

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN SIMÓN
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES



LA PRACTICA NOS ENSEÑA

Validación del protocolo de micropropagación de tuna forrajera

***Opuntia ficus indica* (L.) Mill., en el CIF La Violeta**

Tesis de Grado para Obtener el

Título de Ingeniera Forestal

PAMELA CHUNGARA MARTINEZ

COCHABAMBA – BOLIVIA

2024

RESUMEN

Opuntia ficus indica (L.) Mill. es una de las opciones para enfrentar la difícil situación de las zonas del Valle Alto y el Cono Sur de Cochabamba, tiene al cambio climático como uno de los factores enemigos para la producción en agricultura y ganadería, como la sequía es constante la tuna forrajera es una especie propia de zonas secas, su utilización como forraje para animales, es un campo que abre muchas posibilidades (CIF, 2024). La micropropagación de la tuna forrajera ayuda a incrementar la tasa de propagación masiva del material priorizado en poco tiempo en comparación a los cultivos tradicionales y replica las características genéticas idóneas. Por ello el estudio tiene como objetivo estandarizar medios de cultivo para la micropropagación de la tuna forrajera *Opuntia ficus indica* (L.) Mill., el trabajo de investigación se realizó en predios del Centro de Investigación en Forrajes CIF “La Violeta”, con material vegetal recolectado de la accesión 38, caracterizada por tener resistencia a la enfermedad de la mancha negra. Para el establecimiento de la tuna forrajera en cultivo *in vitro*, se usó medios de cultivo en base a M&S, teniendo así un 31% de sobrevivencia en E5 (Cytoquininas BA 1 mg/ml, Auxinas IAA 1 mg/ml y carbón activado) adherido con maxim XL e hipoclorito de sodio para la procedencia 3 (Planta madre) en la etapa de establecimiento. Una tasa de 32 explantes en la etapa de multiplicación. Y la formación de al menos 3 raíces, por explante en su mayoría del tipo central en la etapa de enraizamiento. En la etapa de aclimatación se obtuvo un 100 % de prendimiento en el sustrato 2 (40 % de arena, 20 % de tierra vegetal y 40 % de tierra esterilizada). El huerto madre en campo con platines de tuna forrajera *in vitro* presentó un 100 % de sobrevivencia y al cabo de 10 meses se obtuvo un promedio de 4 pisos y 7 pencas por planta.

Palabras clave: Micropropagación, tuna forrajera, *in vitro*, medio de cultivo.

ABSTRACT

Opuntia ficus indica (L.) Mill. is one of the options to face the difficult situation of the areas of the High Valley and the Southern Cone of Cochabamba, has climate change as one of the enemy factors for production in agriculture and livestock, as the drought is constant, the forage prickly pear is a species typical of dry areas, its use as fodder for animals, it is a field that opens up many possibilities (CIF, 2024). The micropropagation of forage prickly pear helps to increase the mass propagation rate of the prioritized material in a short time compared to traditional crops and replicates the ideal genetic characteristics. Therefore, the study aims to standardize culture media for the micropropagation of the forage prickly pear *Opuntia ficus indica* (L.) Mill., the research work was carried out on the premises of the CIF Forage Research Center "La Violeta", with plant material collected from accession 38, characterized by having resistance to black spot disease. For the establishment of the forage prickly pear in *in vitro* culture, culture media based on M&S was used, thus having a 31% survival rate in E5 (Cytokinins BA 1 mg/ml, Auxins IAA 1 mg/ml and activated charcoal) adhered with maxim XL and sodium hypochlorite for provenance 3 (Mother plant) in the establishment stage. A rate of 32 explants in the multiplication stage. And the formation of at least 3 roots, mostly by explant of the central type in the rooting stage. In the acclimatization stage, 100% of the attachment was obtained in substrate 2 (40% sand, 20% topsoil and 40% sterilized soil). The mother orchard in the field with *in vitro* forage prickly pear platins showed 100% survival and after 10 months an average of 4 floors and 7 leaves per plant was obtained.

Key words: Micropropagation, fodder prickly pear, *in vitro*, culture medium.

I. INTRODUCCIÓN

La *Opuntia ficus indica* L. Mill, llamada también tuna, se origina en América Tropical y Sub Tropical y hoy día se encuentra en una gran variedad de condiciones agroclimáticas, en forma silvestre o cultivada, en todo el continente americano. Además, se ha difundido a África, Asia, Europa y Oceanía, donde también se la cultiva o se encuentra en forma silvestre (Paucara, 2017).

Según Anaya (2003), citado en Campos et al.(2016), “*Opuntia* es una planta típica del paisaje mexicano, la cual, junto al maíz y el agave, han sido alimentos básicos para grupos étnicos del Centro y Norte de México”.

Opuntia ficus indica pertenece a la familia de las cactáceas, y es una especie que se desarrolla principalmente en regiones áridas y semiáridas, así lo afirman Flores et al. (1995), es endémica del continente americano, se encuentra expandida en muchos países como Chile, Perú, Colombia, Argentina, Bolivia.

La tuna es bien conocida en Bolivia, donde se la somete a múltiples usos. La producción se concentra en Cochabamba, Chuquisaca, Sucre, Tarija y La Paz, en áreas con 350-640 mm de lluvia anual y a altitudes de 1 500 a 3 000 msnm (Ochoa y Barbera, 2018).

Opuntia es un género de plantas subutilizado en nuestro medio, sobre todo como forraje. Con esta finalidad, tiene una serie de ventajas, que van desde la eficiencia en la utilización de agua para su desarrollo, hasta su capacidad de sobrevivir y/o desarrollarse en condiciones extremas de aridez, donde otras especies no prosperan, debido a su amplia plasticidad ecológica y rusticidad.

Hoy en día, el cultivo *in vitro* es una de las herramientas biotecnológicas de mayor aplicación en la agricultura, ya que resuelve una gran cantidad de problemas que antes se tenían. Mediante el cultivo de tejidos vegetales (CTV), llamado también cultivo *in vitro*, se puede llegar a la producción masiva de nuevos individuos deseables bajo condiciones físicas y químicas controladas (Garza et al., 2005).

Según Pérez-Molphe et al. (2002), durante los últimos años, el cultivo de tejidos de plantas ha emergido como una herramienta poderosa para la efectiva propagación de cactus. Esta técnica tiene el potencial de producir muchas plantas en un periodo corto de tiempo, en un espacio reducido y su funcionalidad se ha demostrado para muchas especies de cactus. Sin embargo, cada especie responde de manera diferente a las condiciones establecidas para la multiplicación *in vitro*, el enraizamiento y la aclimatación; por tal motivo es necesario optimizar estas condiciones de cultivo para cada especie de cactus que deba ser micropropagada.

El presente estudio fue elaborado en el marco del Programa *Difusión de la tuna forrajera como acción de resiliencia frente al cambio climático, en la producción animal, en el Valle Alto y Cono Sur del departamento de Cochabamba*. En resumen, el Programa plantea producir pencas de tuna de una variedad seleccionada, la cual -por ahora- se la denomina como Acceso 38 por el Centro de Investigación en Forrajes “La Violeta” (CIF); este material muestra evidentes características sobresalientes que la sitúan como una opción técnica para un manejo forrajero.

A partir del germoplasma de tuna forrajera, seleccionado en el CIF “La Violeta” (acceso 38), se pretende realizar la validación de protocolos desarrollados por Ugarte y Vargas (2019), de cada etapa de la micropropagación de tuna, a fin de contar con un protocolo que permita una propagación eficiente y eficaz de esta acceso 38, que presenta una cierta tolerancia a la mancha negra, coadyuvando a generar clones que evitarán la diseminación de esta enfermedad.

Índice de contenido

	Pág.
I. INTRODUCCION.....	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 <i>Objetivo general</i>	3
1.1.2 <i>Objetivos específicos</i>	3
1.2 Hipótesis y/o pregunta de investigación.....	3
II. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1 Consideraciones generales de la tuna forrajera	4
2.2 Importancia de la tuna forrajera a nivel mundial.....	5
2.3 Importancia de la tuna forrajera en Bolivia.....	6
2.4 Descripción botánica de <i>Opuntia ficus indica</i> (L.) Miller.....	7
2.4.1 <i>Taxonomía</i>	7
2.4.2 <i>Morfología</i>	8
2.4.3 <i>Raíces</i>	12
2.4.4 <i>Consideraciones fisiológicas</i>	13
2.5 Valor nutritivo	13
2.6 Requerimientos para el cultivo de la tuna forrajera.....	14
2.7 Enfermedades y plagas de la tuna forrajera.....	15
2.7.1 <i>La cochinilla</i>	16
2.7.2 <i>La mancha negra</i>	16
2.7.3 <i>Pudrición de raíces y tallos por Armilaria</i>	17
2.8 Usos de la tuna forrajera.....	18
2.9 Aprovechamiento de la tuna.....	18
2.10 Biotecnología.....	19
2.10.1 <i>Cultivo in vitro</i>	19
2.10.2 <i>Medio de cultivo</i>	21
2.10.3 <i>Desinfección del explante in vitro</i>	22
2.10.4 <i>Fases del cultivo in vitro</i>	22
2.10.4.1 <i>Etapas de establecimiento</i>	23
2.10.4.2 <i>Etapas de multiplicación</i>	23

2.10.4.3	Etapa de enraizamiento.....	24
2.10.4.4	Etapa de aclimatación.....	25
2.10.5	Importancia de clonar para evitar las enfermedades.....	25
2.10.6	Tuna forrajera in vitro.....	26
2.10.7	Estudios realizados en la tuna forrajera in vitro.....	26
III.	MATERIALES Y METODOS.....	28
3.1	Ubicación.....	28
3.2	Materiales y equipos.....	29
3.2.1	Material vegetal.....	29
3.2.2	Material de laboratorio.....	29
3.2.3	Equipos de laboratorio.....	29
3.2.4	Reactivos (productos químicos).....	29
3.2.5	Material de campo.....	30
3.3	Metodología.....	30
3.3.1	Recolección.....	30
3.3.2	Desinfección.....	31
3.3.3	Establecimiento.....	33
3.3.4	Multiplicación.....	35
3.3.5	Enraizamiento.....	36
3.3.6	Aclimatación.....	37
3.6.7	Establecimiento de huerto madre de tuna forrajera in vitro.....	38
3.4	Diseño experimental.....	39
3.4.1	Tratamientos por etapa.....	39
3.4.2	Variables de respuesta por etapa.....	39
3.4.3	Modelo estadístico por etapa.....	39
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	41
4.1	Etapa de recolección de la tuna forrajera.....	41
4.1.1	Características morfológicas de la tuna forrajera (<i>Opuntia ficus indica</i> L. Mill) accesión 38.....	41
4.2	Etapa de establecimiento de la tuna forrajera.....	47
4.2.1	Desinfección del material vegetal recolectado.....	47

4.2.2	<i>Establecimiento del material vegetal</i>	48
4.2.3	<i>Evaluación de la contaminación por hongos y/o bacterias</i>	49
4.2.4	<i>Evaluación de oxidación/fenolización</i>	50
4.2.5	<i>Evaluación en la etapa de establecimiento de la tuna forrajera</i>	51
4.3	<i>Etapas de multiplicación de la tuna forrajera</i>	62
4.3.1	<i>Evaluación en la etapa de multiplicación de la tuna forrajera</i>	67
4.3.2	<i>Número de brotes</i>	71
4.3.3	<i>Validación de protocolo en etapa de establecimiento y multiplicación</i>	71
4.4	<i>Etapas de enraizamiento de la tuna forrajera</i>	75
4.4.1	<i>Evaluación en la etapa de enraizamiento de tuna forrajera</i>	76
4.4.2	<i>Evaluación de contaminación y sobrevivencia en la etapa de enraizamiento</i>	77
4.4.3	<i>Número de raíces</i>	78
4.5	<i>Etapas de aclimatación de tuna forrajera</i>	78
4.5.1	<i>Pre aclimatación</i>	78
4.5.2	<i>Aclimatación</i>	80
4.5.3	<i>Evaluación en la etapa de aclimatación de la tuna forrajera</i>	81
4.6	<i>Establecimiento de huerto madre de tuna forrajera in vitro</i>	87
4.6.1	<i>Resultados del huerto madre de tuna forrajera in vitro</i>	90
V.	CONCLUSIONES	95
VI.	RECOMENDACIONES	97
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

Índice de cuadros

	Pág.
Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Opuntia ficus indica</i> (L.) Miller.....	8
Cuadro 2. Comparación de características de plantas en condiciones de laboratorio y naturales.	20
Cuadro 3. Medios de cultivo en base a M&S para la etapa de establecimiento.	34
Cuadro 4. Medios de cultivo en base a M&S para la etapa de multiplicación	35
Cuadro 5. Medios de cultivo en base a M&S para la etapa de enraizamiento.....	37
Cuadro 6. Características de la tuna forrajera accesión 38.	41
Cuadro 7. Procedencias de recolección del material vegetal de la tuna forrajera.....	43
Cuadro 8. Proyección de explantes de la tuna forrajera <i>in vitro</i>	70
Cuadro 9. ANVA para el número de brotes.....	71
Cuadro 10. Proyección de explantes establecidos en el medio M1.	73
Cuadro 11. ANVA para el número de raíces.	78
Cuadro 12. Resumen de resultados del desarrollo de los plantines de tuna forrajera <i>in vitro</i>	93

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Penca o Cladodio de <i>Opuntia ficus indica</i> (L.) Miller.....	9
Figura 2. Flor de <i>Opuntia ficus indica</i> (L.) Miller.....	10
Figura 3. Fruto de <i>Opuntia ficus indica</i> (L.) Miller.....	10
Figura 4. Areola de <i>Opuntia ficus indica</i> (L.) Miller.....	11
Figura 5. Espinas y gloquideas de <i>Opuntia ficus indica</i> (L.) Miller.....	12
Figura 6. Mapa de ubicación del Centro de Investigación en Forrajes (CIF) “La Violeta”.....	28
Figura 7. Recolección de la tuna forrajera.....	30
Figura 8. Desinfección de la tuna forrajera con formol.....	31
Figura 9. Desinfección de la tuna forrajera con hipoclorito de sodio.....	32
Figura 10. Desinfección de la tuna forrajera con formol e hipoclorito de sodio.....	32
Figura 11. Desinfección de la tuna forrajera con maxim XL e hipoclorito de sodio.....	33
Figura 12. Introducción de la tuna forrajera.....	34
Figura 13. Tuna forrajera ya establecida.....	35
Figura 14. Multiplicación de la tuna forrajera.....	36
Figura 15. Enraizamiento de la tuna forrajera.....	36
Figura 16. Aclimatación de la tuna forrajera.....	37
Figura 17. Establecimiento de la tuna forrajera <i>in vitro</i> en campo.....	38
Figura 18. Recolección de brotes de la tuna forrajera.....	45
Figura 19. Brotes recolectados.....	46
Figura 20. Desinfección del material vegetal.....	47
Figura 21. Establecimiento de la tuna forrajera.....	48
Figura 22. Material vegetal establecido de tuna forrajera.....	49
Figura 23. Material vegetal contaminado.....	50
Figura 24. Evaluación de oxidación/fenolización.....	51
Figura 25. Porcentaje de contaminación y oxidación/fenolización, en el material vegetal de la tuna forrajera, de la procedencia 1.....	52
Figura 26. Porcentaje de sobrevivencia, del material vegetal de la tuna forrajera, de la procedencia 1.....	53

Figura 27. Porcentaje de contaminación y oxidación/fenolización, en el material vegetal de la tuna forrajera, de la procedencia 2.....	55
Figura 28. Porcentaje de sobrevivencia, en el material vegetal de la tuna forrajera, de la procedencia 2.	56
Figura 29. Porcentaje de contaminación y oxidación/fenolización, en el material vegetal de la tuna forrajera, de la procedencia 3.....	57
Figura 30. Porcentaje de sobrevivencia, en el material vegetal de la tuna forrajera, de la procedencia 3.	58
Figura 31. Porcentaje de contaminación y oxidación/fenolización, en el material vegetal de la tuna forrajera, de la procedencia 4.....	59
Figura 32. Porcentaje de sobrevivencia, en el material vegetal de la tuna forrajera, de la procedencia 4.	60
Figura 33. Porcentaje de contaminación y oxidación/fenolización, en el material vegetal de la tuna forrajera, de la procedencia 5.....	61
Figura 34. Porcentaje de sobrevivencia en el material vegetal de la tuna forrajera, de la Procedencia 5.....	62
Figura 35. Brotes nuevos de la tuna forrajera establecida en condiciones <i>in vitro</i>	63
Figura 36. Multiplicación de la tuna forrajera.....	64
Figura 37. Desarrollo de nuevos brotes de explantes multiplicados.....	65
Figura 38. Explantes multiplicados.....	66
Figura 39. Tasa de multiplicación de la tuna forrajera.....	67
Figura 40. Evaluación de sobrevivencia.	68
Figura 41. Evaluación de contaminación.....	69
Figura 42. Tuna forrajera <i>in vitro</i> en cámara de crecimiento.....	69
Figura 43. Tasa de multiplicación en el medio de cultivo M1.....	72
Figura 44. Explantes de tuna de Ugarte y Vargas (2019).	72
Figura 45. Evaluación de número de raíz y tipo de raíz.....	76
Figura 46. Evaluación, número de raíces y tipo de raíz.	76
Figura 47. Porcentaje de contaminación, para la etapa de enraizamiento.....	77
Figura 48. Pre aclimatación de la tuna forrajera <i>in vitro</i>	79
Figura 49. Plantines de tuna aclimatados.....	80

Figura 50. Plantines de tuna forrajera podridos.	81
Figura 51. Plantines de tuna forrajera aclimatados, primer grupo.	82
Figura 52. Evaluación de número de pencas y número de brotes.	83
Figura 53. Evaluación del desarrollo de la tuna forrajera.	84
Figura 54. Evaluación al desarrollo de la tuna forrajera aclimatada.	84
Figura 55. Plantines de tuna forrajera aclimatados, segundo grupo.	85
Figura 56. Evaluación del número de pencas y número de brotes.	86
Figura 57. Evaluación del desarrollo de la tuna forrajera.	86
Figura 58. Traslado de la tuna forrajera al terreno.	87
Figura 59. Terreno con plantación de tuna forrajera <i>in vitro</i>	88
Figura 60. Preparación del terreno y plantación de la tuna forrajera.	88
Figura 61. Plantio de la tuna forrajera <i>in vitro</i>	89
Figura 62. Plantación de tuna forrajera.	89
Figura 63. Evaluación del número de pencas y número de brotes.	90
Figura 64. Evaluación del desarrollo de la tuna forrajera ya establecida en campo.	91
Figura 65. Evaluación, largo, ancho y espesor de la tuna forrajera <i>in vitro</i> en campo.	91
Figura 66. Evaluación de la tuna forrajera establecida en campo.	92
Figura 67. Parcela de tuna forrajera <i>in vitro</i> en campo.	93
Figura 68. Tuna forrajera evaluada, establecida en el huerto madre.	94