

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

La ganadería en Bolivia constituye uno de los pilares fundamentales del sector agropecuario y de la economía nacional. El país cuenta con un hato bovino que supera los 11 millones de cabezas, siendo el departamento de Santa Cruz el principal productor, con aproximadamente el 45% del total nacional, seguido por Beni, que junto a Santa Cruz concentra cerca del 75% del hato bovino del país. (Fundación Solón, 2021)

La problemática forrajera en la ganadería de Bolivia es uno de los principales desafíos que enfrenta el sector, afectando directamente la productividad y sostenibilidad de los sistemas ganaderos. En las tierras bajas y regiones chaqueñas, la ganadería se desarrolla mayoritariamente bajo sistemas extensivos e ineficientes, caracterizados por el escaso manejo de pastizales naturales y la limitada siembra de especies forrajeras adaptadas a los ecosistemas locales. Esta situación genera una baja carga animal y, en consecuencia, una baja productividad del hato, además de contribuir a la degradación de suelos, deforestación y emisiones de gases de efecto invernadero. (CIPCA, 2023)

La escasez de forraje se agrava durante los periodos de sequía, como se observa en el Chaco, los valles de Tarija y Santa Cruz, donde la falta de lluvias provoca la reducción del crecimiento de pastos, el secado de los reservorios de agua y el deterioro de la condición corporal del ganado. Esta situación obliga a los productores a vender animales a precios bajos para reducir la carga sobre campos que ya no proveen alimento suficiente, generando pérdidas económicas y poniendo en riesgo la seguridad alimentaria de las familias ganaderas. (El País, 2024; ValorAgro, 2024)

Ante este escenario, surge la Tuna Forrajera (*Opuntia ficus indica*) como una alternativa para la alimentación de ganado caprino, ovino, bovino, entre otros. La introducción y promoción de la tuna forrajera se dio más activamente a partir de los años 2000, especialmente en regiones áridas del altiplano y valles secos (Potosí, Chuquisaca, Tarija, Oruro), instituciones como PROINPA y FAO han desarrollado

proyectos para implementar bancos de forraje basados en *Opuntia* como estrategia de adaptación al cambio climático. (PROINPA, 2014)

Sin embargo, no se logra obtener información estadística de la producción en Centros experimentales, entidades públicas o privadas, que permitan escalar en la modificación del cultivo de tuna forrajera,

El SIIP (2025) reporta que a nivel nacional en Bolivia existen 1690 ha de tuna para fruta, de las cuales 794 Has están en La Paz, 396 Has en Potosí y 273 en Cochabamba.

Descripción del problema

El nopal forrajero (*Opuntia ficus - indica L.*) es una planta de gran importancia en regiones áridas y semiáridas debido a su capacidad de adaptación a condiciones climáticas extremas y su uso como alimento para el ganado. Sin embargo, su reproducción presenta desafíos significativos, siendo que la reproducción asexual del nopal se realiza comúnmente mediante esquejes o cladodios (segmentos de la planta) garantizando la clonación exacta de la planta madre, este método presenta los siguientes principales inconvenientes:

Lentitud: El enraizamiento y el establecimiento de nuevos individuos a partir de esquejes es un proceso lento, lo que limita la rápida expansión de los cultivos.

Enfermedades: La propagación a través de esquejes puede llevar a la diseminación de enfermedades y plagas, ya que los patógenos presentes en la planta madre se transmiten a los clones.

Los agricultores que producen tuna, año tras año emplean como material de siembra “semillas” obtenidas de sus propias plantas, las que por su continua reutilización en numerosas campañas agrícolas han atravesado un proceso gradual de degeneración y además han acumulado enfermedades crónicas, especialmente del tipo de virus, bacterias y nematodos.

Al respecto, diversos autores indican que el empleo de semillas degeneradas e infectadas por virus provocan pérdidas importantes en los rendimientos, que van del 25 al 70 % de acuerdo a las especies cultivadas (Martínez, 2002).

Tradicionalmente el control de este tipo de enfermedades se realiza mediante una rigurosa selección de plantas no infectadas para que luego sean empleadas como semilla. Sin embargo, en la práctica esto es muy difícil y sus resultados poco confiables dada la naturaleza microscópica de los hongos y bacterias patógenas, así como la dimensión molecular de las virosis.

La falta de producción de semillas de calidad (cladodios semilla certificados), además de provocar bajos rendimientos favorece la diseminación de plagas, las que vía semillas van infestando cada vez mayores áreas de cultivo, y en muchos casos imposibilitan el desarrollo exitoso de cultivos.

Un aspecto determinante para la falta de producción local de semillas de alta calidad (semillas prebásicas), es que su obtención y producción masiva a nivel comercial, implica la realización de trabajos especializados en un Laboratorio de Cultivo *in vitro* de plantas aplicando técnicas de micropropagación en la Tuna forrajera, para posteriormente llevarlas a jaulas antiáfidos y luego a campo para obtener plantas madre.

En este contexto, en la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales se cuenta con el Laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro*, instancia que en coordinación con autoridades facultativas se ha planteado, en el corto plazo, desarrollar trabajos de investigación en la micropropagación de cultivos estratégicos del departamento de Tarija, y entre estos cultivos se priorizó la Tuna Forrajera en tres ecotipos (Aguayarence, Tolaba y Vallejas) como parte de una estrategia de mejorar la producción agropecuaria de nuestra región.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el desarrollo de los tres ecotipos de nopal forrajero (*Opuntia ficus – indica* L.), Aguarayense, Tolaba y Vallejas en la fase de establecimiento *in vitro*, a través del análisis de regeneración en el laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro* de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales.

Objetivos específicos.

- Implementar una estrategia de desinfección en los explantes de nopal forrajero (*Opuntia ficus - indica* L.), a través de la fase de establecimiento del cultivo *in vitro*.
- Evaluar los tres ecotipos de nopal forrajero (*Opuntia ficus – indica* L.), en tres medios de cultivos en la fase de establecimiento *in vitro*, a través del análisis de regeneración.

Hipótesis

Hi1. Entre las tres ecotipos de nopal forrajero, una mostrara una mejor regeneración en los tres medios de cultivo evaluados.

Hi2. Entre los tres medios de cultivo, uno mostrara cual es el más óptimo para el desarrollo de los tres ecotipos de nopal.

MARCO TEÓRICO

1.1.Tuna forrajera (*Opuntia ficus indica* L.)

La evolución del género *Opuntia* en ambientes áridos y semiáridos, donde distintas situaciones ambientales imponen limitantes a la sobrevivencia y productividad de las plantas del desierto, ha conducido a desarrollar características adaptativas en su anatomía, morfología y fisiología, mencionan que 10 la especie *Opuntia ficus-indica* es entre las cactáceas, la de mayor importancia agrícola, tanto por sus frutos como por sus tallos que sirven de forraje o pueden ser consumidos como verduras.

El nopal es una planta suculenta que mide de media entre 1,5 y 3 metros de altura. Los tallos (cladodios o “palas”) son aplanados y de color verde grisáceo. Las flores son de color amarillo y los frutos varían entre el amarillo, el rojo y el púrpura y contienen pequeñas semillas que en general se consumen junto con la carne del fruto. La planta se reproduce mediante semillas, pero también puede propagarse con relativa facilidad de forma vegetativa a partir de tallos desprendidos. (FAO, 2026)

1.2.Origen

Opuntia ficus-indica, es entre la cactáceas de mayor importancia agronómica, tanto por sus sabrosos frutos como por sus tallos que sirven de forraje o pueden ser como verdura. El mejoramiento genético que ha sufrido se remonta a la época prehispánica; los cronistas de indias ya relatan sobre estas plantas y sus frutos, que fueron llevadas a España posiblemente en el primer o segundo viaje de Colon a América, aunque el primer registro cierto es para México, en 1515 (Fernández de Oviedo, 1535). En el siglo XVII los navegantes la distribuyen en gran parte del mundo, ya que la consumían en ensaladas por sus propiedades antiescorbúticas. En Bolivia fue introducida por los conquistadores españoles. (Kiesling, 2016)

1.3.Taxonomía

Según Scheinvar, citado por Barbera *et al.* (1999), La taxonomía de esta especie es complicada por diferentes razones, sus fenotipos, que varían en gran medida de acuerdo a las condiciones ecológicas y la poliploidía, con un gran número de poblaciones que

se reproducen vegetativa y sexualmente, así como a la existencia de numerosos híbridos inter específicos ya que casi todas las especies florecen durante el mismo periodo del año y no hay barreras biológicas que las separen.

Según Robles y Julio (2009), el primer nombre español de la tuna fue Higo de las Indias, que alude a su origen, las "Nuevas Indias" y de allí su primer nombre científico: *Cactus ficus-indica* L. El nombre *ficus-indica* había sido usado en "frases diagnósticas" ya mucho antes de Linneo, para designar varias especies.

Aun no existen variedades registradas por el INIAF sobre la tuna en nuestro país. Pero en México hay registradas más de 300 especies según de tuna y 104 especies y variedades. (Vilte, 2018)

Reino Vegetal

Sub reino *Embryophita*

División *Angiospermae*

Clase *Dicotyledonea*

Sub clase Dialipétalas

Orden *Opuntiales*

Familia *Cactaceae*

Subfamilia *Opuntioideae*

Tribu *Opuntiae*

Genero *Opuntia* y *Nopalea*

Especie *Opuntia ficus-indica*

Nombre vulgar Tuna

Fuente: Barrientos citado por Abraján, M. 2008.

1.4.Descripción botánica

1.4.1. El tallo

La tuna es un vegetal arborescente de 3 a 5 m de alto, su tronco es leñoso y mide de entre 20 a 50 cm de diámetro. El tallo, a diferencia de otras especies de cactáceas, está conformado por un tronco y ramas aplanadas que posee cutícula gruesa de color verde de función fotosintética y de almacenamiento de agua en los tejidos. (Robles & Amaya, 2009)

Figura 1: Tallo de Tuna forrajera (*Opuntia ficus indica* L.)



Nota: Planta adulta mostrando los cladodios que forman el tallo (Cladodios). (Shutterstock, 2024)

Las pencas denominadas cladodios de 30 a 60 cm de largo x 20 a 40 cm de ancho y de 2 a 3 cm de espesor. Sus ramas están formadas por pencas de color verde opaco con 10 areolas que contienen espinas más o menos numerosas de color amarillas. Estas estructuras transforman la luz en energía química a través de la fotosíntesis y están recubiertas por una cutícula del tipo lipídica, interrumpida por la presencia de estomas, los mismos que permanecen cerrados durante el día. La cutícula del cladodio evita la deshidratación provocada por las altas temperaturas del verano. La hidratación normal del cladodio alcanza hasta un 95% de agua en peso. (Robles & Amaya, 2009).

1.4.2. Hojas

Sólo en cladodios internos, transformadas en espinas en forma de garra, engrosadas en su base, para defensa; las caducas sólo se observan sobre tallos tiernos. Cuando se produce la renovación de pencas, en cuyas axilas se hallan las aureolas de las cuales brotan las espinas, de aproximadamente 4 a 5 mm de longitud. Las hojas desaparecen cuando las pencas han alcanzado un grado de desarrollo y en cuyo lugar quedan las espinas. (Robles & Amaya, 2009)

Figura 2: *Hojas o cladodios de la Opuntia ficus-indica.*



Nota: (shutterstock, 2024).

1.4.3. Flores

Son solitarias, localizadas en la parte superior de la penca, de 6 a 7 cm de longitud. Cada aréola produce por lo general una flor, aunque no en una misma época de floración, unas pueden brotar el primer año, otras el segundo y tercero. Las flores se abren a los 35 a 40 días de su brotación. Sus pétalos son de colores vivos: amarillo, anaranjado, rojo, rosa. (Robles & Amaya, 2009)

Figura 3: *Flores de tuna.*



Nota: Diversidad de tonalidades de las flores de tuna. (shutterstock, 2024).

1.4.4. Fruto

Es una baya polisperma de forma ovoide esférica de color verde y toma diferentes colores cuando maduran, son comestibles, agradables y dulces; la pulpa es gelatinosa conteniendo numerosas semillas, sus dimensiones y coloración varían según la especie; espinas finas y frágiles de 2 a 3 mm de longitud. (Robles & Amaya, 2009)

Figura 4: *Frutos de tuna*



Nota: Diversidad de formas y colores de frutos de tuna. (shutterstock, 2024).

1.4.5. Areolas

Son depresiones en la epidermis de la planta, de donde nacen las espinas, pelos o cerdas y las hojas. Tienen yemas, lo cual les da la capacidad de generar ramificación y flores. Como también la capacidad de desarrollar nuevos cladodios, flores y raíces según las condiciones ambientales. (Vilte, 2018)

Figura 5: Areola de la *Opuntia ficus-indica*



Nota: Areola de la *Opuntia ficus-indica*. (shutterstock, 2024).

1.4.6. Espinas

Las espinas se originan de las areolas, es decir de las yemas de tejidos interiores de la planta. Están constituidas por tejidos muertos y mineralizados generalmente duros. Sin embargo, también hay delicadas, como cerdas e incluso como pelos. Algunos cactus, relativamente pocos y la mayoría epífitos, no desarrollaron espinas, las tienen latentes. Sus funciones son varias: protección contra los herbívoros, como centro de condensación (al enfriarse el aire la humedad ambiente se condensa sobre ellas), también permiten que el agua se deslice por la superficie, llegue a la base de la espina y caiga al suelo para ser absorbida por las raíces superficiales. Hay espinas de distintas formas: cilíndricas, cónicas, aplanadas, rectas, curvas, ganchudas, el tamaño es muy variable, desde muy pequeñas hasta de 20 cm o más, como en *Opuntia quimilo*. (Vilte, 2018)

Figura 6: Espinas del *Opuntia ficus-indica*.



Nota: Espinas del *Opuntia ficus-indica*. (shutterstock, 2024).

1.4.7. Gloquidio La subfamilia Opuntiodiae tiene en cada areola un verdadero cepillo de espinas pequeñas, los gloquidios (en nuestro medio conocido como quepus) que se desprenden muy fácilmente por tener la base débil. La superficie de los gloquidios es áspera, ya que un extremo de sus células superficiales se separa, de modo que al penetrar en la carne, es difícil extraerlos ya que actúan como anzuelos. (Vilte, 2018)

Figura 7: Gloquidios de la tuna.



Nota: Gloquidios de la tuna. (shutterstock, 2024).

1.4.8. Raíces

El sistema radicular es muy extenso, densamente ramificado, rico en raíces finas absorbentes y superficiales en zonas áridas de escasa pluviometría. La longitud de las raíces está en relación con las condiciones hídricas y con el manejo cultural, especialmente el riego y la fertilización. Las raíces pueden contribuir para la tolerancia a condiciones de sequía en tres formas:

- Restringiendo la superficie radicular y reduciendo su permeabilidad al agua.
 - Absorbiendo rápidamente la pequeña cantidad de agua suplementada por lluvias ligeras vía “raíces de lluvia” o vía la reducción de la superficie radicular desde donde fluye el agua.
 - Reduciendo la transpiración debido a un alto potencial negativo radicular.
- (Vilte, 2018)

1.5. Definición de ecotipo

El ecotipo es una subpoblación genéticamente diferenciada que está restringida a un hábitat específico, un ambiente particular o un ecosistema definido, con unos límites de tolerancia a los factores ambientales. El ecotipismo es una forma de variación asociada al medio y no implica necesariamente la separación de poblaciones en áreas geográficas aisladas entre sí. En opinión de algunos ecólogos el término es algo ambiguo. Es una misma especie que en ambientes diferentes tienen una expresión fenotípica distinta por la interacción de los genes con el medio ambiente. (Boletín Agrario, 2013)

1.6. Requerimientos Climáticas de *Opuntia ficus indica*

1.6.1. Luz

El nopal tiene una marcada preferencia por la luz solar abundante, prosperando en entornos con abundante sol, similares a los de su hábitat original. Para garantizar un crecimiento sano, debe estar expuesta a mucha luz solar; la sombra parcial es tolerable, pero no ideal.

El nopal necesita una alta exposición a la luz solar. Se recomienda un mínimo de 6 a 8 horas diarias de luz directa para un buen desarrollo. (MiniHuerto, 2024)

1.6.2. Temperatura

El entorno de crecimiento nativo relacionado con los requisitos de temperatura de nopal son las regiones templadas con inviernos suaves y veranos calurosos. La planta prefiere un rango de temperaturas de 15 a 38 °C (59 a 100 °F). En invierno, la planta puede tolerar temperaturas de hasta -6,7 °C (20 °F) si se mantiene seca. Durante el verano, es esencial proporcionar algo de sombra para evitar el sobrecalentamiento. En primavera y otoño, la planta puede adaptarse a temperaturas que oscilan entre 4,4 y 26,7 °C (40 y 80 °F). (MiniHuerto, 2024)

El nopal puede soportar temperaturas hasta de 65 °C por una hora. (García, 2021)

1.7. Plagas de la Tuna forrajera.

1.7.1. Fungosis Pudrición acuosa o húmeda (*Phytophthora cactarum*).

Síntomas: Se presentan sitios suaves en pudrición en las tunas.

Control: Puede aplicarse productos a base de cobre. (Monroy, 2010)

Figura 8: Fungosis Pudrición acuosa o húmeda (*Phytophthora cactarum*).



Nota: El hongo causante es *Phytophthora*. En la base de los tallos se observa una decoloración parda o negruzca. Las partes atacadas se pudren. El desarrollo del hongo,

al igual que *Fusarium*, es favorecido por el exceso de riego. Evita los encharcamientos y destruye las plantas enfermas, (InfoJardin, 2023).

1.7.2. Mancha plateada (*Phytophthora* spp., y *Mycosphaerella* spp.).

Síntomas: rompimiento de la epidermis de las pencas y muerte de tejido (manchas necróticas).

Control: Realizar podas sanitarias puede aplicarse compuestos a base de cobre como oxiclورو de cobre. (Monroy, 2010).

Figura 9: *Mancha plateada* (*Phytophthora* spp., y *Mycosphaerella* spp.).



Nota: La mancha plateada o manchas necróticas en cactus, a menudo asociadas a hongos como *Mycosphaerella* spp., se caracterizan por áreas hundidas, oscuras o descoloridas (pueden parecer plateadas, secas o acorchadas) debido al exceso de humedad y falta de ventilación, (InfoJardin, 2023).

1.7.3. Bacteriosis Manca negra (*Pseudomonas* spp.).

Síntomas: Pudrición de las paletas, hay decoloración de cutícula, cambia de color claro con puntas pequeñas color olivo; las manchas se tornan café oscuro, el diámetro se incrementa de 3 a 4 cm con margen amarillo, la parte central se hunde, secándose, la póstula se desprende dejando un orificio.

Control: Eliminar las paletas podridas y quemarlas. En caso requerido asperjar caldo o mezcla bordelesa. (Monroy, 2010).

Figura 10: *Bacteriosis Manca negra*



Nota: Los tejidos internos se encuentran reblandecidos y descompuestos. Favorecen la infección la humedad excesiva y el frío (grietas por heladas), (InfoJardin, 2023).

1.7.4. Escarabajo barrenador: (Torito) *Moneilema variolaris* Thompson.

Identificación: el macho adulto es negro brillante, las hembras tienen manchas grises, antenas largas, cuerpo oval y duro. La larva color blancuzco de 4 cm de largo con cuerpo rugoso y cabeza rojiza.

Biología y daños: hacen túneles causando pudrición, debilitamiento y pérdida parcial o total de la planta.

Control: eliminación de larvas en los meses de noviembre a marzo cuando se detectan masas de goma endurecida en la base de las plantas, mediante extracciones manuales o mecánicas.

Control químico: Endosulfán ó Malatión. En s áreas detectadas con incidencia de los adultos, (Monroy, 2010)

1.7.5. Grana o cochinilla: *Dactylopius indicus* Green

Biología y hábitos: oviposita en promedio de 150 a 160 huevos. El daño inicia en la parte basal de la planta, aparecen masas como algodón, en su interior está el insecto, al ser aplastado libera una sustancia color roja o carmín. Causa caída de frutos, pérdida de vigor y muerte de la planta.

Control: eliminar colonias con barrido mecánico. Aplicar 3 veces por semana solución de detergente biodegradable 5gr/litro de agua, en las plantas infectadas. El control

biológico natural es la catarinita *Chilocorus cacti* (Coleoptera: *Coccinelidae*) las cuales devoran a las hembras. Aplicación de productos botánicos como Bioshampoo ó Clorpirifos etil.

Control químico: por medio de aspersión de Malatión, Paratión metílico ó Triclorfón. (Monroy, 2010)

Figura 11: *Cochinilla*



Nota: La cochinilla es un insecto (*Dactylopius coccus* costa) que se instala, como parásito, en las hojas de la tuna (*Opuntia picus* cactil), de cuya savia se nutre a través de un estilete bucal. (Caillahua, 2011)

1.7.6. Trips: *Sericothrips opuntiae* Hood

Identificación: adultos miden 1.0 mm de tamaño con color amarillo o pálidos.

Biología y daños: el ciclo de vida de huevo a adulto es de 20 a 30 días. Condiciones secas y cálidas favorecen el desarrollo y reproducción. Los daños inician en la brotación de yemas foliares y vegetativas. Al raspar y succionar la savia de pencas y frutos, las ninfas y adultos provocan la formación de manchas color amarillo o plateado y excrementos oscuros que posteriormente se secan provocando pérdidas de frutos y partes vegetativas. Merma calidad de frutos además de ser vector de virus.

Control: control físico con trampas azules o amarillas con pegamento 6/ha. En caso necesario aplicar en aspersión: Malatión ó Paratión metílico (puede ser fitotóxico). (Monroy, 2010)

Figura 12: *Trips del nopal*



Nota: Se observan áreas fuertemente desecadas con costras amarillentas dándole un aspecto roñoso en el fruto, Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de México, (2015).

1.8.Propagación

1.8.1. Propagación sexual

La propagación sexual del nopal o por semilla es factible, sucede en la naturaleza esporádicamente y se puede realizar en vivero. Desde el punto de vista genético los individuos resultantes pueden ser producto de la polinización cruzada, autopolinización o de origen apomictico de acuerdo con la biología reproductiva del nopal (Mondragon, 2001, Reyes et al. 2006). La propagación por semilla se usa regularmente en los programas de mejoramiento genético, sin embargo, puede aprovecharse la presencia de individuos de origen apomictico-derivados de tejidos maternos de la semila y cuyo genotipo es idéntico a la madre- para obtener plantas fieles al tipo. Esto ayudaría a preservar o renovar genotipos raros o en peligro de extinción en bancos de germoplasma. (Jacobo, 2012)

1.8.2. Propagación asexual

La forma más común de propagar el cultivo de Nopal, es utilizando la propagación asexual mediante el cladodio. Este tipo de propagación, asemeja a la propagación por estaca, ya que cuando se habla de cladodio, se refiere a una parte del tallo o ramas de la planta de Nopal. (Arango, 2025)

1.9.Variedades de Nopal Forrajero

Aun no existen variedades registradas por el INIAF sobre la tuna en nuestro país. Sin embargo, en México hay registradas más de 300 especies de tuna y 104 variedades. (Vilte, 2018)

1.9.1. Ecotipos de Nopal forrajero

De acuerdo a Reyes (2024), comunicación personal, el nombre de ecotipos corresponde a los materiales de donde fueron coleccionados, en este entendido, los nombres de las accesiones fueron asignados por la Carrera de Agronomía mismas que se encuentran en proceso de registro.

Tabla 1: *Ecotipos de nopal forrajero*

Ecotipo:	Variedad
Aguarayense	Tuna AGR 101
Tolaba	Tuna AGR 102
Vallejas	Tuna AGR 103

Nota: Elaboracion propia.

1.9.2. Características de los ecotipos de nopal forrajero

Tabla 2: *Análisis de laboratorio sobre materia seca del Nopal*

Análisis materia seca							
Lab.	Identificación	Ceniza (%)	Fibra (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Materia seca parcial (%)	Materia seca total (%)
5986	Aguarayense	20,5	2,2	6,7	13,20	-	-
5987	Tolaba	20,6	2,0	8,6	14,80	-	-
5988	Vallejas	18,8	2,2	6,5	13,20	-	-

Nota: Los valores corresponden a componentes orgánicos e inorgánicos analizados, donde la materia seca es el residuo tras eliminar el agua.

Los materiales promisorios indicados anteriormente, fueron seleccionados después de varios trabajos de investigación en la región, por lo que recomendamos las siguientes variedades en proceso de inscripción en el registro nacional (Reyes, 2024)

1.10. Producción masiva de plantas sanas por cultivo *in vitro*.

Agrios (1996), indica que el Saneamiento es un conjunto de actividades que tienen como objetivo eliminar o disminuir la cantidad de inóculo presente en una planta o zona de cultivo, así como prevenir la diseminación de los patógenos hacia otras plantas sanas. Para ello, un método ampliamente utilizado para el saneamiento virológico de varias especies es el Cultivo *in vitro*.

El cultivo *in vitro* es una técnica Biotecnológica que se refiere al cultivo de organismos vivos en medios estériles, axénicos, de laboratorio, dotándole al material vivo todos sus requerimientos nutricionales. (Agrios, 1996)

Si bien el cultivo *in vitro* de microorganismos como bacterias y hongos fue desarrollado ya muchos años atrás, alrededor de los años 1950, en Francia, se logra el cultivo de plantas *in vitro*, gracias a la capacidad de los vegetales de regenerar órganos a partir de una o unas pocas células. El cultivo *in vitro* de explantes vegetales tiene importancia en el dominio de la fitopatología por la producción de plantas libres de patógenos, en la genética para la obtención y la selección de nuevos genotipos de plantas con características sobresalientes, plantas resistentes a enfermedades, la propagación rápida de material vegetal seleccionado, la conservación de genotipos o germoplasmas en condiciones de mínimo espacio y de disponibilidad permanente. (Sagrentin, 2025)

Para la obtención de plantas libres de virus se puede recurrir al cultivo de ápices meristemáticos, los cuales *in vitro* son capaces de regenerar una planta completa, para luego ser transferidos al suelo y mantener sus características genéticas idénticas. (Sagrentin, 2025)

Los meristemas son tejidos en crecimiento activo, por lo que se considera que las partículas virales todavía no logran alcanzar las células neoformadas además de que

este tejido todavía no cuenta con sistemas conductores, logrando de esta manera obtener plantas libres de virus después de su regeneración *in vitro*. (Sagrentin, 2025)

Morel y Martin en 1952, fueron los primeros en obtener dalias y patatas libres de virus con la ayuda del cultivo de meristemas. (Pierik, 1988)

Sin embargo, estudios posteriores Lepoivre (1989) demostraron que aún en tejidos meristemáticos de donde se regeneran plantas libres de virus, se encuentran partículas virales al microscopio electrónico, por lo que se considera que las condiciones de cultivo *in vitro* con aporte de hormonas, llegan a destruir las moléculas virales.

La técnica del cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos puede ser coadyuvada por tratamientos de termoterapia, que es el de mayor aplicación, de quimioterapia y por electrochoques, para aumentar la posibilidad de eliminación de virus. (Lepoivre, 1989)

Todo el proceso de producción de plantas libres de virus o material base debe ser acompañado de estrictos controles sanitarios (serológicos) para constatar la ausencia de virus. (Gonzales, 2021)

1.10.1. Termoterapia

Consiste en someter a las plantas madres cultivadas *in terra* o *in vitro* a un stress térmico, con temperaturas entre los 30 y 36 °C, por periodos de 15 a 45 días, dependiendo de la especie y de las variedades.

Las altas temperaturas, al parecer, inhibe la replicación viral, evitando de esta manera que los virus lleguen a los tejidos neoformados del meristema, logrando de esta manera extraer meristemas libres de virus. (Gonzales, 2021)

1.10.2. Quimioterapia.

Debido a que la multiplicación de los virus está íntimamente ligada al metabolismo celular del hospedante, se podría sustentar que la aplicación de sustancias químicas específicas a plantas o tejidos infectados con el fin de alterar su metabolismo podría afectar el metabolismo de la síntesis viral y de esta manera eliminarlos. Sin embargo, las dosis efectivas de la mayoría de las sustancias quimioterapéuticas probadas con ese

fin resultaron fitotóxicas o mutagénicas, en tanto que dosis no fitotóxicas solo reducen las tasas de multiplicación viral. No obstante, existen reportes que indican que la adición de un compuesto antiviral denominado Virazole (Rivavirín) al medio de cultivo inhibe la multiplicación del virus S de la papa, eliminándolo. (Díaz & Salinas, 1996)

1.10.3. Electroterapia.

Reportes de las primeras experiencias en la aplicación de corriente eléctrica a través de tejidos vegetales demuestran que este tratamiento induce un aumento en la regeneración de células y tejidos. La electroterapia a dientes de Ajo (10-30 voltios por 5 - 30 minutos) permitió obtener un saneamiento de 53-100%. (Hernández y Col, 1995, citado por García & Noa, 1998)

1.10.4. Cultivo de Callos y Protoplastos.

Pierik (1988), reporta que, mediante el cultivo de callos de papa, y cultivo de protoplastos de hoja de tabaco, se logró obtener plantas libres de virus. Sin embargo, con frecuencia esta técnica tiene el inconveniente de ocasionar mutaciones.

1.11. Condiciones generales para el cultivo *in vitro*.

Según Gutierrez (2002), el crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por una serie de factores complejos:

- La constitución genética de la planta.
- Nutrientes: Agua, macro y microelementos y azúcares.
- Factores físicos que influyen en el crecimiento: Luz, temperatura, pH, concentraciones de O₂ y CO₂.
- Sustancias orgánicas: Reguladores del crecimiento, vitaminas, etc.

1.11.1. Constitución genética de la planta.

El genotipo es un factor decisivo en todos los momentos de la vida de la planta, pues determina tanto las características anatómicas y morfológicas, como el comportamiento fisiológico en un ambiente dado. (Espinoza, 2022)

1.11.2. Nutrientes.

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta. Sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir *in vitro* o *in vivo*. En el cultivo *in vitro* el agua y los nutrientes minerales son los constituyentes básicos del medio de cultivo, al que necesariamente también se añade azúcares ya que en estas condiciones las plantas o sus fragmentos no son completamente autotróficas. (Martos & Garcia, 2006)

1.11.3. Factores Físicos.

Tienen tanta importancia en condiciones *in vivo* como *in vitro*, ya que influyen prácticamente en todo tipo de procesos: Absorción de agua y nutrientes, evaporación, fotosíntesis, respiración, crecimiento, floración, etc. (Martos & Garcia, 2006)

1.11.4. Sustancias Orgánicas.

A este grupo pertenecen los fitorreguladores, vitaminas y compuestos no definidos que coadyuvan al desarrollo de la planta. (Martos & Garcia, 2006)

1.11.5. Medios de cultivo.

En la década de los 1960, se logran medios de cultivo adecuados para el desarrollo *in vitro* de vegetales, constituidos básicamente de:

- Macroelementos minerales
- Microelementos minerales
- Compuestos orgánicos – Vitaminas
- Sustancias de crecimiento – Hormonas
- Sacarosa (Azúcar, fuente de Carbono)
- Sustancias gelificantes (Agar)

Los nutrientes inorgánicos usados en el cultivo *in vitro* son los mismos que normalmente requieren las plantas. (Martos & Garcia, 2006)

1.11.5.1. Macroelementos.

Nitrógeno. Influye en el crecimiento de la planta, componente de la clorofila, alcaloides y ácidos nucleicos, algunas fitohormonas y aminoácidos. Las fuentes de N para el cultivo de tejidos son: el NO_3 y el NH_4 .

Fósforo. Se encuentra en abundancia en los tejidos meristemáticos y en tejidos de rápido crecimiento, tiene la función de ser activador enzimático. Las fuentes de P para el cultivo *in vitro* son: el KH_2PO_4 y el NaH_2PO_4 .

Potasio. Esencial para la división celular, síntesis de carbohidratos y proteínas, la síntesis de clorofila y el proceso de nitroreducción. Las fuentes de K son: el KNO_3 , KH_2PO_4 y KCl .

Azufre. Es constituyente de algunas proteínas, se dispone de S en forma de SO_4 .

Calcio. Forma parte de la pared celular, facilita el movimiento de carbohidratos y aminoácidos. Se adiciona en forma de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o como $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Magnesio. Es el núcleo de la molécula de clorofila, también importante como activador enzimático, se incluye en el medio de cultivo como $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. (Martos & Garcia, 2006)

1.11.5.2. Microelementos.

Además de los principales elementos requeridos por la planta, existen otros elementos que se requieren en cantidades pequeñas para un buen crecimiento, a estos se los llama microelementos o elementos menores, su función en la planta aún no está bien comprendida, su importancia fue reconocida por los síntomas asociados a su deficiencia. (Martos & Garcia, 2006)

Hierro. Está involucrado en síntesis de la clorofila y en la fotosíntesis. Se añade al medio de cultivo como $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pero debe ser previamente mezclada con EDTA (Etilendiamino tetracético) el cual habilita una mayor y fácil disponibilidad de Fe para la planta.

Boro. Moviliza los azúcares dentro la planta, tiene efecto positivo en la síntesis de auxinas, se aplica en forma de H_3BO_3 .

Molibdeno. Participa en la conversión del N a NH_4 , se incluye como $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$

Manganeso. Es un elemento esencial en la membrana del cloroplasto, se suministra como $MnSO_4 \cdot H_2O$

Cobalto. Componente de la vitamina B12, se lo incluye como $CoCl_2 \cdot 6H_2O$

Zinc. Componente esencial de varias enzimas involucradas en la síntesis de clorofila y auxinas (AIA), se emplea como $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

Cobre. Importante para el crecimiento, se incluye como $CuSO_4$

Yodo. Es componente de un aminoácido, se usa como KI

Cloro. Estimula la fotosíntesis, se añade como $CaCl \cdot H_2O$. (Martos & Garcia, 2006)

1.11.5.3. Compuestos orgánicos.

En la mayor parte de los casos las plantas sintetizan sus propios elementos orgánicos como las vitaminas, aminoácidos, etc. Sin embargo, para alcanzar un mejor crecimiento y desarrollo *in vitro*, es necesario suplementar al medio de cultivo una o más vitaminas y aminoácidos como: Tiamina (B1), Piridoxina (B6), Ácido nicotínico (B3) y el Pantotenato de calcio (B5) además de Inositol; son también conocidos como reguladores de desarrollo, algunos autores señalan que la adición de numerosas sustancias orgánicas como: Caseína hidrolizada, leche de coco, extracto de malta, jugo de tomate, extracto de levadura entre otros, son empleados para optimizar el desarrollo de ciertos cultivos de callos y órganos. (Martos & Garcia, 2006)

1.11.5.4. Sustancias de crecimiento (hormonas)

Las hormonas son por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; actúan generalmente en un lugar diferente de donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades. Aparte de estos productos naturales, se han desarrollado otras formas sintéticas, que pueden tener una actividad semejante a la de los primeros. Al

conjunto de estos productos sintéticos, junto con las hormonas, se denomina reguladores, y son los responsables, en primer lugar, de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza. También determinan el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta (Pierik, 1988)

En el cultivo *in vitro*, los reguladores, especialmente las Auxinas y Citoquininas, juegan un papel muy importante. Se puede decir que el cultivo *in vitro* es generalmente imposible sin reguladores. No obstante, si a un medio de cultivo se le debe añadir una auxina o una citoquinina, para conseguir la extensión y/o la división celular, es algo que depende del tipo de explante y de la especie vegetal, inclusive la variedad. (Pierik, 1988)

1.11.5.4.1. Auxinas.

AIA	Ácido 3 - Indol Acético
IBA	Ácido 3 - Indol Butírico
ANA	Ácido $\square$ - Naftalen Acético
2,4 - D	Ácido 2,4 - Diclorofenoxiacético. (Barba, 1991)

Las auxinas frecuentemente se añaden a los medios de cultivo en dosis que varían entre 0,01-10 mg/L. Las auxinas generalmente producen: elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) y formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente embriogénesis en cultivos en suspensión. (Barba, 1991)

1.11.5.4.2. Citoquininas.

Kin	Kinetina
BA	6 - Bencilaminopurina
2ip	6 - ($\square$ $\square$ - dimetilalilamino) purina
BAP	6 - (Bencilamino) - 9 - (2 - tetrahidropiranyl) - 9 H - Purina.
(Barba, 1991)	

La concentración de citoquininas varía entre 0,1-10 mg/L. Estimulan la división celular, promueven la formación de vástagos axilares porque disminuyen la dominancia apical, inhiben la formación de raíces y también retardan el envejecimiento. (Barba, 1991)

Diversos autores comprobaron que el crecimiento y desarrollo de los vegetales en condiciones *in vitro* puede ser controlado hormonalmente, es decir, un adecuado balance hormonal en el medio de cultivo permite inducir un mayor desarrollo de la parte radicular cuando hay una mayor proporción de auxinas que citoquininas; o, por el contrario, favorecer el desarrollo de la parte apical cuando la proporción de citoquininas es mayor a la de auxinas. (Barba, 1991)

1.11.5.4.3. Giberelinas.

Existen más de 40 tipos de giberelinas, sin embargo, la GA3 (Ácido Giberélico) es la más empleada en el cultivo *in vitro*. En general, las giberelinas inducen la elongación de los entrenudos, el crecimiento de meristemos y yemas, además de inhibir la formación de raíces y vástagos adventicios. Existen reguladores como el ABA (Ácido Abscísico), Etileno, que por ser inhibidores del desarrollo no son de uso común en el cultivo *in vitro*, según Barba (1991).

El ABA tiene diferentes efectos fisiológicos en las plantas, como la inhibición de la elongación de la planta y la división celular y la acumulación de proteínas, lo que lleva a un aumento de la resistencia al estrés asociado con las condiciones de almacenamiento; por lo tanto, se considera un inhibidor del crecimiento de las plantas en la conservación *in vitro*. (Barba, 1991)

De hecho, 1 mg L⁻¹ ABA añadido al medio de almacenamiento de genotipos de pera aumentó la duración del almacenamiento hasta 36 meses en 'Mramornaya' en comparación con 18 meses para el control o 0,5 mg L⁻¹ ABA. Los pretratamientos de brotes de castaño con diferentes concentraciones de ABA no influyeron significativamente en su tasa de supervivencia; solo se observó un efecto inhibidor

sobre la proliferación de brotes en la concentración más alta de ABA. (Benelli et al., 2022)

1.11.5.5. Sacarosa

La sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente utilizada, es un compuesto muy importante en cualquier medio de cultivo, es esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, ya que el crecimiento tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis. Se la emplea en una concentración de 1 a 5 %. (Barba, 1991)

1.11.5.6. Substancias gelificantes.

El agar es un polisacárido que se obtiene de un alga marina, tiene la capacidad de gelificar los medios de cultivo, se añade de 6 a 9 g/L. Existen otros gelificantes como el gelrite, phytigel, o gelatina. (Barba, 1991)

2.11.1.7 Medios de Cultivo

El principal medio de cultivo empleado con éxito para la micropropagación de varias especies vegetales es el desarrollado por Murashige y Skoog (1962). Así mismo se desarrolló un medio alternativo para especies forestales, el medio de cultivo McCown Woody Plant (WPM). (Barba, 1991)

En la **Tabla 3**, se detalla la composición base del MS y WPM

Tabla 3: Composición base del MS y WPM

Compuesto	MS mg/lit (mM)	WPM mg/lit (mM)
Macro nutrientes		
NH ₄ NO ₃	1650 (20.6)	400 (4.9)
KNO ₃	1900 (18.8)	—
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370 (1.5)	370 (1.5)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440 (2.99)	96 (0.65)
KH ₂ PO ₄	170 (1.25)	170 (1.25)
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	—	556 (2.35)
K ₂ SO ₄	—	—
Micro nutrientes		
KI	0.83 (0.005)	—
H ₃ BO ₃	6.2 (0.1)	6.2 (0.19)
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3 (0.13)	22.3 (0.13)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6 (0.029)	8.6 (0.029)
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25 (0.01)	0.25 (0.01)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025 (0.0001)	0.25 (0.001)
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025 (0.0001)	—
Na ₂ EDTA	37.3 (0.1)	37.3 (0.1)
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8 (0.1)	27.8 (0.1)
NiSO ₄ · 6H ₂ O	—	—
Zn(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	—	—

Nota: (Quintero y Jaramillo, 2012).

1.12. Secuencia General del Cultivo *in vitro* de para la Obtención de Material Prebásico.

La secuencia del cultivo *in vitro*, de manera general, comienza con la preparación de los medios de cultivo, disposición en envases adecuados y esterilización (en autoclave a 110 °C y 1 atmósfera de presión ó a 120 ° C y 1,5 atmósferas de presión). (Duarte, 2023)

El explante vegetal debe ser seleccionado según las características deseables, cortado en trozos y desinfectado por inmersión en productos desinfectantes (alcohol al 70% por 30 a 60 segundos e Hipoclorito de sodio al 10% por 5 a 20 minutos) y posterior lavado en agua destilada estéril, en cuatro oportunidades de 5 a 10 minutos cada una. (Duarte, 2023)

Luego, dentro de una cámara de Flujo Laminar, que permite asepsia se extrae el tejido meristemático con 1 a 2 primordios foliares con ayuda de estiletes bajo una lupa

estereoscópica. Una vez extraído el explante debe ser colocado en los recipientes con el medio de cultivo específico, siempre con máxima asepsia dentro de la cámara de flujo laminar, de donde son llevados a la cámara de crecimiento. (Duarte, 2023)

La capacidad de regeneración de los vegetales, totipotencia, permitirá que se multipliquen las células para organizar diferentes órganos (hojas, tallos raíces) o células indiferenciadas que forman callos, de los cuales luego se puede inducir a la diferenciación para la formación de órganos. (Duarte, 2023)

Estos clones, obtenidos de una célula o grupo de células genotípicamente idénticas, pueden ser multiplicados varias veces, cortando secciones de la plántula u órgano y repicándolos a otros recipientes con medios de cultivo (transferencia). Una vez que la plántula alcanza un cierto desarrollo puede ser transferido a tierra, mediante un proceso de aclimatación, activando las estomas, debido a que estos no son funcionales dentro del tubo *in vitro*. (Duarte, 2023)

La secuencia general para la obtención de material Prebásico por Cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos es presentada esquemáticamente en la figura 13.

1.12.1. Pruebas ELISA

El ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima) es un método utilizado para detectar cuantitativamente un antígeno en una muestra. Un antígeno es una toxina o cualquier otra sustancia extraña, por ejemplo, el virus de la gripe o un contaminante ambiental, que provoca que el sistema inmunitario de los vertebrados inicie una respuesta defensiva. La diversidad de antígenos potenciales es enorme, por lo que los ELISA se utilizan en muchas áreas de investigación y pruebas para detectar y cuantificar antígenos en una amplia variedad de tipos de muestra. Con los ELISA se pueden analizar sustancias específicas de interés en lisados celulares, muestras de sangre, alimentos y más. (Perez, 1998)

La prueba inmunoenzimática o técnica ELISA fue desarrollada en 1971 para emplearla en medicina y adoptada en 1977 a la patología vegetal para la detección de virus en plantas (Mroginski & Roca, 1991), estandarizada posteriormente por Salazar (1989;

1991). El principio propuesto por Limasset & Cornvet (1949), en el cual la concentración relativa de virus disminuye acropetalmente hacia el meristemo apical, abrió la posibilidad de obtener clones libres de enfermedad mediante la excisión, aislamiento y posterior cultivo *in vitro* de meristemos. La técnica del cultivo de meristemo como método de saneamiento se fundamenta, por lo tanto, en la distribución no uniforme de los microorganismos en las plantas infestadas y la disminución progresiva de su concentración hacia el ápice del tallo. (Pérez, 1998)

1.12.2. Oxidación o Fenolización

La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Amiot et al. 1996, Bray et al. 2000).

1.12.3. Contaminación

La contaminación en el cultivo *in vitro* se refiere a la presencia no deseada de microorganismos, tales como bacterias, hongos o levaduras, dentro del medio de cultivo estéril. Estos organismos compiten con los explantes por los nutrientes disponibles, alteran las condiciones del medio y, en la mayoría de los casos, provocan el deterioro o la muerte del material vegetal. (Gomez, 2026)

La contaminación puede manifestarse en cualquier etapa del proceso, desde la preparación y esterilización de los materiales hasta la manipulación y el mantenimiento de los cultivos, lo que hace indispensable un control riguroso en todas las fases del procedimiento. (Gomez, 2026)

Entre los factores más frecuentes que favorecen la contaminación se encuentran:

- **Esterilización insuficiente:** La inadecuada esterilización de frascos, instrumentos o medios de cultivo permite la supervivencia de microorganismos.

- **Explantos contaminados:** El material vegetal puede portar microorganismos superficiales o endógenos, especialmente si proviene de ambientes no controlados.
- **Condiciones inadecuadas del área de trabajo:** La presencia de polvo, aire sin filtración o superficies mal desinfectadas incrementa el riesgo de contaminación.
- **Errores en la manipulación:** El contacto de herramientas o materiales estériles con superficies no estériles favorece la introducción de agentes contaminantes.

La prevención de la contaminación requiere disciplina, precisión y la adopción de buenas prácticas de laboratorio. (Gomez, 2026)

Utilizar autoclave para materiales y medios de cultivo. Los explantes deben desinfectarse mediante agentes como hipoclorito de sodio o alcohol, ajustando las concentraciones y tiempos según el tipo de tejido. (Gomez, 2026)

Uso de cabina de flujo laminar, realizar las operaciones en un ambiente controlado, verificando el correcto funcionamiento de los filtros HEPA y manteniendo la cabina limpia. (Gomez, 2026)

Lavado de manos, uso de mascarilla y vestimenta adecuada, así como la desinfección del área de trabajo antes y después de cada procedimiento. (Gomez, 2026)

Evitar el uso de explantes provenientes de plantas enfermas, dañadas o expuestas a tratamientos químicos recientes. (Gomez, 2026)

Reducir al mínimo la exposición del material al ambiente y evitar el contacto con superficies no estériles. (Gomez, 2026)

1.12.4. Necrosamiento

El necrosamiento en plantas cultivadas *in vitro* es un trastorno fisiológico caracterizado por la muerte progresiva de tejidos, que puede manifestarse en diferentes órganos o regiones de las plántulas o brotes durante su desarrollo. Este fenómeno suele iniciar en zonas específicas y, en algunos casos, extenderse hacia tejidos adyacentes, afectando

el crecimiento, la viabilidad y la capacidad de regeneración de la planta. Además, puede presentarse en distintas fases del cultivo, tanto durante la multiplicación como en la etapa de enraizamiento. (Da Silva, 2020)

Entre las causas más frecuentes del necrosamiento se encuentran los desequilibrios nutricionales, especialmente la deficiencia o disponibilidad inadecuada de ciertos elementos minerales. Asimismo, la composición y el balance de los reguladores de crecimiento vegetal, particularmente la relación entre auxinas y citoquininas, influyen en el equilibrio fisiológico de los tejidos y pueden favorecer la aparición del problema cuando no se encuentran en proporciones adecuadas. La formulación del medio de cultivo y la disponibilidad de nutrientes también pueden alterar el balance hormonal interno, incrementando la susceptibilidad al daño tisular. (Da Silva et al., 2020)

Las condiciones ambientales dentro del recipiente de cultivo desempeñan un papel importante. La elevada humedad relativa, la ventilación limitada y fenómenos como la hiperhidricidad están estrechamente relacionados con la aparición del necrosamiento. Estas condiciones pueden afectar la absorción y el transporte de nutrientes, especialmente de calcio (Ca^{2+}), elemento clave para la estabilidad de las membranas celulares, la integridad de la pared celular y la regulación de diversos procesos metabólicos. (Da Silva, 2020)

Un suministro adecuado de calcio contribuye a reducir la incidencia del necrosamiento, ya que limita la acumulación de compuestos fenólicos, disminuye el estrés fisiológico y regula procesos asociados al transporte de auxinas y a la producción de etileno. Por el contrario, una baja movilidad o deficiencia de este nutriente, favorecida por la alta humedad o la escasa ventilación, puede desencadenar procesos de muerte celular y deterioro tisular. (Da Silva, 2020)

La incidencia del necrosamiento en cultivos *in vitro* puede reducirse o revertirse mediante ajustes en la composición del medio basal, particularmente en la concentración de calcio, la optimización del balance de reguladores de crecimiento y la mejora de las condiciones de cultivo, como la ventilación y el control de la humedad. La comprensión de los factores involucrados y de sus interacciones resulta fundamental

para el manejo adecuado de este trastorno y para mejorar la eficiencia de los sistemas de propagación vegetal *in vitro*. (Da Silva, 2020)

1.12.5. Regeneración

Una planta entera puede regenerarse a partir de un tejido u órgano adulto, una masa de callos desorganizados o incluso una sola célula en un proceso conocido como regeneración vegetal. La regeneración vegetal se refiere a la renovación, reparación o reemplazo fisiológico de tejido en las plantas (Ikeuchi, 2016).

La totipotencia o pluripotencia de las células vegetales subyace a la capacidad de las plantas para regenerarse, reflejando la alta plasticidad del destino celular. La totipotencia se refiere a la capacidad de una célula para diferenciarse en un individuo completo, mientras que la pluripotencia implica la diferenciación de un grupo específico de tejidos u órganos a partir de una célula (Verdeil, 2007).

El concepto de cultivo de tejidos se propuso hace ya un siglo y contemplaba la regeneración de plantas enteras a partir de células somáticas *in vitro* (Haberlandt, 1902).

El sistema de cultivo de tejidos ha madurado desde el descubrimiento histórico de que diferentes proporciones de concentración de auxina y citoquinina (CK) son cruciales para la regeneración de raíces y brotes adventicios (Skoog & Miller, 1957).

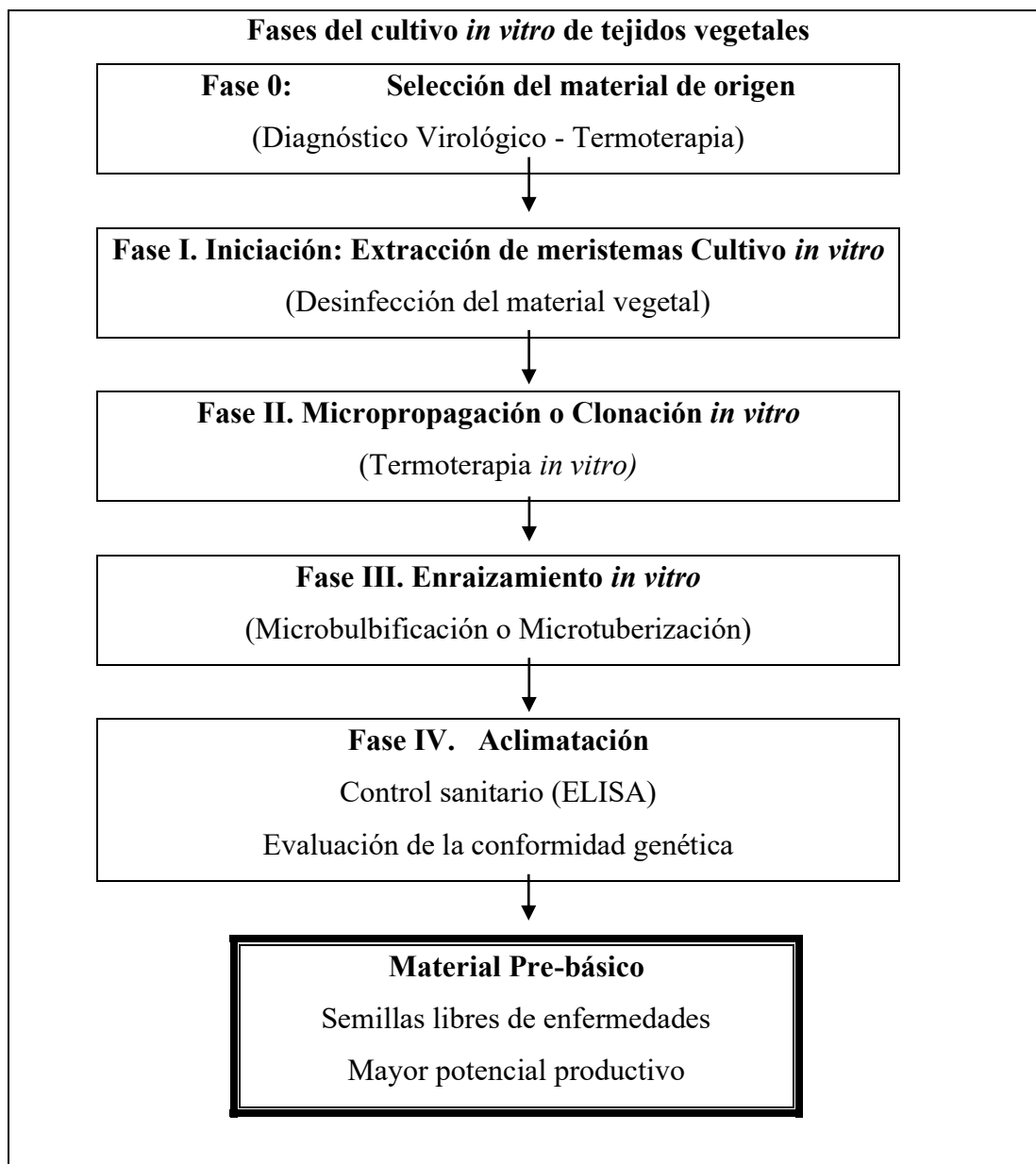
Steward et al. (1958) regeneraron con éxito nuevos embriones somáticos y posteriormente desarrollaron raíces y brotes utilizando células de floema aisladas de raíces de zanahoria, lo que confirmó la totipotencia de las células vegetales. Desde entonces, la tecnología de cultivo de tejidos basada en la capacidad regenerativa se ha utilizado ampliamente en diversos campos, incluyendo la investigación básica, la micropropagación y el mejoramiento genético transgénico.

La capacidad de regeneración de plantas se ve afectada por múltiples factores, incluyendo el uso de un regulador del crecimiento vegetal (PGR; Çabuk y Özgen, 2016; Gerdakaneh et al., 2020), la composición del medio básico (Sundararajan et al., 2017; Chimdessa, 2020) y el tipo de explante (Dhar y Joshi, 2005; Minutolo et al., 2020).

Es importante destacar que el cultivo de tejidos vegetales presenta una fuerte dependencia de la especie y especificidad del genotipo. Algunas plantas, como el tabaco (*Nicotiana tabacum*), *Arabidopsis thaliana* y el arroz (*Oryza sativa*), se pueden regenerar fácilmente *in vitro*, mientras que otras, como la soja (*Glycine Max*), el trigo (*Triticum aestivum*) y el maíz (*Zea mays*), son más difíciles de regenerar. (Abe & Futsuhara, 1986).

La capacidad de cultivo de tejidos de las líneas híbridas es mayor que la de las líneas endogámicas en maíz. Aclarar la red reguladora y el control genético de la capacidad de regeneración de plantas en cultivo de tejidos es útil para mejorar las tasas de regeneración de plantas y la eficiencia de la transformación genética. (Duncan et al., 1985)

Figura 13: *Secuencia General para la Obtención de Material Prebásico por Cultivo in vitro.*



Nota: Elaboración Propia.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.Localización Geográfica

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de fitopatología y cultivo *in vitro* de la Facultad De Ciencias Agrícolas Y Forestales de la Universidad autónoma Juan Misael Saracho”, Ubicado en el Departamento de Tarija, provincia Cercado, Zona el Tejar,

2.2.Ubicación Geográfica

Ubicado geográficamente entre los paralelos 21° y 15’ de latitud sur y el meridiano 64° 21’ de longitud Oeste, con una altura promedio de 1850 m.s.n.m.

Figura 14: *Ubicación del Laboratorio de Fitopatología y Cultivo in vitro*



Fuente: (Google Earth, 2024)

2.3.Materiales

Se utilizó diferentes equipos, reactivos y materiales y productos químicos de laboratorio para el ensayo de desinfección y establecimiento *in vitro*.

2.3.1. Material Vegetal

Se utilizaron plantas madre de las 3 ecotipos de nopal forrajero (*Opuntia ficus-indica* L.), los ecotipos son: Aguayareense, Tolaba, y Vallejas.

Figura 15: Plantas madre de los tres ecotipos



2.3.2. Material de escritorio

- Libreta de Campo
- Papel y Lapiz
- Bolígrafo.
- Celular
- Computadora
- Impresora
- Cámara fotográfica

2.3.3. Equipos de Laboratorio

- Autoclave.
- Cámara de flujo laminar.
- PH-metro.
- Balanzas de precisión.
- Microscopio.
- Agitador.
- Horno de esterilización.
- Horno microondas.
- Navaja para la extracción de muestras

2.3.4. Materiales de laboratorio

- Cajas Petri.
- Vasos de vidrio.
- Pipeta.
- Probeta.
- Tubos de ensayo.
- Mechero.
- Frascos de vidrio.
- Encendedor.
- Marcador.
- Bisturi

2.3.5. Reactivos químicos de laboratorio

- Medio de cultivo de Murashige & Skoog
- Medio de cultivo WPM
- BAP- Bencil Amino Purina.
- Kinetina
- Auxinas
- Agar.
- Sacarosa.
- Alcohol.
- Hipoclorito de sodio.
- Agua destilada

2.4. Metodología

La metodología general que se usó para esta investigación es la del cultivo *in vitro* en sus Fase 0 (Selección del material vegetal) y Fase I (Establecimiento *in vitro*)

Fase 0. Selección del material genético.

Se inició con la prospección del material genético de Tuna Forrajera, y se pudo obtener cladodios de 3 ecotipos de Tuna Forrajera (Aguayareense, *Vallejass* y Tolaba), mismos que fueron obtenidos de Yacuiba, luego trasladados a Tarija y mantenidos por 3 meses en bolsas con sustrato esperando su desarrollo para la obtención de explantes.

Fase I. Establecimiento *in vitro* de la Tuna Forrajera.

Con el objeto de determinar las condiciones óptimas de iniciación *in vitro* de la tuna forrajera, se realizaron 2 ensayos: *el primer ensayo*, para optimizar el proceso de desinfección con 3 concentraciones de hipoclorito de sodio y un medio de cultivo. *El segundo ensayo*, para evaluar la respuesta de las 3 accesiones frente a 3 medios de cultivo.

La metodología y secuencia general de todos los ensayos comenzó con la preparación de los medios de cultivo, disposición en envases adecuados y esterilización en autoclave vertical (a 121 ° C y 1,5 atmósferas de presión).

Los explantes fueron seleccionados según características deseables de sanidad y vigor, cortado en trozos de tamaño conveniente (+/- 1 a 2 cm) para después ser sometidos al proceso de desinfección. Luego, dentro de la Cabina de Flujo Laminar que permite asepsia total, se extrajeron los explantes (areolas) con ayuda de pinzas y bisturíes bajo una lupa estereoscópica. Posteriormente estos explantes fueron inoculados en tubos de ensayo que contenían el medio de cultivo específico, siempre con máxima asepsia dentro de la cabina de flujo laminar, de donde son llevados a la Sala de crecimiento.

A continuación, mencionamos los medios de cultivo utilizados, IT (Inicio Tuna), junto a una breve justificación para su uso en este trabajo de investigación:

- Medio IT0, este medio de cultivo está compuesto por las sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS) fue utilizado por Zúñiga (2012), para realizar el establecimiento *in vitro* de la Tuna Forrajera.
- Medio IT1 el medio de cultivo de Murashigue & Skoog + BAP 1mg
- Medio IT2 el medio de cultivo de Murashigue & Skoog + BAP 0,5mg
- Medio IT3, es el medio de McCown Woody Plant (WPM) + BAP 0,5mg. Este medio se empleó de manera explorativa debido a que tiene un tener menor de sales, lo cual podría incidir en el efecto de habituación de la tuna forrajera a condiciones del cultivo *in vitro*.

Los componentes de los medios de cultivo utilizados para el establecimiento *in vitro* de la tuna forrajera se encuentran detallados en tabla N°3.

2.4.1. Desarrollo Experimental.

En el presente trabajo de investigación para cumplir los objetivos específicos planteados se realizaron 2 series de ensayos: Métodos de desinfección, que se evaluaron forma porcentual, utilizando tres concentraciones de hipoclorito de sodio, cada una con 15 repeticiones y el mejoramiento de medios de cultivo de inicio, este

con un diseño experimental completamente al azar con un arreglo monofactorial, distribuido en 3 tratamientos (M&S 100% + 1,0mg/L, M&S 100% + BAP 0,5mg/L y WPM 100% + BAP 0,5mg/L para el establecimiento *in vitro*), cada uno con 5 repeticiones.

2.4.1.1. Ensayo 1: Método de desinfección.

Debido a la procedencia del material vegetal (cladodios) que fueron recolectados en campo, se desarrolló un ensayo inicial que permita optimizar el proceso de desinfección de los explantes de los tres ecotipos de tuna forrajera

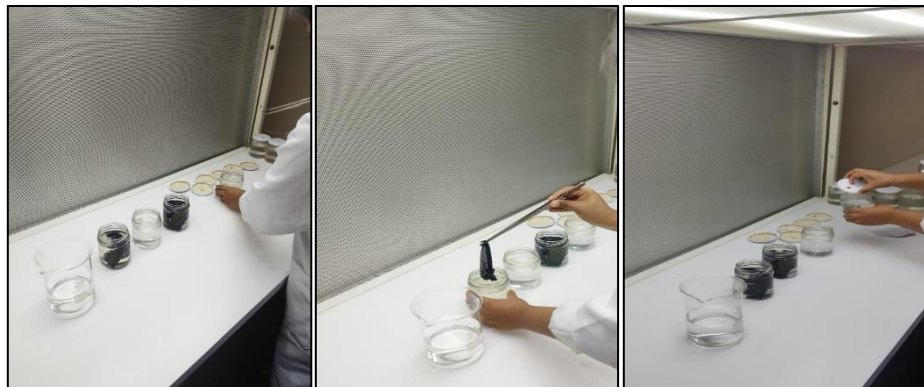
Para la etapa de desinfección de explantes, se evaluaron 3 concentraciones de Hipoclorito de sodio como agente desinfectante en tres ecotipos de nopal forrajero (Aguarayense, Tolaba, y Vallejas), de manera independiente por accesión.

- **Variable de estudio - ensayo 1**

La variable de estudio es el desinfectante Hipoclorito de Sodio en concentraciones de 10%, 15% y 20 % de producto comercial. El agente desinfectante fue aplicado dentro de un protocolo de desinfección de rutina que se emplea en el Laboratorio, el cual consiste en:

- a. Inmersión de las areolas (explantes) durante 60 segundos en alcohol 70 % v/v.
- b. Enjuague con agua destilada por 5 minutos.
- c. Inmersión por 20 minutos en Hipoclorito de Sodio al (10, 15 y 20 %) de solución comercial.
- d. Cuatro lavados en agua destilada estéril, cada uno de cinco minutos.

Figura 16: *Desinfección de explantes*



Nota: Desinfección de los explantes en la cámara de flujo.

Luego del proceso de desinfección el material vegetal de las tres accesiones fue inoculado en tubos Fisher con tapa, conteniendo 10ml de medio de cultivo y un explante (areola) desinfectado por cada concentración de Hipoclorito de sodio, todas fueron cultivadas en condiciones de:

- Fotoperiodo: 16 horas luz, 8 horas oscuridad, luz led blanca controlada por temporizador.
- Temperatura: $22^{\circ}\text{C} \pm 1$, provista por acondicionador de aire tipo Split.

De esta manera dichos tratamientos se muestran a continuación.

Ecotipo: Aguarayense

Tratamiento		R1	R2	R3	R4	R5
NaClO 10%pc	T1					
NaClO 15%pc	T2					
NaClO 20%pc	T3					

Ecotipo: Vallejas

Tratamiento		R1	R2	R3	R4	R5
NaClO 10%pc	T1					
NaClO 15%pc	T2					
NaClO 20%pc	T3					

Ecotipo: Tolaba

Tratamiento	R1	R2	R3	R4	R5
NaClO 10%pc	T1				
NaClO 15%pc	T2				
NaClO 20%pc	T3				

- **Variable de respuesta – ensayo 1.**

Las variables de respuesta del ensayo 1 son: porcentaje de contaminación, porcentaje de necrosamiento y porcentaje de fenolización de cada unidad experimental.

2.4.1.2. Ensayo 2: Optimización de medios de cultivo de inicio

En el segundo ensayo de establecimiento *in vitro*, se evaluó la regeneración de tres ecotipos de nopal forrajero (Aguarayense, Tolaba, y Vallejas) promovida por tres medios de cultivo, de manera independiente por cada accesión, donde, los tratamientos fueron distribuidos completamente al azar, por tanto, para cada ecotipo de tuna forrajera se tuvo 3 tratamientos y 5 repeticiones, con un total de 15 unidades experimentales por ensayo. Siendo cada unidad experimental compuesta por 3 tubos de ensayo, cada uno con 10ml de medio de cultivo y un explante por tubo de ensayo.

- **Variables de estudio – ensayo 2.**

Las variables de estudio del segundo ensayo son tres medios de cultivo.

Medio 1: Murashigue y Skoog 100% + BAP 1.0 mg/L.

Medio 2: Murashigue y Skoog 100% + BAP 0.5 mg/L.

Medio 3: McCown Woody Plant 100% + BAP 0.5 mg/L.

Las unidades experimentales fueron tubos Fisher con tapa, conteniendo 10ml de medio de cultivo y un explante (areola), todas fueron cultivadas en condiciones de:

- Fotoperiodo: 16 horas luz, 8 horas oscuridad, luz led blanca controlada por temporizador.
- Temperatura: 22°C ±1, provista por acondicionador de aire tipo Split.

De esta manera la distribución de tratamientos se muestra a continuación.

Ecotipo: Aguarayense

Tratamiento	R1	R2	R3	R4	R5
M&S 100% + BAP 1,0mg/L	M1				
M&S 100% + BAP 0,5mg/L	M2				
WPM 100% + BAP 0,5mg/L	M3				

Ecotipo: Tolaba

Tratamiento	R1	R2	R3	R4	R5
M&S 100% + BAP 1,0mg/L	M1				
M&S 100% + BAP 0,5mg/L	M2				
WPM 100% + BAP 0,5mg/L	M3				

Ecotipo: Vallejas.

Tratamiento	R1	R2	R3	R4	R5
M&S 100% + BAP 1,0mg/L	M1				
M&S 100% + BAP 0,5mg/L	M2				
WPM 100% + BAP 0,5mg/L	M3				

- Variables respuestas - Nivel de regeneración**

La regeneración *in vitro* es un proceso morfogénico de formación de nuevos tejidos y órganos que son indicadores del grado de efectividad de la formulación de los medios de cultivo para estimular la generación de estas nuevas partes vegetales, en este sentido, el éxito o valor máximo que se puede lograr en una unidad experimental será 1, que significa la obtención de una vitroplanta. Por el contrario, la presencia de necrosamiento seguida de muerte celular tendrá un valor de cero (0), y condiciones intermedias serán registradas comparativamente con los mejores resultados, tomando en cuenta un tiempo definido.

Las unidades experimentales se evaluaron semanalmente, sin embargo, después del día 50 de la introducción *in vitro* es donde se puede observar las primeras muestras de regeneración. La evaluación fue realizada hasta el día 80.

El porcentaje de regeneración se evaluará de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ de regeneración} = \frac{NE - ENR}{NE} * 100$$

Dónde:

NE= Número de Explantes

ENR= Explantes No Regenerados

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el establecimiento *in vitro* de la tuna forrajera (*Opuntia ficus indica*), se realizaron 2 series de ensayos, en los cuales se emplearon 4 medios de cultivo: IT0, IT1, IT2 e IT3 como ya se mencionó anteriormente.

3.1. Establecimiento *in vitro* de tuna forrajera: Desinfección (1^{er} ensayo)

Los ensayos con las 3 accesiones fueron realizados el 03 de octubre de 2024, para lo cual, la mañana de esa misma fecha se obtuvo el material donador de explantes cladodios con areolas en pleno desarrollo vegetativo.

Figura 17: *Proceso de desinfección de explantes de Nopal*



Nota: Proceso de desinfección de los explantes de los tres ecotipos de nopal, realizado en la cámara de flujo dentro del laboratorio de cultivo *in vitro* de la FCA y F.

A continuación, se muestra, para cada ecotipo de tuna forrajera, tablas y gráficos en los que se observan los resultados de: Contaminación, Necrosamiento/Fenolización (Necro/Fenol) y Regeneración (Reg.), por cada tratamiento desinfectante ensayado. Cabe mencionar que en este primer ensayo se empleó únicamente el medio de cultivo MS sin modificaciones (T0), de acuerdo a la información recabada por Zuñiga (2012), quien trabajó en la introducción *in vitro* de cultivares de tuna forrajera en Guadalajara - México.

La razón de usar solamente un medio de cultivo fue el de determinar la mejor concentración de desinfectante que permita, posteriormente, evaluar los efectos de los diferentes medios de cultivo sin ser afectados por pérdida de unidades experimentales a causa de la contaminación generalmente saprófita, muy común en los trabajos de introducción de explantes a condiciones *in vitro*. Así como para corroborar los resultados que obtuvo Zuñiga (2012).

La evaluación final se realizó el 31 de octubre en las tres accesiones.

Tabla 4: Resultados Ensayo 1: Ecotipo Aguayareense

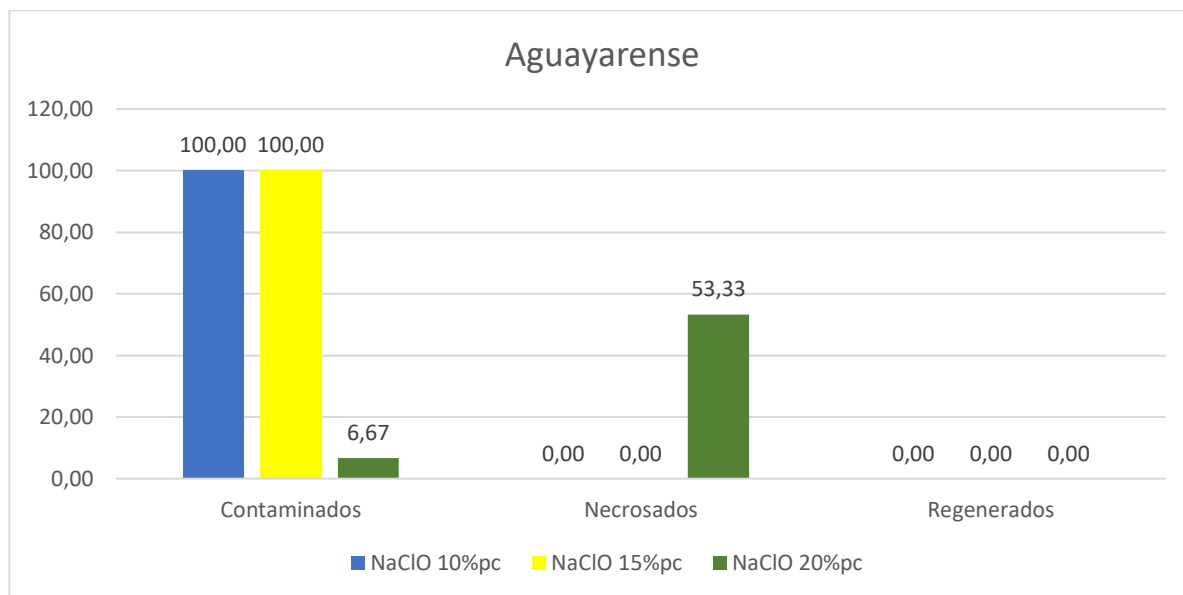
Ecotipo: Aguayareense									
Tratamiento	UE.	Contaminados		Necro./ Fenol.		UEV	Sin desarrollo	Regenerados*	
	Nº	Nº	%	Nº	%	Nº	Nº	Nº	%
NaClO 10%pc	15	15	100,00	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NaClO 15%pc	15	15	100,00	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NaClO 20%pc	15	1	6,67	8	53,33	6,00	6,00	0,00	0,00

UE. Unidades experimentales

UEV. Unidades Experimentales Válidas

* Explantes regenerados, no contaminados, no necrosados

Figura 18: Variables respuesta de contaminación, necrosamiento y regeneración del *Ecotipo Aguayareense* – 1er ensayo.



De la figura 18 podemos indicar que con las menores concentración del desinfectante de 10% y 15% de NaClO se produjo un 100% de contaminación saprofítica, la cual se redujo al 6.67% empleando una concentración mayor (NaClO 20%).

Así mismo, se puede observar que con la concentración de desinfectante (NaClO 20%) el nivel de necrosamiento fue relativamente alto alcanzando un 53,33%; en tanto que empleando las concentraciones bajas (10% y 15% de NaClO) los niveles de necrosamiento fueron nulos. Esto último se debió a la imposibilidad de hacer un seguimiento a los tejidos de los explantes ya que se los eliminó inmediatamente cuando se detectó la contaminación saprófita.

Al respecto podemos indicar que Zuñiga (2012) , empleando NaClO 20% por 7 minutos logró establecer explantes de tuna forrajera libres de contaminación, sin embargo, el mencionado autor no muestra datos de contaminación.

Tabla 5: Resultados Ensayo 1: Ecotipo Vallejas

Ecotipo:	Vallejas								
Tratamiento	UE.	Contaminados		Necro./ Fenol.		UEV	Sin desarrollo	Regenerados*	
	Nº	Nº	%	Nº	%	Nº	Nº	Nº	%
NaClO 10%pc	15	15	100,00	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NaClO 15%pc	15	12	80,00	0	0,00	3,00	3,00	0,00	0,00
NaClO 20%pc	15	3	20,00	3	20,00	9,00	8,00	1,00	11,11

UE. Unidades experimentales

UEV. Unidades Experimentales Válidas

* Explantes regenerados, no contaminados, no necrosados

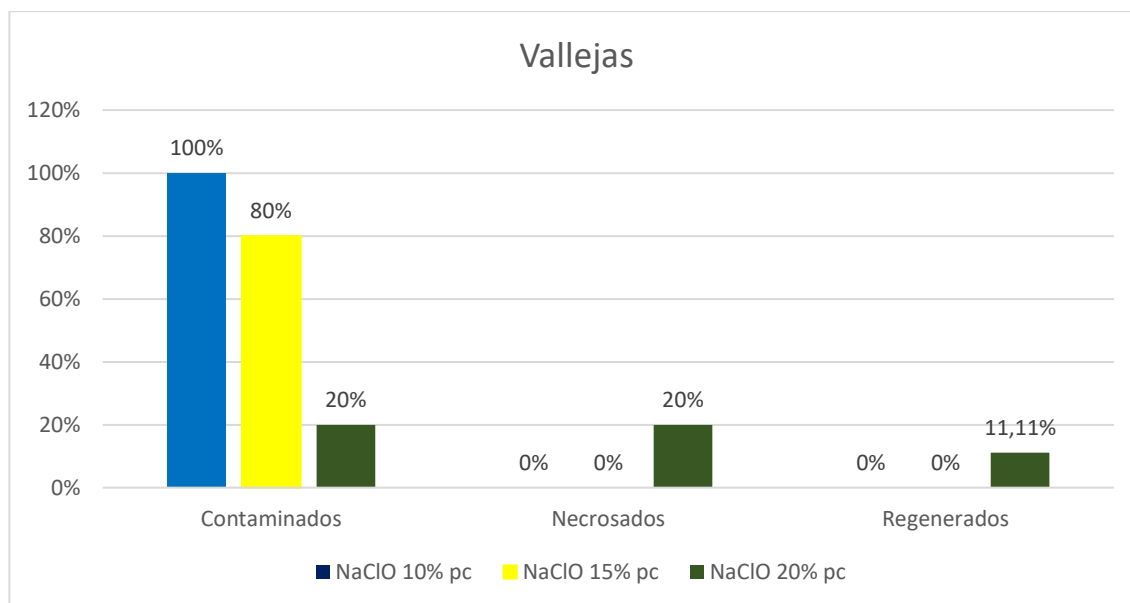
Figura 19: Variables respuesta de contaminación, necrosamiento y regeneración del Ecotipo Vallejas – 1er ensayo.

Tabla 6: Resultados ensayo 1 Desinfección: Ecotipo Tolaba

Ecotipo:	Tolaba								
Tratamiento	UE.	Contaminados		Necro./ Fenol.		UEV	Sin desarrollo	Regenerados*	
	Nº	Nº	%	Nº	%	Nº	Nº	Nº	%
NaClO 10%pc	15	15	100,00	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NaClO 15%pc	15	13	86,67	0	0,00	2,00	2,00	0,00	0,00
NaClO 20%pc	15	1	6,67	6	40,00	8,00	8,00	0,00	0,00

UE. Unidades experimentales

UEV. Unidades Experimentales Válidas

* Explantes regenerados, no contaminados, no necrosados

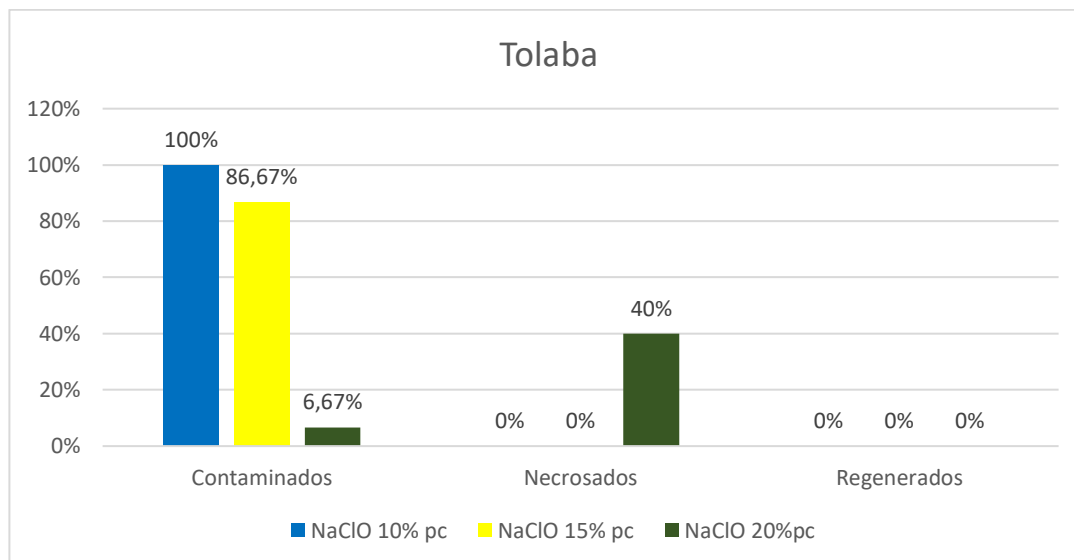
Figura 20: Variables respuesta de contaminación, necrosamiento y regeneración del Ecotipo Tolaba – 1er ensayo.

Tabla 7: Resultados ensayo 1: Ecotipo Aguayareense + Vallejas + Tolaba

Ecotipo:	Aguayareense + Vallejas + Tolaba								
Tratamiento	UE	Contaminados		Necro./ Fenol.		UEV	Sin desarrollo	Regenerados*	
	Nº	Nº	%	Nº	%	Nº	Nº	Nº	%
NaClO 10%pc	45	45	100,00	0	0,00	0	0	0,00	0,00
NaClO 15%pc	45	40	88,88	0	0,00	5,00	5,00	0,00	0,00
NaClO 20%pc	45	5	11,11	17	37,77	23,00	22,00	1,00	4,34

UE. Unidades experimentales

UEV. Unidades Experimentales Válidas

* Explantes regenerados, no contaminados, no necrosados

De los resultados observados en las tablas y gráficos de este primer ensayo de introducción *in vitro* con los tres ecotipos de tuna forrajera podemos deducir que el protocolo empleado por el Laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro*, donde se emplea NaClO al 10%pc por 20 minutos, no resulta ser eficiente para desinfectar explantes provenientes de cladodios de tuna forrajera, dada cuenta que los niveles de contaminación son del 100% en los 3 ecotipos.

Esto puede explicarse porque el protocolo de desinfección para explantes de papa (*Solanum tuberosum* L.) tiene una concentración de NaClO al 10% y tiempo de exposición por 20 minutos que resulta eficiente para eliminar microorganismos de la superficie de tejidos de plantas donadoras de explantes que se desarrollaron en viveros, invernaderos o jaulas antiáfidos, donde recibieron los cuidados y tratamientos fitosanitarios que pueden lograr bajar la carga de inóculo en la superficie de los tejidos del material donador de explantes. Tal como reportan Gutiérrez, 2002 y Abecia, 2008 quienes trabajando con explantes de Papa y Clavel cultivados en pequeños invernaderos lograron en promedio porcentajes de contaminación de 17% y 30% respectivamente.

Debe considerarse que los materiales donadores de explantes de tuna forrajera provinieron del campo (Yacuiba), producidos a la intemperie, hasta el momento de su traslado al laboratorio.

Así mismo, empleando un 15% de NaClOpc por 20 minutos se manifiesta una contaminación saprófita (hongos y bacterias) muy elevado (88,89% en los 3 ensayos), dicha contaminación se presenta en los primeros días después de la siembra de explantes en los tubos de ensayo.

Sin embargo, como se puede observar en los resultados de los tratamientos donde se incrementó la concentración del NaClO a 20%pc por 20 minutos, el nivel de contaminación bajó drásticamente, a un nivel general de 11.11%.

No obstante, debemos indicar que si bien se tuvo bajos niveles de contaminación, no se logró regenerar vitroplantas de tuna forrajera en ninguno de los tres ecotipos. Esta situación puede haber sido ocasionada por la falta de reguladores de crecimiento en la formulación de los medios de cultivo, ya que en las unidades experimentales que no se contaminaron, se pudo observar que los explantes se mantuvieron con una coloración verduzca y una morfología que denotaba signos de turgencia de tejidos, pero sin desarrollo ni crecimiento, tal como se puede observar en las siguientes figuras.

Figura 21: *Explantes del Ecotipo Aguayarensis en regeneración*

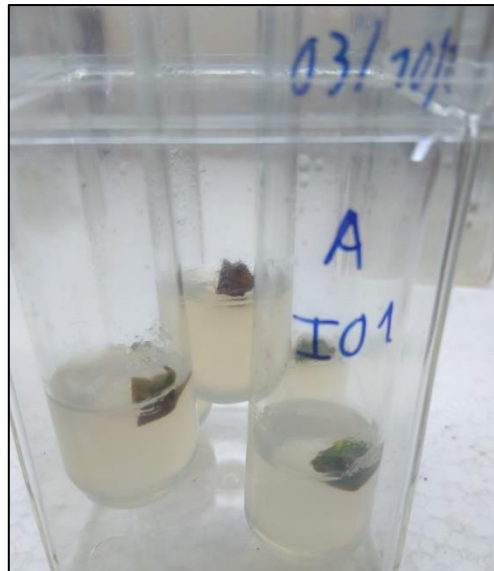
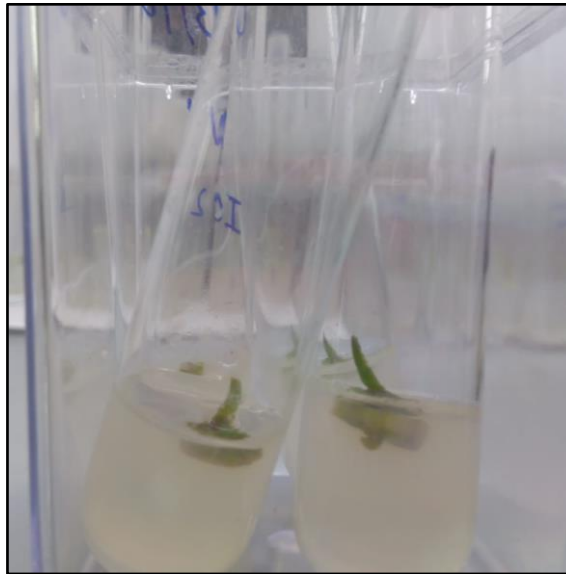


Figura 22: *Ecotipo Vallejas necrosamiento de explantes.*



Figura 23: *Ecotipo Tolaba con signos de contaminación*



En definitiva, la primera serie de ensayos de inicio sirvieron para optimizar el protocolo de desinfección de tuna forrajera, con vistas a descartar la posibilidad que un deficiente

proceso de desinfección no permita evaluar el efecto de los medios de cultivo (tratamientos), ya que la contaminación saprófita reduce las unidades experimentales (por descarte en los primeros días después de la siembra) y las mismas ya no podrán ser evaluadas posteriormente.

3.2. Establecimiento *in vitro* de tuna forrajera: Regeneración - 2do ensayo.

Una vez optimizado el protocolo de desinfección se procedió a realizar la segunda serie de ensayos para el establecimiento *in vitro* de explantes de 3 ecotipos de tuna forrajera en 3 medios de inicio.

La segunda serie de ensayos se realizó en fecha 5 de noviembre de 2024, en la que se sembraron las areolas de las tres accesiones en tubos de ensayo con el respectivo medio de cultivo. Posteriormente, todas las unidades experimentales fueron transferidas a medio fresco cada 15 días para reducir posibles problemas de fenolización y oxidación.

A continuación, se muestra los resultados de regeneración por cada Accesoión:

3.2.1. Regeneración Accesoión Aguayareense.

Tabla 8: Regeneración de explantes de tuna forrajera, Ecotipo: Aguayareense (a 80 días del inicio)

T	Tratamiento	R1	R2	R3	R4	R5	Σ	$\bar{X}$
1	M&S 100% + BAP 1,0mg/L	0,83	0,83	0,67	0,83	0,83	3,99	0,80
2	M&S 100% + BAP 0,5mg/L	0,83	0,67	0,83	0,67	0,83	3,83	0,77
3	WPM 100% + BAP 0,5mg/L	0,67	0,67	0,50	0,67	0,67	3,18	0,64
Σ		2,33	2,17	2,00	2,17	2,33	11,00	

Tabla 9: ANOVA-Análisis de Varianza: Regeneración Ecotipo Aguayareense.

F. de V.	GL	SC	CM	Valor F	Ft 5%	Ft 1%
Tratam.	2	0.07361333	0.03680667	5.94*	3.89	6.93
Error	12	0.07432000	0.00619333			
Total	14	0.14793333				
CV	10,73					

Cómo se puede observar, se tiene una probabilidad de F que nos indica que hay diferencias estadísticamente significativas debido al efecto de los medios de cultivo en la regeneración de los explantes de tuna forrajera del Ecotipo Aguayareense. Por tanto, procede realizar una prueba de comparación de medias por Tukey (0.05).

Tratamiento	Media	
T1	0,80	A
T2	0,77	AB
T3	0,64	B

La comparación de medias por Tukey indica que en el tratamiento T1 (M&S 100% + BAP 1,0mg/L) y el T3 (WPM 100% + BAP 0,5mg/L) los efectos de regeneración de explantes son significativamente diferentes, siendo más eficiente el medio T1, en tanto que entre el T1 (M&S 100% + BAP 1,0mg/L) y T2 (M&S 100% + BAP 0,5mg/L) los resultados de eficiencia regenerativa son estadísticamente similares.

El nivel de regeneración obtenido con el T1 (M&S 100% + BAP 1,0mg/L) con el que se obtuvo 80% de regeneración, a consideración nuestra, es aceptable, ya que permitió obtener clones *in vitro* con la accesión Aguayareense. Así mismo podemos indicar que la revisión bibliográfica comparativa con trabajos de investigación nacional realizadas por Quelca *et al* (2022) en Cochabamba, e internacional por Zuñiga (2012) en México, no permitió cotejar resultados debido a que Quelca (2012) en su trabajo no muestran datos de establecimiento, sino de multiplicación *in vitro*, y en el de Zúñiga (2012)

igualmente mencionan que “se logró con éxito el establecimiento *in vitro* de los explantes” sin hacer referencia a los niveles de regeneración.

3.2.2. Regeneración Accesión Vallejas.

De manera similar al Ecotipo Aguayareense, una vez establecidos las unidades experimentales, se realizó 3 cambios a medio fresco cada 15 días, esto con el objetivo de reducir efectos de oxidación y/o fenolización de los explantes.

Tabla 10: Regeneración de explantes de tuna forrajera, Ecotipo: Vallejas (a 80 días del inicio)

Ecotipo: Vallejas								
T	Tratamiento	R1	R2	R3	R4	R5	Σ	$\bar{X}$
1	M&S 100% + BAP 1,0mg/L	0,92	0,83	0,92	0,83	0,83	4,33	0,87
2	M&S 100% + BAP 0,5mg/L	0,67	0,67	0,67	0,67	0,83	3,51	0,70
3	WPM 100% + BAP 0,5mg/L	0,83	0,67	0,67	0,83	0,67	3,67	0,73
	Σ	2,42	2,17	2,26	2,33	2,33	11,51	

Tabla 11: Análisis de Varianza: Regeneración Ecotipo Vallejas.

F. de V.	GL	SC	CM	Valor F	Ft 5%	Ft 1%
Tratam.	2	0.07557333	0.03778667	7.44**	3.89	6.93
Error	12	0.06092000	0.00507667			
Total	14	0.13649333				
CV	10,73					

Cómo se puede observar, se tiene una probabilidad de F que nos indica que hay diferencias estadísticas altamente significativas debido al efecto de los medios de cultivo en la regeneración de los explantes de tuna forrajera del Ecotipo Vallejas. Por tanto, procede realizar una prueba de comparación de medias por Tukey (0.05).

Tratamiento	Media	
T1	0,87	A
T3	0,73	B
T2	0,70	B

La comparación de medias por Tukey indica que los tratamientos T1 (M&S 100% + BAP 1,0mg/L) y el T3 (WPM 100% + BAP 0,5mg/L) promueven efectos de regeneración de explantes significativamente diferentes, siendo más eficiente el medio T1, en tanto que entre el T3 (WPM 100% + BAP 0,5mg/L) y T2 (&S 100% + BAP 0,5mg/L) los resultados de eficiencia regenerativa son estadísticamente similares.

El nivel de regeneración obtenido con el T1 (M&S 100% + BAP 1,0mg/L) con el que se obtuvo 87% de regeneración en la accesión Vallejas, a consideración nuestra, es aceptable, y de manera similar que con la Accesión Aguayareense, no se logró realizar una discusión de resultados debido a que otros autores no muestran resultados de nivel de regeneración.

3.2.3. Regeneración Accesión Tolaba.

De manera similar los anteriores ecotipos, Aguayareense y Vallejas, una vez establecidos las unidades experimentales, se realizó 3 cambio a medio fresco cada 15 días, esto con el objetivo de reducir efectos de oxidación y/o fenolización de los explantes.

Tabla 12: Regeneración de explantes de tuna forrajera, Ecotipo: Tolaba (a 80 días del inicio)

Ecotipo: Tolaba								
T	Tratamiento	R1	R2	R3	R4	R5	Σ	$\bar{X}$
1	M&S 100% + BAP 1,0mg/L	0,75	0,67	0,58	0,75	0,67	3,42	0,684
2	M&S 100% + BAP 0,5mg/L	0,92	0,75	0,92	0,67	0,83	4,09	0,818
3	WPM 100% + BAP 0,5mg/L	0,75	0,75	0,50	0,67	0,67	3,34	0,668
	Σ	2,42	2,17	2,00	2,09	2,17	10,85	

Tabla 13: *Análisis de Varianza: Regeneración Ecotipo Tolaba.*

F. de V.	GL	SC	CM	Valor F	Ft 5%	Ft 1%
Tratam.	2	0.06785333	0.03392667	3.73ns	3.89	6.93
Error	12	0.10908000	0.00909000			
Total	14	0.17693333				
CV	13.18					

Cómo se puede observar, se tiene una probabilidad de F que nos indica que no hay diferencias estadísticas significativas en el efecto regenerativo de los tres medios de cultivo probados para la regeneración de los explantes de tuna forrajera del Ecotipo Tolaba.

Eso mismo se ve reflejado en la prueba de comparación de medias por Tuckey (0,5)

Tratamiento	Media	
T2	0,82	A
T1	0,68	A
T3	0,67	A

El nivel de regeneración obtenido con el T2 (M&S 100% + BAP 0.5mg/L) con el que se obtuvo 81.8% de regeneración en la accesión Tolaba, a consideración nuestra, es aceptable, sin embargo, debemos observar que para la Accesión Tolaba el mejor nivel de regeneración se obtuvo con una dosis menor de BAP (0.5mg/L) a diferencia de las Accesiones Aguayarenses y Vallejas que tuvieron un mejor nivel de regeneración con BAP 1mg/L.

Así mismo, y de manera similar que con la Accesión Aguayarenses y Vallejas, no se logró realizar una discusión de resultados debido a que otros autores no muestran resultados de nivel de regeneración.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1.Conclusiones

Durante la Fase de Establecimiento *in vitro* del cultivo de tuna forrajera (Accesiones: Aguayareense, Tolaba y Vallejas) en el Laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro*, en las condiciones de los equipos, reactivos y material donador de usadas para realizar los ensayos, las evaluaciones realizadas nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

Desinfección de explantes.

De las tres concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO: 10, 15 y 20%) empleado como agente desinfectante, se logró determinar que la concentración de 20% de NaClO fue la que menor contaminación permitió en los tubos de ensayo con 6.67% en Aguayareense, 20% en Vallejas y 6.67% en Tolaba, tubos de ensayos que no fueron contaminados.

Una evaluación general del proceso de desinfección, considerando las tres accesiones y sus resultados nos permite indicar que la mejor concentración de hipoclorito de sodio empleado para evitar contaminación saprofítica es de 20%pc con la que se obtuvo un nivel de contaminación general promedio de 11,11%, seguido de las concentraciones 15 y 10% pc, con niveles de contaminación general promedio de 88.89 y 100%, respectivamente.

En el proceso de regeneración de vitroplantas a partir de explantes de areolas se concluye que para la Accesión Aguayareense el medio de cultivo más eficiente en dicho proceso estuvo compuesto por M&S 100% + BAP 1,0mg/L (T1) con el que se obtuvo un 80% de regeneración, seguido de los medios de cultivo T2 Y T3 (M&S 100% + BAP 0,5mg/L y WPM 100% + BAP 0,5mg/L) con 77 y 64 por ciento de regeneración respectivamente.

En la regeneración de la Accesión Vallejas el mejor medio de cultivo fue T1 con el que se obtuvo 87 por ciento de regeneración, seguido de los medios T3 y T2 con 73 y 70 por ciento de regeneración, respectivamente.

En la regeneración de la Accesoión Tolaba los 3 medios de cultivo promovieron una similar eficiencia regenerativa de areolas, pues no se halló diferencias estadísticas significativas entre ellos, obteniéndose 82, 68 y 67 por ciento de regeneración en los medios de cultivo T2, T1 y T3, respectivamente.

4.2.Recomendaciones

- Para realizar nuevos ensayos de establecimiento y/o refrescamiento de las accesiones Aguayareense, Tolaba y Vallejas se recomienda emplear como desinfectante Hipoclorito de Sodio 20%pc por 20 minutos.
- Con referencia a los medios de cultivo, para las accesiones Aguayareense y Tolaba se recomienda emplear el medio de cultivo M&S 100% + BAP 1,0mg/L; en tanto que para la Accesoión Tolaba usar el medio de cultivo M&S 100% + BAP 0.5mg/L.
- Continuar con la investigación de la tuna forrajera en las Fases de Multiplicación, Enraizamiento y Aclimatación que permita estandarizar el proceso de producción *in vitro* para que la UAJMS pueda atender satisfactoriamente la futura demanda de material genético de este noble cultivo.
- Promover políticas de expansión del cultivo de tuna forrajera en el departamento de Tarija con el objetivo de aprovechar las propiedades nutritivas y de bajo costo de producción para la alimentación de diferentes especies de ganado que contribuyan a la seguridad alimentaria de nuestra región y del país.
- Recomendar el uso de plantines de tuna forrajera provenientes del cultivo *in vitro* para que su expansión en las áreas donde se promueva su cultivo las plantaciones sean establecidas con material de sanidad garantizada, evitando de esta manera la propagación de plagas que son acarreados cuando se emplean materiales que no cumplen con las normas de producción de semillas (plantines/cladodios de obtención en parcelas de producción tradicional).