el detalle de estos 3 medios se muestran en el Cuadro 1. Para cada medio se adicionó diferentes reguladores de crecimiento para la formación de brotes, los que constituyen los tratamientos. Los tres medios de crecimiento, una vez formulados y preparados, se los esterilizó a 121°C por 20 minutos.

La unidad experimental fue un frasco de vidrio pequeño (6 cm de diámetro * 7 cm de altura) con cinco explantes de 1 cm de altura, con cinco repeticiones. El cultivo se mantuvo en la sala de crecimiento, con temperatura de 25°C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad a 2500 lux.

Cuadro 1. Composición de tres medios de multiplicación para la micropropagación *in vitro* de tuna forrajera (*Opuntia ficus indica* L.)
-Valores por litro de medio de multiplicación-

Composición	Medios de multiplicación		
	M1	M2	M3
MS	4.43 g	4.43 g	4.43 g
Myo-inositol	0.1 g	0.1 g	0.1 g
BAP	1 mg	3 mg	--
AG3	0.2 mg	--	0.2 mg
AIA	--	0.5 mg	--
Adenina	0.08 g	--	--
Fosfato monobásico	--	0.085 g	--
2-4D	--	--	2 mg
Phytigel	2.3 g	2.3 g	2.3 g
Azúcar	30 g	30 g	30 g
pH	5.7	5.7	5.7

Fuente: Tomado de Pacheco 2015; Vásquez 2016.

La variable de respuesta fue el número de brotes por explante, que se registró cada 45 días.

b) Fase de enraizamiento

El Cuadro 2, muestra los componentes de las cuatro concentraciones de sales de Murashige y Skoog (MS). Los datos están expresados para preparar 1 litro de medio de enraizamiento.

c) Fase de aclimatación

Esta fase consistió en la transferencia de plántulas, las cuales pasaron de un medio aséptico a un ambiente natural, bajo condiciones de invernadero, con una humedad y temperatura adecuada.

Este parámetro se evaluó a los 30 días, en los siguientes cuatro tipos de sustrato:

- S1: arena
- S2: tierra vegetal
- S3: cascarilla de arroz
- S4: arena + tierra vegetal + cascarilla de arroz (1:1:1)

Análisis estadístico. El diseño experimental utilizado fue completamente aleatorio (DCA), solo para las fases de multiplicación y enraizamiento.

Para la fase de aclimatación solo se hizo un seguimiento del desarrollo desde su salida del laboratorio hasta la aparición de las características habituales de las plantas.

Costos de producción. En base a los materiales y reactivos utilizados, y los resultados experimentales alcanzados con el trabajo de investigación, se obtuvo un costo directo unitario de los plantines de tuna micropropagados.

Cuadro 2. Componentes de cuatro medios de enraizamiento para micropropagación de tuna forrajera (valores por litro de medio de enraizamiento)

Componentes	T 1	T 2	T 3	T 4
MS	1.11 g	2.22 g	3.32 g	4.43 g
Myo-inositol	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g
AIA	0.5 mg	0.5 mg	0.5 mg	0.5 mg
Carbón activo	1 g	1 g	1 g	1 g
Azúcar	30 g	30 g	30 g	30 g
Phytigel	2.3 g	2.3 g	2.3 g	2.3 g

Resultados y discusión

1. FASE DE MULTIPLICACIÓN

De acuerdo al análisis de varianza del número de brotes por explante, se determinó que el modelo fue apropiado ($P < 0.0001$). Los tratamientos tuvieron resultados altamente significativos ($P = 0.00011$) en los explantes, lo cual puede deberse a los componentes nutritivos de cada tratamiento: BAP, AG3, adenina (en el M1); Bap, AIA, Fosfato monobásico (en el M2) y AG3, 2-4D (en el M3).

Los datos para el análisis estadístico de esta fase de multiplicación, se tomaron a los 135 días de haber iniciado la micropropagación.

La Figura 1 muestra que el medio de multiplicación M1 (1 mg/l BAP + 0.2 mg/l de AG3 + 0.08 g/l adenina) generó una mayor respuesta, mostrándose como el mejor de los tres medios de multiplicación considerados (ver Cuadro 1).

Al respecto, Ojeda *et al.* 2012, trabajando con micropropagación en pitahaya, señala que la mayor tasa de propagación (proliferación de brotes), se obtuvo cuando los explantes se cultivaron usando una dosis alta de 2.0 mg/l BAP.

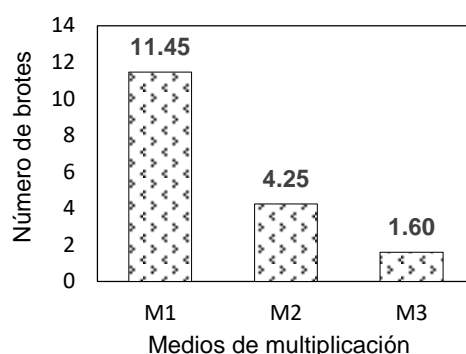


Figura 1. Número de brotes por explante en tuna para tres medios de multiplicación

Por su parte, Pacheco 2015, reporta que la concentración y combinación de reguladores de crecimiento de 1mg/l de BAP + 0.5 mg de P-Ca, generó 7.24 brotes/explante en tres variedades de nopal.

Con el medio de multiplicación M2 (3 mg/l BAP + 0.5 mg/l AIA + 0.085 mg/l fosfato monobásico), se obtuvo 4.25 brotes/explante.

Este bajo número de brotes por explante, puede deberse a que el AIA inhibe el crecimiento de yemas axilares cercanas (Aguirre *et al.* 2010).

Pacheco (2015), obtuvo 6 brotes/explante de tuna, utilizando 3 mg/l de BAP.

Con el medio M3 (0.2 mg AG3 + 2 mg 2-4D) se obtuvo 1.6 brotes/explante y es el medio que tiene 2-4D como fuente de auxina, que tiene la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; al mismo tiempo promueve la división celular en el cultivo y estimula el crecimiento de los tallos (elongación) (Aguirre *et al.* 2010). Como es evidente, la interacción de las dos hormonas en el M3, hizo que los explantes crecieran en altura, pero el número de brotes fue mínimo.

La combinación de BAP, AG3 y adenina que se tiene en el medio de multiplicación M1, es la de mejor respuesta en la fase de multiplicación, debido al uso de la cantidad y la combinación adecuada para el cultivo de tuna de las hormonas de crecimiento, ya que BAP y la adenina son citoquininas que estimulan la división celular y el crecimiento de las yemas laterales (Aguirre *et al.* 2010). El AG3 estimula y regula el desarrollo de las plantas (Bayer, 2013).

2. FASE DE ENRAIZAMIENTO

Número de raíces

El análisis de varianza para esta variable, mostró que el modelo estadístico aplicado, fue el apropiado.

Los cuatro medios de enraizamiento (Cuadro 2) tuvieron resultados altamente significativos ($P = 0.0324$) en los explantes, debido a la diferente concentración de sales de MS en cada tratamiento:

T 1: 25%

T 2: 50%

T 3: 75%

T 4: 100%

La Figura 2, muestra que la concentración de sales MS al 50%, es la que mayor número de raíces genera, con 4.62 raíces/explante.

Sharry *et al.* (2015) sugieren un medio para inducir el enraizamiento con un 50% de concentración de solución de Murashige y Skoog; en el presente ensayo, los medios de enraizamiento evaluados, tuvieron 0.5 mg/l AIA, lo cual estimuló la formación de raíces laterales o adventicias (Aguirre *et al.* 2010).

Sharry *et al.* 2015, indican que las sales de MS desarrollaron un medio nutritivo con el que lograron un crecimiento rápido en tejidos de tabaco.

La Figura 2 muestra, a partir de los coeficientes de determinación, que el número de raíces cambia cuadráticamente a medida que la concentración de solución de sales de Murashige y Skoog (MS) aumenta, logrando que las *in vitro* plantas de tuna, aprovechen mejor los nutrientes.

Con frecuencia es de interés la ecuación de regresión correspondiente a la población de donde se obtuvo la muestra (Spiegel y Stephens 2009).

Con este supuesto, se puede señalar que los resultados de la presente investigación, muestran que la concentración adecuada, según la regresión polinomial, es de 68.47% de sales de Murashige y Skoog,

Con esta concentración se puede obtener un promedio de 4.75 raíces/explante, por lo cual, el nivel de 68.47% de sales MS, es óptimo para obtener una adecuada tasa de reproducción, bajo las condiciones manejadas en el ensayo con tuna forrajera.

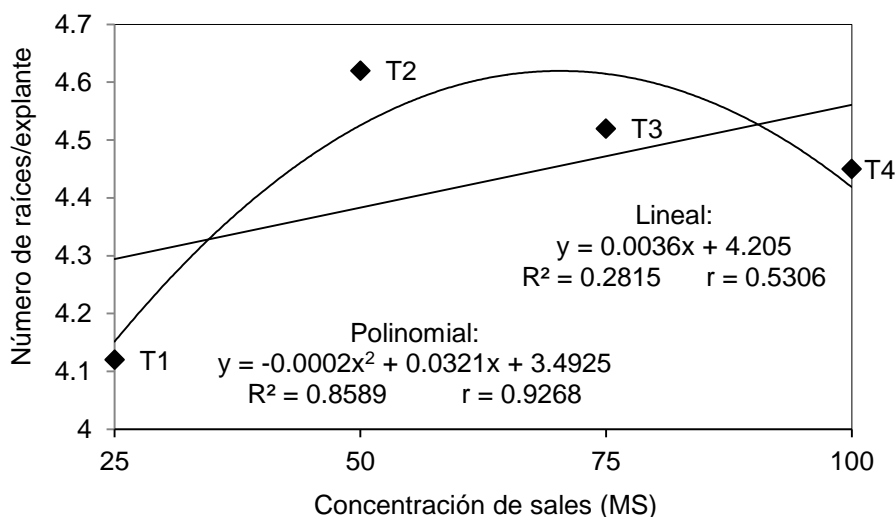


Figura 2. Tendencia cuadrática y lineal para el número de raíces/explante, como respuesta a cuatro concentraciones de sales en la fase de enraizamiento, en la micropropagación de tuna forrajera

3. FASE DE ACLIMATACIÓN

El porcentaje de sobrevivencia no presentó diferencias para los 4 sustratos, lo que refleja la gran rusticidad de la tuna. Sin embargo, según las características del sustrato, se observó que la arena era la que menos humedad conservaba, provocando una menor tasa de crecimiento de los plantines de tuna. En el sustrato compuesto (cascarilla de arroz + arena + tierra vegetal, en partes iguales), se notó de manera general mejores características de crecimiento, vigor y apariencia, con explantes vigorosos. Finalmente, a la 6ta. semana, los plantines aclimatados no presentaron diferencias en tamaño ni sobrevivencia, la cual fue del 100% en los 4 sustratos empleados, lográndose un total de 600 *in vitro* plantas (3 repeticiones de 50 plantines, en los 4 sustratos).

Costos

En la *fase de multiplicación*, el medio M1 es recomendado por el óptimo número de brotes, pero también por los costos,

ya que llegan a 34.18 Bs por litro de medio de multiplicación.

En la *fase de enraizamiento*, el costo fue directamente proporcional a los medios evaluados de acuerdo a su concentración. El costo con la concentración de sales de MS del 68.47%, fue de 16.2 Bs por litro de medio de enraizamiento.

Para la *fase de aclimatación* se determinó que el sustrato adecuado fue tierra vegetal, por el costo, que fue de 0.027 Bs/plantin (es decir 2.7 Bs/1000 plantines) y por sus características físicas, ya que tiene partículas relativamente grandes de materia orgánica.

Considerando todos los costos directos antes detallados, el Cuadro 3 estima el costo directo total para producir 1000 plantines; finalmente el Cuadro 4, presenta el costo total por plantín, considerando partidas complementarias de materiales, insumos y servicios, bajo las condiciones de manejo y desarrollo, planteadas en el presente trabajo.

Cuadro 3. Costos directos de los medios para la micropropagación de 1000 *vitroplantas* de tuna forrajera, en condiciones de laboratorio

Descripción	Unidad	Cantidad	Costo unitario (Bs)	Costo total (Bs)
Medio de establecimiento	Litro	0.38	10.0	3.8
Medio de multiplicación	Litro	4	34.2	136.7
Medio de enraizamiento	Litro	4	16.2	64.8
Sub total				205.3
Sustrato para aclimatación	kg	27	0.1	2.7
Total				208.3

Cuadro 4. Estimación del costo total por unidad de plantín de tuna forrajera (a partir de 1000 plantines) y precio unitario determinado para comercialización

Materiales	(A) Costo directo (Bs)	(B) Mano de obra (Bs)	(C) Servicios (Bs)
Material vegetal	10	600 (laboratorista)	100 (energía eléctrica)
Medio de micropropagación	208	300 (viverista)	30 (agua)
Equipos	109		
Insumos	144		
Total	471	900	130

Costo total por 1000 plantines: (A) + (B) + (C) = 471 + 900 + 130 = **1501 Bs**

Costo unitario por plantín de tuna forrajera: 1501/1000 = **1.5 Bs**

Precio unitario considerando una utilidad neta de 30%: = **1.95 Bs/plantín**

Un análisis del punto de equilibrio en el caso de las *vitroplantas* generadas, reveló que la cantidad mínima de producción para cubrir los gastos, es de 225 plantines. En caso de que la cantidad sea menor, todo el proceso generaría pérdida, dados los elevados costos de producción, ya que la multiplicación *in vitro* tiene como principal objetivo la propagación de plantines a gran escala, en todas sus diferentes fases. Claro está que si se llegara a producir más de 1000 plantines, el costo unitario se reduciría al optimizar procesos y utilización de equipos.

Conclusiones

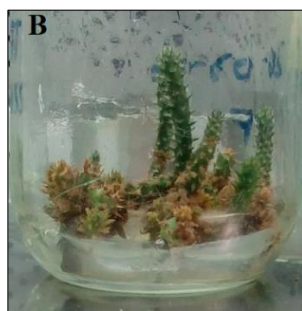
- El medio de cultivo más adecuado para la multiplicación de explantes de tuna forrajera fue el M1 (BAP, AG3, adenina), con el que se alcanzó 11.45 brotes/explante, en 135 días.
- En la fase de enraizamiento, el número de raíces se maximiza al 68.47% de concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS), para una media de 4.75 raíces/explante, en 30 días.

- Los cuatro sustratos evaluados, en la fase de aclimatación, son óptimos por el alto porcentaje de sobrevivencia observado en todos los tratamientos, y por la elevada rusticidad de esta especie.
- El costo directo de producción por plantin de tuna fue de 1.95 Bs tomando en cuenta los costos de los medios de cultivo más óptimos evaluados, con 225 plantines a producir para alcanzar el punto de equilibrio.

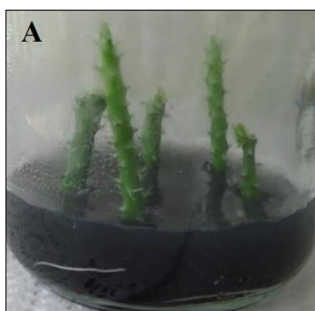
Referencias consultadas

- Aguirre G., Baudoin J., Leigue L. 2010. Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos. Cochabamba, Bolivia. p. 127-132.
- Bayer. 2013 Ácido Giberélico (A.G.3) Fitorregulador Concentrado Soluble. *En línea*. Disponible en: [Acido_Gibe_769_relico_SL\(08-11-13\).pdf](#). Consultado el 23 de mayo de 2017.
- Lazarte L., Achá N. 2016. Recolección y establecimiento de accesiones de tuna (*Opuntia* spp.) en el CIF "La Violeta" y en Pasorapa. **En:** Memoria. XXI Reunión Nacional de ABOPA. Cochabamba, 8 al 10 de septiembre de 2016. CIF-UMSS (ed.). Cochabamba, Bolivia. p. 73-78.
- Ojeda Z., Vázquez A., Santos H., Moreno D.; Aguirre A.; López G., Castellanos J. 2012. Micropropagación de Pitahaya. **En:** X Simposium-Taller Nacional y III Internacional "Producción y Aprovechamiento del Nopal y Maguey". Revista Salud Pública y Nutrición. Edición Especial No. 04. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 128 p.
- Pacheco F. 2015. Micropropagación de tres variedades de nopal (*Opuntia ficus indica* (L.) Miller). Tesis. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. 64 p.
- Sharry S., Adema M., Abedini W. 2015. Plantas de probeta: Manual de para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. 1ra. ed. B. Aires, Argentina. 233 p.
- Spiegel M., Stephens L. 2009. Estadística. 4ta. ed. México 601 p.
- Vásquez M., Gerónimo G., Aguirre G. 2016. Propagación *in vitro* de tuna (*Opuntia ficus-indica*). **En:** Memoria. XXI Reunión Nacional de ABOPA. Cochabamba, 8 al 10 de septiembre de 2016. CIF-UMSS (ed.). Cochabamba, Bolivia. p. 123-127.

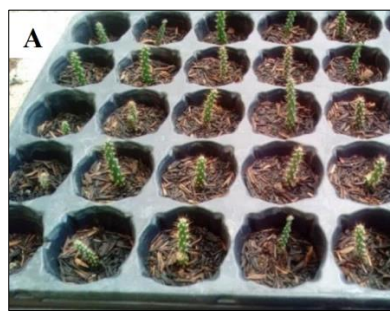
Imágenes de respaldo de las tres fases consideradas en el ensayo:



MULTIPLICACIÓN



ENRAIZAMIENTO



ACLIMATACIÓN

Trabajo recibido el 11 de marzo de 2022 - Trabajo aceptado el 13 de diciembre de 2022