



EVALUACIÓN DE SUSTRATOS PARA LA ACLIMATACIÓN DE TUNA *IN VITRO* EN CONDICIONES DE INVERNADERO

De la Cruz Lapa, G.F.^{1*}; Santillana Villanueva, N. L.² y Quispe Medina, E.R.¹

Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH). Portal Constitución N° 57.
Ayacucho.

¹Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal – FCA-UNSCH.

²Laboratorio de Rhizobiología-FCA-UNSCH

*Autor para correspondencia: german.delacruz@unsch.edu.pe

RESUMEN

Se realizó un ensayo experimental para determinar el tipo del sustrato a utilizar en la aclimatación y enraizamiento de plántulas de tuna *Opuntia ficus-indica* obtenidas *in vitro*, para el trasplante masivo de plántulas de tuna *in vitro*. El experimento se realizó en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNSCH, en condiciones de invernadero; se prepararon 10 tratamientos (sustratos), con 6 repeticiones, conformado por arena, musgo y turba en diferentes proporciones, el riego y el manejo fue uniforme para todos; luego de la primera semana de trasplantado a sustrato fueron inoculadas con dos cepas diferentes de la bacteria *Azospirillum* sp. Se evaluó el peso total, altura de cladodio, número de raíces y longitud de raíces después de 30 días de aclimatación. El sustrato T9 mejoró las condiciones de rizogénesis (p:0.05).

PALABRAS CLAVE

in vitro; *Azospirillum* sp.; aclimatación.

INTRODUCCIÓN

Las plantas del género *Opuntia* son nativas de varios ambientes, desde zonas áridas al nivel del mar hasta territorios de gran altura como los Andes del Perú; en regiones tropicales de México donde las temperaturas están siempre por sobre los 5 °C a aéreas de Canadá que en el invierno llegan a -40 °C (Mondragon-Jacobo and Pérez González, 1996). Por esta razón, estas especies pueden ser un recurso genético de interés para zonas ecológicas muy diversas.

La tuna (*Opuntia ficus indica* L. Mill) es uno de los recursos representativos de las regiones áridas. Es una de las tantas especies valiosas que por muchos años ha sido



**XVII Congreso Nacional y VIII Internacional de la
Ciencia del Suelo**

“Crianza del suelo para el buen vivir”

Ayacucho, Perú – 22 al 25 de mayo de 2017



utilizado por los habitantes de estas regiones en forma silvestre y hoy en día en forma cultivada.

Esta cactácea se encuentra ampliamente distribuida en el Perú, especialmente en los valles interandinos donde ha encontrado condiciones agroclimáticas favorables para su establecimiento y distribución. Sus partes vegetativas y fructíferas son utilizadas en la alimentación del hombre, animales domésticos y en la elaboración de productos industriales y medicinales.

El Perú sigue siendo el primer productor de carmín a nivel mundial, aportando entre el 85 y 90% de la demanda internacional. Las zonas en donde se concentra la actividad productiva de cochinilla son principalmente: Arequipa, donde existe una producción tecnificada; Lima, con producción semi tecnificada y Ayacucho, donde la recolección de los insectos es artesanal.

Ayala-Escobar et al., (2006), plantean que *Pseudocercospora opuntiae* es el agente causal de la enfermedad a nivel de cladodios, al que en Perú denominamos Cercosporiosis. Es la enfermedad más difundida en las zonas ecológicas donde prosperan los tunales silvestres o cultivados, trayendo como consecuencia fuertes reducciones en la producción de fruta y cochinilla por la disminución del área de fotosíntesis de los cladodios y el espacio que ocuparía las cochinillas, Barrantes (1998).

Antecedentes de aclimatación de tuna, como el de Rojas (2001) indican que esta etapa es crucial para la sobrevivencia de las plántulas al pasar de un ambiente de *in vitro* hacia un ambiente de invernadero, de crecer en medio de cultivo hacia un substrato de almácigo y de estar en condiciones de alta humedad relativa dentro del frasco hacia un ambiente con menos humedad relativa.

Las plantas de tuna *in vitro*, por el tipo de explante del cual proceden y dada la tecnología con la que se ha producido se encuentra libre de patógenos sistémicos y obviamente libre del agente causal de la cercosporiosis; estas plantas servir como fuente semillero de cladodios libres de patógenos. Sin embargo, un problema morfogénico se presentó en las plantas de tuna *in vitro* obtenido en el Laboratorio de Genética y Biotecnología vegetal FCA-UNSH: técnicamente no presentaron



crecimiento de raíz, no obstante, el crecimiento foliar si era adecuado en condiciones de *in vitro*.

El objetivo del ensayo fue identificar un substrato que pueda inducir la rizogénesis de plántulas de tuna *in vitro* luego de trasplantado a condiciones de invernadero para su aclimatación adecuada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales de invernadero utilizados involucran las herramientas y equipos para la preparación y manejo del substrato: Fue esterilizado en autoclave por tindalización a 90°C por 20 minutos durante tres días, para el pesado de las plántulas *in vitro* e insumos se utilizó balanza analítica OHAUS y el invernadero cuyas condiciones de temperatura en promedio fue de 25°C, humedad relativa de 40% e iluminación natural para el crecimiento de las plantas.

El substrato fue preparado mezclando arena, turba y musgo en proporción equitativas y la dosis utilizada de inoculante con *Azospirillum* fue de 1ml. Los tratamientos se muestran en la Tabla N° 01. La inoculación con *Azospirillum spp.* se realizó después de haber esterilizado el substrato una semana luego del trasplante de las plántulas *in vitro* al substrato, Figura N° 01.

Tabla N° 01.- Tratamientos utilizados para la aclimatación y enraizamiento de plántulas de tuna *in vitro* en condiciones de invernadero. 2700 msnm Ayacucho.

TRATAMIENTOS	
T1	ARENA
T2	ARENA + TURBA
T3	ARENA + MUSGO
T4	ARENA + MUSGO + TURBA
T5	ARENA + TURBA + CEPA <i>Azospirillum</i> (C1)
T6	ARENA + MUSGO + CEPA <i>Azospirillum</i> (C1)
T7	ARENA + MUSGO + TURBA + CEPA <i>Azospirillum</i> (C1)
T8	ARENA + TURBA + CEPA <i>Azospirillum</i> (C2)
T9	ARENA + MUSGO + CEPA <i>Azospirillum</i> (C2)
T10	ARENA + MUSGO + TURBA + CEPA <i>Azospirillum</i> (C2)



**XVII Congreso Nacional y VIII Internacional de la
Ciencia del Suelo**

“Crianza del suelo para el buen vivir”

Ayacucho, Perú – 22 al 25 de mayo de 2017



El diseño experimental en el cual se distribuyó los 10 tratamientos y las unidades experimentales fue el Diseño Completo Randomizado (DCR) con seis repeticiones.

Las plántulas de tuna (*Opuntia ficus-indica*) *in vitro* (Figura N°01) fueron obtenidas en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal, de la Escuela Profesional de Agronomía – UNSCH, con tamaño promedio de 2 cm de altura de cladodio. No habían formado raíz, y se tomaron datos inicial y final de peso, altura de cladodio, N° de raíces y longitud de raíces.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las evaluaciones, de la respuesta de las plántulas de tuna obtenido *in vitro*, luego de 30 días de cultivadas en los substratos-tratamientos, se observan en Tabla N°02. En el cual el diferencial (la diferencia entre el valor final menos el inicial) de peso en casi todos los tratamientos fue negativo excepto en T2, T6 y T9. Esta respuesta nos indica que los tejidos hidratados de las plántulas que salieron de *in vitro*, se deshidrataron en su mayoría, por efecto del substrato y las condiciones ambientales del invernadero. Dentro de *in vitro* la hidratación era muy eficiente por osmosis y las condiciones de alta humedad relativa dentro de los frascos de vidrio, en contraste con las condiciones de invernadero.

Tabla N° 02.- Respuesta de las plántulas obtenidas *in vitro*, luego de 30 días en substrato para aclimatación y enraizamiento. Invernadero. 2700 msnm Ayacucho.

T	PESO gr	ALTURA cm	N° RAIZ	LONG RAIZ cm
T1	-0.248	0.555	0.0	0.000
T2	0.017	1.120	0.3	0.398
T3	-0.074	0.560	0.0	0.000
T4	0.028	0.665	0.0	0.147
T5	-0.010	0.485	0.0	0.000
T6	0.197	1.242	0.2	1.035
T7	-0.126	0.842	0.3	0.227
T8	-0.081	0.553	0.0	0.000
T9	0.112	1.807	0.7	2.009
T10	-0.232	0.233	0.2	0.167

El diferencial de altura de cladodio, fue positivo en todos los tratamientos, el cual nos muestra a los cladodios que inicialmente tenían 2 cm en promedio, ha incrementado su longitud. Es de destacar a los tratamientos T2, T6 y T9 en cuyos substratos se elongaron los cladodios.



**XVII Congreso Nacional y VIII Internacional de la
Ciencia del Suelo**

“Crianza del suelo para el buen vivir”

Ayacucho, Perú – 22 al 25 de mayo de 2017



Los datos más interesantes para nuestro objetivo están en su respuesta de enraizamiento de los cladodios. El número de raíz por cada cladodio no incremento significativamente, excepto en los tratamientos T9, T7, T6 y T2. Además que la longitud de las raíces obtenidas fueron los datos cruciales, siendo los tratamientos T9 y T6 los que desarrollaron raíces de mayor longitud.

Siendo la rizogénesis nuestro principal problema, debido a que los cladodios sobrevivirían poco tiempo sin raíz, fijamos nuestra atención y análisis de datos en esta variable. Al realizar el Análisis de Varianza (ANVA), Tabla N°03, a los datos de longitud de raíz en el DCR se observa que hay diferencia altamente significativa ($p: 0.01$) entre los tratamientos.

Tabla N° 03.- Análisis de Varianza de los valores de longitud de raíz de cladodios de tuna *in vitro*, luego de 30 días de trasplantado a los substratos. Invernadero, 2700 msnm. Ayacucho.

F. V.	G.l.	\sum Cuadrados	Cuad. Medio	F Val.	Pr > F
Tratamientos	9	23.43266667	2.60362963	2.27	0.0323
Error	50	57.41666667	1.14833333		
Total	59	80.84933333			

Al realizar la prueba de contraste de medias (Tuckey, $p: 0.05$), Tabla N°04, se obtuvo como tratamientos con mayores medias a T9 y T6 que no difieren estadísticamente. Los demás tratamientos respondieron con menor desarrollo radicular.

Tabla N°04.- Prueba de contraste (Tuckey, $P: 0.05$) de los valores de Longitud de raíz de plántulas de tuna *in vitro*, 30 días en substratos, invernadero, 2700msnm Ayacucho

Agrupamiento	Media	N	T
A	2.0333	6	9
B A	1.0833	6	6
B	0.4333	6	2
B	0.2500	6	7
B	0.1667	6	4
B	0.1667	6	10
B	0.0000	6	5
B	0.0000	6	3
B	0.0000	6	1
B	0.0000	6	8

El tratamiento T9 fue seleccionado por su capacidad de inducir mayor número y longitud de raíces en los cladodios de tuna *in vitro* en las condiciones de invernadero. Esta capacidad se atribuye a sus componentes principalmente *Azospirillum spp.*

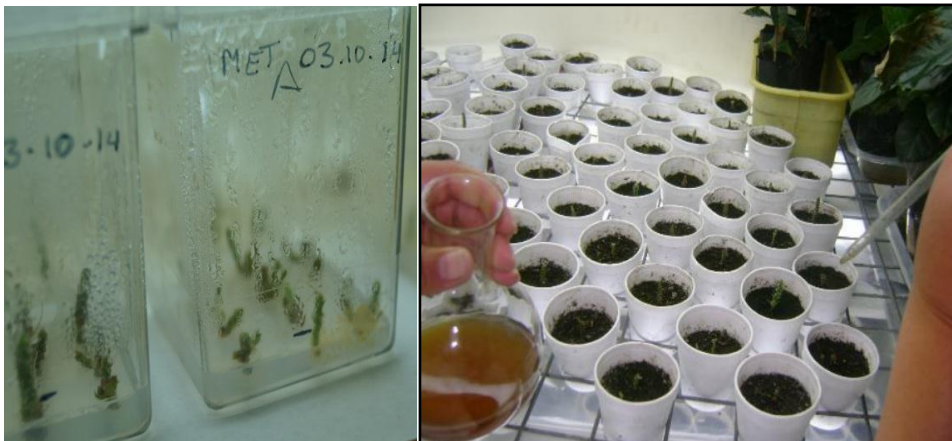


Figura N° 01.- A la izquierda, plántulas de tuna *Opuntia ficus-indica* cultivado de meristemas *in vitro* en desarrollo foliar, sin rizogénesis. A la derecha, Plántulas de Tuna trasplantadas a maceteros con substratos e inoculadas con *Azospirillum sp.*

Los substratos que no contienen *Azospirillum spp.*, no facilitaron la rizogénesis, se observa claramente en las Tablas N°02 y 04. El efecto de inocular las plantas de tuna recién salidas de *in vitro* con *Azospirillum spp.* fue positivo. Reportes de investigación relacionados a la asociación de bacterias del género *Azospirillum spp.* con *Opuntia ficus-indica* son referidos por Villavicencio et al (2011) quienes menciona la asociación que tienen las cactácea con la bacteria en mención.

Fonseca-García et al., (2016) identificó 76 bacterias y dos archaeas pertenecientes a 32 Phylo. Sin embargo 13 bacterias y una archaea fueron los más prevalentes. Los Phyla bacterianos corresponden a Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Acidobacteria, y Bacteroidetes y comprenden más del 85% de la abundancia relativa en cada una de las comunidades encontradas en *Mirtillo geometrizans* y *Opuntia robusta*, en la rizosfera, en la endosfera de la raíz, endosfera del tallo y en la phyllosfera. En el caso de hongos, detectaron 17 clases de hongos



**XVII Congreso Nacional y VIII Internacional de la
Ciencia del Suelo**

“Crianza del suelo para el buen vivir”

Ayacucho, Perú – 22 al 25 de mayo de 2017



pertenecientes a seis Phyla, siendo más abundante el Phylum Ascomycota (más del 90 %), compuesto principalmente por Pleosporales, Chaetothyriales, Capnodiales, Dothideales, y Hypocreales, y de los basidiomycotan Agaricales y Hymenochaetales. También hongos de micorriza arbuscular de los géneros *Entrophospora* y *Glomus* (Phylum Glomeromycota) representando menos del 0.5% de la población en el suelo que rodea las raíces y la rizosfera de ambos cactus

En cactus, como han reportado en otros estudios con suculentas y no suculentas (Singh et al., 2009; Köberl et al., 2011; Lundberg et al., 2012; Marasco et al., 2012; Desgarnes et al., 2014; Makhalanyane et al., 2015; Zarraindia et al., 2015), muestran que los suelos poseen alta diversidad taxonómica microbiana considerando bacterias/archaeas y hongos. La comunidad de bacterias/archaea en la phyllosfera de cactus muestran alta diversidad que aquella observada en la rizosfera, posiblemente porque la phyllosfera está expuesta directamente a la radiación UV y altas gradientes de temperaturas (Desgarnes et al., 2014; Coleman-Derr et al., 2016).

Estos estudios en *Mirtillo geometrizzans*, *Opuntia robusta*, en cactáceas y suculentas demuestran que estas especies han desarrollado una relación importante con las bacterias/archaeas y hongos, con quienes luego de millones de años de convivencia han establecido relaciones simbióticas y otros tipos de relaciones. Que cuando se cultivan *in vitro* son eliminados a través de los procesos de esterilización y asepsia, además de obtener nuevas plantas solo a partir de células meristemáticas, las plantas *in vitro* de tuna se encuentran libres de dichas bacteria/archaeas y hongos, que de lo contrario generarían contaminación proliferando en los medios asépticos *in vitro*.

Además, en invernadero, cuando regresamos estas plántulas nuevamente a las condiciones de *ex vitro*, en maceteros con substratos como arena, musgo, materia orgánica y suelos, estos insumos también están esterilizados para evitar infecciones en la etapa de aclimatación. Estos proveen de minerales y agua que luego son absorbidos por las plantas a las que hospedan.

En las dos etapas, en *in vitro* y en invernadero los substratos están esterilizados y no contienen ningún microorganismo, es lo que sucede en los tratamientos T1, T2, T3



**XVII Congreso Nacional y VIII Internacional de la
Ciencia del Suelo**

“Crianza del suelo para el buen vivir”

Ayacucho, Perú – 22 al 25 de mayo de 2017



y T4. En los cuales no se presentó la rizogénesis. En los tratamientos donde se incorpora la bacteria del género *Azospirillum sp.* mejoró la rizogénesis y en mayor expresión en los tratamiento T6 y T9, debido a la asociación positiva que las bacterias tienen con las cactáceas.

CONCLUSIÓN

Bajo las condiciones y factores concomitantes en el desarrollo del experimento en condiciones de invernadero, Ayacucho 2700 msnm, se concluye:

- 1.- Los sustratos que indujeron rizogénesis en las plántulas de tuna *in vitro*, en 30 días, fueron T9 y T6.
- 2.- La inoculación con *Azospirillum sp.* incrementó la longitud del cladodio, número y longitud de raíces de plántulas de tuna *in vitro* en la etapa de aclimatación.

AGRADECIMIENTOS

A los representantes del Convenio de Cooperación Interinstitucional entre la Dirección Regional Agraria de Ayacucho - MINAGRI y la Facultad de Ciencias Agrarias – UNSCH: Proyecto “Fortalecimiento de Capacidades Para la producción de Tuna en la región Ayacucho” 2013 - 2016.

BIBLIOGRAFÍA

- Ayala-Escobar, V., Yáñez-Morales, M.J., Braun, U., Groenewald, J.Z. and Crous, P.W. (2006). *Pseudocercospora opuntiae* sp. nov., the causal organism of cactus leaf spot in Mexico
- Barrantes D., F. (1996-1998). Enfermedades De La Tuna (*Opuntia ficus-indica* Mill.) En Ayacucho. Resúmenes Del IV Y V Congreso Internacional De La Tuna Y Cochinilla, Ayacucho
- Coleman-Derr, D., Desgarenes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., et al. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytol.* 209, 798–811. doi: 10.1111/nph.13697.
- Desgarenes, D., Garrido, E., Torres-Gomez, M. J., Peña-Cabriales, J. J., and Partida-Martinez, L. P. (2014). Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated *Agave* species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90, 844–857. doi: 10.1111/1574-6941.12438.
- Desgarenes, D., Garrido, E., Torres-Gomez, M. J., Peña-Cabriales, J. J., and Partida-Martinez, L. P. (2014). Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated *Agave* species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90, 844–857. doi: 10.1111/1574-6941.12438.
- Diversity 21: 1-9.



**XVII Congreso Nacional y VIII Internacional de la
Ciencia del Suelo**

“Crianza del suelo para el buen vivir”

Ayacucho, Perú – 22 al 25 de mayo de 2017



Fonseca-García, C , Devin Coleman-Derr , Etzel Garrido¹ , Axel Visel, Susannah G. Tringe y Laila P. Partida-Martínez,, (2016) The Cacti Microbiome: Interplay between Habitat-Filtering and Host-Specificity . *Front. Microbiol.* 7:150. doi: 10.3389/fmicb.2016.00150

Köberl, M., Müller, H., Ramadan, E. M., and Berg, G. (2011). Desert farming benefits from microbial potential in arid soils and promotes diversity and plant health. *PLoS ONE* 6:e24452. doi: 10.1371/journal.pone.0024452

Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Herrera Paredes, S., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., et al. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488, 86–90. doi: 10.1038/nature11237.

Makhalanyane, T. P., Valverde, A., Gunnigle, E., Frossard, A., Ramond, J. B., and Cowan, D. A. (2015). Microbial ecology of hot desert edaphic systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 203–221. doi: 10.1093/femsre/fuu011.

Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., et al. (2012). A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. *PLoS ONE* 7:e48479. doi: 10.1371/journal.pone.0048479 .

Mondragon-Jacobo, C. and Perez-Gonzalez, S. (1996). Native cultivars of cactus pear in Mexico. In: *Progress in new crops.* (ed. J. Janick). ASHS Press, Arlington, VA.: 446450.

Rojas, T. (2001) “Micro-seedling Aclimatization of prickly pear (*Opuntia ficus –indica miller*)”.

Singh, B., Dawson, L. A., Macdonald, C. A., and Buckland, S. M. (2009). Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: a field study. *Appl. Soil Ecol.* 41, 239–248. doi: 10.1016/j.apsoil.2008.10.003

Villavicencio Gutiérrez, E.; González C, A.; Arredondo G., A.; Iracheta D, A.; Comparan S.,S.; y Casique V., R (2011) “Micropropagación de *turbinicarpus knuthianus* (boed.) john & riha cactacea ornamental del desierto chihuahuense, en estatus de riesgo”.

Zarraonandia, I., Owens, S. M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-marcell, J., Lax, S., et al. (2015). The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio* 6, 1–10. doi: 10.1128/mBio.02527-14.