



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**

**CARACTERIZACIÓN DE SEMILLAS DE DIFERENTES ACCESIONES DE TUNAS**  
**(*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.), EN RELACIÓN A SU PLOIDÍA Y APOMIXIS**

Tesis para optar al Grado de Magister en Ciencias Agropecuarias  
Mención en Producción Frutícola

**FRANCO LUCIANO ESPINOSA HENRIQUEZ**

Directores de Tesis  
M. LORETO PRAT DEL RIO  
CARLOS MUÑOZ SCHICK

SANTIAGO - CHILE  
2017

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**

**CARACTERIZACIÓN DE SEMILLAS DE DIFERENTES ACCESIONES DE TUNAS**  
**(*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.), EN RELACIÓN A SU PLOIDÍA Y APOMIXIS**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Magíster en  
Ciencias Agropecuarias  
Mención en Producción Frutícola

**FRANCO LUCIANO ESPINOSA HENRIQUEZ**

Calificaciones

**DIRECTOR DE TESIS/AFE**

Sra. M. Loreto Prat del Río  
Ingeniero Agrónomo, M.S.

Aprobado

Sr. Carlos Muñoz Schick  
Ingeniero Agrónomo, M.S., Ph.D.

Aprobado

**PROFESORES CONSEJEROS**

Sra. Natalia Pamela Lam Pastén  
Ingeniero de ejecución en Acuicultura, M.S., Ph.D.

Aprobado

Sr. Danilo Fernando Aros Orellana  
Ingeniero Agrónomo, Ph.D.

Aprobado

Santiago, Chile  
2017

## INDICE

CAPÍTULO I.....	1
Revisión bibliográfica.....	1
La Tuna ( <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill).....	1
Biología de la tuna .....	1
Propagación.....	2
Apomixis.....	3
Poliploidía.....	4
CAPITULO II.....	6
Resumen .....	6
Abstract.....	7
Introducción.....	8
Hipótesis .....	9
Objetivo General.....	10
Objetivos Específicos.....	10
Materiales y métodos.....	10
Ubicación del estudio.....	11
Material biológico.....	11
Diseño experimental.....	11
Evaluaciones .....	12
Caracterización de las plantas y frutas .....	12
Caracterización anatómica y morfológica de las semillas.....	12
Test de viabilidad.....	12
Germinación de las semillas.....	12
Nivel de ploidía.....	12
Origen apomíctico del embrión.....	13
Análisis estadístico .....	13
Resultados y discusión.....	14
Caracterización de accesiones.....	14
Tuna 'verde' .....	14
Tuna 'Salmón'.....	15
Tuna 'Roja' .....	16
Tuna 'Naranja' .....	17
Tuna 'Morada'.....	18
Tuna 'Mexicana' ( <i>O. amyclaea</i> ).....	19
Tuna 'Gold'.....	20
Tuna 'Beterraga' .....	21
Tuna 'Baby'.....	22
Análisis de conglomerado.....	23
Caracterización de las semillas .....	24
Germinación.....	25
Ploidía de la descendencia de las accesiones .....	26
Origen apomíctico del embrión.....	28
Conclusiones.....	29
ANEXO 1 .....	30
LITERATURA CITADA.....	32

## CAPÍTULO I

### Revisión bibliográfica

#### La Tuna (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill)

La tuna es una de las especies de cactus más importante económicamente a nivel mundial, debido principalmente a la posibilidad de producirla en zonas áridas y semiáridas y los variados productos que se pueden obtener de ella. Esta es originaria del Golfo de México y el Caribe (CEZA, 2007) y desde allí se ha expandido por diversas partes del mundo. Esta especie fue introducida en España por los navegantes y desde allí se distribuyó por toda la cuenca del Mediterráneo y el resto de los continentes (Kiesling, 2012). Actualmente se encuentra en forma silvestre o cultivada en el sur de España, Francia, Grecia, Italia, Turquía, Israel y Sudáfrica, extendiéndose también dentro del mismo continente Americano desde Canadá hasta Chile (Sáenz, 2006).

Entre los países que cultivan la tuna, México es el principal productor con más de 53.000 ha; le sigue Italia con 2.500 ha, Sudáfrica y Chile con 1.500 ha, Israel con 300 ha y Estados Unidos con 200 ha (FIA, 2015). Relacionado con la productividad del cultivo, Israel e Italia alcanzan producciones entre 15t/ha y 20t/ha. En Chile, las producciones alcanzan valores entre 6t/ha y 15t/ha (Sanhueza, 2010). El principal exportador es Italia con una exportación de 15.000 kg/año dirigida principalmente al mercado europeo y norte de África. También existe exportación a Estados Unidos y Canadá (FIA, 2015). México solo tiene una reducida fracción que exporta debido a una alta demanda interna de la fruta y a una baja calidad de fruta, que no alcanza estándares de calidad exigidos (Cruzat G & Barrios, 2009). En Chile, la superficie nacional de tunas se concentra entre la Región Metropolitana (43,1%) y la Región de Coquimbo (38,91%). La producción se destina en casi su totalidad al mercado interno, con una mínima fracción que va a exportación, debido principalmente a la baja calidad de las frutas que se genera. El principal mercado de las exportaciones chilenas es Estados Unidos, seguido de Arabia Saudita y España, Canadá, Japón e Inglaterra (FIA, 2015).

**Biología de la tuna.** La tuna (*Opuntia ficus-indica*) pertenece al género *Opuntia* de la familia de las Cactaceas, cultivada mayoritariamente debido a sus frutos que son aptos para el consumo humano. La especie se caracteriza por ser una planta arbustiva erecta que puede alcanzar 3 a 4 m de altura. Su sistema radical está compuesto por abundantes raíces finas que se distribuyen en forma superficial en el suelo, alcanzando profundidades de 80 cm, si proviene de semilla, y 20 a 30 cm, si viene de reproducción vegetativa (Sudzuki et al, 1993). Esta característica le permite aprovechar de mejor manera las lluvias o aumentos de humedad en zonas áridas (Franck, 2010). Los tallos, llamados cladodios, son órganos suculentos modificados para reemplazar a las hojas en la función fotosintética. Tienen una forma ovoide alargada que alcanzan entre 60 a 70 cm de largo. Los cladodios poseen yemas axilares en forma de areolas donde se encuentran espinas finas llamadas gloquidios. En Chile, debido a las temperaturas, los gloquidios terminan por caer dejando al cladodio con pocas espinas basales (Sudzuki et al., 1993). Los cladodios nuevos poseen hojas verdaderas en forma de pequeñas estructuras suculentas que, después de 15 días, se desprenden y son reemplazadas por espinas esclerificadas considerada como hojas modificadas (Sudzuki et al., 1993). Con el tiempo los cladodios pueden llegar a lignificarse y transformarse en tallos leñosos de color ocre blancuzco a grisáceo (CEZA, 2007). La tuna es una planta con fotosíntesis tipo CAM,

en donde los abundantes estomas que poseen los cladodios, se abren en la noche para absorber el CO<sub>2</sub> y se cierran en el día para disminuir la pérdida por transpiración (CEZA, 2007).

En la tuna, las flores son sésiles, solitarias y hermafroditas, desarrollándose mayoritariamente en los bordes de los cladodios. Se compone de sépalos pequeños y variables en número, y pétalos ovoides de colores amarillos a rojos, soldados en la base de la corona (Reyes-Aguero et al., 2006). Los estambres son más de 400, con anteras que producen gran cantidad de polen, y que se encuentran insertos sobre la superficie cóncava del receptáculo, siendo más cortos que los pétalos. La dehiscencia de las anteras ocurre doce horas antes de que ocurra la floración y se ha registrado que la producción de néctar, en especies de *Opuntia* en las Islas Galápagos, ocurre aproximadamente una hora después de la floración (Reyes-Aguero et al., 2006). Antes de la antesis, los estambres rodean estrechamente al estigma para posteriormente separarse de este a medida que los pétalos se expanden. En la mayoría de los casos, presenta una polinización entomófila y se puede dar una autopolinización si la dehiscencia de las anteras ocurre antes de la antesis (Sudzuki et al., 1993). El ovario es ínfero, unilocular con gran cantidad de óvulos y termina en un estilo cilíndrico con un estigma amplio y húmedo (Sudzuki et al., 1993). La floración ocurre entre los meses de octubre y noviembre, y se presenta de forma escalonada permaneciendo abierta la flor durante 48 h. En Chile, se presenta una segunda floración en marzo, si es que se generan las condiciones ambientales favorables y hay riego en verano, produciendo una fruta llamada “inverniza” que se desarrolla durante todo el invierno (CEZA, 2007). Las yemas florales se desarrollan en cladodios de dos años y rara vez en cladodios de tres años, siendo la proporción de yemas florales a vegetativas de 3:1 en un cladodio (Sudzuki et al., 1993). Completada la fecundación, las partes florales se secan y se mantienen junto al fruto formado hasta que alcanza dos tercios de su desarrollo (Reyes-Aguero et al., 2006). El fruto es una falsa baya de forma ovoide con una epidermis similar a los cladodios, con una abundante cantidad de gloquidios. Tanto los óvulos fecundados como los abortados son capaces de desarrollar pulpa y ayudar a la generación del fruto (Sudzuki et al., 1993). El crecimiento del fruto sigue una curva doble sigmoidea alcanzando su máximo a los 100 días después de la antesis, siendo los últimos 30 días importantes para el crecimiento de la pulpa, en los que debe haber un suministro hídrico para alcanzar su máximo desarrollo. Por otro lado, la fruta inverniza tiene un comportamiento de crecimiento de sigmoidea simple alcanzando su máximo a los 135 días aproximadamente (Sáenz, 2006). El fruto es no climatérico y los parámetros de calidad son el tamaño, mayor a 6 cm de largo y 4 cm de diámetro, un sabor fresco, con un contenido de sólidos solubles mayor a 13, sin espinas y baja cantidad de semillas (Sáenz, 2006).

El crecimiento de las semillas ocurre entre los 30 y 70 días después de antesis, formándose semillas pequeñas (0,45 cm de largo y 0,35 cm de ancho) y de forma ovoides con una testa lignificada (Reyes-Aguero et al., 2006). La cantidad de semillas varía en distintos ecotipos en el mundo, encontrándose aproximadamente 270 semillas por fruto, siendo algunos ecotipo chilenos los que poseen una mayor cantidad de semillas abortadas (Reyes-Aguero et al., 2006). Esta característica otorga una gran ventaja ya que genera una fruta con una mayor proporción comestible.

**Propagación.** La propagación en la tuna se puede realizar mediante una vía asexual y una sexual (Sudzuki et al., 1993). La vía asexual se realiza mediante los cladodios que son desprendidos de la planta madre, ya sea por daño de algún animal, clima o simple peso de los frutos en el cladodio, y que, en contacto con el suelo, desarrollan raíces adventicias formando así una planta nueva, idéntica de la planta madre de la cual se desprendió (Reyes-Aguero et al., 2006). Este es el método más efectivo para la propagación de la especie y en donde se logra rápidamente un desarrollo de la

nueva planta. A nivel agronómico, este tipo de propagación proporciona ciertas ventajas con respecto a la reproducción sexual. Se pueden seleccionar algunos ecotipos que posean cualidades especiales, como mejores adaptaciones al medio, resistencias a plagas y enfermedades o mejores características de la fruta para el mercado. También, mediante la propagación vegetativa, se generan plantas que alcanzan un desarrollo mucho más rápido que si se propagara de forma sexual, haciendo que un tunal sea mucho más precoz en su entrada en producción. La desventaja es que se generan ejemplares idénticos que pueden ser susceptibles a alguna enfermedad o plaga, afectando a todo el tunal de la misma manera. Existen una serie de consideraciones que se deben tener en cuenta al momento de realizar este tipo de propagación: debe elegirse un cladodio no dañado, de preferencia del año anterior, y dejar cicatrizar la herida provocada por el corte para no contaminarlo con algunas enfermedades (CEZA, 2007). Además, la plantación debe realizarse en un periodo sin heladas ni lluvias, para evitar que los cladodios se pudran antes que desarrollen las raíces adventicias (Sudzuki et al., 1993). En caso de no poseer demasiado material para multiplicar, se puede dividir los cladodios en partes para generar una mayor cantidad nuevas plantas.

Por otro lado, la vía sexual se realiza mediante la germinación de las semillas, como resultado de la combinación de los gametos, generando una mayor variabilidad genética en la población y pudiendo ser utilizada de manera agronómica para la obtención de nuevas variedades. Una de las mayores desventajas de este tipo de propagación es el bajo porcentaje de germinación que poseen las semillas, dificultando la generación de nuevos individuos (Altare et al., 2006). La causa de esta baja capacidad de germinación es debido a la forma de dispersión de las semillas, denominado endozoocoria, en donde animales como aves, roedores, reptiles o murciélagos, se comen el fruto para luego dispersarlo mediante la regurgitación o defecación (Rojas-Areh y Vah Zquez-Yanes, 2000). Debido a este proceso, las semillas han desarrollado algunas adaptaciones para resistir las condiciones adversas que generan los jugos gástricos del sistema digestivo de los animales. Estas consisten en una modificación en la estructura del ovulo, el cual se envuelve por tres integumentos para poder desarrollarse completamente, siendo el tercer integumento, derivado del funículo, lignificado fuertemente para proteger al embrión (Altare et al., 2006). Al momento de la germinación, esta lignificación provoca un impedimento en el desarrollo radicular, retardando este proceso, y en algunos casos, imposibilitando la germinación de algunas semillas (Olvera-Carrillo et al., 2003; Altare et al., 2006). Frente a esta situación, se han investigado diversos factores que promueven la germinación de las semillas, entre los cuales se destaca la temperatura, con intervalos óptimos entre los 25°C y 30°C (Altare et al., 2006; Mandujano et al., 2007; Mondragon-Jacobo y Bordelon, 1996; Ochoa et al., 2015; Olvera-Carrillo et al., 2003; Reyes-Aguero et al., 2006; Rojas-Areh y Vah Zquez-Yanes, 2000), el fotoperiodo, con un régimen de 14 horas de luz y la escarificación con ácido sulfúrico durante cinco minutos, que logra aumentar el porcentaje de germinación de las semillas hasta un 58% después de 40 días de incubación. (Altare et al., 2006). También se ha observado que el ácido giberélico no promueve una mayor germinación de las semillas, como ocurre en otras especies (Mandujano et al., 2007).

**Apomixis.** En diversos estudios de germinación de semillas de *Opuntia* se ha registrado poliembriónía, proceso que puede llegar a generar dos o tres plántulas de una misma semilla (Mondragón Jacobo y Bordelon, 2002; Sudzuki et al., 1993). Este fenómeno se debe específicamente a la apomixis que se genera en la tuna. La apomixis se define como la formación asexual de un embrión a partir del tejido del ovulo, sin que haya meiosis ni fertilización, generando un individuo genéticamente idéntico al progenitor materno (Koltunow et al., 1995). En todo tipo de apomixis se comparten estas tres etapas: la generación de una célula capaz de formar un embrión

sin meiosis, la espontánea fertilización y desarrollo del embrión, y la generación de endosperma autónomamente o la utilización del endosperma derivado de la fertilización (Bicknell y Koltunow, 2004). Este tipo de reproducción no es rara en las Angiospermas habiendo ejemplos en plantas pertenecientes a las Asteraceae, Rosaceae y las Poaceae (Koltunow et al., 1995).

Los embriones apomícticos pueden formarse mediante la ruta gametofítica o esporofítica. En la ruta gametofítica, el embrión se forma de una célula del saco embrionario que no ha pasado por un proceso meiótico. Según el origen del saco embrionario, se denomina diplosporía cuando el saco se formó a partir de una megaspóra materna, ya sea que haya sufrido una mitosis o que no haya pasado por el proceso de meiosis, y aposporía, cuando el saco embrionario se forma a partir de la mitosis de una célula somática de la nucela (Bicknell y Koltunow, 2004). Para los dos casos de la vía gametofítica, el embrión se produce mediante la partenogénesis de una célula diploide en el saco embrionario y no por la combinación de gametos como lo es en la reproducción sexual (Ortiz et al., 2004). En la ruta esporofítica o también llamada embrionía adventicia, los embriones se generan a partir de células somáticas de la nucela o del integumento del óvulo (Bicknell y Koltunow, 2004). Es común que en esta ruta se formen embriones múltiples ya que los embriones generado por las células somáticas comparten junto al embrión de origen sexual, utilizando su endosperma para desarrollarse (Ortiz et al., 2004). Para el caso de *O. ficus-indica*, *O. streptacantha* y *O. robusta*, el embrión apomíctico que se genera es mediante la vía esporofítica, alcanzando niveles entre 0,2% y 7% en semillas de *O. ficus-indica*, 10% a un 18% en *O. streptacantha* y entre en 3,6% y 24,7% en *O. robusta* (Mondragón Jacobo y Bordelon, 2002). Se han observado algunas características en la apomixis en tuna, siendo bastante fácil poder reconocerlas al momento de la germinación. El embrión de origen sexual germina primero que los embriones de origen apomíctico, siendo estos mucho más débiles y lentos en su germinación (Mondragon-Jacobo y Bordelon, 1996). También se ha observado un aumento de la germinación de embriones apomícticos cuando las semillas son sometidas a condiciones donde el ambiente es favorable para la germinación (Mondragon Jacobo, 2001). Para un reconocimiento genético de este fenómeno, se han propuesto métodos genéticos como RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), en donde se utilizan primer iniciadores para la identificación de similitudes entre la planta progenitora y su descendencia, encontrándose en algunos casos, correlación con las formas fenotípicas de selección hechas durante la germinación (Mondragon Jacobo, 2001; Mondragón Jacobo y Bordelon, 2002). Otros métodos como AFLPs o microsatelites han sido utilizados para diferenciar genotipos de *Opuntia* y podrían ser utilizados para reconocer el origen apomíctico del embrión (Caruso et al., 2010; Sánchez et al., 2014).

Este fenómeno provoca una serie de dificultades en el mejoramiento genético de la tuna ya que disminuye la variabilidad genética de la población que se busca aumentar al realizar la propagación por semilla (Koltunow, 1993). En los últimos años, se ha buscado utilizar este método para crear líneas en donde se transmiten características de la planta progenitora y se mantienen los beneficios de una planta reproducida por semilla (Koltunow et al., 1995).

**Poliploidía.** La poliploidía ha sido un importante mecanismo para la evolución en las plantas y la tuna no está exenta de esto. Esta se define como la posesión de tres o más juegos completos de cromosomas (haploide) en células, tejidos u organismos (Negrón-Ortiz, 2007). Este fenómeno genera modificaciones en el genotipo y fenotipo de las plantas, permitiendo una mejor capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales (Griffith, 2004). Se ha registrado que *Opuntia ficus-indica* posee una base haploide de 11 cromosomas y que puede alcanzar niveles de hexaploidia y octoploidía (Segura et al., 2007). También se han encontrado genotipos silvestres

que poseen una menor ploidía que los cultivares actualmente cultivados (Mondragon Jacobo y Bordelon, 1996). Es importante considerar la poliploidía en la tuna ya que es uno de los factores que explica la gran capacidad de adaptación que posee esta especie, llegando a expresar diferentes fenotipos dependiendo del lugar en donde se cultive, haciéndola compleja de analizar para la taxonomía (Romano, 2013). Existen algunas hipótesis sobre los diversos niveles de ploidía que posee la tuna. Una de estas hipótesis es que hubo una antigua aloploidía con una especie de *Opuntia*, como podría ser con *O. megacantha*, con la que se ha encontrado una estrecha afinidad, generando un híbrido con una alta ploidía (Griffith, 2004). También se le ha atribuido esta poliploidía a la manipulación humana, que a través de los años, ha seleccionado características relacionadas con mayores ploidía y las ha mantenido en la población (Mondragon Jacobo y Bordelon, 1996). Otra explicación es que el concepto de especie, asociado a *O. ficus-indica*, es solo un englobe de distintos clones, derivados de una selección, y que no están relacionados genéticamente, deduciendo que los niveles de ploidía encontradas en tuna son en realidad diferentes especies que se agruparon por selección (Griffith, 2004).

Una de las formas para medir la ploidía es mediante el conteo de cromosomas. La ventaja de esta técnica es que es posible establecer el número de cromosomas de manera directa ya que se cuenta la cantidad que posee el tejido analizado. La desventaja es que es una técnica laboriosa en la que no siempre se puede observar los cromosomas, ya sea porque la célula no se encontraba en una fase de la mitosis, en donde los cromosomas son distinguibles, o por la superposición que se genera que hace complejo el conteo de estos (Negrón-Ortiz, 2007). Otro método para conocer los niveles de ploidía es el análisis por citometría de flujo. Este método ocupa un citómetro de flujo con el cual es posible medir el contenido de ADN en el núcleo celular y compararlo con una medida de referencia para poder determinar si se presenta ploidía (Dolezel et al., 2007). La ventaja de este método es la rapidez y precisión que presenta para poder determinar el contenido de ADN, la desventaja es que es un proceso que no mide directamente la ploidía y que necesita una previa calibración, además de que es mucho más costoso para ser utilizado que cualquier otro método (Negrón-Ortiz, 2007).

## CAPITULO II

### Resumen

La tuna es originaria del Golfo de México y el Caribe. En Chile, el fruto se consume fresco, pero posee ciertas características que hacen que su producción y consumo no sea masivo, como son las espinas en cladodios y fruto, y gran cantidad de semillas en la pulpa. Existen a nivel mundial pocos programas de mejoramiento genético para desarrollar nuevas variedades. En el país la variabilidad genética que existe es reducida debido que la especie se propaga clonalmente. Sin embargo, diversos estudios de la biología reproductiva de la especie, indican que cuando la especie es propagada sexualmente se observan distintos niveles de ploidía en la descendencia. Por otra parte, también se ha descrito un origen apomítico en los embriones de la semilla. El objetivo de este trabajo fue determinar el nivel de ploidía o el origen apomítico del embrión en semillas de nueve diferentes accesiones de tunas. Para ello, se germinaron semillas de las accesiones y se realizó un conteo de cromosomas para conocer el nivel de ploidía y se determinó la presencia de poliembriones para determinar el eventual origen apomítico del embrión. Los segregantes provenientes de las accesiones de tuna analizadas presentaron variaciones en el nivel de ploidía, tanto en relación con los progenitores como entre ellas. En relación a la naturaleza apomítica del embrión, se presentaron individuos de este origen en las accesiones Beterraga, Mexicana, Roja, Verde y Salmon. La expresión del carácter apomítico fue mejor cuando las condiciones de germinación fueron óptimas. Con respecto a las características morfológicas de las distintas accesiones, se puede señalar que existe una gran variabilidad fenotípica entre las distintas accesiones, por lo que se sugiere que existe una variabilidad genotípica que puede ser utilizada en eventuales programas de mejoramiento genético.

**Palabras claves:** Tuna (*Opuntia*), accesión, apomixis, ploidía.

## Abstract

The prickly pear is native to the Gulf of Mexico and the Caribbean. In Chile, the fruit is consumed fresh, but its production and consumption are not massive, because it has thorns in cladodes and fruits, and has numerous seeds in its pulp. Globally there are very few breeding programs, so most varieties are spontaneous mutations or chance seedlings. In Chile, genetic variability is reduced because the species is vegetatively propagated. When the species is sexually propagated there is abundant segregation in most of the characters, different levels of ploidy and, occasionally, polyembryonic seeds of apomictic origin are observed. The objective of this work was to characterize the genetic variability of 9 accessions of prickly pear and determine the existence of apomixis or changes in the ploidy of seeds from the 9 accessions. To do this, seed of the different accessions was germinated and chromosomes were counted in the seedlings to determine the level of ploidy and the presence of polyembryos. With respect to the morphological characteristics of the different accessions, great genetic variability was detected, particularly in the fruit. Segregants analyzed from the prickly pear accessions showed variations in the level of ploidy, both in relation to the parents and among them. In relation to the apomictic nature of the embryo, individuals of this origin were present in the following accessions: Beterraga, Mexican, Red, Green and Salmon. Expression of the apomictic character was better when the germination conditions were optimal.

**Keyword:** Prickly pear (*Opuntia*), accession, apomixis, ploidy

## Introducción

La tuna (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) es una especie perteneciente a la familia de las Cactáceas, que se desarrolla principalmente en las regiones áridas y semiáridas del continente americano. Es originaria del Golfo de México y el Caribe, desde donde emigró a América del Norte y América del Sur (CEZA, 2007). A nivel mundial, la tuna se consume fresca y madura, siendo un fruto muy popular en México. Existen cerca de 32 países productores de tuna entre los cuales destacan México, Israel, Italia, Sudáfrica, Estados Unidos y Chile (CEZA, 2007). Actualmente nuestro país tiene una superficie plantada que supera las 1500 ha, concentrándose en la zona centro y centro norte del país, específicamente en las localidades de El Noviciado, Til-til y el valle del río Elqui (Sanhueza, 2010). Su sabor y contenido nutricional ha producido un gran interés en los mercados de Europa, especialmente en Alemania, Bélgica, Francia y Holanda, convirtiendo a este cultivo en una opción viable para la exportación (FIA, 2015; Alvarez, 2007). Esta demanda por la fruta, en conjunto con su capacidad de producir con bajos requerimientos hídricos, han colocado a la tuna como una opción de cultivo para zonas áridas y semiáridas del país (FIA, 2015; Sudzuki et al., 1993).

Si bien este fruto presenta un gran atractivo, posee ciertas desventajas que hacen que su producción y consumo no sean tan alto como el de otras especies frutales. La presencia de espinas en los cladodios y en el pericarpio de los frutos, la baja concentración de sólidos solubles en la pulpa y la gran cantidad de semillas (100 a 400 por fruta) son algunas de las características que han limitado su consumo masivo (Cerezal y Duarte, 2005). A través de los años se ha buscado disminuir estas desventajas desarrollando nuevas variedades que puedan convertir a la tuna en una opción de fruta apetecible por el mercado (Mondragon Jacobo y Bordelon, 1996). Para lograr estos objetivos se necesita conocer la diversidad genética de la especie, de manera de poder seleccionar genotipos que tengan estas características deseadas. En los diversos países donde se cultiva la tuna se han caracterizado las variedades que se cultivan y la diversidad genética que poseen, dando como resultado diversos programas de mejoramiento genético para obtener variedades mejoradas. México, por ser el centro de origen de la especie, cuenta con cerca de tres bancos de germoplasma con un número de accesiones que varían entre 50 a más de 150 accesiones (Mondragon-Jacobo y Bordelon, 1996), entendiéndose por accesión a la muestra viva de una planta, cepa o población mantenida en un banco de germoplasma para su conservación o uso (Puldón Padrón, 2006). En California se han desarrollado alrededor de 130 accesiones con el objetivo de resistir las bajas temperaturas. Italia y Sudáfrica también han desarrollado programas de mejoramiento y generando sus propios bancos de germoplasma (Mondragon Jacobo y Bordelon, 1996).

En el caso de Chile, la diversidad genética disponible para esta especie es muy limitada debido a que la propagación se realiza de manera clonal (Sanhueza, 2010). Una posibilidad para conocer la variabilidad genética de una especie es determinar la variabilidad presente en plantas propagadas por semilla. En la tuna, este tipo de propagación tiene diversas inconvenientes que hace compleja su utilización como herramienta en el mejoramiento genético. Una baja capacidad de germinación y un tiempo muy extendido en el crecimiento de la planta (Mondragon Jacobo y Bordelon, 1996) son algunas de las mayores desventajas a la hora de utilizar la propagación por semilla. Diversos estudios en germinación de semillas de tuna han dado como resultado mejores procedimientos a la hora de realizar este tipo de propagación (Altare et al., 2006). Dentro de algunas investigaciones

realizadas han destacado las diferentes características morfológicas y anatómicas que pueden tener las semillas de tuna (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000; Mondragon-Jacobo, 2001). Una de las principales causas a las cuales se le atribuye esta diferencia es a la gran cantidad de semillas abortadas por fruto, que alcanzan porcentajes de 55% del total (Altare et al., 2006). Este tipo de semillas tiene un menor tamaño que la mayoría y contribuye a la diversidad de formas que se encuentran en los frutos de tuna.

Otra causa a la cual se le podría atribuir esta variación de tamaño se relaciona con las eventuales diferencias en los niveles de ploidía o poliploidía dentro de las diversas variedades de tuna. Mediante estudios citogenéticos en tuna se ha revelado la existencia de diferentes niveles de ploidía, registrándose alrededor de 12 niveles en el género *Opuntia*, siendo *O. ficus-indica* la que presenta mayor variación dentro de la especie (Segura et al., 2007; Mondragon-Jacobo y Bordelon, 1996). Diversas investigaciones han relacionado mayores tamaños de las células a mayores niveles de ploidía, confiriéndole a este tipo de plantas mayores tamaños en sus estructuras (Day y Lawrence, 2000). En la tuna se ha observado que el tamaño de fruta y cladodios poseen una correlación positiva con los diversos niveles de ploidía que se generan en la especie (Mondragon Jacobo y Bordelon, 1996). También se ha registrado una correlación positiva entre el diámetro del polen y el nivel de ploidía en el género *Schlumbergera* de la misma familia de las Cactáceas (Parks y Boyle, 2003). Conocer el grado de ploidía que tienen las plantas es una herramienta útil en el mejoramiento genético, ya que puede ser utilizado para conocer las diferentes expresiones fenotípicas que pueden tener, como un mayor vigor y mejor adaptación al medio ambiente, y para realizar cruzamientos entre plantas que puedan ser compatibles según su ploidía (Negrón-Ortiz, 2007).

Además de la poliploidía y de las semillas abortadas, se ha detectado que la apomixis podría generar variaciones morfológicas en las semillas. En este proceso el embrión que se forma es genéticamente idéntico a la planta madre generando un clon en lugar de una semilla híbrida (Koltunow et al., 1995). En el caso de las Cactáceas, este tipo de reproducción ocurre frecuentemente en el género *Opuntia* en donde se genera una apomixis del tipo esporofítica (Reyes-Agüero, Aguirre R., & Valiente-Banuet, 2006). Según Mondragon-Jacobo (2001), se ha reportado que este fenómeno llega a alcanzar cerca del 20% de los embriones generados. Las semillas que se generan a partir de embriones de origen apomítico se pueden identificar por ciertas características que desarrollan. En estas semillas se produce una poliembriónía generada por un embrión de origen sexual y otro apomítico en la misma semilla (Mondragon Jacobo y Bordelon, 1996), observándose que cuando estas germinan, se generan más de una plántula por semilla. Además, las semillas que poseen un embrión de origen apomítico se demoran mucho más en germinar que las que poseen embriones generados de forma sexual (Mondragon Jacobo, 2001). Para el caso del mejoramiento genético, la apomixis tiene ventajas y desventajas. Si el objetivo es poder generar un material genético y poder mantenerlo en el tiempo, la apomixis es una buena herramienta ya que los embriones que genera son idénticos a la planta madre (Koltunow et al., 1995), pero si el caso es poder ver resultados de cruzamientos o aumentar la variabilidad genética, la apomixis es considerada una gran limitante.

En el presente trabajo, se pretende caracterizar la descendencia de diferentes accesiones de tuna en cuanto a su ploidía y apomixis, lo cual resulta indispensable de hacer si se pretende a futuro desarrollar un programa de mejoramiento genético en esta especie.

## **Hipótesis**

Distintas accesiones de tuna presentan variaciones en el nivel de ploidía o en la naturaleza apomíctica del embrión presente en las semillas.

### **Objetivo General**

Determinar el nivel de ploidía o el origen apomíctico del embrión en semillas de diferentes accesiones de tunas.

### **Objetivos Específicos**

1. Caracterizar anatómica y morfológicamente las plantas, frutos y semillas de diferentes accesiones de tuna.
2. Determinar el grado de ploidía de los embriones provenientes de la germinación de las semillas de distintas accesiones de tuna.
3. Identificar la naturaleza apomíctica del embrión en semillas de distintas accesiones de tuna.

### **Materiales y métodos**

## Ubicación del estudio

La recolección de semillas se realizó en el jardín de variedades de tunas de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile (33°34'10.54"S 70°38'6.24"O), Región Metropolitana de Santiago de Chile. La germinación de las semillas y los posteriores análisis de estas se desarrollaron en la misma Facultad de Ciencias Agronómicas.

## Material biológico.

Para el presente trabajo se colectaron 20 frutos maduros de tuna por cada una de las 9 accesiones seleccionadas presentes en el jardín de variedades de la Facultad de Ciencias Agronómicas. El listado de las variedades utilizadas en este estudio aparece en el siguiente cuadro:

Cuadro 1: Accesiones de tunas.

Numero	Acesiones	Especie registrada
1	Tuna Verde	<i>Opuntia ficus-indica</i>
2	Tuna Salmon	<i>Opuntia ficus-indica</i>
3	Tuna Roja	<i>Opuntia ficus-indica</i>
4	Tuna Naranja	<i>Opuntia ficus-indica</i>
5	Tuna Morada	<i>Opuntia ficus-indica</i>
6	Tuna Mexicana	<i>Opuntia amyclaea</i>
7	Tuna Gold	<i>Opuntia ficus-indica</i>
8	Tuna Beterraga	<i>Opuntia ficus-indica</i>
9	Tuna Baby	<i>Opuntia ficus-indica</i>

Se procedió a extraer 200 semillas de los frutos seleccionados por accesión para luego germinarlas según el método realizado por Mondragon (2001), en donde las semillas fueron sumergidas dos veces en agua con una temperatura inicial de 80°C hasta llegar a temperatura ambiente y dejadas en remojo por 24 horas en agua con temperatura inicial de 80°C. A continuación, fueron esterilizadas durante 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 15% y lavadas con agua destilada estéril por 4 minutos. Se sembraron en almacigueras de “plumavit” con un sustrato de turba y perlita (1:1) y se colocaron en un invernadero climatizado a 20°C±5°C con humedad relativa no controlada. También se realizó una germinación, según el método realizado por Altare et al (2006), a un grupo de 50 semillas por accesión en donde se procedió a hacer una escarificación con ácido clorhídrico al 98% durante 5 min y un posterior lavado con agua destilada estéril durante 3 min. Al igual que el grupo anterior, estas fueron esterilizadas en una solución de hipoclorito de sodio y colocadas en placas para ser germinadas en una cámara de crecimiento a 25°C. Las semillas germinadas se trasplantaron a maceteros plásticos para continuar con su crecimiento en el invernadero.

## Diseño experimental.

Para este trabajo se midieron características de las plantas y frutos de cada accesión seleccionada según descriptores escogidos (Anexo 1) y se realizó un análisis de conglomerado. Para el caso de la caracterización de las semillas, se realizó un análisis de varianza con 8 repeticiones por cada accesión. También se realizó un análisis de varianza para el test de viabilidad, donde sometieron 25 semillas por accesión a la tinción de trifenil tetrazolio, repitiendo este tratamiento tres veces. Luego, utilizando el protocolo de Mondragon (2001), se colocaron a 24 semillas por accesión a germinar en almacigueras, repitiendo esto en 8 almacigueras, y se realizó un análisis de varianza. Utilizando el protocolo de Altare et al. (2006), se colocaron las 25 semillas por accesión en placas de germinación, repitiendo esto dos veces. Posteriormente, con la descendencia obtenida, se identificó el nivel de ploidía midiendo tres placas de muestras por accesión, obteniendo el número modal, en caso que se presente o el promedio de los cromosomas por accesión. Para el origen apomítico del embrión, se registró la cantidad de semillas en las que germinaba más de una plántula.

## **Evaluaciones**

**Caracterización de las plantas y frutos.** Se realizó una caracterización de las accesiones en cuanto a descripciones morfológicas de la planta (habito de crecimiento, forma cladodio, presencia de espinas, etc) y la fruta (Peso, largo y diámetro del fruto, grosor de cascara). Se observaron tres plantas y 20 frutos por accesión para hacer este análisis.

**Caracterización anatómica y morfológica de las semillas.** Para la caracterización morfológica, se midió el tamaño de 50 semillas, considerando el diámetro y grosor. Para la caracterización anatómica, se realizaron cortes de un grupo de semillas determinando la proporción de la testa que éstas poseían observándolas mediante una lupa (marca Konus Crystal-45, Italia) y registrándola con una cámara digital (marca Tucsen).

**Test de viabilidad.** Dentro de cada accesión, se observó semillas diferentes tamaños, distinguiéndose un grupo de semillas grandes (>2mm) y otro de semillas pequeñas (<2mm). Se consideró 2 mm luego de una medición previa del tamaño de las semillas. Se realizó una prueba de viabilidad con el Test de Tetrazolio a los dos grupos de semilla por cada accesión, para comprobar si el tamaño más pequeño correspondía a semillas abortadas. Se seleccionaron 25 semillas de cada grupo por accesión y se les realizó un corte para la observación de la tinción del embrión. Estas se sometieron a una solución de trifenil tetrazolio (1%) por 24h a 25°C. Luego del tiempo requerido, se registró los embriones que se teñieron.

**Germinación de las semillas.** Desde el momento de la siembra, se fueron registrando las semillas que germinaron según accesión y protocolo utilizado.

**Nivel de ploidía.** Para determinar la ploidía se obtuvieron los cromosomas metafásicos de muestras de raíces de las plantas germinadas. Las muestras se sometieron a un pretratamiento con colchicina al 0.05% durante 2 hrs a temperatura ambiente, para inhibir la mitosis, y luego se sumergieron en el reactivo de Farmer durante 24 h a 4°C, para una fijación de los procesos vitales. Posteriormente se realizó un proceso de hidrólisis ácida con HCl al 1N en un agitador con estufa a 50°C durante 6 minutos para romper la pared celular. Se lavaron las muestras con agua destilada y se teñieron con orceína acética al 1% durante 20 min a temperatura ambiente para poder ser observadas en el

microscopio (BA310 Trinocular marca Motic). Se tomaron fotos digitales de las células que se encontraron cromosomas con la cámara digital (Moticam 5, 5 MP).

**Origen apomítico del embrión.** Para analizar el origen apomítico, a los 120 días de sembradas, se contabilizó, dentro de cada accesión, las plántulas que obtuvieron un mayor tiempo desde siembra hasta germinación y las que presentaban más de una plántula por espacio de las almacigueras (Mondragon Jacobo, 2001).

### **Análisis estadístico**

Para poder estudiar la información, se utilizó el *software* estadístico InfoStat y se realizó un análisis de varianza al test de viabilidad, características de las semillas y de la germinación de las estas al 5% de nivel de significancia. Para la caracterización de las plantas y frutos se realizó un análisis de conglomerado con distancia euclídea y un dendrograma que representa gráficamente el análisis. Para el caso del nivel de ploidía se realizó un análisis descriptivo considerando un número modal o promedio por accesión, dependiendo de los resultados que se obtengan de las muestras.

## Resultados y discusión

### Caracterización de accesiones

Para una adecuada caracterización de las accesiones elegidas, se procedió describirlas basándose en algunos descriptores estandarizados (Anexo 1) aceptados internacionalmente (Chessa y Nieddu, 1997).

### Tuna 'verde'

Cuadro 2: Descripción de la planta y fruto de la accesión Verde.

<b>Descriptor de planta</b>	<b>Valor</b>
Tamaño de planta	Medio (1,5-2 m)
Forma de planta	Redondeada
Habito	Arbustivo
Forma cladodio	Elíptica
Espinas	Sin espinas
Gloquidios	Pocas
<b>Descriptor de fruta</b>	
Forma	Ovoide
Largo (cm)	8,29
Ancho (cm)	5,69
Peso (g)	142,35
Solidos solubles (° Brix)	16,32
Color piel	Verde
Grosor de la piel del fruto(mm)	4,60
Color pulpa	Verde claro
Numero de semillas	Medio (<300)



Figura 1: Imagen de planta de accesión Verde y su fruto.

**Tuna 'Salmón'**

Cuadro 3: Descripción de la planta y fruto de la accesión Salmón.

<b>Descriptor de planta</b>	<b>Valor</b>
Tamaño de planta	Alto (>2 m)
Forma de planta	Elongada
Habito	Vertical
Forma cladodio	Ovoide
Espinas	Pocas
Gloquidios	Pocas
<b>Descriptor de fruta</b>	
Forma	Ovoide
Largo (cm)	8,27
Ancho (cm)	5,94
Peso (g)	173,86
Solidos solubles	15,12
Color piel	Naranja
Grosor de la piel del fruto(mm)	3,44
Color pulpa	Naranja
Numero de semillas	Medio (<300)



Figura 2: Imagen de planta de accesión Salmón y su fruto.

## Tuna 'Roja'

Cuadro 4: Descripción de la planta y fruto de la accesión Roja.

<b>Descriptor de planta</b>	<b>Valor</b>
Tamaño de planta	Alto (>2 m)
Forma de planta	Elongada
Habito	Vertical
Forma cladodio	Elíptica
Espinas	Pocas
Gloquidios	Pocas
<b>Descriptor de fruta</b>	
Forma	Ovoide
Largo (cm)	7,43
Ancho (cm)	4,29
Peso (g)	104,76
Solidos solubles	15,42
Color piel	Roja
Grosor de la piel del fruto(mm)	2,90
Color pulpa	Rosada
Numero de semillas	Medio (<300)



Figura 3: Imagen de planta de accesión Roja y su fruto.

**Tuna 'Naranja'**

Cuadro 5: Descripción de la planta y fruto de la accesión Naranja.

<b>Descriptor de planta</b>	<b>Valor</b>
Tamaño de planta	Alto (>2 m)
Forma de planta	Elongada
Habito	Vertical
Forma cladodio	Elíptica
Espinas	Pocas
Gloquidios	Pocas
<b>Descriptor de fruta</b>	
Forma	Ovoide
Largo (cm)	8,21
Ancho (cm)	5,91
Peso (g)	159,90
Solidos solubles	15,16
Color piel	Naranja
Grosor de la piel del fruto(mm)	3,89
Color pulpa	Naranja
Numero de semillas	Medio (<300)



Figura 4: Imagen de planta de accesión Naranja y su fruto.

**Tuna 'Morada'**

Cuadro 6: Descripción de la planta y fruto de la accesión Morada.

<b>Descriptor de planta</b>	<b>Valor</b>
Tamaño de planta	Alto (>2m)
Forma de planta	Elongada
Habito	Vertical
Forma cladodio	Ovoide
Espinas	Pocas
Gloquidios	Pocas
<b>Descriptor de fruta</b>	
Forma	Ovoide
Largo (cm)	8,20
Ancho (cm)	5,50
Peso (g)	126,30
Solidos solubles	14,76
Color piel	Morada
Grosor de la piel del fruto(mm)	6,36
Color pulpa	Morada
Numero de semillas	Alto (>300)



Figura 5: Imagen de planta de accesión Morada y su fruto.

### Tuna 'Mexicana' (*O. amyclaea*)

Cuadro 7: Descripción de la planta y fruto de la accesión Mexicana.

<b>Descriptor de planta</b>	<b>Valor</b>
Tamaño de planta	Alto (>2 m)
Forma de planta	Elongada
Habito	Vertical
Forma cladodio	Elíptica
Espinas	Abundante
Gloquidios	Intermedio
<b>Descriptor de fruta</b>	
Forma	Oblonga
Largo (cm)	8,37
Ancho (cm)	5,00
Peso (g)	114,27
Solidos solubles	16,06
Color piel	Verde claro
Grosor de la piel del fruto(mm)	3,57
Color pulpa	Verde claro
Numero de semillas	Medio (<300)



Figura 6: Imagen de planta de accesión Mexicana y su fruto.

**Tuna 'Gold'**

Cuadro 8: Descripción de la planta y fruto de la accesión Gold.

<b>Descriptor de planta</b>	<b>Valor</b>
Tamaño de planta	Medio (1,5-2 m)
Forma de planta	Redondeada
Habito	Arbustiva
Forma cladodio	Elíptica
Espinas	Sin espinas
Gloquidios	Pocas
<b>Descriptor de fruta</b>	
Forma	Ovoide
Largo (cm)	6,43
Ancho (cm)	5,01
Peso (g)	91,69
Solidos solubles	18,20
Color piel	Amarilla
Grosor de la piel del fruto(mm)	3,24
Color pulpa	Verde claro
Numero de semillas	Pocas (100-200)



Figura 7: Imagen de planta de accesión Gold y su fruto.

**Tuna 'Beterraga'**

Cuadro 9: Descripción de la planta y fruto de la accesión Beterraga.

<b>Descriptor de planta</b>	<b>Valor</b>
Tamaño de planta	Medio (1,5-2 m)
Forma de planta	Redondeada
Habito	Arbustiva
Forma cladodio	Redonda
Espinas	Sin espinas
Gloquidios	Pocas
<b>Descriptor de fruta</b>	
Forma	Redonda
Largo (cm)	6,59
Ancho (cm)	6,17
Peso (g)	143,39
Solidos solubles	12,65
Color piel	Morado
Grosor de la piel del fruto(mm)	4,35
Color pulpa	Morado
Numero de semillas	Medio (<300)

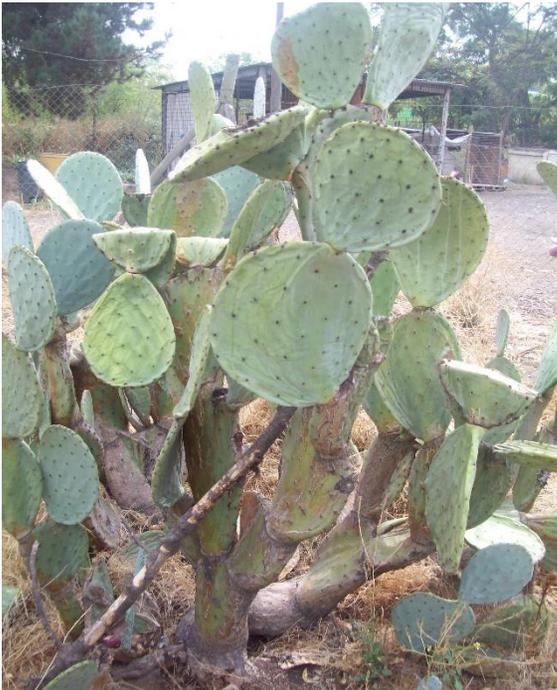


Figura 8: Imagen de planta de accesión Beterraga y su fruto.

**Tuna 'Baby'**

Cuadro 10: Descripción de la planta y fruto de la accesión Baby.

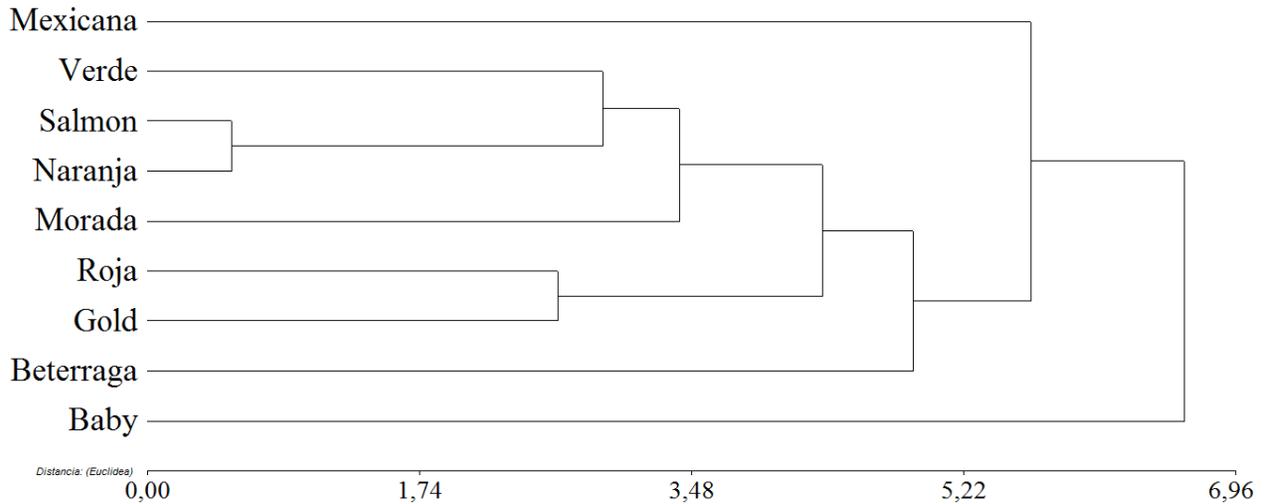
<b>Descriptor de planta</b>	<b>Valor</b>
Tamaño de planta	Medio (1,5-2 m)
Forma de planta	Redondeada
Habito	Arbustiva
Forma cladodio	Ovoide
Espinas	Abundante
Gloquidios	Pocas
<b>Descriptor de fruta</b>	
Forma	Ovoide
Largo (cm)	4,99
Ancho (cm)	3,66
Peso (g)	31,37
Solidos solubles	9,71
Color piel	Rosado
Grosor de la piel del fruto(mm)	3,19
Color pulpa	Rosado
Numero de semillas	Bajo (<100)



Figura 9: Imagen de planta de accesión Baby y su fruto.

**Análisis de conglomerado.** Con los datos de planta y frutos se realizó un análisis de conglomerado con el objetivo de encontrar similitudes entre las accesiones elegidas. Se puede observar en el dendrograma de la Figura 10 que existe una gran distancia entre 'Baby' y las demás accesiones.

Figura 10: Dendrograma de las accesiones según los descriptores utilizados.



Es posible que la accesión Baby sea un híbrido o sencillamente sea otra especie de *Opuntia* que se consideró como un ecotipo de *O. ficus-indica* (Griffith, 2004). Comparando las descripciones morfológicas que existen de otras especies de *Opuntia* con 'Baby', es posible encontrar bastantes similitudes entre esta y *O. streptacantha* (Romano, 2013). Como se puede observar en la Figura 11, *O. streptacantha* posee similitudes morfológicas con cladodios con una alta presencia de espinas y frutos de color rojo a rosado de tamaño pequeño. Para poder determinar si pertenece a esta especie sería necesario utilizar el método RAPD, AFLPs o microsatelite para poder comparar a nivel molecular (Sánchez et al., 2014; Caruso et al., 2010; Wang et al., 1998)

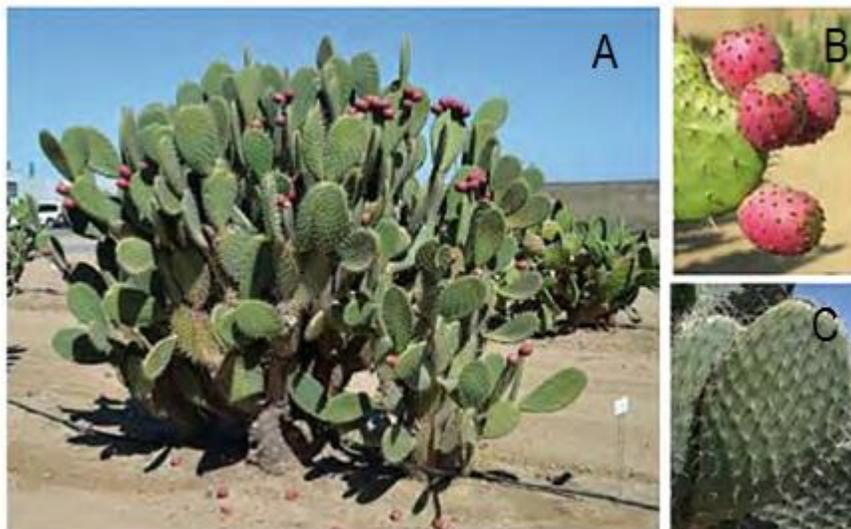


Figura 11: Imagen de planta (A), frutos (B) y cladodios (C) de *O. streptacantha*

Se puede observar que la tuna Mexicana y Beterraga también presentan una mayor distancia con el resto de las accesiones, con excepción de 'Baby'. Según los registros de la Universidad de Chile,

'Mexicana' está clasificada como *Opuntia amyclaea*, por lo que se explican las diferencias que existe entre esta y las demás accesiones. Para el caso de 'Beterraga' se desconoce si puede ser otra especie. Es posible que posea alguna relación con *O. rubusta* como se observa en la Figura 12 (Romano, 2013), por su parecido en la morfología de sus cladodios y sus frutos, aunque sin un análisis a nivel molecular es difícil poder determinar su parentesco.

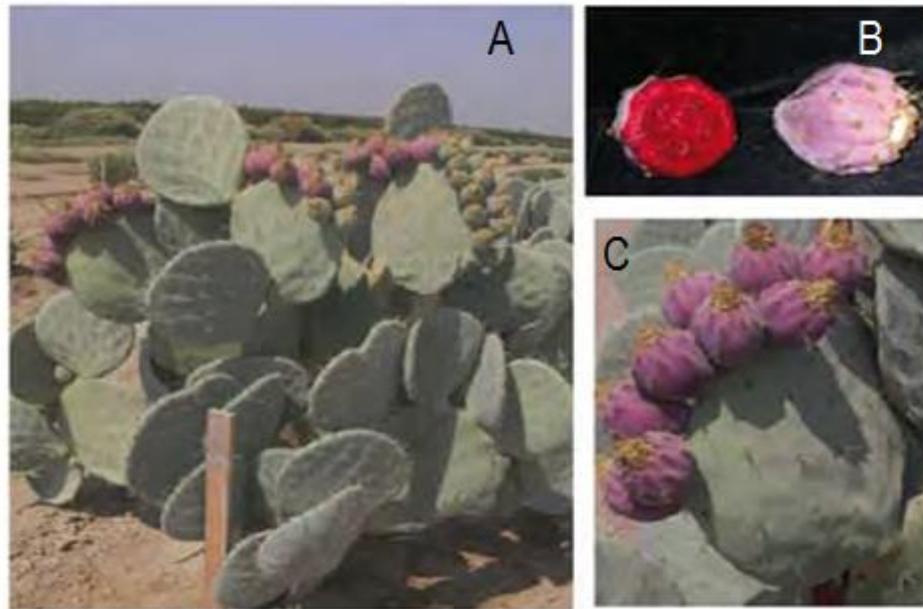


Figura 12: Imagen de planta (A), frutos (B) y frutos en cladodios (C) de *O. rubusta*.

Para el caso de las tunas Salmon y Naranja, el dendrograma muestra que son las más cercanas entre todas las accesiones. Según las observaciones y mediciones realizadas a estas dos acciones, es probable que solo hayan sido registradas como distintas pero que sean la misma accesión.

### Caracterización de las semillas

Se caracterizaron semillas de cada accesión midiendo el largo y ancho de la semilla. También se midió el grosor de la testa (Cuadro 11).

Cuadro 11: Largo y ancho de semillas y grosor de testa según accesiones.

Características	Verde	Salmon	Roja	Naranja	Morada	Mexicana	Gold	Beterraga	Baby
Largo (mm)	3,44B	3,42B	4,00A	4,06A	4,20A	4,19A	3,31B	3,20BC	2,71C
Ancho (mm)	1,31A	1,31A	1,24A	1,24A	1,33A	1,41A	1,43A	1,21A	1,25A
Grosor testa (mm)	0,68BC	0,71BC	0,98A	0,83AB	0,85AB	0,62C	0,28D	0,34D	0,34D

Porcentajes unidos por letras distintas en sentido horizontal indican diferencias estadísticamente significativas entre las accesiones dentro de cada características de las semillas, según test de Tukey, p-valor<0,05.

Se puede observar que la tuna Baby es la que posee un menor tamaño de semilla, asociado al tamaño que posee de la fruta, que es el menor de todos. Las accesiones Morada, Mexicana, Naranja y Roja son las que posee un mayor tamaño de semilla significativamente. Analizando el grosor de

la testa de la semilla, se observa que 'Gold', 'Baby' y 'Beterraga' son la que posee el significativamente un menor grosor. Esto es importante de destacar ya que al momento de la germinación, el grosor de la testa determina la facilidad con la que se desarrolla la salida radicular de la semilla (Altare et al., 2006).

Dentro de cada accesión, las semillas se encuentran diferencias según el tamaño de estas, distinguiéndose un grupo de semillas grandes (>2mm) y otro de semillas pequeñas(<2mm) (Figura 13).

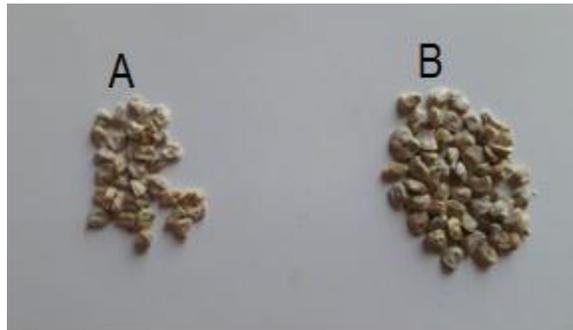


Figura 13: Semillas pequeñas (A) y semillas grandes (B) de la accesión Verde.

Como se observa en el cuadro 12, las semillas pequeñas poseen un menor porcentaje de viabilidad, indicando que su tamaño se debe al aborto o inviabilidad del embrión. También se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las accesiones según la viabilidad, indicando que todas las accesiones parten con las mismas condiciones para su germinación.

Cuadro 12: Resultados de la prueba de viabilidad para cada grupo de semillas según accesión.

Accesión	Tinción en semillas (%)	
	Grandes	Pequeñas
Baby	81 Aa	11 Bb
Beterraga	87 Aa	10 Bb
Gold	81 Aa	8 Bb
Mexicana	95 Aa	23 Bb
Morada	72 Aa	20 Bb
Naranja	87 Aa	17 Bb
Roja	96 Aa	17 Bb
Salmón	99 Aa	12 Bb
Verde	88 Aa	15 Bb

Porcentajes unidos por letras minúsculas distintas en sentido horizontal indican diferencias estadísticamente significativas entre la viabilidad de las semillas grandes y pequeñas, letras mayúsculas distintas en sentido vertical indican diferencias estadísticamente significativas entre las accesiones según test de Tukey, p-valor<0,05.

**Germinación.** Como se observa en el cuadro 13, la accesión que obtuvo un mayor porcentaje de germinación en los dos protocolos fue 'Beterraga'. Se observa que, utilizando el protocolo de Altare (2006), germinan las accesiones que no germinaron utilizando el otro protocolo, esto debido a que en este protocolo se realiza una escarificación con ácido clorhídrico que degrada la testa lignificada

de las semillas favoreciendo el desarrollo radical al momento de la germinación (Olvera-Carrillo et al., 2003). Otro factor que favoreció la germinación en el protocolo Altare (2006) fue la cámara de crecimiento en la que fueron colocadas las semillas ya que mantenía una temperatura constante de 25°C y un mayor periodo de luz (Altare et al., 2006).

Cuadro 13: Porcentaje de germinación de las accesiones según protocolo utilizado.

Accesión	Germinación (%)	
	Protocolo Mondragón (2001)	Protocolo Altare (2006)
Baby	1 B	22 B
Beterraga	47 A	74 A
Gold	0 B	26 B
Mexicana	4 B	32 B
Morada	0 B	24 B
Naranja	1 B	14 B
Roja	0 B	2 C
Salmón	0 B	0 C
Verde	2 B	24 B

**Porcentajes unidos por letras mayúsculas distintas en sentido vertical indican diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de germinación entre las accesiones según test de Tukey, p-valor<0,05.**

Como se puede observar, las accesiones que poseen un mayor grosor de testa (Cuadro 11) fueron las que alcanzaron un menor porcentaje de germinación (Cuadro 13), asociado a lo dicho anteriormente sobre el impedimento físico de la testa lignificada para la germinación, aun sometiéndolas a un proceso de escarificación.

### **Ploidía de la descendencia de las accesiones**

Existe poliploidía en las accesiones de tunas seleccionadas y en la descendencia que estas poseen (Cuadro 14). Se conoce para el género *Opuntia*, específicamente para *O. ficus-indica*, que el número base de cromosomas es  $x=11$  y que esta especie puede alcanzar diferentes niveles de ploidía ( $2n=2x$ ,  $2n=4x$ ,  $2n=6x$ ,  $2n=8x$ , etc) (Mondragon Jacobo y Bordelon, 1996; Segura et al., 2007). De acuerdo con esto, los resultados, al realizar el conteo de cromosomas, son coherentes con las ploidías que puede tener la tuna. La variación en los números obtenidos se puede explicar debido a que al utilizar este método existe la posibilidad de que los cromosomas se pueden sobreponer unos con otros al momento de la observación provocando que en algunos casos el conteo sea variable (Figura 14) (Negrón-Ortiz, 2007).

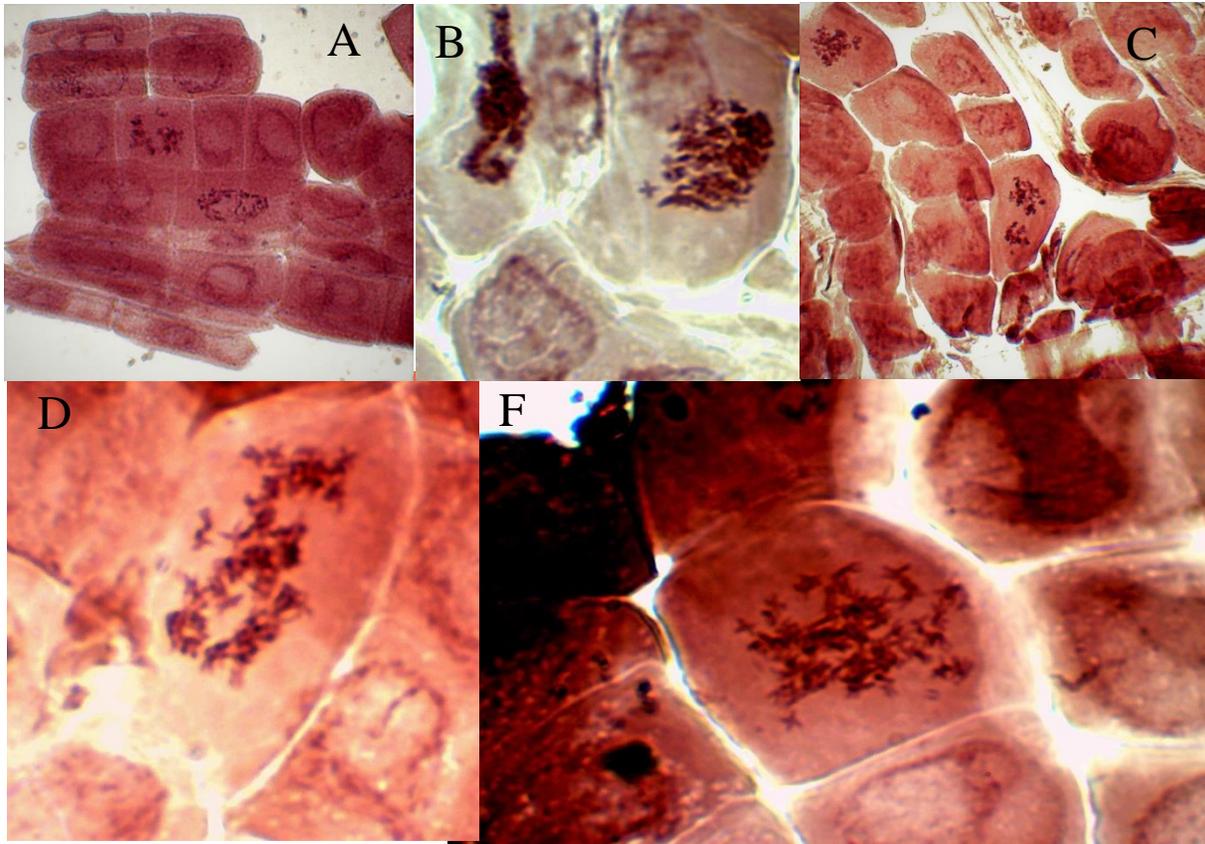


Figura 14: Imágenes de cromosomas en la célula en accesión Verde (A, B, C) y Morada (D y F).

Cuadro 14: Numero modal o promedio de cromosomas según parentales y segregantes para cada accesión.

Accesión	Número de cromosomas	
	Parental	Segregante
Verde	39	26 ± 2
Naranja	40 ± 14	59
Morada	60	46 ± 19
Mexicana	62 ± 14	47
Gold	46 ± 11	44 ± 6
Beterraga	19	32
Baby	36	22

También se puede observar en el cuadro 14, un aumento o disminución de la ploidía en algunas variedades al comparar la descendencia con respecto al parental. Estas variaciones se pueden explicar debido al mecanismo por el cual se produce la ploidía, que es mediante una reducción o duplicación en el número de cromosomas en las células sexuales, provocando que al combinarse puedan generar un nuevo nivel de ploidía, distinto al de la planta parental (Bretagnolle y Thompson, 1995). La poliploidía encontrada en estas accesiones y su descendencia muestra una fuente de diversidad genética que puede desarrollarse para ser utilizada en un posterior mejoramiento genético, logrando obtener variedades con caracteres requeridos para las condiciones del país.

### **Origen apomítico del embrión**

Para poder distinguir si en algunas accesiones existía un origen apomítico del embrión, se observaron las semillas germinadas que poseyeran dos o más plántulas por semilla. Al utilizar el protocolo de Mondragon (2001) solo se observó apomixis en la accesión Beterraga y Mexicana, en cambio, utilizando el protocolo de Altare (2007), la apomixis se presentó en las accesiones de Beterraga, Mexicana, Roja, Verde; en donde algunos casos aprecia más de dos plántulas por semilla. La mayor expresión de la apomixis en el protocolo de Altare (2007) es explicada por las condiciones a las que fueron sometidas las semillas al momento de la germinación. Se ha registrado que en condiciones de germinación óptima (25°C) aumenta la germinación de embriones apomíticos ya que facilitan el crecimiento y desarrollo de estos que son más débiles que los embriones generados de manera sexual (Mondragon Jacobo, 2001).

La presencia de apomixis está muy relacionada con las especies que generan poliploidías (Koltunow et al., 1995). Existen tres hipótesis con respecto a esta correlación entre estos dos fenómenos. Una hipótesis es que estos dos fenómenos son provocados en respuesta a los mismos factores ambientales de estrés, hídrico, salino, etc, con el propósito de poder sobrevivir y colonizar de mejor manera en estos ambientes, al ser poliploides existe la posibilidad de que tengan expresión de algunos caracteres que los ayuden a sobrevivir (Soltis et al., 2004). Una segunda hipótesis es que la poliploidía favorece tipos de reproducciones asexuales como la apomixis, esto debido a que la poliploidía podría interferir en la reproducción sexual dejando a la reproducción asexual como único método para propagarse (Vallejo-Marín, 2014). La tercera hipótesis es que la reproducción asexual facilita la poliploidía ya que permite la persistencia de estos genotipos en la población a través del tiempo (Vallejo-Marín, 2014). La tuna puede ser considerada como la mejor exponente de estas hipótesis ya que es una especie que se ha prosperado en climas adversos y posee una reproducción asexual muy desarrollada que le ha permitido generar estos dos fenómenos de manera muy persistente. El encontrar que este fenómeno se genere en genotipos introducidos en Chile puede ser una herramienta útil al momento de querer mantener algún carácter ya establecido. También, en el caso de querer aumentar la diversidad del material genético disponible, el conocer que se genera apomixis en estos genotipos puede ser útil para discriminar y no seleccionar estos individuos, de manera de dejar las plantas que se presenten con un origen sexual.

## Conclusiones

1. Los segregantes provenientes de las accesiones de tuna analizadas presentaron variaciones en el nivel de ploidía, tanto en relación con los progenitores como entre ellas. Estas variaciones son coherentes con lo reportado por otros investigadores para esta especie.
2. En relación a la naturaleza apomíctica del embrión, se presentaron individuos de este origen en las accesiones Beterraga, Mexicana, Roja, Verde y Salmon. La expresión del carácter apomíctico fue mejor cuando las condiciones de germinación fueron óptimas, es decir, las semillas apomícticas son más exigentes en cuanto a las condiciones requeridas para germinar.
3. Con respecto a las características morfológicas de las distintas accesiones, se puede señalar que existe una gran variabilidad fenotípica entre las distintas accesiones, lo que sugiere una posible variabilidad genética que permitiría su uso en eventuales programas de mejoramiento genético.

**ANEXO 1**

Descriptores utilizados para las plantas y frutos de las accesiones (Chessa y Nieddu, 1997)

**7.1.2 Plant size**

- 3 Small
- 5 Medium
- 7 Large

(Height < 1.5 m)

(Height 1.6 - 2.0 m)

(Height > 2.1 m)

**7.1.3 Plant shape**

- 1 Flat
- 2 Round
- 3 Elongate

(Width > height)

(Width = height)

(Width < height)

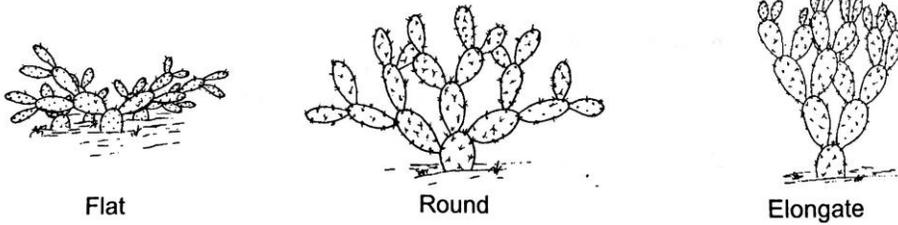


Fig. 3 Plant shape

**7.1.5 Habitus**

- 1 Upright
- 2 Medium
- 3 Spreading
- 4 Prostrate
- 5 Shrubby
- 6 Arborescent

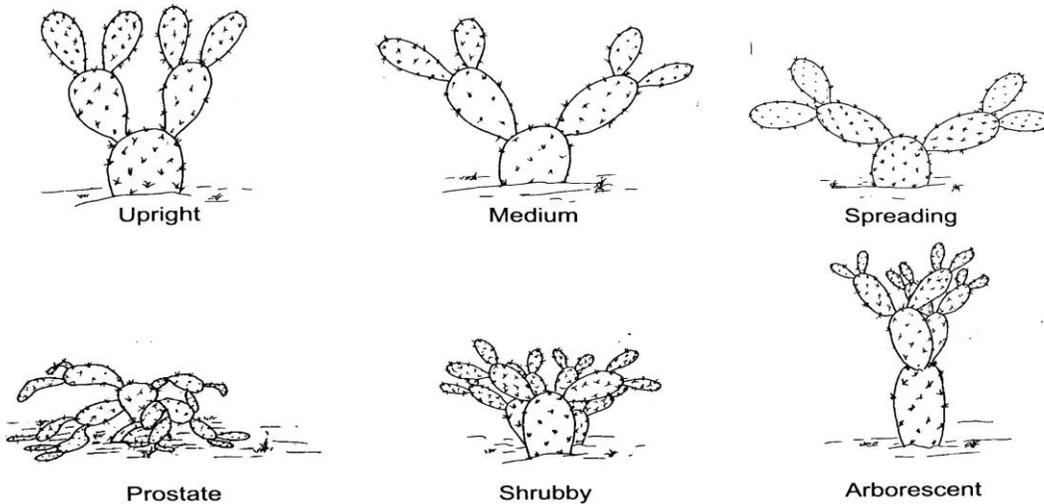
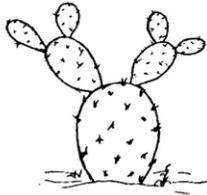


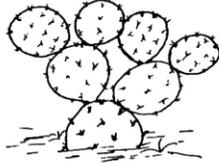
Fig. 4 Plant habitus

**7.3.1 Cladodes shape**

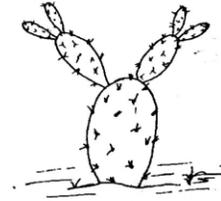
- 1 Ovate
- 2 Round
- 3 Elliptic



Ovate



Round



Elliptic

Fig. 5 Cladodes shape

**7.3.12 Spines**

- 0 Absent
- 3 Few
- 5 Intermediate
- 7 Many

**7.3.17 Glochides**

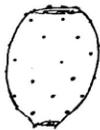
- 0 Absent
- 3 Few
- 5 Intermediate
- 7 Many

**7.5 FRUIT DESCRIPTOR**

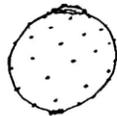
Average of 20 healthy fruits at harvest time (colour break)

**7.5.1 Shape**

- 1 Ovoid
- 2 Round
- 3 Elliptic
- 4 Oblong



Ovoid



Round



Elliptic



Oblong

Fig. 6 Fruit shape

**7.5.19 Pulp colour**

- 1 Green
- 2 White
- 3 Light yellow
- 4 Yellow
- 5 Dark yellow
- 6 Orange
- 7 Pink
- 8 Red
- 9 Deep red
- 10 Purple
- 11 White-pink
- 12 Yellow-orange

**7.5.22 Seed number (n/fruit)**

- 1 Very few (< 100)
- 2 Few (101-200)
- 3 Medium (201-300)
- 4 Many (301-500)
- 5 Very many (> 500)

**7.5.10 Peel colour**

- 1 White
- 2 Light green
- 3 Greenish
- 4 Yellow
- 5 Dark yellow
- 6 Orange
- 7 Pink
- 8 Red
- 9 Deep red
- 10 Purple
- 11 Mottled

## LITERATURA CITADA

Altare, M., Trione, S., Guevara, J., & Cony, M. 2006. Stimulation and promotion of germination in *Opuntia ficus-indica* seeds. *Journal of the Professional*. Mendoza, Argentina. 9p.

Alvarez, B. 2007. Análisis de factibilidad del cultivo de la tuna en la localidad de Icaño , Departamento La Paz. Dirección Provincial de Programación Del Desarrollo, Ministerio de Producción Y Desarrollo. Gobierno de La Provincia de Catamarca, 42p.

Bicknell, R. A., y Koltunow, A. M. 2004. Understanding Apomixis: Recent Advances and Remaining Conundrums. *The Plant Cell*, 16, 17p.

Bretagnolle, F., y Thompson, J. 1995. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist*, 129(1). 21p.

Caruso, M., Curro, S., Las Casas, G., La Malfa, S., y Gentile, A. 2010. Microsatellite markers help to assess genetic diversity among *Opuntia ficus-indica* cultivated genotypes and their relation with related species. *Plant Systematics and Evolution*, 290(1), 85–97p.

Cerezal, P. y Duarte, G. 2005. Algunas características de tuna (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller) cosechadas en el altiplano andino de la 2da Región de Chile. Departamento de Alimentos. Facultad de Recursos Del Mar. Universidad de Antofagasta, 25p.

CEZA. 2007. Tuna (*Opuntia ficus-indica*). FIA, Ministerio de Agricultura, 12p.

Chessa, I., y Nieddu, G. 1997. Descriptors for Cactus Pear (*Opuntia* Spp.). U. D. S. di R. Calabria, Ed. FAO Intern.39p.

Cruzat G, R., y Barrios, E. 2009. Fundación para la Innovación Agraria VII Región del Maule Producción de Tunas Bajo Riego en Secano. G. González Enei, Ed.. Región del Maule.42p.

Day, S. J., y Lawrence, P. a. 2000. *Measuring dimensions: the regulation of size and shape*. Development Cambridge, England, 127, 10p.

Dolezel, J., Greilhuber, J., Suda, J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2(9), 11p.

FIA. 2015. Producción de Tunas Bajo Riego en Secano. Región del Maule. 4p

Franck, N. 2010. Perspectivas de la tecnificación del cultivo de la tuna. Región de Arica y parinacota: INIA URURI.4p.

Griffith, M. P. 2004. The origins of an important cactus crop *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): New molecular evidence. *American Journal of Botany*, 91(11), 6p.

Kiesling, R. 2012. Historia de la *Opuntia ficus-indica*. Santiago del Estero: Instituto Argentino de las Zonas Árida. 5p.

- Koltunow, A. 1993. Apomixis: Embryo Sacs and Embryos Formed without Meiosis or Fertilization in Ovules. *The Plant Cell American Society of Plant Physiologists*, 5, 12p.
- Koltunow, A., Bicknell, R., Chaudhury, A. 1995. Apomixis: Molecular Strategies for the Generation of Genetically Identical Seeds without Fertilization. *Plant Physiology*, 108(1 995). 12p.
- Mandujano, M. C., Golubov, J., Rojas-Aréchiga, M. Resumen. 2007. Efecto del ácido giberélico en la germinación de tres especies del género *Opuntia* (Cactaceae) del Desierto Chihuahuense. *Cactaceas Y Suculentas Mexicanas*, 2, 6p.
- Mondragón, J., y Bordelon, B. 2002. Apomixis in crosses of mexican pear cactus , preliminary molecular identification. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 25(3). 5p.
- Mondragon Jacobo, C. 2001. Verification of the apomictic origin of cactus pear (*Opuntia* spp Cactaceae) seedling of open pollinted and crosses from central mexico. Queretaro, México.7p.
- Mondragon Jacobo, C. y Bordelon, B. 1996. Cactus pear (*Opuntia* spp. Cactaceae) breeding for fruit production. *Professional Association for Cactus* 16p.
- Negrón-Ortiz, V. 2007. Chromosome number, nuclear DNA content, and polyploidy in *Consolea* (Cactaceae), an endemic cactus of the Caribbean Islands. *American Journal of Botany*, 94(8), 10p.
- Ochoa, M. J., González-Flores, L. M., Cruz-Rubio, J. M., Portillo, L., Gómez-Leyva, J. F. 2015. Effect of substrate and gibberellic acid (GA 3 ) on seed germination in ten cultivars of *Opuntia* sps. *JPACD*.10p.
- Olvera-Carrillo, Y., Marquez-Guzman, J., Barradas, V. L., Sanchez-Coronado, M. E., Orozco-Segovia, A. 2003. Germination of the hard seed coated *Opuntia tomentosa* S.D., a cacti from the Mexico valley. *Journal of Arid Environments*, 55, 13p.
- Ortiz, J. P., Pessino, S., Quarin, C. 2004. Manipulación de la apomixis y su aplicación en la agricultura. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*, VIII, 9p.
- Parks, C., y Boyle, T. H. 2003. Variation in ploidy level, fertility, and breeding behavior in cultivated *schlumbergera* (cactaceae). In *Acta Horticulturae*.8p.
- Puldón Padrón, V. 2006. Documentacion, conservacion y multiplicacion de germoplasma. Instituto de Investigaciones Del Arroz, 10p.
- Reyes-Agüero, J. a., Aguirre R., Valiente-Banuet A.2006. Reproductive biology of *Opuntia*: A review. *Journal of Arid Environments*. 36p
- Rojas-Aréchiga, M. y Vázquez-Yanes, C. 2000. Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments*, 44, 19p.
- Romano, G. 2013. Colección de *Opuntia* en el National Arid Land Plant Genetix Resources Unit. *Actas de La Segunda Reunión Para El Aprovechamiento Integral de La Tuna Y Otras Cactáceas Y I Reunión Sudamericana CACTUSNET FAO-ICARDA*, (13), 8p.

Sáenz, C. 2006. Utilización agroindustrial del nopal. FAO, 113p.

Sanhueza, C. 2010. Identificación y caracterización de los agentes participantes y encadenamientos productivos en el agronegocio de la tuna. Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronomicas.23p.

Sánchez, E. E., Silos Espino, H., Flores Benitez, S., Valera Montero, L., Rodríguez Salazar, E., Gallegos Vázquez, Guzmán Maldonado, H. 2014. Agrupamiento de genotipos de nopal (*Opuntia* spp.) de México por medio de la técnica de AFLPs y características del fruto. FYTON ISSN, 31(83), 9457–299pp.

Segura, S., Scheinvar, L., Olalde, G., Leblanc, O., Filardo, S., Muratalla, A. Flores, C. 2007. Genome sizes and ploidy levels in Mexican cactus pear species *Opuntia* (Tourn.) Mill. series *Streptacanthae* Britton et Rose, *Leucotrichae* DC., *Heliabravoanae* Scheinvar and *Robustae* Britton et Rose. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(5), 8p.

Soltis, D. E., Soltis, P. S., Tate, J. A. 2004. Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. *New Phytologist*, 161(1), 18p.

Sudzuki, F., Berger, H., Muñoz, C. 1993. El cultivo de la tuna (Cactus pear). Universidad de Chile, Ed. Primera Ed. Santiago 88p.

Vallejo-Marín, M. 2014. La correlación entre la poliploidía y la reproducción asexual. *ECOSISTEMAS, Revista Científica de Ecología Y Medio Ambiente*, 23(3), 4p.

Wang, X., Felker, P., Burow, M. D., Paterson, A. H. 1998. Comparison of RAPD Marker Patterns To Morphological and Physiological Data In the Classification of *Opuntia* Accessions. Center for Semi-Arid Forest Resources, 12p.