



MICROPROPAGACIÓN DE *Opuntia velutina*: UNA ESPECIE UTILIZADA COMO NOPAL VERDURA

MICROPROPAGATION OF *Opuntia velutina*: A SPECIES USED AS VEGETABLE CACTUS

Eréndira Rubio-Ochoa, Carlos Andrés Herrera-Molina, Giovanni Alejandro Magaña-Escobar, María del Carmen Rocha-Granados y Pedro Antonio García-Saucedo*

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Laboratorio de Bromatología, Uruapan, Michoacán, México.

*Autor de correspondencia (antonio.garcia@umich.mx)

RESUMEN

El nopal (*Opuntia ficus-indica*) ha destacado en el siglo XXI debido a sus características de crecimiento, usos y propiedades nutricionales y fitoquímicas, lo que ha impulsado el interés por especies como el nopalillo silvestre (*Opuntia velutina*), empleado como nopal verdura. A pesar de su aprovechamiento, se carece de datos sobre su ecología, fisiología y genética, por lo que es necesario desarrollar sistemas de propagación eficientes, como la micropropagación. En este estudio se estableció un protocolo para la micropropagación de *O. velutina*. Para el establecimiento e inducción de brotes, las areolas se sumergieron en hipoclorito de sodio comercial (NaClO) a diferentes concentraciones (0-15 %) y tiempos de inmersión (5-15 min) y colocados en medio básico de Murashige y Skoog (MS). En la fase de multiplicación el medio MS fue suplementado con distintas concentraciones (0.5-1.5 mg L⁻¹) de 6-benciladenina (BA), Kinetina (Kin), ácido indolacético (IAA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Para alargamiento y enraizamiento se usaron Kin (0.5, 1, 1.5 mg L⁻¹) combinada con IAA y 2,4-D (1.5, 1, 0.5 mg L⁻¹) y para la aclimatación se evaluaron cinco proporciones de turba:perlita (1:0, 0:1, 1:1, 2:1 y 1:2). Los mayores porcentajes de explantes establecidos (70.8 %) e inducción de brotes (66.7 %) se observaron tras 5 min en 5 % de NaClO. El tratamiento con 1.5 mg L⁻¹ de BA produjo el mayor número de brotes y capacidad formadora de brotes (7.06). Los explantes con mayor longitud (26.82 mm) y enraizamiento (8.26) se obtuvieron con 0.5 mg L⁻¹ de Kin y 1.5 mg L⁻¹ de IAA, superando significativamente al control. En la aclimatación, la mezcla 1:1 de turba:perlita promovió la mayor supervivencia (80 %). El protocolo de micropropagación desarrollado en este estudio constituye una herramienta biotecnológica para la multiplicación a gran escala de *O. velutina* que podría emplearse en programas de reintroducción y en el aprovechamiento comercial de la especie.

Palabras Clave: *Opuntia velutina*, cladodio, micropropagación, multiplicación, nopal.

SUMMARY

Prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica*) has gained prominence in the 21st century due to its growth characteristics, uses and nutritional and phytochemical properties, which has boosted interest in related species such as the wild nopalillo (*Opuntia velutina*), used as a vegetable cactus. Despite its use, there is a lack of data on its ecology, physiology and genetics, making it necessary to develop efficient propagation systems such as micropropagation. This study established a protocol for micropropagation of *O. velutina*. For explant establishment and shoot induction, areolas were immersed in

commercial sodium hypochlorite (NaClO) at different concentrations (0-15 %) and immersion times (5-15 min) and then placed on basic Murashige and Skoog (MS) medium. In the multiplication phase, the MS medium was supplemented with different concentrations (0.5-1.5 mg L⁻¹) of 6-benzyladenine (BA), kinetin (Kin), indolacetic acid (IAA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). For shoot elongation and rooting, Kin (0.5, 1, 1.5 mg L⁻¹) was combined with IAA and 2,4-D (1.5, 1, 0.5 mg L⁻¹), and for acclimation five peat:perlite ratios (1:0, 0:1, 1:1, 2:1 and 1:2) were evaluated. The highest percentages of established explants (70.8 %) and shoot induction (66.7 %) were observed after 5 min in 5 % NaClO. Treatment with 1.5 mg L⁻¹ of BA produced the largest number of shoots and shoot-forming capacity (7.06). Explants with the longest shoots (26.82 mm) and highest rooting response (8.26) were obtained with 0.5 mg L⁻¹ Kin and 1.5 mg L⁻¹ IAA, significantly outperforming the control. In acclimatization, the 1:1 peat:perlite mixture promoted the highest survival (80 %). The micropropagation protocol developed in this study represents a biotechnological tool for large-scale multiplication of *O. velutina* that could be used in reintroduction programs and commercial exploitation of the species.

Index words: *Opuntia velutina*, cactus, cladode, micropropagation, multiplication.

INTRODUCCIÓN

El nopal es una planta perteneciente a la familia Cactaceae, que incluye géneros botánicos de importancia alimentaria, como *Opuntia*, la cual incluye a las especies de nopal verdura (Tenorio-Escandón *et al.*, 2022). A nivel mundial, el nopal verdura es reconocido por sus características nutricionales y su composición fitoquímica. El análisis de sus compuestos bioactivos, caracterizados por alta capacidad antioxidante (flavonoides, fenólicos, β-carotenos, betalainas y vitamina C) ha permitido catalogarlo como un alimento funcional (Abbas *et al.*, 2022).

En México, la creciente popularidad del consumo de nopal, junto con las nuevas oportunidades de exportación, han fomentado el incremento en la producción y en la superficie destinada a este cultivo. En el año 2022, el Servicio de Información Agroalimentaria Pesquera

(SIAP) reportó la siembra en México de 12,491 ha y una producción de 872,000 t, lo que representa un incremento del 8 % respecto al año anterior, alcanzando el valor más alto de los últimos tres años (SIAP, 2022).

La creciente demanda de nopal ha impulsado la exploración de nuevas especies con mayor potencial productivo. Aunque especies como *O. ficus-indica* dominan el mercado, la existencia de más de 150 especies de nopal ofrece una amplia gama de opciones para diversificar la producción y garantizar la sostenibilidad del cultivo a largo plazo. El nopalillo silvestre (*O. velutina*), una especie nativa de México, se presenta como una alternativa prometedora debido a su capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales. Aunque su cultivo no está oficialmente registrado como hortaliza, es ampliamente cultivado en los estados de Guerrero, Guanajuato, Michoacán y Jalisco; sin embargo, su clasificación como especie, con datos deficientes en la NOM-059-SEMARNAT-2010, resalta la necesidad de ampliar su investigación para comprender su ecología, fisiología y genética, así como sus técnicas de propagación (Louhaichi *et al.*, 2018; Tenorio-Escandón *et al.*, 2022).

La creciente necesidad de abastecer la demanda del producto y la expansión del cultivo de nopal ha impulsado la evaluación de diferentes metodologías de propagación, tanto sexual como asexual. Actualmente, se reporta que la germinación de semillas es una técnica poco empleada debido a la variación genética y al lento desarrollo de las plantas, por lo que la siembra de pencas se ha consolidado como el método tradicional de multiplicación más empleado en sistemas productivos. (Bougdaoua y El Mtili, 2020); no obstante, las técnicas tradicionales de generación de plantas presentan limitaciones frente a los sistemas de multiplicación intensiva, como la demanda de superficie, la susceptibilidad a problemas fitosanitarios y el tiempo requerido para la generación de nuevas plantas (Chadipiralla *et al.*, 2020).

En la agricultura del siglo XXI, la producción intensiva de plantas ha experimentado un auge impulsado por el desarrollo de tecnologías biotecnológicas. Entre estas estrategias destacan las técnicas de cultivo de tejidos vegetales (CTV) *in vitro*. Dentro del CTV, la técnica de micropropagación posibilita la obtención de plantas completas a partir de fragmentos de tejido de una planta madre bajo condiciones controladas *in vitro* (Chadipiralla *et al.*, 2020). Esta técnica reduce los tiempos de desarrollo y facilita el manejo de altos volúmenes de individuos en espacios limitados, por lo que es recomendado en especies con largos periodos juveniles, complejidad genética o baja viabilidad de las semillas, tal como ocurre en las especies de *Opuntia* (Bouzroud *et al.*, 2022; Hasnain *et al.*, 2022).

Las técnicas de micropropagación ofrecen un amplio abanico de posibilidades para mejorar la producción de nopales (Portillo y Soltero, 2021). La optimización de las condiciones de la micropropagación permite la producción a gran escala de plantas de alta calidad, libres de patógenos y genéticamente homogéneas, lo que contribuye a la conservación de especies de nopal (Bouzroud *et al.*, 2022; Portillo y Soltero 2021). En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar un protocolo eficiente de micropropagación de *O. velutina*, orientado a su aprovechamiento como nopal verdura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron cladodios y órganos florales de plantas madre de más de 36 meses de edad, provenientes de un huerto comercial de nopal verdura ubicado en el municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, México, con coordenadas 19° 23' 45.6" N y 102° 00' 00" O. Para la verificación de la especie de trabajo, los ejemplares botánicos fueron prensados, secados y depositados en el Herbario del Instituto de Ecología A.C. (INECOL), Centro Regional del Bajío, con el número de registro IEB-273300.

Establecimiento del cultivo aséptico e inducción de brotes

Cladodios de entre 10 y 15 cm de longitud se recolectaron y trasladaron en papel periódico húmedo dentro de una bolsa hermética. Los cladodios se seccionaron en segmentos de 1 cm² que incluyeran una areola, los cuales se usaron como explantes. Éstos se enjuagaron con agua corriente y se colocaron en agitación con agua y detergente comercial (Roma®, 5 g L⁻¹) durante 40 min; posteriormente, se sumergieron en Captan® y Benomilo® (4 g L⁻¹) por 4 h, también en agitación. En campana de flujo laminar, los explantes se colocaron en una solución de alcohol etílico 70 % por 60 s, seguido de una solución de NaClO (Cloralex®) a 5, 10 y 15 %, con tiempos de inmersión de 5, 10 y 15 min; el tratamiento control se agregó sin exposición a solución de NaClO. Entre cada solución desinfectante se realizó un triple enjuague con agua destilada estéril. Por último, se sumergieron en una solución antioxidante estéril compuesta por ácido ascórbico (5 g L⁻¹) y cítrico (5 g L⁻¹) por 30 s y se secaron con toallas de papel estéril. En seguida, los explantes se colocaron en medio de cultivo basal compuesto por sales inorgánicas del medio Murashige y Skoog (1962, MS), tal como se describe en el respectivo apartado, e incubados por un periodo de tres semanas.

Al término del periodo mencionado se evaluó el porcentaje de explantes sobrevivientes (ES), contaminación fúngica (CF) y bacteriana (CB) y oscurecimiento del tejido (OS), la inducción de brotes se registró mediante el porcentaje de explantes con brote (EB). El experimento constó de ocho repeticiones por tratamiento. Cada repetición consistió en un frasco con tres unidades experimentales (tres aréolas por frasco).

Medio de cultivo basal y condiciones de incubación

El medio basal utilizado en las diferentes etapas de micropropagación consistió en sales inorgánicas y orgánicas (myo-inositol 100 mg L⁻¹, tiamina-HCl 0.1 mg L⁻¹, ácido nicotínico 0.5 mg L⁻¹, piridoxina-HCl 0.5 mg L⁻¹ y glicina 2 mg L⁻¹) del medio MS, adicionadas con sacarosa (30 g L⁻¹), polivinilpirrolidona (PVP, 1 mg L⁻¹), y solidificado con agar (Sigma Aldrich, 8 g L⁻¹). El pH se ajustó a 5.7 con NaOH y HCl 1 N, mediante un potenciómetro (modelo pH1100, Oakton Instruments, Vernon Hills, Illinois, EUA). Se colocaron 20 mL de medio basal en frascos de vidrio con tapa hermética de 90 mL de capacidad. La esterilización se llevó a cabo en autoclave (All American, Modelo 1925X, Fall River, Wisconsin, EUA) a 121 °C y 1.5 kg cm⁻² de presión por 20 min. Los cultivos se incubaron a 25 ± 2 °C en fotoperiodo de 16 h luz e intensidad lumínica de 45 μmol m⁻² s⁻¹.

Multiplicación de brotes

Segmentos asépticos de 1 cm² con una areola se establecieron en medio de cultivo basal suplementado con cuatro reguladores: BA, Kin, AIA y 2,4-D, cada uno en tres concentraciones distintas (0.5, 1, 1.5 mg L⁻¹). A las tres semanas, los explantes obtenidos se subcultivaron a medio basal libre de fitoreguladores para evitar la pérdida por hiperhidracidad (vitrificación); este mismo medio se utilizó para el tratamiento testigo. El efecto residual de los reguladores se mantuvo por un periodo de tres semanas posteriores al subcultivo. A las seis semanas totales se cuantificó el número de brotes por explante (BE), el porcentaje de brotación (B), la capacidad formadora de brotes (CFB), acorde con lo reportado por Stojičić *et al.* (2024), que se describe mediante la siguiente ecuación:

$$CFB = \frac{(B)(BE)}{100}$$

Donde, B describe el porcentaje de brotación y BE el número de explantes con brote; al mismo tiempo se cuantificó el número de raíces por explante (NR). El experimento tuvo 10 repeticiones por tratamiento y cada repetición consistió en un frasco de cultivo con tres unidades experimentales (tres aréolas por frasco).

Alargamiento y enraizamiento *in vitro*

Se usaron brotes provenientes de la etapa de multiplicación de 1 cm de longitud, se cultivaron en medio basal con Kin (0.5, 1, 1.5 mg L⁻¹) en combinación con AIA y 2,4-D (1.5, 1, 0.5 mg L⁻¹). A las tres semanas de incubación, se realizaron subcultivos en medio basal libre de fitoreguladores, este mismo medio se utilizó para el tratamiento testigo. Tal y como se mencionó en la sección de Multiplicación de brotes, después de seis semanas se evaluó la longitud del explante (LE), número de raíces por explante (RE), porcentaje de enraizamiento (R) y capacidad formadora de raíces (CFR), ésta fue calculada con la fórmula indicada en la sección de Multiplicación de brotes con la sustitución de los valores R y NR. Se tuvieron 10 repeticiones por tratamiento. Cada unidad experimental fue un frasco de cultivo con tres explantes.

Aclimatación

Las plántulas enraizadas *in vitro*, de 4 a 6 cm, fueron transferidas a sustrato divididas en cinco tratamientos compuestos por proporciones de turba y perlita (1:0, 1:1, 2:1, 1:2 y 0:1). Las proporciones de turba y perlita pura (1:0 y 0:1 respectivamente) se usaron como tratamientos control. El experimento tuvo tres repeticiones, cada repetición consistió en una caja de policarbonato con 10 plántulas de nopal.

Los trasplantes se realizaron en cajas de policarbonato (12 × 10 × 7 cm). Durante el proceso de aclimatación se aplicó un único riego con solución compuesta por enraizador comercial (Rooting®, 1 ml L⁻¹) y ácido glutámico comercial (GLU-500®, 0.3 g L⁻¹). A los 40 días se evaluó el porcentaje de supervivencia (S) y el número de raíces generadas (NR).

Análisis estadístico

Los experimentos se establecieron en un diseño completamente al azar. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y se empleó la prueba de Tukey para identificar diferencias significativas (P ≤ 0.05) entre tratamientos. Los análisis se hicieron con el procedimiento estadístico JMP 11.0.0. (SAS Institute, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Material vegetal

El material colectado fue verificado como *O. velutina*, también conocido como nopal velludo o nopalillo silvestre, que se caracteriza por ser planta arborescente con tronco ramificado, que alcanza 2 a 4 m de altura, con cladodios

obovados, oblongos o piriformes y areolas de 3 mm que contienen gloquidias y espinas agudas de tamaño variable; en estado joven son comestibles. Tiene flores hermafroditas de hasta 3 cm, con pétalos amarillos, anaranjados o rojos, y numerosas espinas (Figura 1).

A pesar de su consumo como verdura en los estados de Guerrero, Guanajuato, Michoacán y Jalisco, existe una carencia de información sobre sus características nutricionales, fitoquímicas y nutraceuticas.

Establecimiento del cultivo aséptico e inducción de brotes

En el sistema de desinfección superficial, el mayor porcentaje de explantes sobrevivientes (70.8 %) se registró con 5 % de NaClO durante 5 min, además de ser uno de los tratamientos con menor contaminación fúngica, bacteriana, oscurecimiento y porcentaje de explantes con brotación (Cuadro 1).

Por otro lado, el tratamiento con 15 % de NaClO durante 15 min resultó en un porcentaje de establecimiento (12.5 %) estadísticamente semejante al testigo, pero presentó el mayor nivel de oscurecimiento (62.5 %), mientras que el porcentaje de explantes con brotes no presentó diferencias en comparación con el control. Estos resultados indican una tendencia en la que tanto el aumento de la concentración de NaClO como el tiempo de exposición reducen la contaminación fúngica y bacteriana;

sin embargo, incrementa el oscurecimiento y reduce la viabilidad de los explantes. Este comportamiento coincide con lo reportado por Rodríguez-de la O y Ramírez-Pantoja (2020) en explantes de *O. ficus-indica*, donde los autores observaron 100 % de sobrevivencia con una solución de NaClO 10 % durante 10 min, en comparación con los tratamientos de mayor concentración (20 %) y tiempos de exposición más extensos (20 min). Del mismo modo, Mabrouk *et al.* (2021) observaron niveles de necrosis inferiores al 0.33 % en explantes de *Opuntia* spp. con una solución de hipoclorito de calcio al 4.23 % y tensioactivo (tween 20), lo que sugiere que tanto la forma química del cloro como el uso de adyuvantes podrían minimizar la fitotoxicidad sin comprometer la sobrevivencia de los explantes. Bouzroud *et al.* (2022) señalaron que concentraciones superiores al 10 % de NaClO aumentan significativamente el oscurecimiento, lo cual demuestra la importancia de equilibrar la eficacia desinfectante con la conservación de la integridad del tejido; además, atribuyeron el oscurecimiento de los explantes durante la micropropagación de *Opuntia* a la liberación de compuestos fenólicos tras la manipulación de los tejidos. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en el presente estudio, lo que sugiere que un aumento en la concentración del compuesto antioxidante en el medio de cultivo podría tener un efecto positivo en el establecimiento *in vitro* de explantes de *O. velutina*.

Se observó brotación en explantes cultivados en medio MS sin la adición de reguladores de crecimiento, lo que

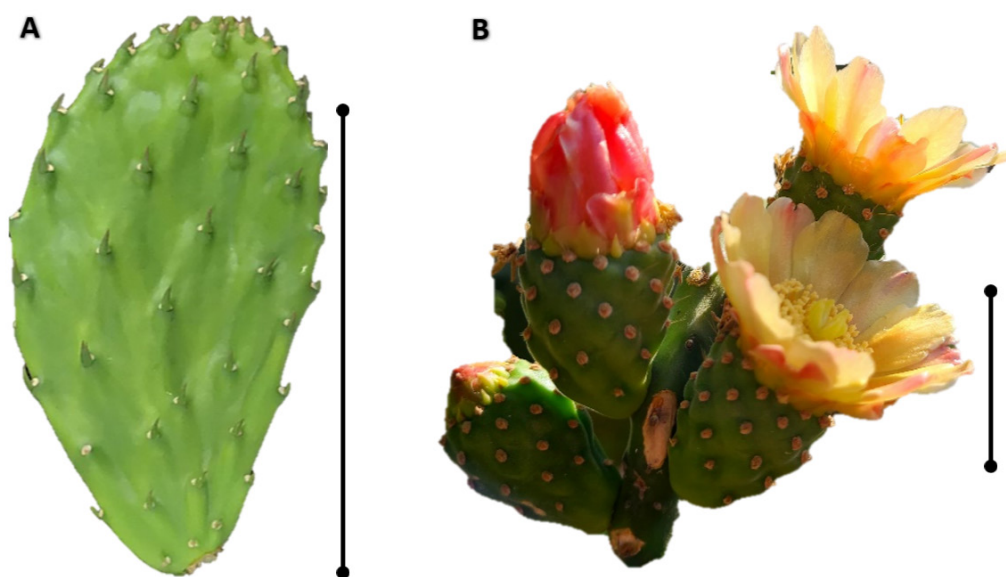


Figura 1. Órganos de nopal verde (*O. velutina*). A) Cladodios de nopal verde (barra de escala a 10 cm). B) Órganos florales (barra de escala a 3 cm).

Cuadro 1. Efecto de la concentración (%) y tiempo de inmersión (min) en hipoclorito de sodio (NaClO) sobre el porcentaje de explantes sobrevivientes (ES), contaminación fúngica (CF), contaminación bacteriana (CB), oscurecimiento (OS) y porcentaje de explantes con brote (EB) en *Opuntia velutina* a las tres semanas de cultivo *in vitro*.

[NaClO] (%)	Tiempo de inmersión (min)	ES (%)	CF (%)	CB (%)	OS (%)	EB (%)
0	0	4.2 d	4.2 d	91.6 a	0.0 e	4.2 d
5	5	70.8 a	12.5 cd	8.3 b	8.3 de	66.7 a
5	10	50.0 ab	16.7 bcd	16.7 b	16.7 cde	45.8 ab
5	15	45.8 abc	12.5 cd	8.3 b	33.3 bc	41.7 bc
10	5	20.8 cd	54.2 a	20.8 b	4.2 de	16.7 d
10	10	29.2 bcd	33.3 abc	16.7 b	20.8 cde	25.0 bcd
10	15	41.7 bc	25.0 bcd	8.3 b	25.0 cd	20.8 cd
15	5	12.5 d	41.7 ab	12.5 b	33.3 bc	12.5 d
15	10	12.5 d	29.2 abcd	8.3 b	50.0 ab	8.3 d
15	15	12.5 d	12.5 cd	12.5 b	62.5 a	0.0 d

Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

sugiere la participación de fitohormonas endógenas presentes en el tejido vegetal. Esta capacidad de regeneración en ausencia de auxinas o citocininas exógenas ha sido previamente reportada en especies del género *Opuntia* y otras cactáceas.

En *Opuntia ficus-indica*, Bouzroud *et al.* (2022) documentaron la emisión de brotes axilares sin aplicación de reguladores de crecimiento, fenómeno atribuido al contenido natural de citocininas en tejidos juveniles; además, Senanayake *et al.* (2023) señalaron que la competencia morfogénica está determinada por el tipo de explante, su estado fisiológico y su reserva hormonal, lo que explicaría la brotación observada en este estudio, incluso sin estímulos hormonales exógenos.

Aunque en todos los tratamientos del presente trabajo se registró brotación, los tratamientos de desinfección intensos pueden inducir oscurecimiento y daño tisular, afectando la integridad meristemática y la dinámica hormonal, lo que compromete la organogénesis, asociada con pérdida de viabilidad celular y posible inactivación de reguladores endógenos, tal como se ha reportado en *Opuntia silvestre* (Marhi *et al.*, 2023) e *Hylocereus polyrhizus* (Lee y Chang, 2022).

En este contexto, el mayor porcentaje de explantes con brotación (66.7 %) se obtuvo con el tratamiento de 5 % de NaClO durante 5 min. Los brotes emergieron desde la parte interna de las areolas, precedidos por un agrandamiento de las mismas. La brotación fue evidente a los seis días de incubación, con la aparición de estructuras foliares

(Figura 2A); a los 9 días, se observaron hojas verdes completamente desarrolladas (Figura 2B). A partir del día 15, las hojas comenzaron a tornarse amarillas, con pérdida de turgencia (Figura 2C), hasta adquirir una coloración café y presentar defoliación hacia el día 21, momento en el cual se observó la aparición de espinas (Figura 2D).

En las especies de *Opuntia*, los cladodios jóvenes desarrollan hojas en las areolas durante las etapas iniciales, las cuales se desprenden conforme madura el tejido (Pratt *et al.*, 2018). Estas estructuras foliares transitorias son reemplazadas por espinas y gloquidios, considerados como hojas modificadas permanentes (Maiuolo *et al.*, 2024). Este patrón morfológico se interpreta como una estrategia fisiológica de adaptación a ambientes áridos, al reducir la superficie de transpiración y optimizar la eficiencia del metabolismo CAM (Inglese *et al.*, 2018; Niechayev *et al.*, 2023).

En condiciones *in vitro*, este fenómeno puede interpretarse como una respuesta adaptativa conservada, la abscisión temprana de estructuras foliares remanentes podría reflejar una transición hacia un estado maduro del tejido, lo que favorecería la activación de meristemos y la diferenciación de estructuras especializadas.

Multiplicación de brotes

Los tratamientos con los fitoreguladores evaluados mostraron diferentes respuestas organogénicas en *O. velutina*, observándose variaciones en el número de brotes por explante. A las seis semanas, el número de brotes

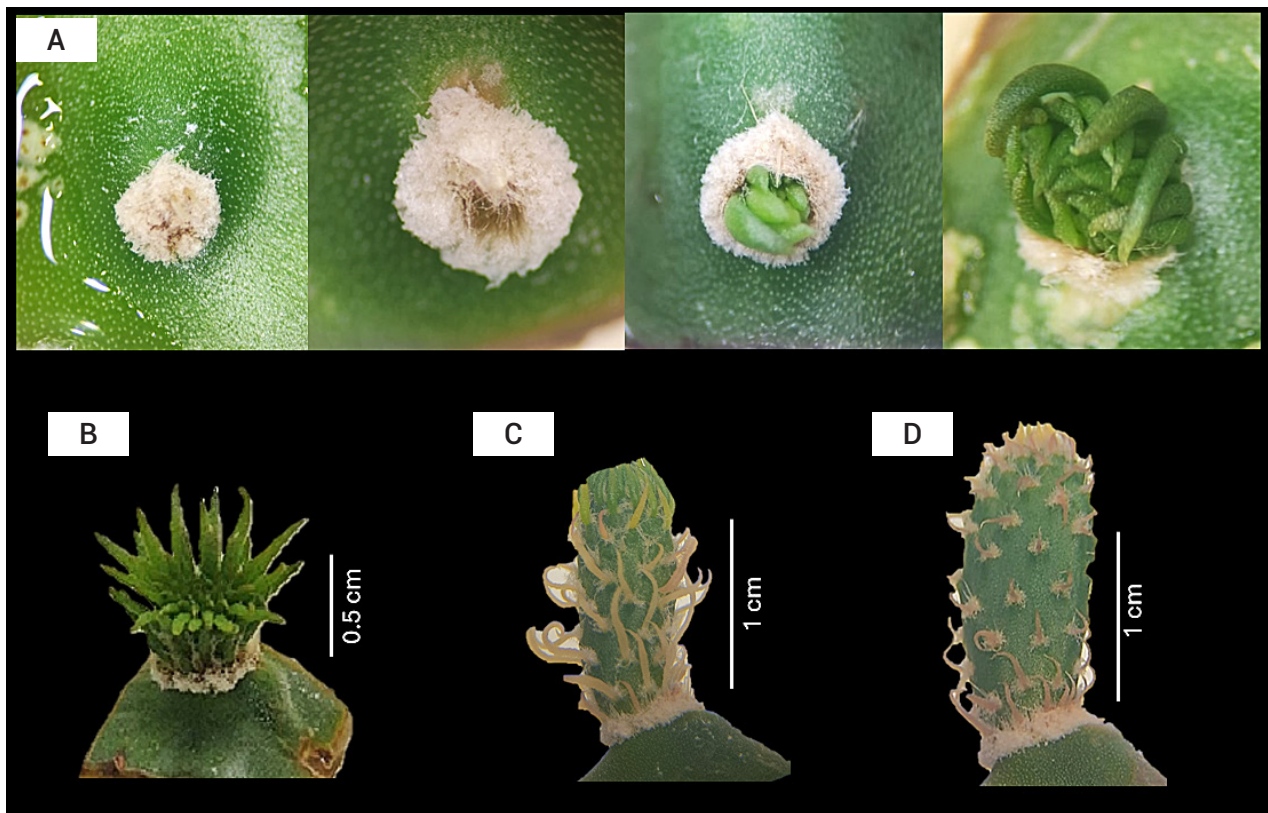


Figura 2. Regeneración *in vitro* de *Opuntia velutina*. A) etapas iniciales de brotación a los seis días de incubación, B) desarrollo de hojas temporales a los 9 días, C) brotes con hojas en amarillamiento a los 15 días, D) plántulas *in vitro* con espinas visibles a los 21 días.

reflejó tanto la eficacia de la respuesta inicial mediada por reguladores de crecimiento, como el desarrollo posterior en medio basal. El subcultivo a medio libre de reguladores a las tres semanas evitó la aparición de hiperhidricidad, condición comúnmente reportada en especies de *Opuntia* por la exposición prolongada a reguladores de crecimiento, lo cual puede interferir en la respuesta del explante y provocar la pérdida durante las etapas de micropropagación (Bouzroud *et al.*, 2022; De souza *et al.*, 2019; Polivanova y Bedarev, 2022). En las tres semanas posteriores al subcultivo se evidenció un efecto residual de los reguladores de crecimiento en la multiplicación y desarrollo de los brotes. Este efecto residual también ha sido documentado en otras especies, donde se ha observado que la aplicación de auxinas o citocininas durante la inducción y multiplicación puede influir en fases subsecuentes libres de reguladores, como en piña (*Ananas comosus* var. *comosus*), rosa (*Rosa* spp. cultivares Bianca y El Torro) y durazno (*Prunus* sp.) (Eliwa, 2025; Mahmood y Hauser, 2015; Souza *et al.*, 2010).

El tratamiento adicionado con 1.5 mg L⁻¹ de BA alcanzó el valor más alto, con un promedio de 7.06 de brotes por

explante (Cuadro 2).

Estos resultados superaron a los reportados por Rodríguez-de la O y Ramírez-Pantoja (2020) en *O. ficus-indica*, quienes obtuvieron 5.57 brotes por explante en medio MS adicionado con 2 mg L⁻¹ de BA. Del mismo modo, Ferreira *et al.* (2021) reportaron 2.05 brotes por explante con 1.5 mg L⁻¹ de BA en explantes de *O. stricta*; en contraste, Mabrouk *et al.* (2021) observaron hasta 15 brotes por explante durante la micropropagación de *O. ficus-indica* con 1.5 mg L⁻¹ de BA. Estos datos evidenciaron que la organogénesis en nopal no solo depende del tipo y concentración de fitoreguladores de crecimiento, sino también del genotipo y las condiciones específicas del cultivo.

Por otro lado, la capacidad formadora de brotes relaciona el número de brotes formados por explante y el porcentaje de brotación, lo que podría expresarse como un índice realista de la capacidad regenerativa de tejido en respuesta a un regulador de crecimiento o al medio de cultivo específico (Annisa *et al.*, 2023; García-Saucedo *et al.*, 2005). Los resultados en el presente estudio sugieren una

Cuadro 2. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre el número de brotes por explante (BE), porcentaje de brotación (B), capacidad formadora de brote (CFB) y número de raíces inducidas en explantes *in vitro* de *Opuntia velutina* desarrollados con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), Kinetina (Kin), 6-benciladenina (BA) y ácido indolacético (AIA) a las seis semanas de cultivo *in vitro*.

2,4-D (mg L ⁻¹)	Kin (mg L ⁻¹)	BA (mg L ⁻¹)	AIA (mg L ⁻¹)	BE (Núm)	B (%)	CFB	RE (Núm)
-	-	-	-	0.69 ef	69.94 cd	0.50 f	0.60 def
0.5	-	-	-	0.80 ef	79.60 bc	0.66 ef	1.83 b
1.0	-	-	-	0.73 ef	73.28 cd	0.55 ef	1.53 bc
1.5	-	-	-	0.46 f	46.20 e	0.24 f	0.66 cdef
-	0.5	-	-	2.70 d	96.66 ab	2.63 d	0.27 ef
-	1.0	-	-	3.83 b	100.00 a	3.83 b	1.00 bcde
-	1.5	-	-	3.53 bc	100.00 a	3.53 bc	3.93 a
-	-	0.5	-	0.73 ef	72.80 cd	0.55 ef	0.20 ef
-	-	1.0	-	3.03 cd	100.00 a	3.03 cd	0.00 f
-	-	1.5	-	7.06 a	100.00 a	7.06 a	0.20 ef
-	-	-	0.5	1.33 e	93.33 ab	1.27 e	3.86 a
-	-	-	1.0	0.73 ef	73.28 cd	0.55 ef	1.80 b
-	-	-	1.5	0.60 f	59.94 de	0.38 f	1.47 bcd

Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

tendencia proporcional entre la respuesta organogénica del explante y el incremento en la concentración de BA.

El uso de citocininas, como BA y Kin, en el cultivo de tejidos vegetales suprime la dominancia apical y estimula el desarrollo de yemas axilares (Bouzroud *et al.*, 2022). Dentro de los resultados del presente estudio, Kin promovió una respuesta organogénica significativa ($P \leq 0.05$), alcanzando hasta 3.83 brotes por explante con 1 mg L⁻¹, con 100 % de brotación y una capacidad formadora de brotes (CFB) elevada (3.83), en contraste con el testigo. Estos resultados confirman su eficacia como alternativa a la BA en protocolos para regeneración de especies de *Opuntia*.

En la mayoría de los tratamientos se presentó formación de raíces, con excepción del tratamiento con 1 mg L⁻¹ de BA. Tanto el tratamiento con 1.5 mg L⁻¹ de Kin como el de 0.5 mg L⁻¹ de AIA presentaron un valor seis veces mayor que el control, sin mostrar diferencias estadísticas entre ellas (3.93 y 3.86, respectivamente).

Alargamiento y enraizamiento *in vitro*

La mayor media en alargamiento de los explantes (26.82 mm) se obtuvo con la combinación de 0.5 mg L⁻¹ de Kin y 1.5 mg L⁻¹ de AIA. En este mismo tratamiento se presentó

el mayor número de raíces (8.26) y capacidad formadora de raíces (8.26), con diferencias estadísticas significativa ($P \leq 0.05$), en contraste con los demás tratamientos. En comparación con el control, este tratamiento triplicó el alargamiento de los explantes, duplicó el número de raíces y la capacidad formadora de raíces (Cuadro 3).

El alargamiento y enraizamiento del explante corresponde a una de las fases finales del protocolo de micropropagación por proliferación de yemas axilares, donde se induce la formación de raíces adventicias, proceso conocido como rizogénesis, el cual se puede activar cuando los brotes desarrollados alcanzan una longitud adecuada (Suárez, 2020).

La combinación de auxinas y citocininas ha sido empleada en diversas especies del género *Opuntia* para inducir elongación y rizogénesis. En *O. stricta*, De Souza *et al.* (2019) reportaron un alargamiento promedio de 23 mm y 100 % de enraizamiento en brotes cultivados en medio semisólido con 0.26 mg L⁻¹ de meta-topolina y 0.1 mg L⁻¹ de AIA; no obstante, los mayores índices de enraizamiento se obtuvieron con BA (0.25 y 0.5 mg L⁻¹) en combinación con AIA (0.1 mg L⁻¹), independientemente del tipo de medio empleado (semisólido o líquido). Por su parte, Rodríguez-de la O y Ramírez-Pantoja (2020) obtuvieron un promedio de 5.9 raíces por explante en *O. ficus-indica* con la adición

Cuadro 3. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre la longitud del explante (LE), número de raíces (NR), porcentaje de enraizamiento (R) y capacidad formadora de raíces (CFR) inducidos en explantes *in vitro* de *Opuntia velutina* desarrollados con Kinetina (Kin), ácido indolacético (AIA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a las seis semanas de cultivo *in vitro*.

Kin (mg L ⁻¹)	AIA (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)	LE (mm)	NR (Núm)	R (%)	CFR
-	-	-	7.31 c	2.83 c	100.00 a	2.83 c
0.5	1.5	-	26.82 a	8.26 a	100.00 a	8.26 a
1.0	1.0	-	7.06 cd	0.43 d	40.00 b	0.00 d
1.5	0.5	-	9.62 b	0.36 d	33.33 b	0.12 d
0.5	-	1.5	5.64 d	0.03 d	3.33 c	0.01 d
1.0	-	1.0	3.73 e	0.10 d	10.00 c	0.03 d
1.5	-	0.5	6.46 cd	3.96 b	100.00 a	3.96 b

Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Cuadro 4. Efecto del sustrato (proporciones de turba y perlita) sobre el número de raíces (NR) y porcentaje de supervivencia (S) de plántulas de *Opuntia velutina* a los 40 días de aclimatación.

Turba	Perlita	NR (Núm)	S (%)
0	1	0.26 d	26.6 b
1	0	1.53 c	53.3 ab
1	1	3.93 b	80.0 a
1	2	4.33 ab	66.6 a
2	1	5.13 a	66.6 a

Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

de 6 mg L⁻¹ de Kin y 2 mg L⁻¹ de AIA, y destacaron que la presencia de auxinas, independientemente de la concentración, promueve la generación de raíces en condiciones *in vitro*. En el presente estudio, la combinación de 0.5 mg L⁻¹ de Kin y 1.5 mg L⁻¹ de AIA superó los valores reportados en ambas investigaciones, lo cual podría atribuirse a diferencias en la sensibilidad hormonal específica de *O. velutina* o al tipo de explante empleado.

Resultados similares han sido descritos por Bouzroud *et al.* (2022), quienes señalaron que las interacciones entre auxinas y citocininas en concentraciones moderadas fomentan el desarrollo de raíces sin comprometer la elongación del brote en cactáceas. En *O. ficus-indica*, estos autores también reportaron la presencia de auxinas como el principal factor asociado con la inducción de raíces adventicias. De manera similar, Marhri *et al.* (2023) desarrollaron un protocolo para *Opuntia* silvestre mediante la combinación de BAP (5 mg L⁻¹) y AIA (2 mg L⁻¹), logrando una tasa de enraizamiento del 100 %, aunque sin reportar valores específicos de elongación. En otras cactáceas, como *Gymnocalycium*, se observó que el alargamiento y enraizamiento dependieron del tipo de explante, así como de la interacción hormonal (Cortés-Olmos *et al.*, 2023); asimismo, el uso de auxinas como AIA

en combinación con citocininas promovió el desarrollo de raíces, lo que coincidió con lo observado en *O. velutina*; además, Senanayake *et al.* (2023) mencionaron que, en especies ornamentales y comerciales de cactáceas, el uso de auxinas como ácido indolacético o indolbutírico resultó eficaz para inducir raíces, mientras que la adición de citocininas en concentraciones bajas podría potenciar la respuesta en la brotación sin interferir con la formación radicular. La combinación de 0.5 mg L⁻¹ de Kin y 1.5 mg L⁻¹ de AIA representa una alternativa eficiente para inducir elongación y rizogénesis simultáneamente, facilitando la transición del cultivo *in vitro* hacia la fase de aclimatación.

Aclimatación de plantas

Durante la fase de aclimatación, se observó una respuesta diferencial en la supervivencia y el desarrollo de raíces en función de las proporciones de turba y perlita. En este sentido, tanto la combinación 2:1, como la mezcla 1:2 de turba y perlita presentaron el mayor promedio en el número de raíces, 5.13 y 4.33, respectivamente. En contraste, los tratamientos únicamente con turba o perlita mostraron el menor número de raíces (1.53 y 0.26, respectivamente) (Cuadro 4).

En lo referente a la sobrevivencia, los tratamientos 1:1, 2:1 y 1:2 generaron valores de sobrevivencia estadísticamente superiores a los obtenidos únicamente con turba o perlita (53.3 % y 26.6 %, respectivamente). Estos resultados son semejantes a lo reportado por Angulo-Bejarano y Paredes-López (2011), quienes obtuvieron 98 % de supervivencia en *O. ficus-indica* utilizando una mezcla 1:1 de perlita y vermiculita, lo cual evidencia la necesidad de mantener un equilibrio entre aireación y retención de humedad en especies adaptadas a condiciones áridas.

En contraste, Rodríguez-de la O y Ramírez-Pantoja (2020) reportaron una supervivencia de 100 % con turba como único componente; así mismo, Ebuy y Ayimut (2023) reportaron una supervivencia de 100 % en sustrato de turba de coco bajo condiciones controladas de humedad relativa (80 %) y con uso de bandejas de policarbonato, lo que destaca la relevancia de la humedad ambiental en el éxito de la aclimatación. Por su parte, García-Saucedo *et al.* (2005) obtuvieron una tasa de supervivencia de 100 % en tres variedades de nopal comestible (Blanco sin espinas, Milpa Alta y Villa Nueva); los autores sugieren que la succulencia de los cladodios minimiza el estrés hídrico durante la transición al ambiente *ex vitro*, lo que probablemente se redujo con el microambiente generado en las cajas de policarbonato ensayadas en este estudio, lo que proporcionó una alta humedad relativa y con ello menor evapotranspiración. En este contexto, el uso de mezclas de turba y perlita en cajas de policarbonato puede ser adecuado para la aclimatación de plantas de nopal verdura.

CONCLUSIONES

El presente estudio permitió establecer un protocolo eficiente de micropropagación para *O. velutina*, el cual abarca desde la desinfección superficial de explantes hasta la aclimatación *ex vitro*. El tratamiento con NaClO 5 % durante 5 min resultó el más eficaz para el establecimiento *in vitro*, al maximizar la viabilidad de los explantes (70.8 %) y reducir los niveles de oscurecimiento y contaminación microbiana. La mayor inducción de brotes se reflejó con NaClO 5%, mientras que al aumentar a 15 % la brotación disminuyó. En la fase de multiplicación, el uso de BA promovió el mayor número de brotes, superando a otras concentraciones y fitoreguladores evaluados. La combinación de 0.5 mg L⁻¹ de Kin con 1.5 mg L⁻¹ de AIA favoreció significativamente el alargamiento de brotes, así como la formación y capacidad formadora de raíces, evidenciando una interacción hormonal positiva entre citocininas y auxinas. Durante la etapa de aclimatación, la mezcla de turba:perlita en proporción 1:1 registró la mayor tasa de supervivencia y desarrollo radicular, lo que la posicionó como una alternativa adecuada para

especies de suculentas en transición a condiciones *ex vitro*. El protocolo de micropropagación desarrollado en el presente estudio representa una estrategia biotecnológica prometedora para el aprovechamiento y conservación de *Opuntia velutina*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas E. Y. Z., M. I. Ezzat, H. M. El Hefnawy and E. Abdel-Sattar (2022) An overview and update on the chemical composition and potential health benefits of *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller. *Journal of Food Biochemistry* 46:e14310, <https://doi.org/10.1111/jfbc.14310>
- Angulo-Bejarano P. I. and O. Paredes-López (2011) Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.). *Scientia Horticulturae* 128:283-288, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.01.030>
- Annisa R. R. R., A. Setiaji, Purnomo, Sutikno and A. B. Sasongko (2023) *In vitro* regeneration of hybrid *Dendrobium* sect. *Spatulata* through pseudobulb segment culture. *Comunicata Scientiae* 14:e3679, <https://doi.org/10.14295/cs.v14.3679>
- Bougdaoua H. and N. El Mtili (2020) *In vitro* regeneration of two northern Moroccan *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. genotypes. *Moroccan Journal of Biology* 17:36-42.
- Bouzroud S., E. El Maaiden, M. Sobeh, K. P. Devkota, H. Boukcim, L. Kouisni and Y. El Kharrassi (2022) Micropropagation of *Opuntia* and other cacti species through axillary shoot proliferation: a comprehensive review. *Frontiers in Plant Science* 13:926653, <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.926653>
- Chadipiralla K., P. Gayathri, V. Rajani and P. V. B. Reddy (2020) Pant tissue culture and crop improvement. In: Sustainable Agriculture in the Era of Climate Change. R. Roychowdhury, S. Choudhury, M. Hasanuzzaman and S. Srivastava (eds.). Springer, Cham, Switzerland. pp:391-412, https://doi.org/10.1007/978-3-030-45669-6_18
- Cortés-Olmos C., V. M. Guerra-Sandoval, V. Blanca-Giménez and A. Rodríguez-Burruzo (2023) Micropropagation and acclimatization of *Gymnocalycium* cv. Fancy (Cactaceae): developmental responses to different explant types and hormone conditions. *Plants* 12:3932, <https://doi.org/10.3390/plants12233932>
- De Souza L. M., M. R. Barbosa, J. R. Zárate-Salazar, F. Lozano-Isla and T. Rangel C. (2019) Use a meta-topolin, an unconventional cytokinin in the *in vitro* multiplication of *Opuntia stricta* Haw. *Biotechnología Vegetal* 19:85-97.
- Ebuy T. K. and K. M. Ayimut (2023) Propagation of cochineal scale insect free cactus (*Opuntia ficus-indica*) by *in vitro* regeneration culture technique in Tigray, Ethiopia. *African Journal of Biotechnology* 22:119-125, <https://doi.org/10.5897/AJB2022.17529>
- Eliwa G. I., E. R. F. El Dengawy, M. S. Gawish and M. M. Yamany (2025) Comprehensive study on *in vitro* propagation of some imported peach rootstocks b. *In vitro* rooting and acclimatization. *Scientific Reports* 15:17905, <https://doi.org/10.1038/s41598-025-00848-z>
- Ferreira C. C. S., C. D. da Paz, J. C. de Souza, A. R. Peixoto, L. S. Rios, A. R. Nascimento, ... and J. F. Araújo (2021) Development of prickly pear cactus *Opuntia stricta* (Haw.) Haw. (Cactaceae) *in vitro* in response to the replacement potassium nitrate for a commercial KNO₃ fertilizer. *Ciencia Rural* 52:e20200122, <http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200122>
- García-Saucedo P. A., M. Valdez-Morales, M. E. Valverde, A. Cruz-Hernández and O. Paredes-López (2005) Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80:215-219, <https://doi.org/10.1007/s11240-004-9158-0>
- Hasnain A., S. A. H. Naqvi, S. I. Ayesha, F. Khalid, M. Ellahi, S. Iqbal, ... and M. M. A. Abdelhamid (2022) Plants *in vitro* propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. *Frontiers in Plant Science* 13:1009395, <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1009395>

- Inglese P., G. Liguoria y E. de la Barrera (2018) Ecofisiología y biología reproductiva de los nopales cultivados. *In: Ecología del Cultivo, Manejo y Usos del Nopal*. P. Inglese, C. Mondragon J., A. Nefzaoui y C. Sáenz (eds.). FAO-ICARDA. Roma, Italia. pp:31-44.
- Lee Y.-C. and J.-C. Chang (2022) Development of an improved micropropagation protocol for red-fleshed pitaya 'Da Hong' with and without activated charcoal and plant growth regulator combinations. *Horticulturae* 8:104, <https://doi.org/10.3390/horticulturae8020104>
- Louhaichi M., A. Nefzaoui y J. C. Guevara (2018) El nopal en los ecosistemas y servicios. *In: Ecología del Cultivo, Manejo y Usos del Nopal*. P. Inglese, C. Mondragon J., A. Nefzaoui y C. Sáenz (eds.). FAO-ICARDA. Roma, Italia. pp:163-174.
- Mabrouk A., Y. Abbas, Y. El Goumi, E. El Maaiden, Y. El Kharrassi, S. El Antry-Tazi, ... and M. Fakiri (2021) Optimization of prickly pear cacti (*Opuntia* spp.) micropropagation using an experimental design method. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science* 11:e1577, <https://doi.org/10.15414/jmbfs.1577>
- Maiuolo J., S. Nucera, M. Serra, R. Caminiti, F. Oppedisano, R. Macri, ... and V. Mollace (2024) Cladodes of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. possess important beneficial properties dependent on their different stages of maturity. *Plants* 13:1365, <https://doi.org/10.3390/plants13101365>
- Mahmood S. M. and B. Hauser (2015) Influence of cytokinins on the shoot proliferation and subsequent rooting in rose. *Asian Journal of Agricultural Research* 9:259-267, <https://doi.org/10.3923/ajar.2015.259.267>
- Marhri A., A. Tikent, L. Garros, O. Merah, A. Elamrani, C. Hano, ... and M. Addi (2023) Rapid and efficient *in vitro* propagation protocol of endangered wild prickly pear growing in Eastern Morocco. *Horticulturae* 9:491, <https://doi.org/10.3390/horticulturae9040491>
- Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Niechayev N. A., J. A. Mayer and J. C. Cushman (2023) Developmental dynamics of crassulacean acid metabolism (CAM) in *Opuntia ficus-indica*. *Annals of Botany* 132:869-879, <https://doi.org/10.1093/aob/mcad070>
- Polivanova O. B. and V. A. Bedarev (2022) Hyperhydricity in plant tissue culture. *Plants* 11:3313, <https://doi.org/10.3390/plants11233313>
- Portillo L. y R. Soltero (2021) Multiplicación *in vitro* de nopal. *In: Opuntia: Aportaciones a su Conocimiento y Aprovechamiento*. L. Portillo, R. Soltero, A. L. Viguera y R. L. Romo (eds.). CUCBA, Universidad de Guadalajara. Zapopan, Jalisco, México. pp:101-108.
- Pratt L., N. Franck y F. Sudzuki (2018) Morfología y anatomía de *Platiopuntia*. *In: Ecología del Cultivo, Manejo y Usos del Nopal*. P. Inglese, C. Mondragon J., A. Nefzaoui y C. Sáenz (eds.). FAO-ICARDA. Roma, Italia. pp:21-29.
- Rodríguez-de la O. J. L. and P. E. Ramírez-Pantoja (2020) Micropropagation of selected materials of *Opuntia ficus indica* L through culture *in vitro* of areols. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering* 7:121-126, <https://doi.org/10.15406/jabb.2020.07.00225>
- SAS Institute (2013) The SAS system for Windows. Release 9.4 SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA.
- Senanayake S. G. M. S. D., G. Senanayake and R. M. C. S. Ratnayake (2023) Propagation and management of ornamental and commercial cacti – a review. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 99:267-282, <https://doi.org/10.1080/14620316.2023.2298987>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2022) Anuario estadístico de la producción agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Ciudad de México. https://nube.agricultura.gob.mx/cierre_agricola/ (Junio 2023).
- Souza F. V. D., A. M. M. E. Canto, A. S. Souza and M. A. P. C. Costa (2010) Residual effect of growth regulators in etiolation and regeneration of *in vitro* pineapple plants. *Revista Brasileira de Fruticultura* 32:612-617, <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010005000075>
- Stojičić D., S. Budimir, V. Čokeša and B. Uzelac (2024) Optimization of *in vitro* regeneration of *Pinus peuce* (Gris.). *Horticulturae* 10:97, <https://doi.org/10.3390/horticulturae10010097>
- Suárez P. I. E. (2020) Cultivo de Tejidos Vegetales. Fondo Editorial Universidad de Córdoba. Montería, Colombia. 116 p.
- Tenorio-Escandón P., A. Ramírez-Hernández, J. Flores, J. Juan-Vicedo and A. P. Martínez-Falcón (2022) A systematic review on *Opuntia* (Cactaceae; *Opuntioideae*) flower-visiting insects in the world with emphasis on Mexico: implications for biodiversity conservation. *Plants* 11:131, <https://doi.org/10.3390/plants11010131>