

# **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional  
Unidad Oaxaca**



**Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos  
Naturales (Producción y Protección Vegetal)**

**Conservación *in vitro* de pitahaya (*Hylocereus* spp.) mediante  
el cultivo de mínimo crecimiento**

**T E S I S**

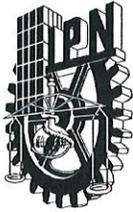
**Que para obtener el Grado Académico de:  
Maestro en Ciencias**

**Presenta:  
Laura Belem Montiel Frausto**

**Directores de tesis  
Dra. Martha Angélica Bautista Cruz  
Dr. José Raymundo Enríquez del Valle**

**Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.**

**Enero, 2017**



# INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

## SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

### ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 12 del mes de diciembre del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA)** para examinar la tesis de grado titulada: **Conservación *in vitro* de pitahaya (*Hylocereus spp.*) mediante el cultivo de mínimo crecimiento**

Presentado por la alumna:

**Montiel**

Apellido paterno

**Frausto**

materno

**Laura Belem**

nombre(s)

Con registro: 

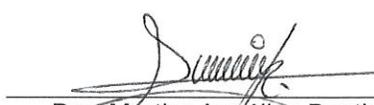
B	1	4	0	0	9	8
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

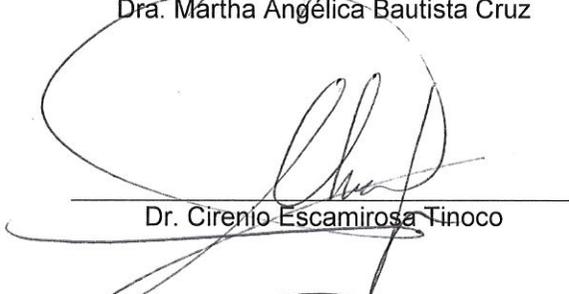
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

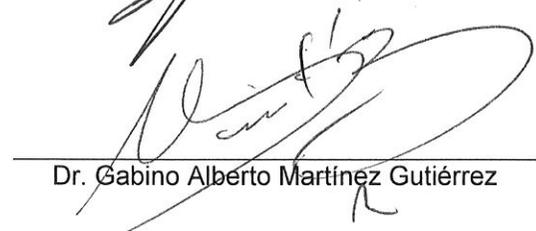
### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

  
Dra. Martha Angélica Bautista Cruz

  
Dr. José Raymundo Enríquez del Valle

  
Dr. Cirenjo Escamirosa Tinoco

  
Dr. Gabino Alberto Martínez Gutiérrez

  
Dr. Teodulfo Aquino Bolaños

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACION PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD OAXACA  
I.P.N.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 12 del mes de diciembre del año 2016, el (la) que suscribe **Montiel Frausto Laura Belem** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro A140098, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Drs. Martha Angélica Bautista Cruz y José Raymundo Enríquez del Valle y cede los derechos del trabajo titulado, **Conservación *in vitro* de pitahaya (*Hylocereus spp.*) mediante el cultivo de mínimo crecimiento** al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: [posgradoax@ipn.mx](mailto:posgradoax@ipn.mx) ó [mfraustolb@hotmail.com](mailto:mfraustolb@hotmail.com) se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



**Montiel Frausto Laura Belem**



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACION PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD OAXACA  
I.P.N.

## ÍNDICE

	Página
<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	3
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>I. MARCO TEÒRICO</b>	
1.1 Pitahaya .....	7
1.2 Descripción botánica .....	7
1.3 Origen y distribución .....	8
1.4 Importancia .....	9
1.5 Propagación .....	10
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b>	
2.1 Conservación de germoplasma vegetal .....	11
2.2 Estrategias de conservación .....	12
2.3 Conservación <i>in vitro</i> .....	14
<b>III. OBJETIVOS</b>	
3.1 Objetivo general .....	19
3.2 Objetivos específicos .....	19
<b>IV. HIPOTESIS</b> .....	20
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
5.1 Material vegetal .....	21
5.2 Micropropagación .....	23
5.2.1 Establecimiento de cultivos asépticos de semillas para su germinación <i>in vitro</i> .....	23
5.2.2 Uniformización del material vegetal .....	24
5.2.3 Dosis de citocinina y auxina en el medio de cultivo para la multiplicación de brotes .....	25
5.2.4 Enraizado y elongación de brotes .....	27
5.2.5 Aclimatación de plantas de pitahaya obtenidas <i>in vitro</i> .....	27
5.3 Conservación <i>in vitro</i> .....	28
5.3.1 Concentración de osmo-reguladores .....	28
5.3.2 Volumen de recipiente de cultivo .....	29
5.3.3 Nivel de intensidad luminosa .....	30

5.3.4 Refrescamiento	.....	30
<b>VI. RESULTADOS</b>		
6.1 Micropropagación		
6.1.1 Establecimiento de cultivos asépticos de semillas para su germinación <i>in vitro</i> .....		32
6.1.2 Dosis de citocinina y auxina en el medio de cultivo para la multiplicación de brotes.....		33
6.1.3 Enraizado y elongación de brotes	.....	37
6.1.4 Aclimatación de plantas de pitahaya obtenidas <i>in vitro</i> .....		37
6.2 Conservación <i>in vitro</i>		
6.2.1 Concentración de osmo-reguladores	.....	38
6.2.2 Volumen de recipiente de cultivo	.....	45
6.2.3 Nivel de intensidad luminosa	.....	46
6.2.4 Refrescamiento	.....	47
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	.....	49
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	.....	53
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	.....	54

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Tratamientos resultantes de la combinación de reguladores de crecimiento para la multiplicación clonal de <i>H. undatus</i> e <i>H. monacanthus</i> . .....	26
Cuadro 2 Coloración de los segmentos apicales según la carta de colores de Munsell (1998). .....	31
Cuadro 3 Análisis de varianza realizado a las variables número de brotes, altura de los brotes y peso fresco evaluadas durante la etapa de multiplicación de las especies <i>H. undatus</i> y <i>H. monacanthus</i> . .....	33
Cuadro 4 Multiplicación clonal de dos especies de pitahaya en la respuesta individual al efecto principal de la auxina o la citocinina. ....	34
Cuadro 5 Efecto combinado de los reguladores de crecimiento en la multiplicación <i>in vitro</i> de la especie <i>H. undatus</i> . .....	35
Cuadro 6 Efecto combinado de los reguladores de crecimiento en la multiplicación <i>in vitro</i> de la especie <i>H. monacanthus</i> .....	36
Cuadro 7 Efecto combinado del regulador de crecimiento ácido indolbutírico (AIB) y diferentes concentraciones de las sales MS en la longitud de las raíces de las vitroplantas de las especies de pitahaya <i>H. undatus</i> y <i>H. monacanthus</i> . .....	37
Cuadro 8 Resumen de análisis de varianza de osmo-reguladores en el crecimiento de <i>H. undatus</i> en conservación <i>in vitro</i> .....	41
Cuadro 9 Efecto de agentes osmóticos en el crecimiento de <i>H. undatus</i> . .....	41
Cuadro 10 Resumen de análisis de varianza de osmo-reguladores en el crecimiento de <i>H. monacanthus</i> en conservación <i>in vitro</i> .....	42
Cuadro 11 Efecto de agentes osmóticos en el crecimiento de <i>H. monacanthus</i> para su conservación en mínimo crecimiento. ....	42
Cuadro 12 Resumen de análisis de varianza de osmo-reguladores en variables de desarrollo y supervivencia de <i>H. undatus</i> en conservación <i>in vitro</i> transcurridos 180 días de cultivo. ....	43
Cuadro 13 Efecto de osmo-reguladores en el desarrollo de <i>H. undatus</i> para su conservación en mínimo crecimiento. ....	43
Cuadro 14 Resumen de análisis de varianza de osmo-reguladores en variables de desarrollo y supervivencia de <i>H. undatus</i> en conservación <i>in vitro</i> transcurridos 180 días de cultivo. ....	45
Cuadro 15 Efecto de osmo-reguladores en el desarrollo de <i>H. monacanthus</i> para su conservación en mínimo crecimiento. ....	45

Cuadro 16. Efecto del volumen de recipiente de cultivo en segmentos apicales de <i>H. undatus</i> para su conservación en mínimo crecimiento. ....	46
Cuadro 17. Efecto del volumen de recipiente de cultivo en segmentos apicales de <i>H. monacanthus</i> para su conservación en mínimo crecimiento. ....	47
Cuadro 18 Efecto del nivel de iluminación en segmentos apicales de <i>H. undatus</i> para su conservación en mínimo crecimiento. ....	48
Cuadro 19 Efecto del nivel de iluminación en segmentos apicales de <i>H. monacanthus</i> para su conservación en mínimo crecimiento. ....	48
Cuadro 20 Coeficientes de multiplicación para dos especies de pitahaya antes y después de su conservación por mínimo crecimiento. ....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica del genero <i>Hylocereus</i> en México (CONABIO, 2012). .....	9
Figura 2. Vitroplantas de pitahaya en la etapa de multiplicación de propágulos (a) <i>H. undatus</i> (b) <i>H. monacanthus</i> . .....	21
Figura 3. Esquema de la secuencia de experimentos para la propagación y conservación <i>in vitro</i> de pitahaya. ....	22
Figura 4. Frutos de pitahaya de coloración que caracteriza su estado de madurez (a) <i>H. undatus</i> y (b) <i>H. monacanthus</i> . ....	23
Figura 5. Desinfestación de semillas de pitahaya (a) en solución de hipoclorito de sodio (b) condiciones de asepsia en campana de flujo laminar, para establecer las semillas en el medio de cultivo. ....	24
<b>Figura 6.</b> Vitroplantas de pitahaya de 30 días a partir de la siembra (a) <i>Hylocereus undatus</i> (b) <i>Hylocereus monacanthus</i> . ....	25
Figura 7. Aclimatación a) Recipiente de poliestireno con sustrato; b) cubierta de polietileno para mantener humedad relativa alta. ....	28
Figura 8. Diferentes etapas del cultivo <i>in vitro</i> de dos especies de pitahaya ( <i>Hylocereus</i> spp.). Características de los frutos cosechadas (a) <i>H. undatus</i> y (b) <i>H. monacanthus</i> ; (c) semillas viables seleccionadas; (d) plántulas germinadas para emplear como fuente de explante. ....	32
Figura 9. (a) Formación de callo en la base del explante; (b) vitrificación en brotes de <i>H. monacanthus</i> . ....	37
Figura 10. Vitroplantas a los 30 días de aclimatación de (a) <i>H. undatus</i> y de (b) <i>H. monacanthus</i> . ....	38
Figura 11. Segmentos apicales de pitahaya en cultivo <i>in vitro</i> por mínimo crecimiento durante 180 días de cultivo (a) formación de brotes en manitol (c) formación de raíces en sacarosa (e) oxidación (coloración café) en la base de los segmentos apicales de <i>H. undatus</i> . (b) formación de brotes en manitol (d) formación de raíces en sacarosa (f) coloración amarilla de brotes de <i>H. monacanthus</i> . ....	39
Figura 12. Crecimiento de brotes a partir de segmentos apicales durante 180 días de cultivo en mínimo crecimiento (a) <i>H. undatus</i> (b) <i>H. monacanthus</i> . ....	40
Figura 13 Coloración que presentaron los segmentos apicales de <i>H. undatus</i> considerados vivos y con posibilidades de recuperación. C=control; ma= manitol; sa=sacarosa. La cuadrícula es de 1cm. ....	44

Figura 14 Coloración que presentaron los segmentos apicales de *H. monacanthus* considerados vivos y con posibilidades de recuperación. C=control; ma= manitol; sa=sacarosa. La cuadrícula es de 1cm. .... 46

Figura 15 Vitroplantas de pitahaya en la etapa de refrescamiento después de la conservación en mínimo crecimiento comparadas con la etapa de multiplicación de la propagación (a) (b) *H. undatus* (c) (d) *H. monacanthus*. .... 50

## RESUMEN

La pitahaya (*Hylocereus spp.*) es una cactácea de amplia distribución en México, de importancia medicinal, industrial, ecológica y producción de frutos, con gran potencial productivo y económico en climas semiáridos y subtropicales. Esta especie sufrió una gran presión en sus poblaciones debido a la colecta de material silvestre para establecer plantaciones comerciales en países de América, Asia y Medio Oriente. Su diversidad se encuentra susceptible a sufrir erosión genética debido a la práctica de actividades humanas como la deforestación y a los efectos del cambio climático. Por ello se requiere de una metodología viable que permita un equilibrio entre su aprovechamiento y conservación. En este trabajo se desarrolló una alternativa para la conservación de pitahaya (*Hylocereus undatus* e *Hylocereus monacanthus*) basada en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, centrado en la técnica de mínimo crecimiento. Se evaluó el efecto de la concentración de osmo-reguladores (sacarosa, manitol y sorbitol), el volumen del recipiente de cultivo y la intensidad luminosa para limitar el crecimiento y desarrollo de segmentos apicales con la finalidad de extender el tiempo entre subcultivos. Se realizaron experimentos independientes por cada especie de pitahaya. Se utilizaron los reguladores de crecimiento (BA/AIA) en concentraciones (1, 2, 4/0, 0.5 mg L<sup>-1</sup>) en la etapa de multiplicación de propágulos para obtener el material vegetal para los tres experimentos de conservación. Se establecieron segmentos apicales de 20 mm en: 1) medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% suplementado con sacarosa a 6, 9 y 12% (m/v), mientras que, manitol y sorbitol fueron empleados a 0.5, 1 y 1.5% (m/v) con un suplemento básico de sacarosa a 1% (m/v) como fuente de carbono; 2) recipientes de cultivo de 145 cm<sup>3</sup> y 175 cm<sup>3</sup> y 3) dos niveles de intensidad luminosa 5 y 25  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El tiempo de cultivo de cada experimento de conservación fue de 180 días con 90 días de diferencia entre ellos. Tras el periodo de conservación *in vitro* los segmentos apicales se subcultivaron en medio MS libre de reguladores de crecimiento para refrescamiento de los tejidos y 45 días después en medio MS con 2/0.5 mg L<sup>-1</sup> de BA/AIA para *H. undatus* y 1/0 de BA/AIA para *H. monacanthus*. La efectividad del método de conservación se determinó en función de la supervivencia, limitación del crecimiento y regeneración. Los resultados indicaron que segmentos apicales de pitahaya pueden mantenerse sin subcultivo durante seis meses. Utilizando medio basal MS

adicionado con 1% de manitol, recipiente de cultivo de 145 cm<sup>3</sup> y 5  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de intensidad luminosa se obtienen 1.5 brotes de 2.8 cm y 97% de supervivencia para *H. undatus* y con medio basal MS adicionado con 1% de manitol, recipiente de cultivo de 145 cm<sup>3</sup> y 25  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de intensidad luminosa se obtienen 1.7 brotes de 2.3 cm y 100% de supervivencia para *H. monacanthus*. En la etapa de refrescamiento en *H. undatus* se obtuvieron 8.8 brotes de 3.7 cm comparado con los 6.9 brotes de 8.7 cm obtenidos en la multiplicación de propagulos mientras que en *H. monacanthus* se obtuvieron 7.3 brotes de 3.1 cm comparado con los 19.8 brotes de 24 cm. Este trabajo brinda herramientas para micropropagación y conservación de dos especies de pitahaya en condiciones de cultivo *in vitro*. El material vegetal micropropagado puede ser fuente de germoplasma como una alternativa de producción para las comunidades locales y el material vegetal en conservación como fuente de explantes para otras investigaciones.

## ABSTRACT

The pitahaya (*Hylocereus spp.*) is a cactus widely distributed in Mexico. This plant has a medicinal, industrial and ecological importance. Further, it has great productive and economic potential in semi-arid and subtropical climates. Individuals of the different species of pitahaya are taken out of their wild populations and used to establish commercial plantations in countries of America, Asia and Middle East. The pitahaya diversity is susceptible to genetic erosion due to the different human practices such as deforestation and the effects of the climate change. For these reason a feasible methodology, that allows a balance between their use and conservation, is required. In this research an alternative was developed for the conservation of Pitahaya (*Hylocereus undatus* and *Hylocereus monacanthus*) based on the *in vitro* plant tissue culture, focused in the technique by minimal growth. The effect of the concentration of the osmo-regulators (sucrose, mannitol and sorbitol), the volume of the culture vessel and the light intensity were evaluated to limit the growth and development of apical segments with the main goal of extending the time between subcultures. Independent experiments were performed for each species of Pitahaya. Growth regulators (BA/AIA) in concentrations (1, 2, 4/0, 0.5 mg L<sup>-1</sup>) were used in the multiplication of propagules to obtain the plant material for the three conservation experiments. These consisted in establishing 20 mm apical segments in: 1) MS medium (Murashige and Skoog, 1962) at 50 % supplemented with 6, 9 and 12% (w / v) sucrose, while mannitol and sorbitol were used at 0.5, 1 and 1.5% (w / v) with a basic sucrose supplement at 1%) as a carbon source; 2) culture vessels of 145 cm<sup>3</sup> and 175 cm<sup>3</sup> and 3) two levels of light intensity 5 and 25  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ . The culture time of each experiment was 180 days with 90 days difference between them. After the *in vitro* preservation period the apical segments were subcultured in free medium of growth regulators for tissue cooling and 45 days later in MS medium with 2/0.5 mg L<sup>-1</sup> of BA/AIA for *H. undatus* and 1/0 from BA/AIA for *H. monacanthus*. The effectiveness of the conservation method was based on the survival, the growth limitation and the regeneration. The results indicated that apical segments of pitahaya can be maintained without subculture for six months. Using MS basal medium added with 1% mannitol, culture vessel of 145 cm<sup>3</sup> and 5  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  light intensity 1.5 shoots of 2.8 cm and 97% survival

were obtained for *H. undatus* and with basal medium MS added with 1% mannitol, 145 cm<sup>3</sup> culture vessel and 25  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  light intensity, 1.7 shoots of 2.3 cm and 100% survival for *H. monacanthus* were obtained. In the cooling stage in *H. undatus* 8.8 shoots of 3.7 cm were obtained compared to the 6.9 shoots of 8.7 cm obtained in the multiplication of propagules whereas in *H. monacanthus* 7.3 shoots of 3.1 cm were obtained compared to the 19.8 shoots of 24 cm. This research provides tools for the micropropagation and the conservation of two species of pitahaya under *in vitro* culture conditions. The micropropagated plant material can be used as a source of germplasm for alternative production in local communities and as explants for further research.

## INTRODUCCIÓN

Las técnicas de conservación de especies vegetales *in situ* y *ex situ*, son componentes fundamentales que contemplan esencialmente las operaciones de almacenamiento y propagación de germoplasma (Iriundo-Alegría, 2001). Se han utilizado técnicas basadas en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para la conservación de germoplasma a corto plazo, en el que se mantiene el material vegetal en condiciones libres de agentes contaminantes garantizando la sanidad y calidad del material vegetal disponible para propagación o intercambio de germoplasma (García-Águila, 2007).

En el cultivo *in vitro* mediante mínimo crecimiento se modifican las condiciones ambientales (luz, temperatura, fotoperiodo) y/o la composición del medio de cultivo (nutrientes, potencial osmótico) para reducir la velocidad de crecimiento de los cultivos de células, propágulos o plantas. Lo anterior permite mantener un gran número y variedad de muestras en un área reducida, facilitando el manejo de los cultivos al aumentar el periodo entre subcultivos por varios meses o años (García-Águila, 2007; Neiva y Jiménez, 2010).

La técnica de mínimo crecimiento ha sido implementada para la creación de bancos *in vitro* de *Saccharum officinarum* (Taylor y Dukin, 1993), *Manihot esculenta* (Roca *et al.*, 1994), *Carica papaya* (Suksa *et al.*, 1997), *Solanum tuberosum* (Toledo y Golmirzaie, 1998), *Saccharum officinarum* (García-Águila *et al.*, 2003), *Haberlea rhodopensis* (Daskalova *et al.*, 2011) *Syngonanthus mucugensis* (Lima *et al.*, 2011), *Agave* spp. (Pérez Molphe Balch *et al.*, 2012a), *Cinchona officinali* (Armijos, 2016) entre otros, por ser especies con un beneficio real o potencial para la alimentación, la industria, la investigación o el mejoramiento de cultivos (Neiva y Jiménez, 2010).

Entre las especies de cactáceas con gran potencial productivo y económico a nivel nacional se encuentra la pitahaya (*Hylocereus* spp.). La pitahaya es una planta perenne, semi epífita, trepadora, cuyos frutos son apreciados por su apariencia y color, en los mercados nacionales e internacionales se comercializa como fruta exótica, sus tallos, flores y semillas también son utilizados. La demanda creciente de pitahaya a nivel mundial ha incrementado la colecta desmedida de material silvestre con la finalidad de establecer plantaciones comerciales en otros países, propiciando una rápida pérdida de diversidad del género *Hylocereus* y dada la

importancia ecológica y económica es necesario contar con una alternativa para su conservación y aprovechamiento sustentable (Ortiz y Livera, 1999; Manzanero-Acevedo *et al.*, 2014).

## I. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Pitahaya

Las cactáceas comprenden unas 2,000 especies, algunas con centro de origen en México, en donde se encuentra la mayor diversidad en esta familia con un alto índice (79%) de endemismo (CONABIO, 2009). En el género *Hylocereus* se tienen varias especies con gran potencial productivo y económico. Las diferentes especies presentan diversos hábitos de crecimiento y tienen frutos que se conocen comúnmente como pitaya o pitahaya (Español), cuahnochtli (Náhuatl), cierge lèzard y poire de chardon (Francés) y night-blooming cereus, straw berry pear y dragon fruit (Inglés) (Paul y Duarte, 2012).

### 1.2 Descripción botánica

Planta perenne, suculenta, epifita o hemiepifita, muy ramificada, diploide ( $2n=22$ ), posee el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). Crece sobre arboles o piedras en regiones con precipitación pluvial de 2,000 mm, rango de temperaturas entre 11 y 40 °C y hasta 1,840 m sobre el nivel del mar (Rodríguez, 2000; Ortiz-Hernández y Carrillo-Salazar, 2012).

Se distingue por tener tallos suculentos, verdes y fotosintéticos, que presentan costillas o aristas gruesas que los recorren longitudinalmente, grupos de 3 a 5 espinas de 2 a 4 mm de longitud ubicadas sobre las areolas de filtro lanoso distantes entre sí de 3 a 4 cm. La epidermis presenta estomas y toda su superficie está recubierta por una capa cerosa de aproximadamente 1 mm de grosor (Cruz *et al.*, 2015).

Las pitahayas tienen dos tipos de raíces: las primarias que se encuentran en el suelo y las secundarias o adventicias, que se desarrollan fuera del suelo. Las raíces adventicias, generalmente se generan cuando la planta sufre de estrés hídrico y sus funciones son fijar y sostener las plantas a su tutor y absorber sustancias nutritivas y agua del ambiente (Gunasena *et al.*, 2007).

Las flores hermafroditas de apertura nocturna, generalmente blancas o con tinte amarillento y de gran tamaño (20 a 30 cm de longitud y hasta 25 cm en su diámetro mayor), nacen en las axilas de las espinas, en las partes más expuestas a los rayos solares.

El fruto es una baya de forma ovoide, redondeada o alargada, de 10 a 12 cm de diámetro, con escamas foliáceas y exocarpo de color amarillo, rojo y magenta. El endocarpo es de color blanco, amarillo o magenta con numerosas semillas diminutas (García-Rubio *et al.*, 2015).

Las semillas sexuales o verdaderas se encuentran distribuidas en la pulpa del fruto. Son de color negro, muy pequeñas y abundantes. Están recubiertas por una sustancia mucilaginosa. Las semillas sexuales son muy delicadas, normalmente presentan buena germinación (Le belleq *et al.*, 2006).

### **1.2.1 *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Britton & Rose [*H. polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose]**

Tiene flores muy largas (25-30 cm); su fruto color rojo (longitud: 10- 12 cm; peso: 130-350 g) es oblongo y cubierto de escamas que varían en tamaño; tiene pulpa roja con muchas pequeñas semillas negras, la textura de la pulpa es agradable y de buen gusto (Le belleq *et al.*, 2006)

### **1.2.2 *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose**

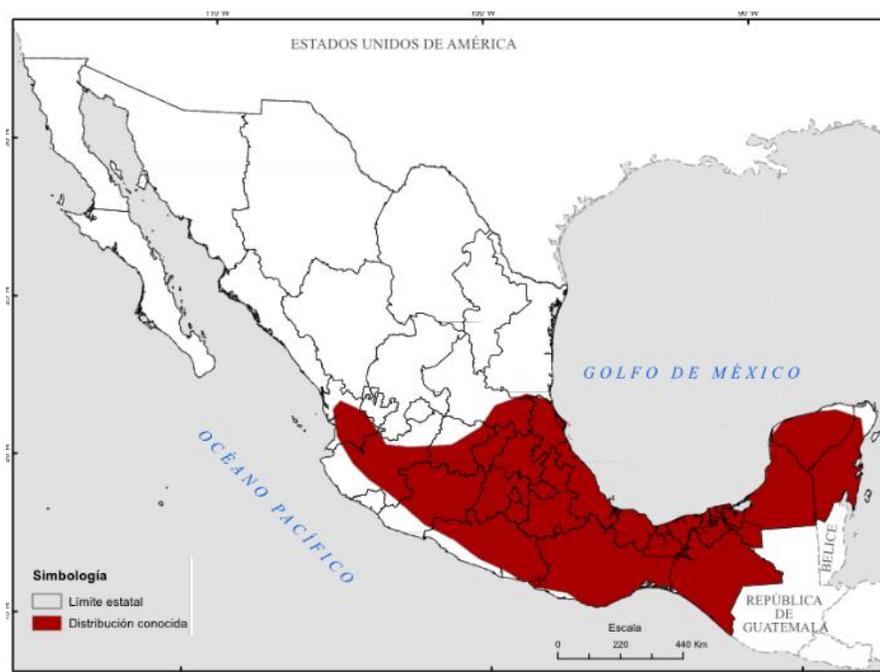
Las flores son muy largas (hasta 29 cm), su fruto de color de rosa-rojo (longitud: 15-22 cm; peso: 300-800 g) es oblonga y cubierto de escamas grandes y largos, rojo y verde en las puntas; tiene una pulpa blanca con muchas pequeñas semillas negras, la textura de la pulpa es agradable y con buen sabor (Le belleq *et al.*, 2006).

## **1.3 Origen y distribución**

El género *Hylocereus* spp. (Haworth) Britton & Rose, es originario de América, agrupa 16 especies distribuidas en regiones boscosas, tropicales y subtropicales de Colombia, Costa Rica, Guatemala, México, Nicaragua y Perú (Cruz *et al.*, 2015).

En México las especies *H. undatus*, *H. purpusii*, *H. ocamponis*, *H. minutiflorus* forman parte de las selvas tropicales y subtropicales de Campeche, Chiapas, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tlaxcala Veracruz y Yucatán (Figura 1) (Manzanero-Acevedo *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2015;).

La adaptabilidad a condiciones climáticas y edáficas adversas ha extendido el cultivo de la pitahaya a diferentes países de América, Asia, Medio Oriente y países tropicales y subtropicales del mundo (Ortiz-Hernández y Carrillo-Salazar, 2012; Cruz *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Distribución geográfica del genero *Hylocereus* en México (CONABIO, 2012).

#### 1.4 Importancia

La pitahaya ha recibido reconocimiento alrededor del mundo como planta ornamental y cultivo frutal. *H. monacanthus* es ampliamente cultivada como fuente de pigmentos naturales, mientras que *H. undatus* tiene una producción anual que varía de 4-20 ton de fruta fresca, la región Mekong Delta en Vietnam es el mayor productor con una superficie de cultivo de 6000 ha (Paul y Duarte, 2012). En México existen 265 ha de plantaciones, principalmente en los estados de Yucatán, Quintana Roo y Puebla, en los que se obtienen rendimientos promedios anual de 3.99 ton ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2014).

## **1.5 Propagación**

### **1.5.1 Semillas**

Por medio de semillas se puede propagar la pitahaya, que de modo natural son diseminadas por aves y otros animales que se alimentan de los frutos; no obstante, para fines de cultivo la propagación sexual no es recomendable, las plantas requieren demasiados cuidados en tanto se trasplantan en el terreno definitivo, y tardan de cuatro a seis años en llegar a su etapa productiva (Gunasena *et al.*, 2007).

### **1.5.2 Vegetativa**

Se realiza a partir de los tallos o esquejes mediante trasplante directo en el terreno definitivo o su colocación en bolsas con sustrato hasta la formación de nuevos brotes y raíces (Estrada-Luna *et al.*, 2008)

Son importantes las técnicas de propagación para la conservación de la integridad genética de las especies vegetales (Alegría, 2001), la biotecnología vegetal ofrece una serie de técnicas, como las relacionadas con el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, que pueden ser incorporadas a los esquemas de conservación de recursos fitogenéticos. Una técnica de propagación utilizada en cactáceas es la activación de yemas axilares, que se encuentran ubicadas en las estructuras denominadas areolas. Las areolas contienen células meristemáticas que dan origen a nuevos brotes y posterior desarrollo a una planta completa (Villavicencio *et al.*, 2012; Lema-Ruminska y Kulus, 2014).

En *Hylocereus* la mayoría de las areolas permanecen en estado latente, solo algunas pueden iniciar actividad de división celular para desarrollar brotes vegetativos o capullos de floración (Khaimov–Armoza *et al.*, 2012). La técnica de propagación a partir de activación de areolas es importante por su simplicidad, alta tasa de propagación y bajo riesgo de inestabilidad genética (Zoghلامي *et al.*, 2012). La combinación de reguladores de crecimiento (RC) como son las auxinas y citocininas en la etapa de multiplicación de la propagación desempeñan una función importante para determinar la vía de desarrollo de las células. La ocurrencia de la activación de yemas vegetativas para el desarrollo de brotes está determinada por la condición fisiológica de la planta, particularmente al evento dominancia apical, que se refiere a la inhibición o control del crecimiento que ejerce la yema apical sobre las yemas axilares, este fenómeno se debe a la acción de las hormonas, auxinas y citocininas, que

alcanzan una relación de concentración óptima para la división y diferenciación (Lallana y Lallana, 2014). Diversas especies responden de manera diferente a una misma condición de cultivo, en cactus la brotación de yemas axilares requiere niveles bajos de auxina y altos niveles de citocininas (Viñas *et al.*, 2012).

## II. JUSTIFICACIÓN

### 2.1 Conservación de germoplasma vegetal

La conservación de la flora silvestre que ha servido como fuente de alimento, compuestos de interés industrial, energía, principios medicinales, por su valor ornamental y por su valor ecológico, fue propuesta como actividad científica desde los años 70, con el objetivo de prevenir la erosión genética resultado de las actividades humanas y mejorar la productividad agrícola (García-Águila *et al.*, 2007; Iriondo-Alegría, 2001).

Las técnicas modernas de mejoramiento genético han producido variedades altamente homogéneas y que son usadas por cada vez mayor cantidad de agricultores, desplazando a las variedades locales provocando la reducción de la variabilidad genética de las especies cultivadas, ocasionando una erosión genética. La conservación de germoplasma vegetal es de fundamental importancia en los programas de mejoramiento genético para el mantenimiento de las fuentes primarias de variabilidad genética a ser empleadas en la hibridación y la investigación; y así permitir garantizar la preservación de las especies y su uso sostenible (Silva y Scherwinski-Pereira, 2011; Rayas *et al.*, 2012).

El concepto de conservación de los recursos fitogenéticos incluye la utilización de métodos que capten la máxima diversidad de genotipos, así como el uso de técnicas de conservación y posterior regeneración que mitiguen sus pérdidas a través del tiempo (Rao, 2004).

Manzanero-Acevedo *et al.* (2014) refirieron que a pesar de que la pitahaya presenta amplia variación morfológica, fisiológica y genética aunado a una gran distribución geográfica, por diversos factores la especie está en riesgo de perder variedades locales localizadas en huertos de traspatio de Campeche, por lo que es necesario crear estrategias de conservación del germoplasma. Por ello, conservar la variabilidad genética, posibilita la

evaluación para selección de genotipos sobresalientes en diversas características de interés, útiles para generar variedades de alto rendimiento, calidad de las cosechas, o capacidad de adaptación a determinados ambientes, etc.

## **2.2 Estrategias de conservación**

Existen dos estrategias básicas para la conservación de germoplasma vegetal: *i*) conservación *in situ* y *ii*) conservación *ex situ*.

### **2.2.1 Conservación *in situ***

Se refiere a la conservación de los ecosistemas y hábitats naturales y al mantenimiento y recuperación de poblaciones viables de especies, tanto cultivadas o domesticadas, en los alrededores en donde hayan desarrollado sus propiedades distintivas. Se considera un proceso de conservación dinámico, ya que las plantas continúan evolucionando con los cambios en el ambiente, por lo que resulta muy favorable para los estudios de genética y evolución. La conservación *in situ* incluye la conservación en áreas protegidas, parques nacionales, reservas biológicas y reservas ecológicas, así como en fincas y jardines caseros. Presenta como inconvenientes que el material vegetal se encuentra vulnerable a desastres naturales y a la devastación humana, además de que no está fácilmente accesible para su uso. Así mismo requiere de regímenes adecuados de manejo y elevados niveles de supervisión y monitoreo, lo que incrementa los costos de manutención y hace de este tipo de conservación una estrategia poco viable (Engelmann y González-Arno, 2013).

### **2.2.2 Conservación *ex situ***

Se entiende como la conservación de los componentes de la diversidad biológica fuera de su hábitat natural. Este tipo de conservación es particularmente apropiada para especies cultivadas y sus parientes silvestres (Engelmann y González-Arno, 2013). Implica el muestreo, transferencia y almacenamiento del material vegetal desde el área de colecta hasta el lugar donde será conservado. Se divide en diferentes técnicas como: criopreservación (semillas, polen o tejido), banco de semillas, almacenamiento de cultivo de tejidos (tejidos somáticos y semillas que se propagan *in vitro*), banco de genes de campo, jardines botánicos y jardín comunal (Lascrain *et al.*, 2006; Castilla, 2012).

Los bancos de semillas botánicas y los bancos en condiciones de campo han sido ampliamente utilizados, sin embargo, tienen ciertas limitantes con especies de semillas de corta supervivencia, auto incompatibles o de propagación vegetativa obligada, además que en condiciones de campo las plantas se encuentran vulnerables a daños climatológicos y expuestas a plagas, enfermedades, sequía y errores humanos como la evaluación del germoplasma; el material vegetal no se encuentra en condiciones fitosanitarias para su intercambio y aunado a esto los costos por mantenimiento y las grandes extensiones de tierra (García-Águila *et al.*, 2007; Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010; Engelmann y González-Arno, 2013).

Las prácticas tradicionales han de ser complementadas con estrategias más integrales y dinámicas que incidan sobre los aspectos sociales, económicos y culturales (Cuevas y de la Torre, 2015), como la biotecnología vegetal que ofrece herramientas para la multiplicación y conservación de germoplasma *in vitro* a través de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, (CTV), con las cuales es posible conservar plantas completas, meristemas, semillas, embriones somáticos, embriones cigóticos, hojas, tallos, raíces, yemas, polen, anteras, callos o protoplastos (Martin *et al.*, 2013).

En el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México se han establecido protocolos de regeneración mediante organogénesis directa e indirecta así como embriogénesis somática para la propagación de diversas especies de la familia Cactaceae en especies como *Turbinicarpus laui*, *T. pseudopectinatus*, *Mammillaria pectinifera*, *Ariocarpus kotschyobeyanus*, *Pelecypora aselliformis*, *P. strobiliformis*, *Leuchtenbergia principis*, *Astrophytum ornatum*.

El cultivo *in vitro* de diferentes especies vegetales dio la posibilidad de desarrollar nuevas alternativas al disponer de suficientes individuos en periodos de tiempo relativamente cortos, lo cual permite tener duplicados seguros de aquellos genotipos de particular interés con un desarrollo fisiológico homogéneo (García-Águila *et al.*, 2007), éstos pueden mantenerse bajo condiciones controladas de luz y temperatura para constituir los bancos de germoplasma *in vitro* (Perez Molphe Balch *et al.*, 2012).

## **2.3 Conservación *in vitro***

La conservación *in vitro* se considera como complemento a las estrategias generales de conservación de los recursos genéticos, es ideal para el intercambio de germoplasma, porque el material vegetal se encuentra libre de patógenos al mantenerse bajo condiciones asépticas y en un ambiente controlado (Roca *et al.*, 1991).

La “miniaturización” de los explantes *in vitro* permite reducir los requerimientos de espacio y algunos costos en mano de obra, sin embargo, las tasas de multiplicación que pueden alcanzarse mediante los procedimientos *in vitro* son elevadas, dificultándose el manejo y almacenamiento de las colecciones, al requerir el material vegetal subcultivos frecuentes a medio fresco (Engelmann y González-Arno, 2013).

La repetición de cada subcultivo aumenta la posibilidad de pérdidas debidas a contaminación microbiana o un error humano (Scowcroft, 1984), por lo que se ha propuesto reducir al mínimo la frecuencia de los subcultivos, con lo que se logra además reducir la variación genética (Roca *et al.*, 1991).

Por el tiempo de almacenaje se tienen dos sistemas básicos de conservación de germoplasma *in vitro*: i) mediante la limitación de crecimiento hasta tasas mínimas y ii) mediante la supresión total del crecimiento y del metabolismo celular (Roca *et al.*, 1991)

### **2.3.1 Conservación *in vitro* mediante mínimo crecimiento**

El objetivo de este método es disminuir la actividad metabólica y fisiológica de los tejidos vegetales, a partir de la modificación de las condiciones físicas (factores ambientales), químicas (composición del medio de cultivo) y combinación de ambas, que permitan extender al máximo el intervalo de transferencia a medio fresco, sin que ello afecte la viabilidad de los explantes (Roca *et al.*, 1991; Abdelnour, 2011). Se hace necesaria la realización de un refrescamiento del material vegetal posterior a la conservación.

El ritmo de crecimiento de los cultivos se puede restringir por distintos métodos como la reducción de la temperatura, la disminución de la intensidad de luz o la manipulación del medio de cultivo mediante la adición de agentes osmóticos o retardantes del crecimiento (Engelmann, 1998).

En especies de interés alimenticio, ornamental o en peligro de extinción, se ha aplicado la metodología de conservación *in vitro* mediante mínimo crecimiento utilizando osmo-

reguladores como manitol y sorbitol que en *Agave* spp. (Pérez Molph Balch *et al.*, 2012a) el subcultivo ocurrió a 10 meses de la siembra, sin que se presentaran alteraciones morfológicas en las plantas.

La combinación de osmo-reguladores con bajas temperaturas se han utilizado con buenos resultados en la conservación de *Vitis* sp. (Hassan *et al.*, 2014) y *Turbinicarpus* (Pérez Molph Balch *et al.*, 2012b) en donde 3% de manitol en el medio de cultivo, complementado con incubación a 4 o 10 °C fueron las condiciones para mantener los cultivos por 12 y 6 meses respectivamente con un 100% de supervivencia.

Adicionalmente se han utilizado inhibidores del crecimiento como el ácido abscísico (ABA) y paclobutrazol (PBZ) en la conservación de *Piper* sp. (Silva y Scherwinski-Pereira, 2011) y *Phoenix dactylifera* L. (El-Dawayati *et al.*, 2013) y *Vanilla* (Bello-Bello *et al.*, 2015) en donde en 180 días el PBZ tuvo influencia en el 100% de supervivencia de las plantas pero con anomalía en la parte apical y radical.

- **Factores limitantes del crecimiento**

La tasa de crecimiento de los cultivos *in vitro* se puede controlar empleando principalmente los siguientes factores: temperatura, componentes inorgánicos y orgánicos, reguladores de crecimiento y potencial osmótico del medio. Otros factores, como el tamaño de recipiente de cultivo, la calidad y concentración del agente gelificante, la adición de carbón activado al medio, la limitación de la oxigenación, la intensidad de la luz y del fotoperiodo, son también importantes en el control del crecimiento (Roca *et al.*, 1991; Engelmann, 1998; Sharry *et al.*, 2015).

La adición de agentes osmóticos al medio de cultivo reduce la adsorción de agua y nutrientes limitando el crecimiento del material vegetal; en concentraciones elevadas, la sacarosa, que es la principal fuente de carbono, actúa como agente osmótico. Otros agentes osmóticos que interaccionan con la sacarosa y resultan más eficientes al limitar el crecimiento, son el manitol y el sorbitol, sustancias difíciles de metabolizar por las plantas (Roca *et al.*, 1991).

El potencial osmótico está íntimamente ligado a la presión de turgencia que es la fuerza motriz para la elongación celular. Cuando el potencial osmótico es más negativo en el interior de la célula que en el medio, el agua que entra a la célula provoca que aumente el volumen

vacuolar y ejerce presión de turgencia sobre las paredes celulares, induciendo a que éstas se expandan y aumente la longitud de la célula (Roca *et al.*, 1991; Azcon- Bieto y Talón 2003).

A medida que aumentamos la concentración de solutos en el medio, el potencial se hace más negativo y se reduce la absorción de agua, ocasionando una disminución de la presión de turgencia y en consecuencia reduciendo el crecimiento de la planta. George (1993) señaló que las células mantenidas en un ambiente con bajo potencial osmótico pierden agua y disminuyen su potencial hídrico, alterando su morfogénesis y velocidad de crecimiento

El potencial osmótico siempre posee valores negativos, sin embargo, Pierik (1990) indicó que el crecimiento y organogénesis de los explantes se detienen cuando el potencial osmótico del medio es más negativo que -0.3 MPa debido a la baja absorción de agua.

Como agentes osmóticos se puede emplear la sacarosa en elevadas concentraciones, debido a que es altamente metabolizable y a consecuencia de la hidrólisis la osmolaridad del medio se duplica, y los azúcar-alcohol como el manitol y el sorbitol (Roca *et al.*, 1991). El empleo de fuentes de carbono diferentes a la sacarosa como el sorbitol o manitol que no pueden ser metabolizadas o que se metabolizan más lento representan una opción para reducir la tasa de crecimiento de los cultivos *in vitro*.

### ***i) Sacarosa***

De manera generalizada, las plantas superiores sintetizan y transportan sacarosa como la principal fuente de carbono de los órganos fuente a los órganos sumidero donde ésta se puede usar en el metabolismo y el crecimiento o para almacenarse como reserva (Azcon-Bieto y Talón, 2003; Lemoine, 2013).

La sacarosa, en concentraciones de 2 al 4% (p/v), constituye la fuente de carbono más utilizada en los medios de cultivo ya que es sintetizada, transportada y metabolizada de manera natural en las plantas (Pierik, 1990).

Los cultivos *in vitro* no son suficientemente autotróficos y el crecimiento tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis o incluso en obscuridad, por lo tanto, la adición de azúcares al medio de cultivo es fundamental para satisfacer la demanda energética y de carbono que genera el crecimiento y desarrollo celular (Pierik, 1990; Ertola, 1994, Rukundo *et al.*, 2012), además de tener efecto en la fisiología, crecimiento y diferenciación de las células (Soo-Cheon, 2013).

Existen especies vegetales que pueden sintetizar, transportar y metabolizar simultáneamente junto con la sacarosa, azúcares alcohólicos como el manitol y el sorbitol (Azcon-Bieto y Talón, 2003; Karakas, 2001).

### **ii) Manitol y Sorbitol**

Se ha observado que el manitol y sorbitol pueden funcionar como fuente de carbono y energía para cultivos *in vitro* cuando la especie con la que se está trabajando produce estos azúcar-alcohol de manera natural o posee enzimas que le permiten metabolizarlo (Marino *et al.*, 1993; Kadota y Nimmi, 2004).

En especies vegetales que carecen de las enzimas necesarias para metabolizar el manitol y el sorbitol, el uso de éstos como fuente de carbono puede disminuir la tasa de crecimiento, la capacidad de morfogénesis o la sobrevivencia del cultivo (Kadota y Nimmi, 2004).

El mínimo crecimiento en cultivos *in vitro* se puede propiciar mediante la adición de agentes osmóticos, sustancias que inducen cambios en el potencial osmótico del medio de cultivo *in vitro* sin interferir con el metabolismo de carbono en la planta (Pierik, 1990; Azcon-Bieto y Talón, 2003).

Se ha reportado que el manitol, en algunas especies se difunde lentamente entre el espacio extracelular pero no puede entrar a las células y ser metabolizado por los tejidos de la planta, adicionalmente su presencia no interfiere con la actividad enzimática. Por estas razones es empleado frecuentemente como agente para modificar el potencial osmótico del medio de cultivo, y promover estrés hídrico artificial en explantes *in vitro* (George, 1993; Stoop, 1993; Whitters y Engelmann, 1997).

### **iii) Iluminación**

El fotoperiodo y la intensidad de la luz son factores que influyen en el control de la velocidad de crecimiento, principalmente cuando interactúan con la temperatura. El comportamiento de muchos cultivos depende de la calidad, intensidad y fotoperiodo de la luz que reciben, dado que varias enzimas involucradas en el desarrollo y en el metabolismo secundario son influenciadas por la luz, la mayoría de los cultivos se desarrollan a una intensidad lumínica entre 5 a 25 W/m<sup>2</sup> (1000 a 5000 lux), si bien la calidad de la luz puede

determinar diferentes respuestas morfogénicas, en general se utiliza luz blanca, pobre en longitudes de onda larga. El fotoperiodo habitualmente utilizado es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, aunque algunos cultivos requieren oscuridad (Marín, 1993).

#### **iv) Volumen del recipiente de cultivo**

El volumen del recipiente de cultivo puede ser determinante para definir la frecuencia de subcultivos y el almacenamiento óptimo de los explantes (Engelmann 1991, Keller *et al.*, 2006). Por ejemplo, en *Curcuma longa* se utilizaron envases con capacidad de 180 mL para el almacenamiento a corto plazo (durante seis semanas) y de 2.5 L para el almacenamiento más prolongado (durante 23 semanas). Esto permitió una optimización en el almacenamiento de esta especie al utilizar eficientemente al volumen del recipiente según las necesidades de crecimiento del explante (Cousins y Adelberg, 2008).

#### **v) Temperatura**

Uno de los recursos más utilizados para disminuir el crecimiento del cultivo es la reducción de la temperatura, que en condiciones óptimas se encuentra entre los 20 y 30 °C. Sin embargo, la disminución de la misma va a depender de la sensibilidad de la especie de interés (Whitters, 1991).

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la concentración de osmo-reguladores (sacarosa, manitol y sorbitol), volumen del recipiente de cultivo e intensidad luminosa en la tasa de crecimiento y desarrollo de dos especies de pitahaya (*Hylocereus undatus* e *Hylocereus monacanthus*) para su conservación *in vitro* mediante el cultivo de mínimo crecimiento.

#### 3.2 Objetivos particulares

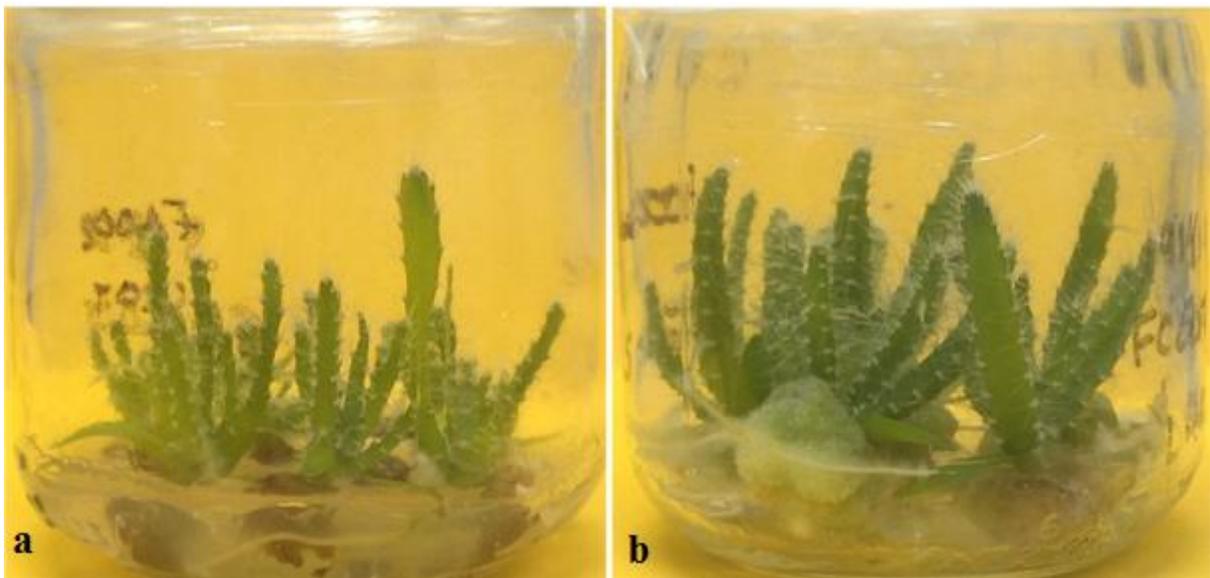
- Determinar el efecto de tres concentraciones de osmo-reguladores (sacarosa, manitol y sorbitol) de segmentos apicales de *Hylocereus undatus* e *Hylocereus monacanthus* para limitar la tasa de crecimiento y desarrollo en cultivo *in vitro*.
- Conocer el comportamiento de segmentos apicales de *Hylocereus undatus* e *Hylocereus monacanthus* establecidos en recipientes de cultivo con diferente volumen, para limitar su tasa de crecimiento y desarrollo en cultivo *in vitro*.
- Determinar la influencia de dos niveles de intensidad luminosa en segmentos apicales de *Hylocereus undatus* e *Hylocereus monacanthus* para limitar su tasa de crecimiento y desarrollo en cultivo *in vitro*.
- Probar la capacidad regenerativa de las vitroplantas de *Hylocereus undatus* e *Hylocereus monacanthus* conservadas seis meses mediante mínimo crecimiento.

#### **IV. HIPÓTESIS**

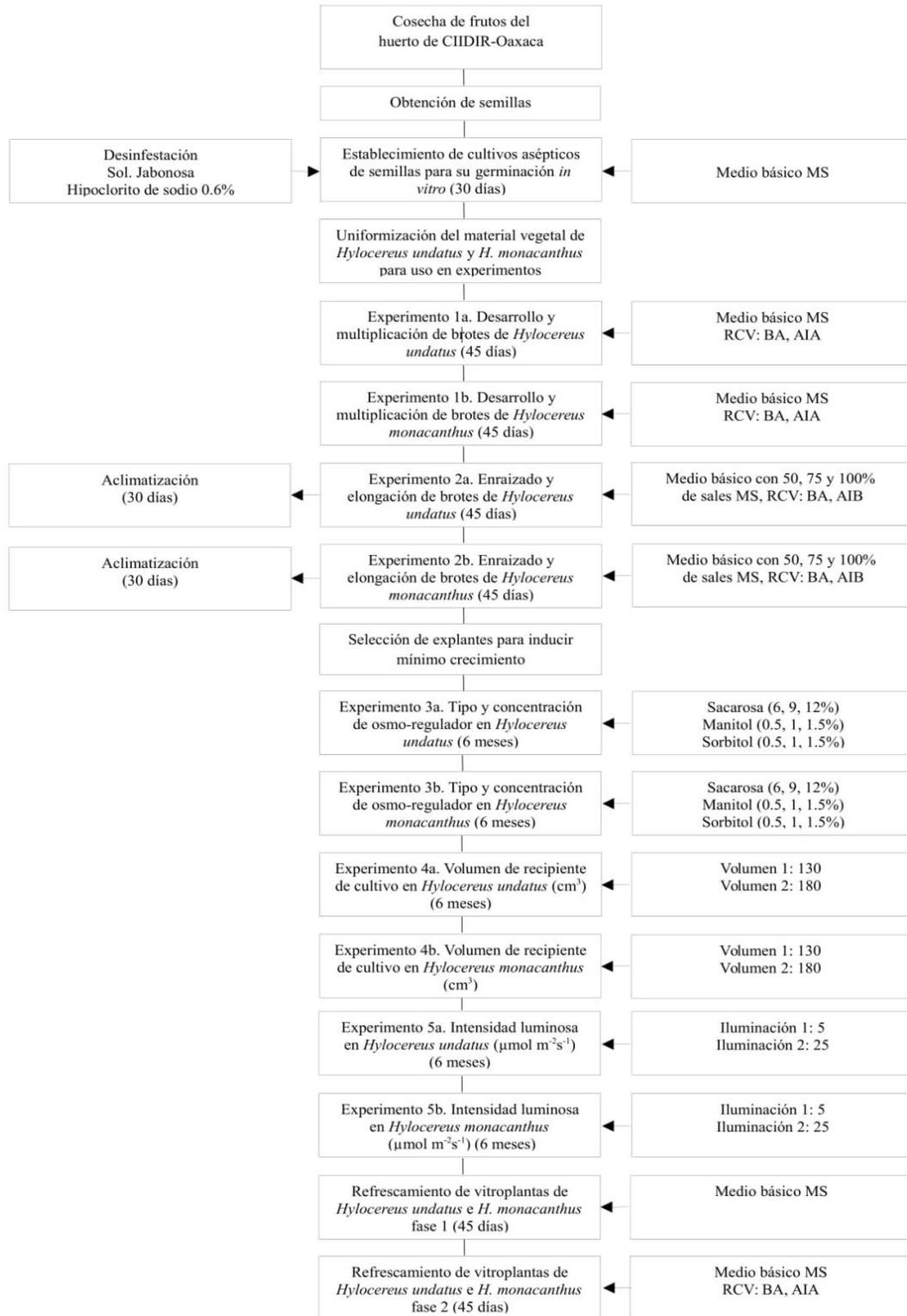
La tasa de crecimiento y desarrollo de segmentos apicales de pitahaya están limitados por la concentración de osmo-reguladores, volumen del recipiente de cultivo e intensidad luminosa.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de micropropagación vegetal del Instituto Tecnológico de Valle de Oaxaca (ITVO). La secuencia de actividades y experimentos en las etapas de germinación, multiplicación, enraizamiento, aclimatación y conservación mediante mínimo crecimiento de *H. undatus* y *H. monacanthus* se resumen en (Figura 3). Para los experimentos de conservación se partió de segmentos apicales que en una secuencia de micropropagación se tenían en la etapa de multiplicación de propágulos (Figura 2). **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**



**Figura 2.** Vitroplantas de pitahaya en la etapa de multiplicación de propágulos (a) *H. undatus* (b) *H. monacanthus*.



MS: medio Murashige y Skoog, RCV: reguladores de crecimiento vegetal, BA: benciladenina, AIA: ácido indolacético, ANA: ácido 1-naftalenacético.

**Figura 3.** Esquema de la secuencia de experimentos para la propagación y conservación *in vitro* de pitahaya.

## 5.1 Material vegetal

En el CIIDIR-IPN unidad Oaxaca, se tiene un huerto de pitahaya con plantas de cuatro años de edad. En el mes de septiembre de 2014 se colectó un fruto de *H. undatus* y un fruto de *H. monacanthus* respectivamente, la referencia de madurez fue la coloración rosa - roja del exocarpio (Figura 4).



**Figura 4.** Frutos de pitahaya de coloración que caracteriza su estado de madurez (a) *H. undatus* y (b) *H. monacanthus*.

## 5.2 Micropropagación

### 5.2.1 Establecimiento de cultivos asépticos de semillas para su germinación *in vitro*

Durante el mes de septiembre de 2014 frutos maduros cosechados de dos especies de pitahaya *H. undatus* y *H. monacanthus*, se utilizaron para obtener semillas. En condiciones de laboratorio, los frutos se lavaron con detergente en polvo (Roma) y agua destilada. Las semillas de entre 1.5 y 2 mm de diámetro, se separaron del mesocarpium utilizando agua corriente y una criba de plástico con aberturas de 1 mm. Las semillas obtenidas se colocaron en papel absorbente durante 24 horas, posteriormente se seleccionaron las semillas viables y se colocaron en recipientes de vidrio debidamente etiquetados. En condiciones asépticas proporcionadas por una cámara de aire filtrado de flujo laminar horizontal, el uso de cajas petri de vidrio, pinzas y bisturí esterilizados, las semillas se sometieron a un proceso de desinfección superficial, en la secuencia siguiente: inmersión y agitación continua durante 10 minutos en agua destilada con detergente en polvo (Roma) al 0.5% m/v; inmersión durante 15

min en una solución al 0.6% de hipoclorito de sodio; tres enjuagues con agua destilada estéril (Figura 5). Posteriormente se establecieron 10 frascos con 10 semillas de cada especie. Estos frascos de vidrio fueron de 145 cm<sup>3</sup> que contenía 20 mL de medio de cultivo esterilizado y consistencia de gel, preparado con las sales inorgánicas MS (Murashige y Skoog, 1962) a 50% de concentración y libre de reguladores de crecimiento suplementado con 30 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa (SIGMA, SLBK0684V), 0.1 g·L<sup>-1</sup> de Myo-inositol (MERK, 431KZT204328) y 0.04 g·L<sup>-1</sup> de Tiamina-HCl (SIGMA, T-4625). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 con NaOH 1N, antes de agregar 6 g·L<sup>-1</sup> de agar (SIGMA, P8169-100G) se disolvió por medio de calor en una parrilla (CIMMAREC) en agitación constante. Se esterilizó durante 17 min a 121 °C y 1.2 kg cm<sup>-2</sup> de presión en autoclave (AESA, MOD 300). Después de establecer las semillas en el medio de cultivo, se colocó la tapa, se selló el frasco usando polietileno adherente y los cultivos se incubaron durante 30 días en condiciones semi controladas de temperatura promedio de 24 ± 4 °C, fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad y 25 μmoles m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de intensidad luminosa.

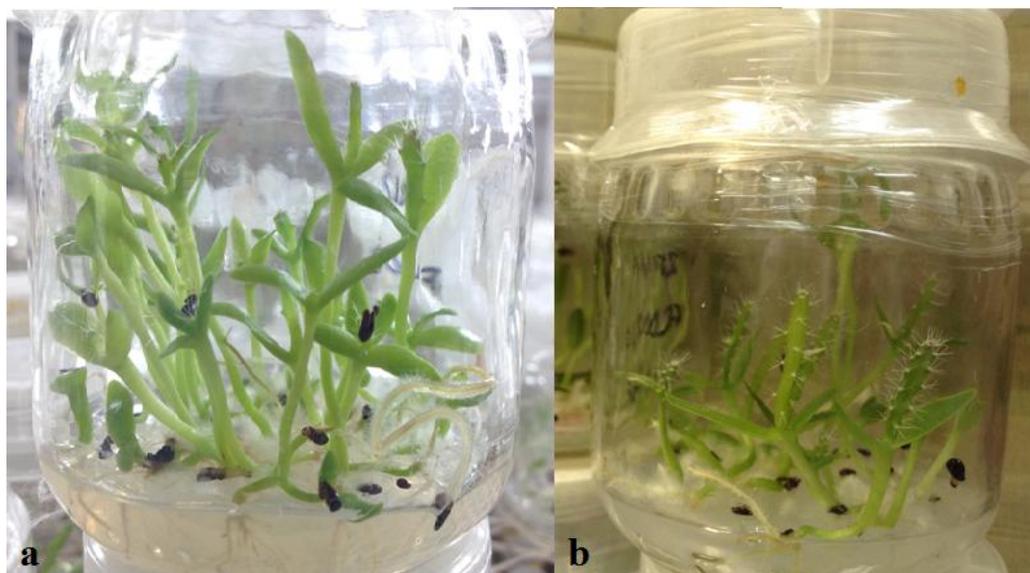


**Figura 5.** Desinfestación de semillas de pitahaya (a) en solución de hipoclorito de sodio (b) condiciones de asepsia en campana de flujo laminar, para establecer las semillas en el medio de cultivo.

### 5.2.2 Uniformización del material vegetal

A partir de la germinación de semillas *in vitro*, se seleccionaron plántulas de aspecto sano y vigoroso de 30-50 mm de altura del hipocótilo al ápice meristemático (Figura 6), con

ayuda de pinzas y bisturí estéril, en cada planta se cortó la parte del tallo arriba de las hojas cotiledonares. Los segmentos apicales se homogenizaron a 5 mm de altura en *H. undatus* y 10 mm de altura en *H. monacanthus* y se establecieron 5 ápices en cada recipiente de vidrio de 145 cm<sup>3</sup> que contenía 20 mL de medio de cultivo de composición similar que el utilizado para la germinación de semillas. Los ápices se incubaron durante 30 días para descartar contaminación en condiciones semi controladas de temperatura promedio de  $24 \pm 4$  °C, fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad y  $25 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad luminosa.



**Figura 6.** Vitroplantas de pitahaya de 30 días a partir de la siembra (a) *Hylocereus undatus* (b) *Hylocereus monacanthus*.

### 5.2.3 Dosis de citocininas y auxina en el medio de cultivo para la multiplicación de brotes

#### a) *H. undatus*

Segmentos apicales de 30 días después de establecidos en cultivo aséptico, se seleccionaron de acuerdo al procedimiento descrito por Dahanayake y Ranawake (2012). El tamaño de segmento apical utilizado como explante fue de 3 mm.

Los segmentos apicales, que contenían el ápice y areolas, se establecieron en diversas variantes de medio de cultivo para inducir la multiplicación de brotes. El medio básico de cultivo empleado contenía las sales minerales MS, sacarosa  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , Tiamina-HCl  $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y Myo-inositol  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . A este medio básico se añadieron diferentes combinaciones de

citocinina y auxina en concentraciones de AIA (ácido indolacético, 0 y 0.5 mg·L<sup>-1</sup>) y BAP (N<sup>6</sup>-bencilaminopurina, 1, 2 y 4 mg·L<sup>-1</sup>) por lo que resultaron seis variantes de medio de cultivo y comparados contra un control libre de reguladores del crecimiento (Cuadro 1). El pH de cada medio de cultivo se ajustó a 5.8, antes de agregar 6 g·L<sup>-1</sup> de agar. Después de disolver el agar con calor y agitación se distribuyeron 20 mL de medio de cultivo en cada frasco de vidrio de 145 cm<sup>3</sup>, se colocó la tapa de polipropileno y se esterilizaron durante 17 min a 121 °C y 1.2 kg/cm<sup>2</sup> de presión.

**Cuadro 1** Tratamientos resultantes de la combinación de reguladores de crecimiento para la multiplicación clonal de *H. undatus* e *H. monacanthus*.

Tratamientos	Regulador del crecimiento (mg·L <sup>-1</sup> )	
	BAP	AIA
Control	0	0
T1	1	0
T2	2	0
T3	4	0
T4	1	0.5
T5	2	0.5
T6	4	0.5

\*BAP:=Bencilaminopurina; AIA=ácido indolacético.

Después de colocar la tapa a cada frasco y sellar la unión con polietileno adherente, los cultivos se colocaron en el área de incubación por 45 días en condiciones semi controladas de temperatura promedio de 24 ± 4 °C, fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad y 25 μmoles m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de intensidad luminosa. Transcurrido el periodo citado, se tomaron datos de número de brotes, longitud de brotes, porcentaje de hiperhidratación, callo y raíces. El experimento se estableció de acuerdo a un diseño completamente al azar. La unidad experimental fue un segmento apical y se tuvieron 15 repeticiones por tratamiento. Los datos se sometieron a análisis de varianza y comparaciones de medias (Tukey, 0.05) con el programa computacional SAS versión 9.00. El procedimiento experimental descrito se realizó de manera independiente para cada especie.

b) *H. monacanthus*

El tamaño del segmento apical utilizado como explante fué de 10 mm, siguiendo la metodología anteriormente descrita para el desarrollo y multiplicación de brotes para la especie *H. undatus*.

#### 5.2.4 Enraizado y elongación de brotes

a) *H. undatus*

Los brotes obtenidos en la etapa de multiplicación fueron separados para inducir su elongación y enraizamiento, al colocarlos en diversas variantes de medio de cultivo MS que contenían diferentes concentraciones de sales inorgánicas (50, 75 y 100%) suplementado con 0 y 0.1 mg·L<sup>-1</sup> de la auxina ácido indolbutírico (AIB). Los brotes fueron homogenizados en tamaño a 20 mm de longitud y se establecieron tres brotes en cada recipiente de cultivo. Posteriormente, los cultivos fueron incubados por un periodo de 45 días en condiciones semi controladas de temperatura promedio de 24 ± 4 °C, fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad y 25 μmoles m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de intensidad luminosa. Se tomaron datos de altura de brote, número de raíces y longitud de raíces. El experimento se estableció de acuerdo a un diseño completamente al azar, con arreglo factorial 3x2, con el factor sales inorgánicas en tres niveles y el factor ácido indolbutírico en dos niveles; por lo que se tuvieron seis tratamientos. La unidad experimental fue un segmento apical y se tuvieron 15 repeticiones por tratamiento. Los datos se sometieron a análisis de varianza y comparaciones de medias (Tukey, 0.05) con el programa computacional SAS versión 9.00.

b) *H. monacanthus*

Se siguió la misma metodología de enraizado y elongación de brotes descrita anteriormente para la especie *H. undatus*.

#### 5.2.5 Aclimatación de plantas de pitahaya obtenidas *in vitro*

Una parte de las plántulas de las especies de pitahaya micropropagadas (*H. undatus* y *H. monacanthus*) se extrajeron de los medios de cultivo y se establecieron individualmente en recipientes de poliestireno de 177 cm<sup>3</sup> que contenían una mezcla de sustrato de perlita y peat moss (1:1). Cada maceta se cubrió con una bolsa de polietileno transparente para crear un ambiente de humedad relativa alta. La primera semana, diariamente, la bolsa de polietileno fue

retirada por 30 min, en la segunda semana por 60 min y en la tercer y cuarta semana se retiró por completo. Se programaron dos riegos por semana con la solución de Steiner a 50% de concentración de nutrientes, descrita en Trejo-Téllez y Gómez-Merino (2012) y transcurridos 28 días se evaluó el porcentaje de plantas que se adaptó (Figura 7).



**Figura 7.** Aclimatación a) Recipiente de poliestireno con sustrato; b) cubierta de polietileno para mantener humedad relativa alta.

### 5.3 Conservación *in vitro*

Como explantes se utilizaron brotes vigorosos de tamaño homogéneo provenientes de la etapa de enraizado y elongación de brotes. A fin de determinar las condiciones químicas y ambientales para favorecer el mínimo crecimiento en segmentos apicales de dos especies de pitahaya (*H. undatus* y *H. monacanthus*) se realizaron tres experimentos.

#### 5.3.1 Concentración de osmo-reguladores

##### a) *H. undatus*

Se seleccionaron cinco segmentos apicales de 20 mm de altura y se establecieron en cada frasco de 145 cm<sup>3</sup>, que contenía 20 mL de alguna variante de medio de cultivo preparado

con medio basal que contenía las sales MS al 50%, suplementado con  $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Tiamina-HCl y  $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de Myo-inositol, adicionando diferentes concentraciones de osmo-reguladores: Sacarosa a 6, 9 y 12% (m/v), mientras que, manitol y sorbitol fueron empleados a 0.5, 1 y 1.5% (m/v) con un suplemento básico de sacarosa a 1% (m/v) como fuente de carbono. Las diferentes concentraciones de osmo-reguladores evaluadas dieron como resultado nueve tratamientos que fueron comparados contra un control que contenía el mismo medio basal y suplementado con 3% sacarosa (medio basal de micropropagación). El pH de cada medio de cultivo se ajustó a 5.8, antes de agregar  $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de phytigel. Después de disolver el phytigel con calor y agitación se distribuyeron 20 mL de medio de cultivo en cada frasco de vidrio de  $145 \text{ cm}^3$ , se colocó la tapa de polipropileno y se esterilizaron durante 17 min a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $1.2 \text{ kg}/\text{cm}^2$  de presión. Posteriormente, los cultivos fueron incubados por un periodo de 180 días en condiciones semi controladas de temperatura promedio de  $24 \pm 4 \text{ }^\circ\text{C}$ , fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad y  $25 \text{ } \mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de intensidad luminosa. Se evaluó crecimiento, número de brotes, número de raíces adventicias, longitud de raíz y supervivencia de acuerdo a la coloración (Cuadro 2). El experimento se estableció de acuerdo a un diseño completamente al azar. La unidad experimental fue un segmento apical y se tuvieron 25 repeticiones por tratamiento. Los datos se sometieron a análisis de varianza y comparaciones de medias (Tukey, 0.05). Para la rutina de análisis estadístico se usó el programa computacional SAS versión 9.00.

b) *H. monacanthus*

Se siguió la misma metodología para concentración de osmo-reguladores descrita anteriormente para la especie *H. undatus*.

### 5.3.2 Volumen de recipiente de cultivo

a) *H. undatus*

Los segmentos apicales utilizados en este experimento tenían similares características a las del experimento 5.3.1. Se establecieron cinco segmentos apicales en recipientes de cultivo con diferente volumen: Volumen 1 =  $145 \text{ cm}^3$  y Volumen 2 =  $175 \text{ cm}^3$  conteniendo el medio de cultivo que resultó más favorable al mínimo crecimiento en el experimento 5.3.1, siendo este experimento iniciado 90 días posteriores al experimento 5.3.1. Posteriormente, los cultivos fueron incubados por un periodo de 180 días en condiciones semi controladas de

temperatura promedio de  $24 \pm 4$  °C, fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad y  $25 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad luminosa. Se evaluó crecimiento, número de brotes, número de raíces adventicias, longitud de raíz y supervivencia de acuerdo a la coloración (Cuadro 2). El experimento se estableció de acuerdo a un diseño completamente al azar. La unidad experimental fue un segmento apical y se tuvieron 25 repeticiones por tratamiento. Los datos se sometieron a la prueba t-student para dos muestras independientes. Para la rutina de análisis estadístico se usó el programa computacional SAS versión 9.00.

b) *H. monacanthus*

Se siguió la misma metodología para volumen de recipiente de cultivo descrita anteriormente para la especie *H. undatus*.

### 5.3.3 Nivel de intensidad luminosa

Los segmentos apicales poseían similares características a los experimentos anteriores (5.3.1 y 5.3.2). Se establecieron segmentos apicales bajo dos niveles de intensidad luminosa I1 =  $5 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e I2 =  $25 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en recipientes de cultivo (volumen 1 =  $145 \text{ cm}^3$ ) conteniendo el medio de cultivo que resultó más favorable al porcentaje de supervivencia y mínimo crecimiento en el experimento 5.3.1, siendo este experimento iniciado 90 días posteriores al experimento 5.3.2. Posteriormente, los cultivos fueron incubados por un periodo de 180 días en condiciones semi controladas de temperatura promedio de  $24 \pm 4$  °C y fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad. Se evaluó crecimiento, número de brotes, número de raíces adventicias, longitud de raíz y supervivencia de acuerdo a la coloración (Cuadro 2). El experimento se estableció de acuerdo a un diseño completamente al azar. La unidad experimental fue un segmento apical y se tuvieron 25 repeticiones por tratamiento. Los datos se sometieron a la prueba t-student para dos muestras independientes. Para el análisis estadístico se usó el programa computacional SAS versión 9.00.

### 5.3.4 Refrescamiento

La etapa de refrescamiento se realizó en dos fases:

**Fase 1:** Se utilizaron 50 vitroplantas de *H. undatus* y *H. monacanthus* provenientes del experimento tres de conservación *in vitro*, se subcultivaron en medio de cultivo para promover crecimiento activo (medio basal de micropropagación) para paulatinamente sacar del estrés a

las vitroplantas. Los cultivos fueron incubados por 45 días en condiciones semi controladas de temperatura promedio de  $24 \pm 4$  °C, fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad y  $25 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad luminosa.

**Fase 2:** Las vitroplantas de *H. undatus* y *H. monacanthus* provenientes de la fase 1 de refrescamiento se subcultivaron en los medios de cultivo específico para cada especie en la etapa de multiplicación. Los cultivos se colocaron por 45 días bajo las mismas condiciones de cultivo descritas para la fase 1. Luego del periodo de desarrollo de los cultivos se evaluó, el número de brotes y el porcentaje de supervivencia.

La evaluación del mínimo crecimiento para los experimentos 3, 4 y 5 se hizo con los datos obtenidos cada 30 días hasta llegar a 180 días de cultivo. Se registraron datos de crecimiento (cm), número de brotes, número de raíces adventicias, longitud de la raíz (cm) y porcentaje de supervivencia en función a la coloración, relacionada con la deficiencia de nutrientes apoyada en la carta de colores de Munsell (Cuadro 2). Los datos expresados en porcentaje fueron transformados por arco seno raíz cuadrada.

**Cuadro 2** Coloración de los segmentos apicales según la carta de colores de Munsell (1998).

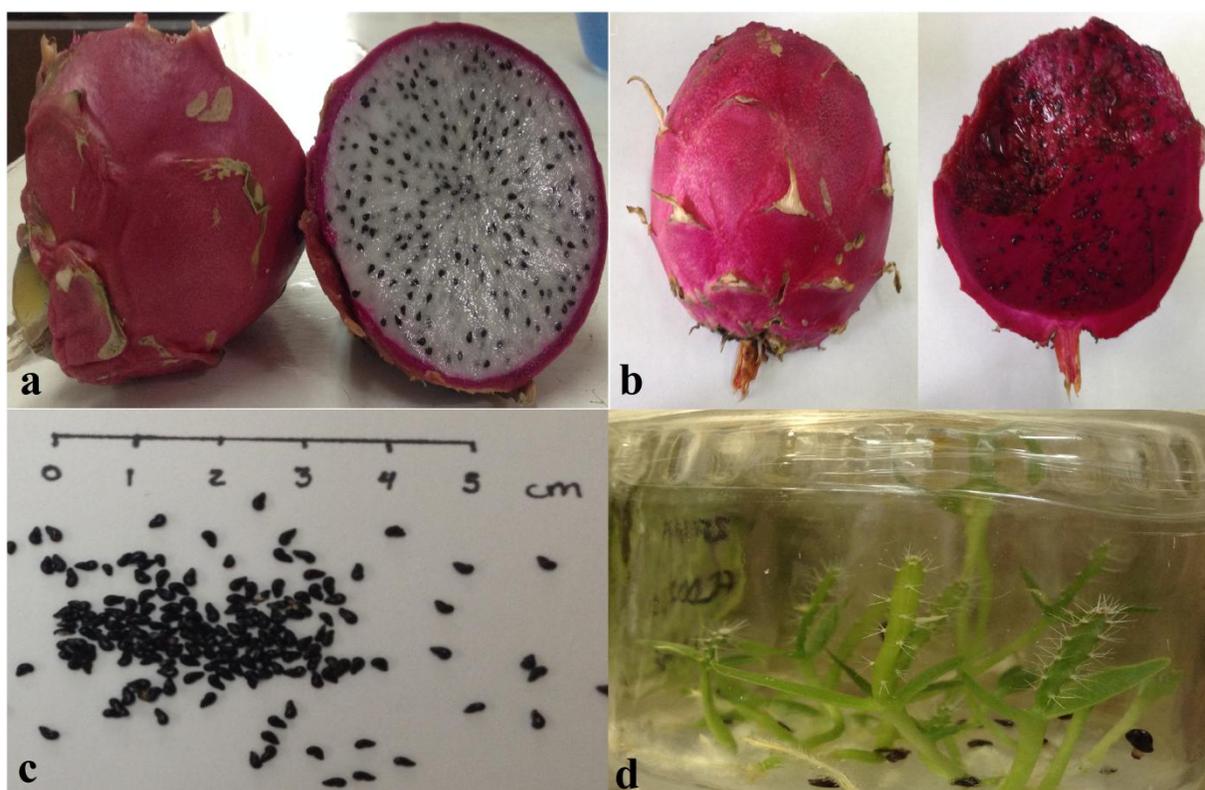
Código	Característica general	Estado de la planta	
5 GY 5/10	verde (Característico de la planta)		
5 GY 6/8	verde claro	viva	1
2 5 Y 6/8	Amarillo		
7 5 YR 4/4	Café		
10 R 3/2	Marrón	muerta (necrosis)	0

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Micropropagación

#### 6.1.1 Establecimiento de cultivos asépticos de semillas para su germinación *in vitro*

Con el proceso de desinfección de las semillas se obtuvo una asepsia de 90%. Del total de semillas de *H. undatus* y *H. monacanthus* que se establecieron en medio de cultivo, germinaron el 80 y 70% respectivamente. La germinación ocurrió entre 4 y 6 días después de la siembra. Estos resultados muestran la buena calidad de semillas seleccionadas de frutos fisiológicamente maduros (Figura 8a y 8b), según su clasificación morfológica (Figura 8c), y su rápida germinación (Figura 8d), posterior al tiempo de cosecha.



**Figura 8.** Diferentes etapas del cultivo *in vitro* de dos especies de pitahaya (*Hylocereus* spp.). Características de los frutos cosechados (a) *H. undatus* y (b) *H. monacanthus*; (c) semillas viables seleccionadas; (d) plántulas germinadas para emplear como fuente de explante.

### 6.1.2 Dosis de citocinina y auxina en el medio de cultivo para la multiplicación de brotes

Utilizando concentraciones diferentes de la citocinina BAP y la auxina AIA, se observaron efectos sobre el número de brotes, la altura de brotes, formación de raíces y peso fresco. La calidad de los brotes fue determinada de acuerdo a los porcentajes de hiperhidratación y formación de callo.

De acuerdo al análisis de varianza realizado en la especie *H. undatus* los niveles de BAP mostraron efectos diferentes significativos ( $P \leq 0.01$ ) en el número de brotes. Los niveles AIA tuvieron efectos diferentes significativos ( $P \leq 0.001$ ) en número de brotes y en altura de brotes ( $P \leq 0.05$ ). La interacción de los reguladores de crecimiento BAP y AIA mostraron efecto significativo ( $P \leq 0.05$ ) en peso fresco y en número y altura de brotes (Cuadro 3).

En la especie *H. monacanthus* los niveles de BAP y la interacción de los reguladores de crecimiento tuvieron efectos significativos ( $P \leq 0.001$ ) en peso fresco y el número de brotes, respectivamente. La interacción de los reguladores de crecimiento tuvo efectos significativos en número de brotes, altura de los brotes y en peso fresco ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 3 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

**Cuadro 3** Análisis de varianza realizado a las variables número de brotes, altura de los brotes y peso fresco evaluadas durante la etapa de multiplicación de las especies *H. undatus* y *H. monacanthus*.

Fuentes de variación	GL	Cuadrados medios y niveles de significancia					
		Número de brotes		Altura de los brotes		Peso fresco	
		<i>H. u</i>	<i>H. m</i>	<i>H. u</i>	<i>H. m</i>	<i>H. u</i>	<i>H. m</i>
BAP	2	0.0009**	0.17 <sup>ns</sup>	0.21 <sup>ns</sup>	0.17 <sup>ns</sup>	0.65 <sup>ns</sup>	1.41 <sup>ns</sup>
AIA	1	0.0046**	0.70 <sup>ns</sup>	0.015*	0.1008 <sup>ns</sup>	1.56 <sup>ns</sup>	1.03 <sup>ns</sup>
BAP*AIA	5	0.0091**	0.0089**	0.0047**	0.0009**	0.02*	0.0015**
Error	35	0.07	0.083	0.06	0.05	0.96	0.21
Total	43						

BAP=Bencilaminopurina; AIA=Ácido indolacético; GL= grados de libertad; *H. u*= *Hylocereus undatus*; *H. m*= *Hylocereus monacanthus* \*= valor de F significativo ( $P \leq 0.05$ ); \*\*= valor de F altamente significativo ( $P \leq 0.01$ ); ns= valor de F no significativo ( $P > 0.05$ ).

Los segmentos de tallo de *H. undatus* establecidos en el medio de cultivo con 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP desarrollaron en promedio 5.3 brotes, cantidad mayor y significativamente diferente (Tukey, 0.05) a los 3.8 y 3.9 brotes que desarrollaron en los segmentos de tallo establecidos en los medios de cultivo con 1 y 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Las alturas de los brotes en los diversos medios estuvo en el intervalo de 5.8 a 6.5 mm, magnitudes que estadísticamente (Tukey, 0.05) no son diferentes entre sí. Los segmentos de tallo de *H. monacanthus* establecidos en los medios con las diversas concentraciones de BAP desarrollaron de 12.8 a 14.1 brotes, y que tuvieron tamaños de 19 a 21.8 mm, magnitudes que estadísticamente (Tuckey, 0.05) no son diferentes entre sí (Cuadro 4).

**Cuadro 4** Multiplicación clonal de dos especies de pitahaya en la respuesta individual al efecto principal de la auxina o la citocinina.

Regulador de crecimiento	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	Número de brotes		Altura de los brotes (mm)	
		<i>H. undatus</i>	<i>H. monacanthus</i>	<i>H. undatus</i>	<i>H. monacanthus</i>
BAP	1	3.9 ± 2.7 b*	14.1 ± 9.7 a	5.8 ± 5.7 a	21.8 ± 13.3 a
	2	5.3 ± 3.7 a	12.8 ± 6.2 a	6.5 ± 4.6 a	19.1 ± 8.4 a
	4	3.8 ± 2.7 b	14.1 ± 8.1 a	6.2 ± 3.5 a	19.0 ± 8.7 a
AIA	0	3.3 ± 2.2 b	14.9 ± 9.6 a	4.5 ± 2.7 b	19.7 ± 10.4 a
	0.5	5.4 ± 3.6 a	12.5 ± 6.1 b	7.8 ± 5.5 a	20.2 ± 10.4 a

\*Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey; P<0.05), entre concentraciones de reguladores de crecimiento. La media se acompaña de la desviación estándar.

Se observó que en los niveles de BAP el número de brotes de *H. undatus* fué mayor en la concentración de 2 mg·L<sup>-1</sup>. La mayor cantidad de brotes/explante se obtuvo con una concentración de 2/0.5 mg·L<sup>-1</sup> de BAP/AIA (Cuadro 5). La interacción de auxinas y citocininas potenció el número de areolas activas que desarrollaron en un nuevo brote. La BAP en concentración superior a 2 mg·L<sup>-1</sup> tuvo un efecto inhibitor en el número de nuevos brotes.

La altura de los brotes de *H. undatus* estuvo relacionada con el incremento en las concentraciones de BAP, y brotes de mayor longitud se obtuvieron en los medios de cultivo con la auxina AIA en concentración de 0.5 mg·L<sup>-1</sup> (Cuadro 5). Para la etapa de multiplicación

de brotes de *H undatus*, los segmentos de tallo establecidos en el medio de cultivo con 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIA, y los segmentos de tallo establecidos en medios de cultivo sin reguladores de crecimiento desarrollaron en promedio 6.9 y 1.0 brotes de 8.7 y 2.4 mm de altura, así como 0.403 y 0.016 g de peso fresco, que en cada caso fueron magnitudes significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

**Cuadro 5** Efecto combinado de los reguladores de crecimiento en la multiplicación *in vitro* de la especie *H. undatus*.

Tratamientos	Regulador de crecimiento (mg L <sup>-1</sup> )		Número de brotes	Altura de brotes (mm)	Peso fresco (g)
	BA	AIA			
Control	0	0	1.0 ± 0.89 c*	2.4 ± 1.6 c	0.0160 ± 0.12 d
T1	1	0	2.7 ± 1.7 b	3.4 ± 3.3 bc	0.0779 ± 0.19 c
T2	2	0	3.7 ± 2.7 ab	4.4 ± 1.0 b	0.0751 ± 0.4 c
T3	4	0	3.5 ± 2.1 b	5.7 ± 2.9 b	0.1429 ± 0.2 b
T4	1	0.5	5.1 ± 3.1 ab	8.2 ± 6.5 a	0.3114 ± 1.8 a
T5	2	0.5	6.9 ± 4.0 a	8.7 ± 5.8 a	0.4039 ± 0.1 a
T6	4	0.5	4.2 ± 3.2 ab	6.7 ± 4.1 ab	0.3723 ± 0.5 a

\*Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey; P < 0.05). La media se acompaña de la desviación estándar.

En la especie *H. monacanthus* el efecto de los niveles de BAP reflejados en el número de brotes/explante fue en decremento al aumentar la concentración, se obtuvo el máximo número de brotes/explante con una concentración de 1 mg·L<sup>-1</sup> de BAP. Al adicionar AIA al medio la respuesta del número de brotes/explante fue completamente diferente, el número de brotes obtenidos fue mayor al aumentar las concentraciones de BAP, pero no superior al número de brotes/explante obtenidos solo con BAP (Cuadro 6).

En comparación a los segmentos de tallo que se establecieron en medios de cultivo sin reguladores de crecimiento (RC), la adición de citocininas y auxinas en el medio estimuló que en los segmentos de tallo brotase mayor cantidad de yemas, que lograran tamaño y peso fresco mayor. De tal manera que en los segmentos establecidos en medio de cultivo sin RC y los establecidos en el medio de cultivo con 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP desarrollaron 1.16 y 19.8 brotes, de

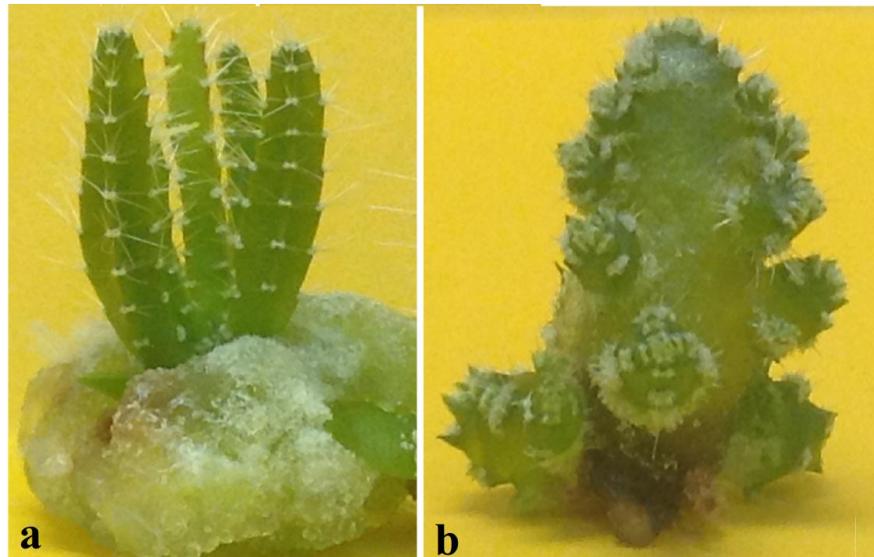
8.6 y 24.2 mm de altura y 0.713 y 3.04 g de peso fresco, magnitudes que en cada caso fueron significativamente diferentes (Tukey, 0.05) (Cuadro 6).

**Cuadro 6** Efecto combinado de los reguladores de crecimiento en la multiplicación *in vitro* de la especie *H. monacanthus*

Tratamiento	Regulador de crecimiento (mg L <sup>-1</sup> )		Número de brotes	Altura de brotes (mm)	Peso fresco (g)
	BA	AIA			
Control	0	0	1.1 ± 0.92 c*	8.6 ± 3.2 c	0.713 ± 0.2 e
T1	1	0	19.8 ± 10.5 a	24.2 ± 13.2 a	3.040 ± 2.2 bc
T2	2	0	12.0 ± 7.3 ab	17.6 ± 7.9 b	3.738 ± 3.4 ab
T3	4	0	12.9 ± 9.4 ab	17.3 ± 8.5 b	3.838 ± 2.7 ab
T4	1	0.5	8.5 ± 4.1 b	19.4 ± 13.4 b	1.268 ± 1.5 d
T5	2	0.5	13.6 ± 5.2 ab	20.6 ± 9.0 ab	2.074 ± 1.8 cd
T6	4	0.5	15.4 ± 6.7 ab	20.8 ± 8.9 ab	4.547 ± 4.5 a

\*Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey; P < 0.05). La media se acompaña de la desviación estándar.

Los brotes de la especie *H. monacanthus*, fueron más susceptibles a presentar hiperhidratación y formación de tejido calloso (Figura 9a y 9b), lo cual se reflejó en el peso fresco de los explantes. Sólo en los tratamientos en los explantes sometidos a los tratamientos T4 y T5 hubo formación de raíces. En *H. undatus* los tratamientos T3 y T6 que contenían la mayor concentración de BAP (4 mg·L<sup>-1</sup>) se inhibió la formación de raíces, en los explantes sometidos a los tratamientos restantes la formación de raíces fue menor al 70%.



**Figura 9.** (a) Formación de callo en la base del explante; (b) vitrificación en brotes de *H. monacanthus*.

### 6.1.3 Enraizado y elongación de brotes

En la etapa de enraizamiento en todos los tratamientos probados para la especie *H. monacanthus*, ya sea con y sin la auxina AIB. Se observó la formación y el desarrollo de las raíces, sin encontrarse diferencias significativas en las tres variables evaluadas (longitud de brote, número y longitud de raíces). Siendo los brotes establecidos en el medio de cultivo con 50% de las sales MS y  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIB el que mostró mayor longitud de las raíces (4.5 cm) para *H. monacanthus* (Cuadro 7). En la especie *H. undatus* solamente se encontró diferencia significativa para la longitud de las raíces. En la variable longitud de raíces para la especie *H. undatus* se obtuvo que la máxima longitud de raíz (6.10 cm) la tuvieron los brotes que se establecieron en el T6 con 100% de las sales MS y suplementado con  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIB (Cuadro 7).

**Cuadro 7** Efecto combinado del regulador de crecimiento ácido indolbutírico (AIB) y diferentes concentraciones de las sales MS en la longitud de las raíces de las vitroplantas de las especies de pitahaya *H. undatus* y *H. monacanthus*.

Tratamiento	Concentración		Longitud de las raíces (cm)	
	Sales MS (%)	AIB ( $\text{mg L}^{-1}$ )	<i>H. undatus</i>	<i>H. monacanthus</i>
T1	50	0	3.9 ab*	2.5 ab
T2	50	0.1	4.4 ab	4.5 a
T3	75	0	4.0 ab	3.5 ab

T4	75	0.1	3.7 ab	2.1 b
T5	100	0	3.1 b	2.9 ab
T6	100	0.1	6.1 a	3.6 ab

\*Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey;  $P < 0.05$ ).

#### 6.1.4 Aclimatación de las plantas de pitahaya obtenidas *in vitro*

Del material vegetal que se obtuvo en la etapa de multiplicación, se destinaron 60 vitroplantas de *H. undatus* y *H. monacanthus* respectivamente para su aclimatación, se transfirieron a macetas con sustrato y establecieron en condiciones de invernadero. Durante las cuatro semanas de aclimatación en invernadero en varias plantas ocurrió la pudrición en la base del tallo, debido a la retención del agua de riego por mal drenaje en el sustrato, por lo que la supervivencia de plantas fue 97.2% en *H. undatus* y 95.6% en *H. monacanthus* (Figura 10).

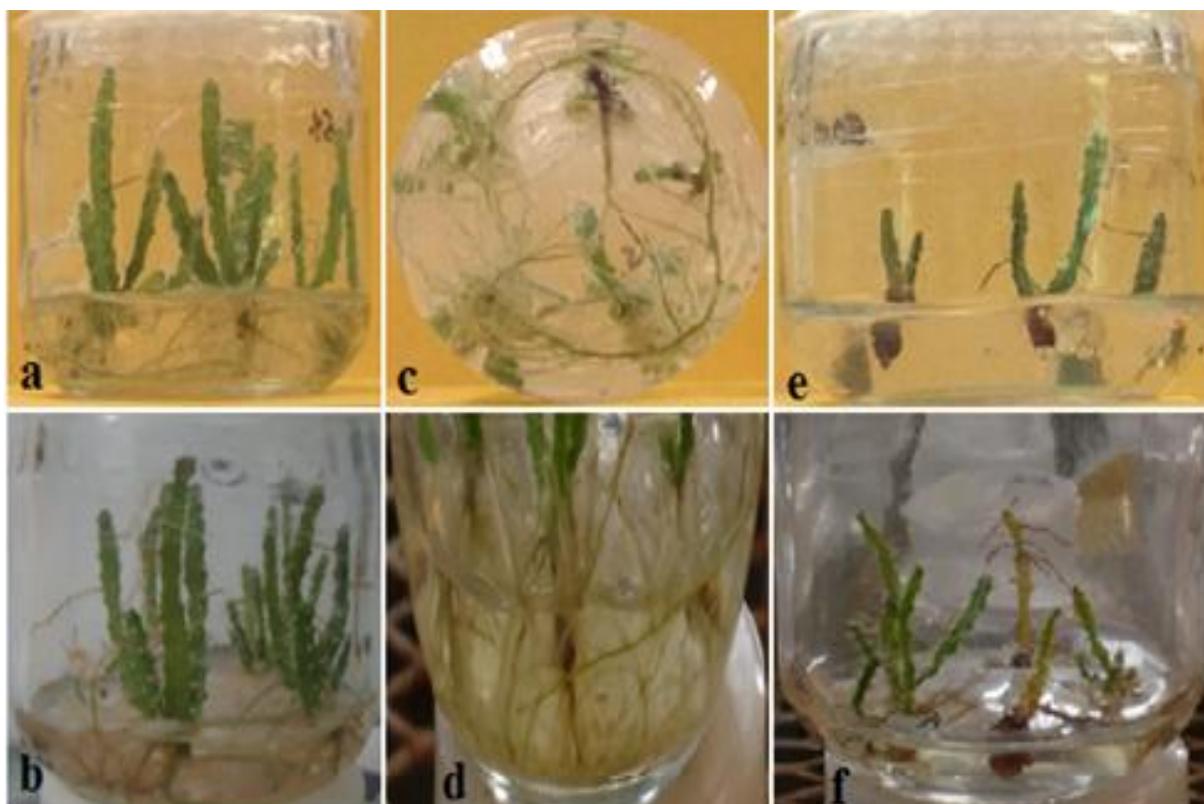


**Figura 10.** Vitroplantas a los 30 días de aclimatación de (a) *H. undatus* y de (b) *H. monacanthus*.

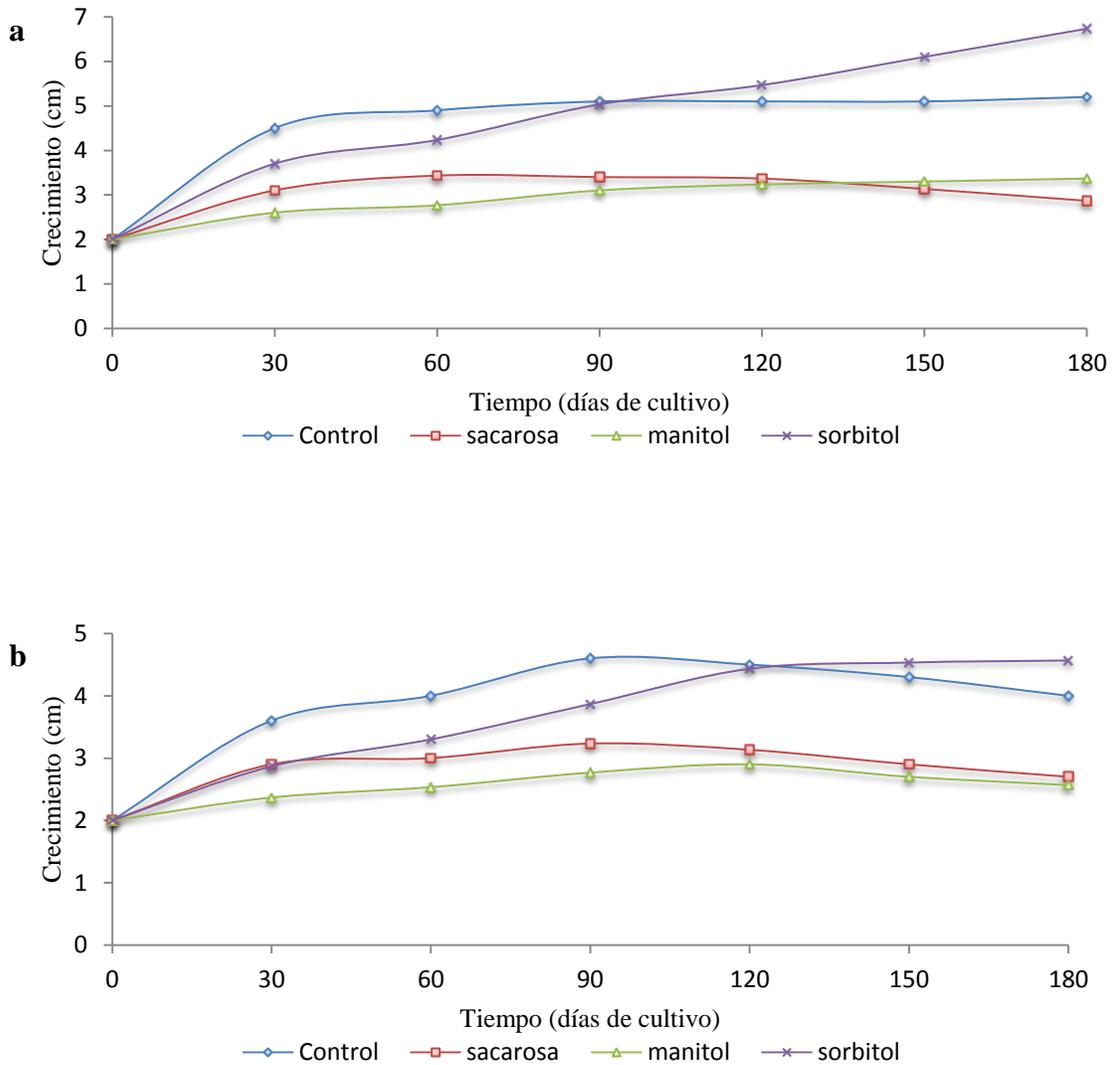
## 6.2 Conservación *in vitro*

### 6.2.1 Concentración de osmo-reguladores

La efectividad de los osmo-reguladores en la limitación del crecimiento de segmentos apicales de pitahaya (*H. undatus* y *H. monacanthus*) se evaluó principalmente a través del crecimiento (altura del segmento de ápice) cada 30 días y la formación de brotes, raíces y el porcentaje de supervivencia al finalizar los 180 días de cultivo (Figura 11). La limitación del crecimiento ocurrió en los tratamientos con sacarosa y manitol, no así en sorbitol ya que a partir del día 90 de cultivo en *H. undatus* (Figura 12a) y treinta días después en *H. monacanthus* (Figura 12b) el crecimiento fue superior al control.



**Figura 11.** Segmentos apicales de pitahaya en cultivo *in vitro* por mínimo crecimiento durante 180 días de cultivo (a) formación de brotes en manitol (c) formación de raíces en sacarosa (e) oxidación (coloración café) en la base de los segmentos apicales de *H. undatus*. (b) formación de brotes en manitol (d) formación de raíces en sacarosa (f) coloración amarilla de brotes de *H. monacanthus*.



**Figura 12.** Crecimiento de brotes a partir de segmentos apicales durante 180 días de cultivo en mínimo crecimiento (a) *H. undatus* (b) *H. monacanthus*.

En *H. undatus* el crecimiento fue menor en sacarosa y manitol comparado con el tratamiento control, estadísticamente existieron diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) entre los medios de cultivo con diferentes concentraciones de osmo-reguladores a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días de cultivo (Cuadro 8), sin embargo la influencia de 12 y 9% de sacarosa, seguido de 1.5% de manitol favoreció menor crecimiento a los 180 días de cultivo en los segmentos apicales con una media de 2, 2.7 y 2.9 cm respectivamente (Cuadro 9).

**Cuadro 8** Resumen de análisis de varianza de osmo-reguladores en el crecimiento de *H. undatus* en conservación *in vitro*

FV	Gl	Cuadrados medios y significancia					
		días de cultivo					
		30	60	90	120	150	180
Osmo-reguladores	9	<b>10.71</b> <sup>***</sup>	<b>14.4</b> <sup>***</sup>	<b>21.9</b> <sup>***</sup>	<b>29.8</b> <sup>***</sup>	<b>47.4</b> <sup>***</sup>	<b>72.4</b> <sup>***</sup>
Error	200						
Total	209						

Valores en negritas y asteriscos indican diferencias significativas \* P<0.05, \*\* P <0.01, \*\*\* P<0.001

**Cuadro 9** Efecto de agentes osmóticos en el crecimiento de *H. undatus*.

Tratamiento	días de cultivo					
	30	60	90	120	150	180
Control	4.5 ± 1.3 a	4.9 ± 1.5 a	5.1 ± 1.5 a	5.1 ± 1.7 ab	5.1 ± 1.5 abc	5.2 ± 2.3 abc
<b>Sacarosa (%)</b>						
6	3.8 ± 1.3 ab	4.2 ± 1.5 abc	4.3 ± 1.5 ab	4.3 ± 1.9 bc	4.1 ± 2.0 bcd	3.9 ± 2.4 bcd
9	2.9 ± 1.0 bcde	3.2 ± 0.8 bcde	3.1 ± 0.9 b	3.1 ± 0.8 c	2.9 ± 0.9 d	2.7 ± 1.0 d
12	2.6 ± 0.4 de	2.9 ± 0.7 ed	2.8 ± 0.8 b	2.7 ± 0.7 c	2.4 ± 0.6 d	2.0 ± 0.6 d
<b>Manitol (%)</b>						
0.5	2.8 ± 0.9 cde	2.9 ± 1.2 cde	3.2 ± 1.5 b	2.9 ± 1.5 c	3.3 ± 2.0 cd	3.7 ± 2.7 bcd
1.0	2.7 ± 0.9 ed	2.9 ± 1.1 ed	3.2 ± 1.6 b	3.8 ± 1.9 bc	3.7 ± 1.6 bcd	3.5 ± 1.9 bcd
1.5	2.3 ± 0.5 e	2.5 ± 0.6 e	2.9 ± 0.9 b	3.0 ± 0.9 c	2.9 ± 0.8 d	2.9 ± 0.9 cd
<b>Sorbitol (%)</b>						
0.5	3.6 ± 1.3 abcd	4.2 ± 1.6 abc	4.8 ± 2.1 a	5.3 ± 1.9 ab	6.3 ± 2.3 a	7.2 ± 2.7 a
1.0	3.9 ± 1.1 ab	4.4 ± 1.4 ab	5.4 ± 1.8 a	6.1 ± 2.5 a	6.6 ± 2.7 a	7.2 ± 3.5 a
1.5	3.6 ± 1.5 abcd	4.1 ± 1.9 abcd	4.9 ± 2.0 a	5.4 ± 2.2 ab	5.4 ± 2.5 ab	5.8 ± 3.3 ab

\*Diferentes letras de la misma columna indican diferencias significativas (Tukey; P<0.05). La media se acompaña de la desviación estándar.

En *H. monacanthus* los brotes mostraron crecimiento menor en medios de cultivo con manitol y sacarosa, comparado con el control hubo diferencias estadísticas significativas (P<0.01) a los 30, 60 y 90 días de cultivo y a los 120, 150 y 180 días de cultivo (P<0.001) en

los medios de cultivo con diferentes concentraciones de osmo-reguladores (Cuadro 10), sin embargo la influencia de 1.5 y 1% de manitol y 12 % de sacarosa favoreció un menor crecimiento a los 180 días de cultivo en los segmentos apicales con una media de 2, 2.1 y 2.1 cm respectivamente (Cuadro 11).

**Cuadro 10** Resumen de análisis de varianza de osmo-reguladores en el crecimiento de *H. monacanthus* en conservación *in vitro*

FV	Gl	Cuadrados medios y significancia					
		días de cultivo					
		30	60	90	120	150	180
T	9	<b>2.37**</b>	<b>3.82**</b>	<b>6.81**</b>	<b>11.1***</b>	<b>14.8***</b>	<b>19.8***</b>
Error	130						
Total	139						

Valores en negritas y asteriscos indican diferencias significativas \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001

**Cuadro 11** Efecto de agentes osmóticos en el crecimiento de *H. monacanthus* para su conservación en mínimo crecimiento.

Tratamiento	Días de cultivo					
	30	60	90	120	150	180
Control	3.6 ± 12.0 a	4.0 ± 2.2 a	4.6 ± 2.4 a	4.5 ± 2.3 ab	4.3 ± 2.0 abc	4.0 ± 1.8 abc
<b>Sacarosa (%)</b>						
6	3.0 ± 1.0 ab	3.2 ± 1.0 ab	3.3 ± 1.1 ab	3.5 ± 1.3 ab	3.5 ± 1.2 abc	3.4 ± 1.1 abc
9	2.8 ± 0.8 ab	2.8 ± 0.8 ab	3.2 ± 0.9 ab	2.9 ± 1.0 ab	2.7 ± 1.2 abc	2.6 ± 1.4 bc
12	2.9 ± 0.4 ab	3.0 ± 0.5 ab	3.2 ± 0.8 ab	3.0 ± 0.6 ab	2.5 ± 0.6 bc	2.1 ± 0.6 bc
<b>Manitol (%)</b>						
0.5	2.7 ± 1.0 ab	2.9 ± 1.2 ab	3.3 ± 1.9 ab	3.6 ± 2.5 ab	3.6 ± 2.6 abc	3.6 ± 2.9 abc
1.0	2.3 ± 0.3 b	2.5 ± 0.4 b	2.7 ± 0.7 ab	2.8 ± 0.8 ab	2.4 ± 0.7 bc	2.1 ± 0.6 bc
1.5	2.1 ± 0.1 b	2.2 ± 0.2 b	2.3 ± 0.2 b	2.3 ± 0.3 b	2.1 ± 0.3 c	2.0 ± 0.5 c
<b>Sorbitol (%)</b>						
0.5	2.9 ± 0.9 ab	3.0 ± 1.0 ab	3.4 ± 1.5 ab	3.7 ± 1.9 ab	3.6 ± 2.4 abc	3.4 ± 3.0 abc
1.0	2.9 ± 0.9 ab	3.6 ± 1.3 ab	4.3 ± 1.8 a	4.8 ± 2.2 a	4.9 ± 2.4 ab	4.9 ± 2.6 ab
1.5	2.8 ± 0.9 ab	3.3 ± 1.4 ab	3.9 ± 1.9 ab	4.8 ± 3.0 a	5.1 ± 3.7 a	5.4 ± 4.5 a

Diferentes letras de la misma columna indican diferencias significativas (Tukey; P<0.05). La media se acompaña de la desviación estándar.

En *H. undatus* a los 180 días de cultivo la reducción en la formación de brotes no fue significativo (P>0.05) (Cuadro 12) en los tratamientos con 0.5% de manitol y sorbitol se

observó la menor cantidad de brotes (Cuadro 13). En el número de raíces adventicias el efecto fue significativo ( $P < 0.001$ ) (Cuadro 12) tal que los brotes establecidos en medios de cultivo con 0.5% de sorbitol y 1 % de manitol formaron la menor cantidad de raíces adventicias en comparación al control (Cuadro 13). En la longitud de la raíz primaria el efecto no fue significativo ( $P > 0.05$ ) (Cuadro 12) sin embargo en los brotes establecidos en medio de cultivo con 1.5 % de sorbitol la longitud menor fue de 2 cm (Cuadro 13). El efecto en la supervivencia de los ápices no fue significativa ( $P > 0.05$ ) (Cuadro 12), no obstante se observó que al aumentar la concentración de sacarosa y manitol, la supervivencia disminuyó, se registró el menor porcentaje de supervivencia en 12% de sacarosa y el mayor en 1% de sorbitol (Cuadro 13) La supervivencia se registró en función del estado de los segmentos apicales de acuerdo a la coloración que los tejidos presentaron (Figura 13). Los datos anteriores muestran que los segmentos apicales de *H. undatus* se conservan por 180 días con un mínimo crecimiento, alta supervivencia y poco desarrollo de brotes y raíces en medio básico MS suplementado con 1 % de manitol.

**Cuadro 12** Resumen de análisis de varianza de osmo-reguladores en variables de desarrollo y supervivencia de *H. undatus* en conservación *in vitro* transcurridos 180 días de cultivo.

FV	Gl	Cuadrados medios y significancia			
		Número de brotes	Número de raíces adventicias	Longitud de raíz	Supervivencia
T	9	3.1	<b>114.3***</b>	4.3	1.4
Error	170				
Total	179				

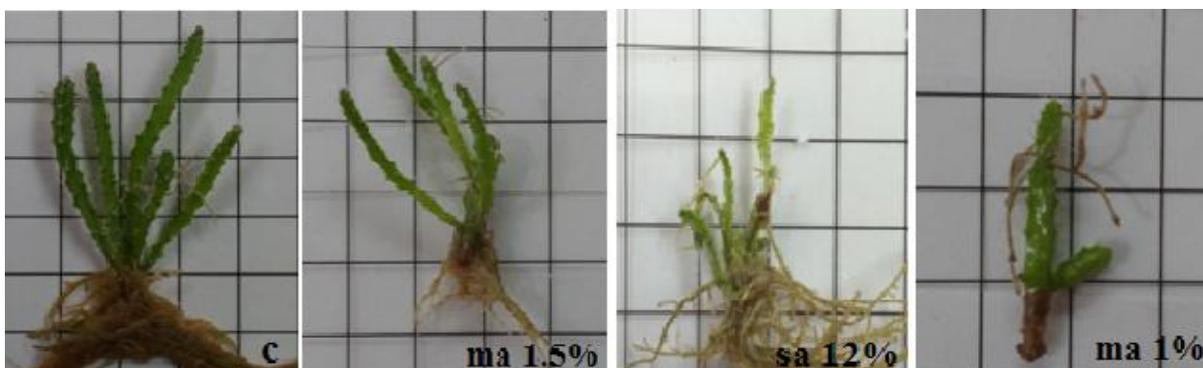
Valores en negritas y asteriscos indican diferencias significativas \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

**Cuadro 13** Efecto de osmo-reguladores en el desarrollo de *H. undatus* para su conservación en mínimo crecimiento.

Tratamientos	Número de brotes	Número de raíces adventicias	Longitud de raíz (cm)	Supervivencia (%)
Control	4.0 ± 1.6 a	12.4 ± 7.0 a	2.3 ± 1.6 ab	97 a
<b>Sacarosa (%)</b>				
6	3.3 ± 1.9 a	12.5 ± 6.2 a	3.7 ± 2.0 a	90 a
9	3.1 ± 2.0 a	8.3 ± 2.9 ab	3.0 ± 1.2 ab	75 a
12	3.5 ± 1.2 a	7.5 ± 2.8 ab	2.6 ± 0.8 ab	55 a
<b>Manitol (%)</b>				

0.5	2.8 ± 1.9 a	6.4 ± 4.5 b	2.9 ± 2.1 ab	85 a
1.0	3.4 ± 2.3 a	6.1 ± 3.9 b	3.0 ± 1.7 ab	80 a
1.5	4.0 ± 3.1 a	7.0 ± 3.9 b	2.2 ± 1.2 ab	70 a
<b>Sorbitol (%)</b>				
0.5	2.8 ± 1.1 a	5.3 ± 1.9 b	2.8 ± 1.4 ab	75 a
1.0	3.6 ± 1.7 a	10.1 ± 7.6 ab	2.9 ± 1.4 ab	97 a
1.5	3.7 ± 1.7 a	8.9 ± 3.9 ab	2.0 ± 1.0 b	85 a

La media se acompaña de la desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey, P<0.05).



**Figura 13** Coloración que presentaron los segmentos apicales de *H. undatus* considerados vivos y con posibilidades de recuperación. C=control; ma= manitol; sa=sacarosa. La cuadrícula es de 1cm.

En *H. monacanthus* a los 180 días de cultivo el efecto de los osmo-reguladores fue significativo (P<0.001) (Cuadro 14) en la reducción en la formación de brotes, el número de raíces adventicias y la longitud de la raíz primaria en comparación con el control la menor cantidad brotes se observó en el medio con 0.5 y 1.5 % de manitol, de raíces adventicias en 1% de sorbitol y de la longitud de la raíz primaria en 1.5 % de manitol (Cuadro 15). El efecto en el porcentaje de supervivencia no fue significativo (P<0.05) (Cuadro 14), se registró el menor porcentaje de supervivencia en 12 % de sacarosa y el mayor en 1 % de manitol (Cuadro 15). Al igual que en *H.undatus* la supervivencia se registró en función del estado de los segmentos apicales de acuerdo a la coloración que los tejidos presentaron (Figura 14). Los datos anteriores muestran que los segmentos apicales de *H. monacanthus* se conservan por 180 días con un mínimo crecimiento, alta supervivencia y poco desarrollo de brotes y raíces en medio básico suplementado con 1 % de manitol.

**Cuadro 14** Resumen de análisis de varianza de osmo-reguladores en variables de desarrollo y supervivencia de *H. undatus* en conservación *in vitro* transcurridos 180 días de cultivo.

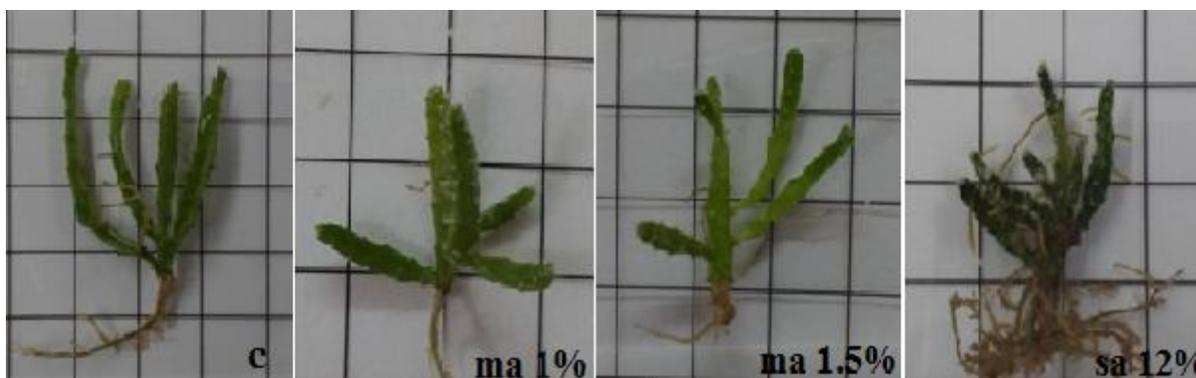
FV	Gl	Cuadrados medios y significancia			
		Número de brotes	Número de raíces adventicias	Longitud de raíz	Supervivencia
T	9	<b>29.5<sup>***</sup></b>	<b>308.4<sup>***</sup></b>	<b>9.8<sup>***</sup></b>	<b>0.2<sup>*</sup></b>
Error	170				
Total	179				

Valores en negritas y asteriscos indican diferencias significativas \* P<0.05, \*\* P <0.01, \*\*\* P<0.001

**Cuadro 15** Efecto de osmo-reguladores en el desarrollo de *H. monacanthus* para su conservación en mínimo crecimiento.

Tratamientos	Número de brotes	Número de raíces adventicias	Longitud de raíz (cm)	Supervivencia (%)
Control	6.6 ± 4.2 a	17.7 ± 14.3 ab	4.3 ± 1.6 a	72 ab
<b>Sacarosa (%)</b>				
6	4.8 ± 2.6 ab	18.1 ± 14.9 a	1.9 ± 2.0 bc	70 ab
9	3.6 ± 2.3 b	10.8 ± 7.2 abc	2.2 ± 1.2 bc	57 ab
12	3.5 ± 2.1 b	6.5 ± 4.8 c	1.5 ± 0.8 bc	37 ab
<b>Manitol (%)</b>				
0.5	1.9 ± 1.4 b	7.0 ± 4.9 c	2.0 ± 2.1 bc	90 a
1.0	4.7 ± 2.4 ab	6.5 ± 4.2 c	2.6 ± 1.7 abc	95 a
1.5	2.0 ± 1.4 b	5.6 ± 4.5 c	1.0 ± 1.2 c	57 ab
<b>Sorbitol (%)</b>				
0.5	2.7 ± 1.3 b	5.7 ± 3.8 c	2.2 ± 1.4 bc	67 ab
1.0	2.5 ± 1.1 b	3.8 ± 2.6 c	3.1 ± 1.4 ab	80 ab
1.5	1.9 ± 1.4 b	7.0 ± 7.9 bc	2.0 ± 1.0 bc	82 ab

La media se acompaña de la desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey; P<0.05).



**Figura 14** Coloración que presentaron los segmentos apicales de *H. monacanthus* considerados vivos y con posibilidades de recuperación. C=control; ma= manitol; sa=sacarosa. La cuadrícula es de 1cm.

### 6.2.2 Volumen de recipiente de cultivo

Al comparar el crecimiento y supervivencia de los segmentos apicales de *H. undatus* en recipientes de cultivo de diferente volumen establecidos en medio básico MS suplementado con 0.5 % de manitol se observaron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), siendo de 2.1 cm el menor crecimiento de los brotes que se establecieron en el recipiente de 175 cm<sup>3</sup> y 92% el mayor porcentaje de supervivencia en el recipiente de 145 cm<sup>3</sup>. Para las variables de número de brotes, número de raíces adventicias y longitud de raíces, no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ), sin embargo los segmentos apicales establecidos en el recipiente de 145 cm<sup>3</sup> el desarrollaron menos brotes y raíces adventicias, no así en la longitud de la raíz (Cuadro 16). Los datos anteriores muestran que los segmentos apicales de *H. monacanthus* se conservan por 180 días con un mínimo crecimiento, alta supervivencia y poco desarrollo de brotes y raíces en recipientes de cultivo de 145 cm<sup>3</sup>.

**Cuadro 16.** Efecto del volumen de recipiente de cultivo en segmentos apicales de *H. undatus* para su conservación en mínimo crecimiento.

Volumen de recipiente de cultivo (cm <sup>3</sup> )	Crecimiento (cm)	Numero de brotes	Numero de raíces adventicias	Longitud de raíz (cm)	Supervivencia (%)
	***	*	*	*	***
145	<b>4.5</b>	3.8	7.1	2.8	<b>92</b>
175	2.1	4.8	8.2	2.7	66

Valores en negritas y asteriscos indican diferencias significativas \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  (t student)

Respecto al crecimiento de los segmentos apicales de *H. monacanthus* establecidos en medio MS suplementado con 0.5 % de manitol se observaron diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) siendo de 2.5 cm el menor crecimiento en el recipiente de 175 cm<sup>3</sup>, para las variables número de brotes, número de raíces adventicias, longitud de raíz y porcentaje de supervivencia no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). Los valores más bajos se encontraron en el recipiente de 175 cm<sup>3</sup> (Cuadro 17). Los datos anteriores muestran que los segmentos apicales de *H. monacanthus* se conservan por 180 días con un mínimo crecimiento, alta supervivencia y poco desarrollo de brotes y raíces en recipientes de cultivo de 145 cm<sup>3</sup>.

**Cuadro 17.** Efecto del volumen de recipiente de cultivo en segmentos apicales de *H. monacanthus* para su conservación en mínimo crecimiento.

Volumen de recipiente de cultivo (cm <sup>3</sup> )	Crecimiento (cm) ***	Numero de brotes *	Numero de raíces adventicias *	Longitud de raíz (cm) *	Supervivencia (%) *
145	<b>4.3</b>	4.2	10.6	2.6	86
175	2.5	3.9	7.4	2.5	76

Valores en negritas y asteriscos indican diferencias significativas \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  (t student)

### 6.2.3 Nivel de intensidad luminosa

Al comparar el crecimiento y el numero de brotes de los segmentos apicales de *H. undatus* establecidos en medio básico MS suplementado con manitol y en recipientes de cultivo de 145 cm<sup>3</sup> e incubados a diferente intensidad luminosa se observaron diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) siendo que los nuevos brotes alcanzaron 2.8 cm que fue el menor crecimiento y desarrollaron 1.5 brotes, cuando los segmentos apicales se incubaron a una intensidad luminosa de 5  $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ . No se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en número de raíces adventicias, longitud de raíz y el porcentaje de supervivencia (Cuadro 18) Los datos anteriores muestran que los segmentos apicales de *H. undatus* se conservan por 180 días con un mínimo crecimiento, alta supervivencia y poco desarrollo de brotes y raíces incubados bajo un nivel de iluminación de 5  $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ .

**Cuadro 18** Efecto del nivel de iluminación en segmentos apicales de *H. undatus* para su conservación en mínimo crecimiento.

Intensidad luminosa ( $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ )	Crecimiento (cm)	Numero de brotes	Numero de raíces adventicias	Longitud de raíz (cm)	Supervivencia (%)
	***	***	*	*	*
5	2.8	1.5	4.7	2.1	97
25	<b>3.3</b>	<b>2.0</b>	5.2	2.3	100

Valores en negritas y asteriscos indican diferencias significativas \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  (t student)

Respecto al crecimiento de los segmentos apicales de *H. monacanthus* establecidos en medio básico MS suplementado con manitol y en recipientes de cultivo de  $175 \text{ cm}^3$  e incubados a diferente intensidad luminosa se observaron diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) siendo de 2.3 cm el menor crecimiento. No se encontraron efectos significativos ( $P < 0.05$ ) en número de brotes, número de raíces adventicias, longitud de raíz y el porcentaje de supervivencia (Cuadro 19). Los datos anteriores muestran que los segmentos apicales de *H. undatus* se conservan por 180 días con un mínimo crecimiento, alta supervivencia y poco desarrollo de brotes y raíces incubados bajo un nivel de iluminación de  $25 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ .

**Cuadro 19** Efecto del nivel de iluminación en segmentos apicales de *H. monacanthus* para su conservación en mínimo crecimiento.

Intensidad luminosa ( $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ )	Crecimiento (cm)	Numero de brotes	Numero de raíces adventicias	Longitud de raíz (cm)	Supervivencia (%)
	***	*	*	*	*
5	<b>2.9</b>	1.7	4.5	3.2	97
25	2.3	1.7	4.7	3.0	100

Valores en negritas y asteriscos indican diferencias significativas \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  (t student)

## 6.2.4 Refrescamiento

### Etapa I

En esta etapa se observó que los segmentos apicales que desarrollaron nuevos brotes y raíces ahora se pueden considerar vitroplantas. Las vitroplantas de *H. undatus* y *H. monacanthus* provenientes del experimento 5 de conservación y establecidas en medio de cultivo MS libre de RC mejoraron su apariencia al recuperar la turgencia y coloración verde en los brotes. En 25% del total de las vitroplantas se presentó contaminación que fue parte del efecto del tiempo de conservación y las condiciones de asepsia del laboratorio que no son las idóneas.

## Etapa II

Se observó que las vitroplantas de ambas especies de pitahaya tuvieron la capacidad para continuar con su crecimiento y desarrollo, se obtuvieron coeficientes de multiplicación iguales en *H. undatus* y menos de la mitad en *H. monacanthus* en comparación a la etapa de multiplicación (Cuadro 20). Los nuevos brotes tuvieron características de aspecto sano y vigoroso, morfología de acuerdo a la etapa de cultivo, sin presencia de clorosis, ni oxidación, formación de callo o hiperhidratación (Figura 15).

**Cuadro 20** Coeficientes de multiplicación para dos especies de pitahaya antes y después de su conservación por mínimo crecimiento.

Etapa	Altura (cm)		Número de brotes		Vigor	
	<i>H. u</i>	<i>H. m</i>	<i>H. u</i>	<i>H. m</i>	<i>H. u</i>	<i>H. m</i>
Propagación	8.7	24.0	6.9	19.8	3.0	3.0
Refrescamiento	3.7	3.1	8.8	7.3	2.5	2.7

*H. u* = *Hylocereus undatus*; *H. m* = *Hylocereus monacanthus*.



**Figura 15** Vitroplantas de pitahaya en la etapa de refrescamiento después de la conservación en mínimo crecimiento comparadas con la etapa de multiplicación de la propagación (a) (b) *H. undatus* (c) (d) *H. monacanthus*.

En esta etapa, aunque existió contaminación para ambas especies, sus valores fueron muy inferiores a la etapa de multiplicación de propágulos, por lo que se sumió que pudo haber sido producto del manejo y manipulación *in vitro*. La etapa de refrescamiento aplicada para la recuperación del material vegetal y la supervivencia son criterios determinantes para darle validez a la metodología para la conservación *in vitro* mediante mínimo crecimiento.

## VII. DISCUSIÓN

Luego de la desinfección y siembra de las semillas de ambas especies bajo condiciones *in vitro*, se observó un alto porcentaje de germinación con relativamente bajo rechazo por agentes contaminantes. Las altas tasas de germinación de semillas de cactáceas están relacionadas con el ambiente creado por el medio de cultivo, como alta humedad relativa y la presión osmótica creada por el medio de cultivo MS (Ruvalcaba-Ruíz *et al.*, 2010). La viabilidad de las semillas estuvo determinada principalmente por la selección de acuerdo a su clasificación morfológica (Cisneros *et al.*, 2011), y al corto tiempo de almacenamiento posterior al tiempo de cosecha como lo realizado por Dahanayake y Ranawake (2011). Teniendo esto un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo de los explantes; para los que posteriormente se registró una tasa muy baja de muerte a causa de la oxidación de los mismos.

La activación de los puntos de crecimiento celular en las areolas de los explantes para producir nuevos brotes, estuvo altamente influenciado por la concentración de citocinina y auxina empleada en este estudio. De acuerdo al análisis de varianza realizado, para ambas especies de *Hylocereus*, se observó un marcado efecto de los reguladores del crecimiento sobre las variables evaluadas con diferencias significativas, ya sea en combinación o por si sola cada una. Las citocininas reducen el efecto de dominancia apical, que es el predominio de meristemas apicales, que inhiben el desarrollo de brotes axilares. Sin embargo, la aplicación de altas concentraciones de citocininas inhibe la elongación de yemas adventicias (Ngomuo *et al.*, 2014).

La combinación adecuada de auxinas y citocininas bajo condiciones apropiadas se utilizan para romper la latencia de las yemas y aumentar la cantidad de brotes (Lema-Ruminska y Kulus, 2014). Panda y Hazra (2012) cultivaron segmentos nodales de *Semecarpus anacardium*, en medio enriquecido con 2.27 mM de Thidiazuron (TDZ) y promovieron la división y proliferación de células meristemáticas en las yemas axilares, sin embargo, el desarrollo de los brotes fue inhibido por el TDZ, el cual está considerado como una citocinina fuerte y con efecto favorable sobre la maduración y diferenciación de embriones híbridos de *Hylocereus* spp. (Cisneros *et al.*, 2013). En este trabajo se encontraron resultados similares en ambas especies de pitahaya para la altura de los brotes, donde los tratamientos que solo

contenían BAP, mostraron la mayor altura, siendo la adición del AIA negativa para el crecimiento y desarrollo de los brotes de pitahaya en fase de multiplicación. No siendo este el caso para la aplicación de otras auxinas como el ácido a-naftaleneacético (ANA) empleado por Cisneros y Tel-Zur (2010), para el rescate de embriones inmaduros de pitahaya.

De las técnicas empleadas en cactáceas la activación de areolas es muy utilizada porque no induce variación somaclonal. En *Opuntia ficus-indica* la proliferación de brotes se inició incubando los cultivos durante siete días en condiciones de obscuridad y posteriormente en fotoperiodo de 16 h luz 8 h obscuridad, resultando el 100% de las areolas activas con brotes de mayor longitud (Zoghلامي *et al.*, 2012).

Se han desarrollado protocolos de propagación de especies de *Hylocereus*, utilizando diferentes concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento, así como fuentes de explantes. Por organogénesis directa Dahanayake y Ranawake (2011) evaluaron el potencial de generación de brotes en dos tipos de explantes, hoja y tallo de *Hylocereus undatus*, donde los tallos presentaron mayor habilidad para la formación de los brotes.

La regeneración de plantas por vía organogénesis directa e indirecta permiten superar las desventajas que se producen con la propagación sexual por semillas (Ruvalcaba-Ruíz *et al.*, 2010). Estos métodos de propagación han sido utilizados en varias especies de cactáceas para realizar la reintroducción a su habitat natural de *Mammillaria mathildae* (García-Rubio y Malda, 2010), para la recuperación mediante la propagación *in vitro* del *Coryphantha retusa* en categoría de amenazado (Ruvalcaba-Ruíz *et al.*, 2010), también para la obtención de material de propagación de *H. undatus* (Dahanayake y Ranawake, 2011), y en la organogénesis indirecta de *Ortegocactus macdougallii* (Arellano-Perusquía *et al.*, 2013). Aun cuando una de las especies que en este trabajo se evaluó, ya ha sido reportada en la micropropagación comercial, si observamos que hubo una respuesta diferencial especie-específica, que bajo las condiciones reportadas no obtuvimos buenos resultados (datos no mostrados); lo cual también ha sido bien documentado que las condiciones de cultivo varían de un laboratorio a otro y los resultados pueden ser diferentes.

La tasa de crecimiento de ambas especies de pitahaya, tuvieron la misma tendencia, sin embargo, *H. monacanthus* tuvo un menor crecimiento, al ser diferentes especies de un mismo género, la tasa de crecimiento *in vitro* puede diferir. Pérez Molphe Balch (2012a) refiere que esta diferencia puede ser el reflejo de la tasa de crecimiento *in vivo* ya que algunas especies

tienen la capacidad de satisfacer mejor sus necesidades nutricionales que otras además de la tolerancia que tienen al estrés.

El medio de cultivo suplementado con los osmo-reguladores manitol y sacarosa en tres concentraciones diferentes tuvo efecto al limitar el crecimiento y desarrollo de vitroplantas de pitahaya. Los resultados indican que en medios de cultivo con manitol además de limitar el crecimiento, se obtienen porcentajes de supervivencia mayores al 80%. Usualmente altas concentraciones de sacarosa no resultan tóxicas a corto plazo, si se presenta daño en las plantas, el crecimiento celular puede ser reasumido cuando las plantas son transferidas a medios con concentraciones menores o normales de sacarosa (Mora *et al.*, 2011). En *H. undatus* la altura de la vitroplanta fue 64% menor en 0.5% de manitol en comparación con el control y en su desarrollo no produjo gran cantidad brotes y raíces; y en 1% de manitol la altura de *H. monacanthus* fue 58% menor respecto al control, también su desarrollo se mantuvo con pocos brotes y raíces. Las especies de plantas responden de manera diferente a los agentes osmóticos, para reducir el crecimiento sin que se produzcan cambios morfológicos en las plantas y afecten la calidad de las mismas (Mora *et al.*, 2011).

El manitol como agente osmótico en la conservación de especies se ha reportado como tóxico por causar oxidación en los tejidos hasta causar la muerte de los explantes. Silva (2011) reportó que el manitol en concentraciones de 1-3% causó efectos negativos en la recuperación de brotes de dos especies de Chile (*P. hispidernervum* y *P. anduncum*). En otro experimento Shawky and Aly (2007) obtuvo buenos resultados con manitol en concentración de 4% solo en los primeros tres meses de conservación, pero la supervivencia y vigorosidad de los explantes de *Cynara scolymus* fue en decremento después de los seis meses de conservación.

El desarrollo de las vitroplantas de pitahaya se vio influenciado por el volumen de recipiente de cultivo, a menor volumen la altura fue mayor pero se obtuvieron vitroplantas de mejor calidad, con menor cantidad de brotes y raíces y los porcentajes de supervivencia fueron superiores a 80% en las dos especies de pitahaya. El volumen del recipiente de cultivo puede ser determinante para definir la frecuencia de subcultivos y el almacenamiento óptimo de los explantes (Engelmann, 1991; Keller *et al.*, 2006). Por ejemplo, en *Curcuma longa* se utilizaron envases con capacidad de 180 mL para el almacenamiento a corto plazo (durante seis semanas) y de 2,5 l para el almacenamiento más prolongado (durante 23 semanas). Esto permitió una optimización en el almacenamiento de esta especie al utilizar eficientemente al

volumen del recipiente según las necesidades de crecimiento del explante (Cousins y Adelberg, 2008).

En esta investigación se pudo observar que un nivel mínimo de intensidad luminosa en *H. undatus* tuvo efecto al limitar el crecimiento, mientras que en *H. monacanthus* las vitroplantas fueron más grandes, pero ambas especies mantuvieron buena calidad. Las intensidades superiores pueden producir efectos perjudiciales como la inducción de oxidantes y hasta daño en el aparato fotosintético. Recientes estudios han mostrado alta frecuencia de regeneración de brotes adventicios en *Aloe arborescens* Mill. (Amoo *et al.*, 2012) y en la conservación *in vitro* de *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. (Sharma *et al.*, 2012) usando intensidades lumínicas que fluctúan entre 30-40  $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ .

La intensidad de la luz es uno de los principales factores ambientales que determina la morfología y fisiología de las plantas, sin embargo la plasticidad de la morfología y la fisiología puede ser diferente entre especies y diferentes especies pueden exhibir distintas respuestas en condiciones ambientales similares (Koner, 1991). El fotoperiodo e intensidad luminosa son factores importantes en el desarrollo y calidad de la planta, la baja intensidad de luz incrementa la altura de la planta en especies como *Anemone coronaria*, *Centaurea americana* Nutt., *Echinops ritro* L.

Para considerar las óptimas condiciones de cultivo se debe tomar en cuenta principalmente aquel que reduzca la tasa de crecimiento de la pitahaya y que los propágulos mantengan una morfología normal durante el periodo de cultivo, y una de las etapas más importante es que al realizar un subcultivo en un medio basal de multiplicación o libre de reguladores, la planta tenga un crecimiento exitoso (Lopez-Puc, 2013). En la etapa de refrescamiento, se observó que las vitroplantas de ambas especies de pitahaya cultivadas en condiciones de mínimo crecimiento no tuvieron problema para reiniciar un desarrollo normal en la etapa de multiplicación, los coeficientes de multiplicación que se obtuvieron coinciden con los que se han obtenido en los protocolos de propagación de la especie, el desarrollo de las plantas presentó problemas de brotes cloróticos por lo que es una oportunidad para evaluar otros niveles de iluminación de tal forma que se encuentre la ideal para la conservación de las vitroplantas.

## VIII. CONCLUSIONES

Se estableció una metodología de propagación *in vitro* utilizando BA y AIA como reguladores de crecimiento en concentración 2/0.5 mg L<sup>-1</sup> para *H. undatus* y 1/0 mg L<sup>-1</sup> para *H. monacanthus*, lo cual permitió obtener el material vegetal de inicio para establecerlo en conservación mediante mínimo crecimiento.

El osmo-regulador manitol tuvo mayor efecto para limitar el crecimiento y desarrollo de los segmentos apicales con alto porcentaje de supervivencia de los segmentos apicales de *H. undatus* y *H. monacanthus* en condiciones *in vitro*. En 1% de manitol se obtuvieron 3.4 brotes de 3.5 cm y 80 % de supervivencia en *H. undatus*, mientras que en *H. monacanthus* se obtuvieron 4.7 brotes de 2.1 cm y 95% de supervivencia.

El recipiente de cultivo de 145 cm<sup>3</sup> favoreció las condiciones de cultivo de mínimo crecimiento, se obtuvieron 3.8 brotes de 4.5 cm y 92% de supervivencia en *H. undatus* y en *H. monacanthus* se obtuvieron 4.2 brotes de 4.3 cm y 86% de supervivencia.

El nivel de intensidad luminosa de 5  $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$  favoreció las condiciones ambientales de cultivo de mínimo crecimiento, se obtuvieron 1.5 brotes de 2.8 cm y 97% de supervivencia en *H. undatus*, en *H. monacanthus* se obtuvieron 1.7 brotes de 2.3 cm y 100% de supervivencia con 25  $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$  de intensidad luminosa.

La conservación *in vitro* mediante mínimo crecimiento, sin subcultivo durante un periodo de 180 días, fue adecuado para la pitahaya ya que los segmentos apicales mostraron su capacidad de regeneración al observarse coeficientes de multiplicación similares a los obtenidos en la etapa de multiplicación de la micropropagación.

La metodología de propagación *in vitro* obtenida incluye la multiplicación de propágulos, enraizado de brotes y aclimatación de plantas en invernadero, que mostraron características morfológicas normales.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alegría, J. M. I. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Investigación agraria, producción y protección vegetal*, 16, 5-24.
- Amoo, S.O., A.O. Aremu and J. Van Staden. 2012. *In vitro* plant regeneration, secondary metabolite production and antioxidant activity of micropropagated *Aloe arborescens* Mill. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 111: 345-358.
- Arellano-Perusquía, A., López-Peral, M. C. G., Chablé-Moreno, F. and Estrada-Luna, A. A. 2013. Effect of growth regulators in the organogenesis and multiplication of *Ortegocactus macdougallii* Alexander. *Propagation of Ornamental Plants*, 13, 160-167.
- Armijos G. R. 2016. Conservación de platas regeneradas *in vitro* y análisis de la variación somaclonal de *Cinchona officinalis*, Linneo. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
- Azcón B., J. y M. Talón. 2003. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Mc Graw Hill Interamericana. 3ra edición. España. 522 p.
- Castilla V. Y. 2012. Conservación de recursos fitogenéticos de cafeto (*Coffea* spp.) por métodos biotecnológicos: una alternativa para su preservación. *Cultivos Tropicales*, 33(4), 29-39.
- Cisneros, A. and Tel-Zur, N. 2010. Embryo rescue and plant regeneration following interspecific crosses in the genus *Hylocereus* (Cactaceae). *Euphytica*, 174, 73-82.
- Cisneros, A., Benega, R. and Tel-Zur, N. 2011. Ovule morphology, embryogenesis and seed development in three *Hylocereus* species (Cactaceae). *Flora*, 206, 1076-1084.
- Cisneros, A., Benega-Garcia, R. and Tel-Zur, N. 2013. Creation of novel interspecific-interploid *Hylocereus* hybrids (Cactaceae) via embryo rescue. *Euphytica*, 189, 433-443.
- Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2009. *Cactus y biznagas (Cactaceae)*. Recuperado de <http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/granfamilia/plantas/magnoliayMarg/cactaceas.html>. (Consultado 13 de mayo de 2015).
- Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2012. Portal de Geoinformación. Sistema nacional de información sobre biodiversidad. Recuperado de <http://www.conabio.gob.mx/información/gis>. (Consultado 28 de Abril 2016).

- Cousins, M., Adelberg, J. 2008. Short term and long term time course studies of turmeric 336 (*Curcuma longa* L.) microrrhizome development *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 93,283-293.
- Mora, N. C., Huertas, M. B., Esquivel, A. A., y Venutolo, S. A. 2011. Establecimiento de un protocolo para la conservación *in vitro* a mediano plazo de uña de gato (*Uncaria Tomentosa* (Willd). DC). *Tecnología en Marcha*, 24(4): 19-29.
- Cruz J. A. M., Rodríguez-Larramendi L., Ortiz-Pérez R., Fonseca-Flores M. D. L. Á., Herrera, G. R., y Guevara-Hernández, F. 2015. Revisión bibliográfica. Pitahaya (*Hylocereus* spp.) un recurso fitogenético con historia y futuro para el trópico seco mexicano. *Cultivos Tropicales*. 36(5): 67-76.
- Cuevas, F. A., y de la Torre, F. 2015. Conservación de las especies subvaloradas como recursos genéticos agrícolas. *Revista digital universitaria*. 16 (5). Recuperado de <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num5/art37>.
- Dahanayake N. and Ranawake A. L. 2011. Regeneration of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) plant lets from leaf and stem explants. *Tropical Agricultural Research and Extension*. 14 (4).
- Daskalova, E., Dontcheva, S., Yahoubian, G., Minkov, I. and Toneva V. 2011. A strategy for conservation and investigation of the protected resurrection plant *Haberlea rhodopensis* Friv. *BioRisk*. 6: 41–60.
- El-Dawayati, M. M., Baker, E., Gomaa, A. H., and Zayed, Z. E. 2013. *In vitro* conservation of date palm shoot tip explants under minimal growth condition. *Egypt J. Agric. Res.* 91 (13): 1043-1062.
- Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm—a review. *Euphytica* 57:227-243.
- Engelmann, F. 1998. *In vitro* germplasm conservation. *Acta Horticulturae*. 461:41-48
- Engelmann, F. y M.T. González-Arno. 2013. Introducción a la conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales. En: *Crioconservación de Plantas en América Latina y el Caribe*. Engelmann, F. y M. T. González-Arno. (eds). San Jose, Costa Rica.: IICA. pp.26-35.
- Ertola, R.J., A.M. Giulietti and F.J. Castillo. 1994. Design, formulation and optimization of media. In: *Bioreactors Systems Design*. Asenjo J. and J Merchuk (eds.). Marcel Dekker. New York. USA. pp.: 89-137.
- Estrada-Luna, A.; Martínez-Hernández, J.; Torres-Torres, M. and Chablé-Moreno, F. *In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear 174 cactus *Opuntia lanigera* Salm-Dyck and effects of sprayed GA3 after transplantation to *ex vitro* conditions. En: *Scientia Horticulturae*. 2008, vol. 117, no. 4, p. 378-385.

- García-Águila, L., Pérez P., J., Rodríguez, M., Pérez, B., Martínez, Y., & Sarría, Z. 2003. Influencia de la formulación salina en la conservación de plantas *in vitro* de caña de azúcar a dos temperaturas. *Biotecnología Vegetal*, 3(3): 155-160.
- García-Águila, L., de Fera M, Acosta K. 2007. Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. *Biotecnología Vegetal* 7 (2): 67-79.
- García-Rubio, O. and Malda-Barrera, G. 2010. Micropropagation and reintroduction of the endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to its natural habitat. *HortScience*, 45, 934-938.
- García-Rubio, L. A., Vargas P., O., Ramírez-Mireles, F., Munguía-Lino, G., Corona-Oceguera, C., Cruz-Hernández T. 2015. Distribución geográfica de *Hylocereus* (Cactaceae) en México. *Botanical Sciences*. 93 (4): 921-939.
- George, E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology. Components of culture media. The Exergetics Ltd. Edington, Wilts. England. pp: 327-574
- Gunasena, H. P. M., Pushpakumara, D. K. N. G., & Kariyawasam, M. (2007). Dragon Fruit *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose. Underutilized fruit trees in Sri Lanka. New Delhi, World Agroforestry Centre, 110-142.
- Hassan, N. A., R. G. Stino, R., A. H. Gomaa and R. N. Al-Mousa. 2014. *In vitro* medium-term germplasm conservation and genetic stability of grape (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Horticultural Science y Ornamental Plants*. 6: 09-17.
- Iriondo-Alegría, J. M. 2001. Conservación de recursos fitogenéticos. pp. 15-31. En: González-Andrés, F. & J. M. Pita Villamil (Eds.). Conservación y caracterización de recursos filogenéticos. Publicaciones Instituto Nacional de Educación Agrícola. Valladolid, España.
- Kadota, M. and Y. Niimi. 2004. Influences of Carbon Sources and their Concentrations on Shoot Proliferation and Rooting of 'Hosui' Japanese Pear. *HORTSCIENCE* 39(7):1681-1683.
- Karakas, B. 2001. The role of sorbitol synthesis in photosynthesis of peach (*Prunus persica*). PhD dissertation. University of Georgia.
- Keller E.R.J., A. Senula, S. Leunufna and M. Grube. 2006. Slow growth storage and cryopreservation - tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *International Journal of Refrigeration* 29:411-417.

- Khaimov–Armoza, A., Novák, O., Strnad, M. and Mizrahi, Y. 2012. The role of endogenous cytokynins and environmental factors in flowering in the vine cactus *Hylocereus undatus*. Israel Journal of Plant Sciences, 60, 371-383.
- Lallana, V. H. y Lallana, M. 2014. Manual de prácticas de fisiología vegetal. Cordoba Argentina. Eduner. Recuperado de <http://www.eduner.uner.eduar/libro/96/manual-de-prácticas-de-fisiología-vegetal>.
- Le Bellec, F. Vaillant, F. and Imbert, E. 2006. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. Fruits 61: 237-250.
- Lema-Ruminska, J. and Kulus, D. 2014. Micropropagation of cacti—A review. Haseltonia, 19, 46-63.
- Lemoine R, S. La Camera , R. Atanassova, F. Dédaldéchamp, T. Allario, N. Pourtau, J.L. Bonnemain, M.Laloi , P. Coutos-Thévenot, L. Maurousset, M. Faucher , C. Girousse, P. Lemonnier, J. Parrilla, M. Durand. 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. Frontiers in Plant Science. 4: 272.
- Lima, A., Sampaio, M., Matos, B., Resende, S., Cortizo, M. & Ferreira, J. 2011. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. Ciencia Rural. 41 (8): 1354-1361.
- Lopez-Puc, G. 2013. An effective *in vitro* slow growth protocol for conservation of the orchid *Epidendrum chlorocorymbos* Schltr. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 16 (1).
- Marín, J.A. 1993. Micropropagación de especies frutales. Horto Frutic. 1: 56-62.
- Marino, G., E. Bertazza, Magnanini and A.D. Altan 1993. Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 34:235–244.
- Martín, C., Senula, A., González, I., Acosta, A., Keller, E. J., and González-Benito, M. E. 2013. Genetic identity of three mint accessions stored by different conservation procedures: field collection, *in vitro* and cryopreservation. Genetic Resources and Crop Evolution. 60 (1): 243-249.
- Manzanero-Acevedo, L. A., Isaac-Márquez, R., Zamora-Crescencio, P., Rodríguez-Canché, L. G., Ortega-Haas, J. J. & Dzib Castillo, B. B. 2014. Conservación de la pitahaya [*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose] en el estado de Campeche, México. Foresta Veracruzana. 16 (1): 9-16.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15: 437- 497.

- Neiva, C. y Jiménez, V. 2010. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*. 21(1): 193-205.
- Ngomuo, M., Mneney, E. and Ndakidemi, P. 2014. The *in vitro* propagation techniques for producing banana using shoot tip cultures. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 1614-1622.
- Ortiz H., Y.D. y Livera M. 1999. La pitahaya en la agrobiodiversidad. Seminario Internacional sobre agrobiodiversidad campesina. Toluca, Edo. de México. ISBN 968-835-440-6. 205-209.
- Ortiz-Hernández Y. D. and Carrillo-Salazar J. A. 2012. Pitahaya (*Hylocereus* sp.): a short review. *Comunicata Scientiae*. 3(4): 220-237.
- Panda, B. M. and Hazra, S. 2012. Micropropagation of *Semecarpus anacardium* L.: A medicinally important tree species. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 146, 61-68.
- Paul R. E. and Duarte O. 2012. Tropical fruits, 2nd edition, volume II. Wallingford, UK: CABI, 371 pp.
- Pérez Molphe Balch, Eugenio, Esparza Araiza, Mayra J., Pérez Reyes, Martha E. 2012a. Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave* spp. bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(4), 279-287.
- Pérez Molphe Balch, E., Pérez-Reyes, M. E., & Rosa-Carrillo, M. D. L. D. L. 2012b. *In vitro* conservation of *Turbinicarpus* (Cactaceae) under slow growth conditions. *Haseltonia*, 17, 51-57.
- Pierik R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Edic. Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p.
- Rayas, A., Cabrera, M., Santos, A., Basail, M., López, J., Medero, V. y Beovides, Y. 2012. Efecto del manitol y el nitrato de plata en la conservación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma* spp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, XV, 167-171.
- Roca, W.M., D.I. Arias, R. Chávez. 1991. Métodos de conservación *in vitro* de germoplasma. Capítulo 31. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Roca, W.M., M. Roginski. (eds.) CIAT. pp. 697-713
- Roca, WM, Escobar R, Mafla G. 1994. Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Principios y técnicas. CIAT, Cali. 8-12.
- Rodríguez, C. A. 2000. Producción y comercialización de pitahayas en México. *Claridades Agropecuarias* (82): 3-22. ISSN 0188-9974.

- Rukundo, P. 2012 Comparative study of effects of table sugar, laboratory grade sucrose and mannitol on growth of banana plantlets under *in vitro* conditions. *Rwanda Journal*. 76 (28): 76-83.
- Ruvalcaba-Ruíz, D., Rojas-Bravo, D. y Valencia-Botín, A. J. 2010. Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12, 139-143.
- Sánchez-Chiang, N. y V. M Jiménez. 2010. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*. 21 (1): 193-205.
- Scowcroft, W.R. 1984. Genetic Variability in Tissue: Impact on Germplasm Conservation and utilization. Rome: International Board for Plant Genetic Resources. *Agronomía Mesoamericana* 21(1):193-205.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2014. Anuarios estadísticos de la producción agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). México, D. F. <http://www.siap.gob.mx>. (Consultado 25 de Mayo de 2015).
- Sharma, N., R. Satsang, R. Pandey, R. Singh, N. Kaushik, and R.K. Tyagi. 2012. *In vitro* conservation of *Bacopa monnieri* (L.) using mineral oil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 111: 291-301.
- Shawky B and Aly UI. 2007. *In vitro* Conservation of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Germplasm. *Int. J. Agri. Biol.* 9(3): 404-407
- Silva, T. L. D., and Scherwinski-Pereira, J. E. 2011. *In vitro* conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 46 (4): 384-389.
- Soo-Cheon, C. 2013 Influence of carbon sources on shoot organogenesis in *Echinacea angustifolia* DC. *Life Science Journal*. 10 (3): 1300-1303.
- Stoop, J. and D. Pharr. 1993. Effect of Different Carbon Sources on Relative Growth Rate, Internal Carbohydrates, and Mannitol 1 -Oxidoreductase Activity in Celery Suspension Cultures. *Plant Physiol*. 103: 1001-1008
- Suksa, PA, Kataoka I, Fujime Y, Subhadrabandhu S. 1997. Effect of temperature, growth retardants and osmotic potential of growth of Papaya Shoots Conserved *in vitro*. *Tropical Agriculture* 41(1): 7-13.
- Taylor, PWJ. and Dukin S. 1993. Development of an *in vitro* culture technique for conservation of *Saccharum* ssp. hybrid germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34: 217-222.

- Toledo, J. and Golmirzaie A. 1998. Conservación *in vitro* de *Solanum* ssp bajo condiciones de estrés osmótico y ambiental. Centro Internacional de la papa, Lima, Perú. Libro de Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO 98. Junio/ 1-5. Palacio de Convenciones. La Habana. Cuba.
- Villavicencio, E. E. G., González, C. A. y Carranza, P. M. A. 2012. Micropropagación de *Ephithelantha micromeris* (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. & Rose, cactácea ornamental y recurso fitogenético del desierto Chihuahuense. Revista Mexicana de Ciencias Forestales, 3, 83-102.
- Viñas, M., Fernandez-Brenes, M., Azofeifa, A. and Jiménez, V. M. 2012. *In vitro* propagation of purple pitahaya (*Hylocereus costaricensis* [F. A. C. Weber] Britton & Rose) cv. Cebra. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 48, 469-477.
- Withers, L. 1991. *In vitro* conservation. Biological Journal of the Linnean Society. 43: 3 1-42.
- Withers L. and Engelmann F.1997. *In vitro* Conservation of Plant Genetic Resources. In: Altman A (ed) Agricultural Biotechnology, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong, pp 57-88
- Zoghiami, N., Bouamama, B., Khammassi, M. and Ghorbel, A. 2012. Genetic stability of long term micropropagated *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. plantlets as assessed by molecular tools: Perspectives for *in vitro* conservation. Industrial Crops and Products, 36, 59-64.