



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

TESIS

ESTABLECIMIENTO Y PROPAGACIÓN *in vitro* DE VARIEDADES
COMERCIALES DE PITAHAYA (*Hylocereus spp.*)

PRESENTA

LBt Adan Abdiel Velázquez Jiménez

PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestro en Ciencias: área Biotecnología Vegetal

TUTORES

Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch

M. en C. Otilio Vázquez Martínez

COMITÉ TUTORAL

Dr. José Francisco Morales Domínguez

Aguascalientes, Ags., 11 de Noviembre 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
P R E S E N T E

Por medio de la presente, como cotutor designado del estudiante **Adan Abdiel Velázquez Jiménez**, con ID 154228, quien realizó la tesis titulada: **ESTABLECIMIENTO Y PROPAGACIÓN *in vitro* DE VARIETADES COMERCIALES DE PITAHAYA (*Hylocereus spp.*)**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 11 de noviembre de 2020.

Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch
Cotutor de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
PRESENTE

Por medio de la presente, como cotutor designado del estudiante **Adán Abdiel Velázquez Jiménez**, con ID **154228**, quien realizó la tesis titulada: **ESTABLECIMIENTO Y PROPAGACIÓN *in vitro* DE VARIEDADES COMERCIALES DE PITAHAYA (*Hylocereus spp.*)**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 12 de noviembre de 2020.

MC Otilio Vázquez Martínez
Cotutor de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
Decano Del Centro de Ciencias Básicas
P R E S E N T E

Por medio del presente como Asesor designado del estudiante **Adan Abdiel Velázquez Jiménez** con ID **154228** quien realizó la tesis titulada **Establecimiento y propagación *in vitro* de variedades comerciales de pitahaya (*Hylocereus spp*)**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
“Se Lumen Proferre”
Aguascalientes, Ags., a 12 de noviembre de 2020



Dr. José Francisco Morales Domínguez
Asesor de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

NOMBRE: Adan Abdiel Velázquez Jiménez **ID** 154228

PROGRAMA: Maestría en Ciencias área Biotecnología Vegetal o Toxicología **LGAC (del posgrado):** Biotecnología Vegetal

TIPO DE TRABAJO: () Tesis () Trabajo Práctico

TÍTULO: ESTABLECIMIENTO Y PROPAGACIÓN *in vitro* DE VARIETADES COMERCIALES DE PITAHAYA (*Hylocereus* spp.)

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): La pitahaya es un fruto de alto valor, cuyo cultivo puede extenderse en las zonas de clima subtropical del Estado generando un impacto económico y social positivos. En esta tesis se desarrolló tecnología para multiplicar masivamente variedades comerciales de este cultivo.

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:				
SI				El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI				La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI				Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI				Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI				Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI				El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI				Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
N.A.				Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI				Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:				
SI				Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI				Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI				Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
N.A.				Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI				Coincide con el título y objetivo registrado
SI				Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI				Tiene el CVU del Conacyt actualizado
N.A.				Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
En caso de Tesis por artículos científicos publicados				
				Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
				El estudiante es el primer autor
				El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
				En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
				Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
				La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

Sí X
No _____

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

Yenny Adriana Gómez A.
Dr. Yenny Adriana Gómez Aguirre

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

ERM B
Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Haydee Martínez Ruvalcaba
Dra. Haydee Martínez Ruvalcaba

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma de Aguascalientes** por permitirme continuar mi desarrollo profesional, y brindarme excelentes profesores e instalaciones.

A el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt)** por otorgarme la beca con el número 908348 para realizar el posgrado.

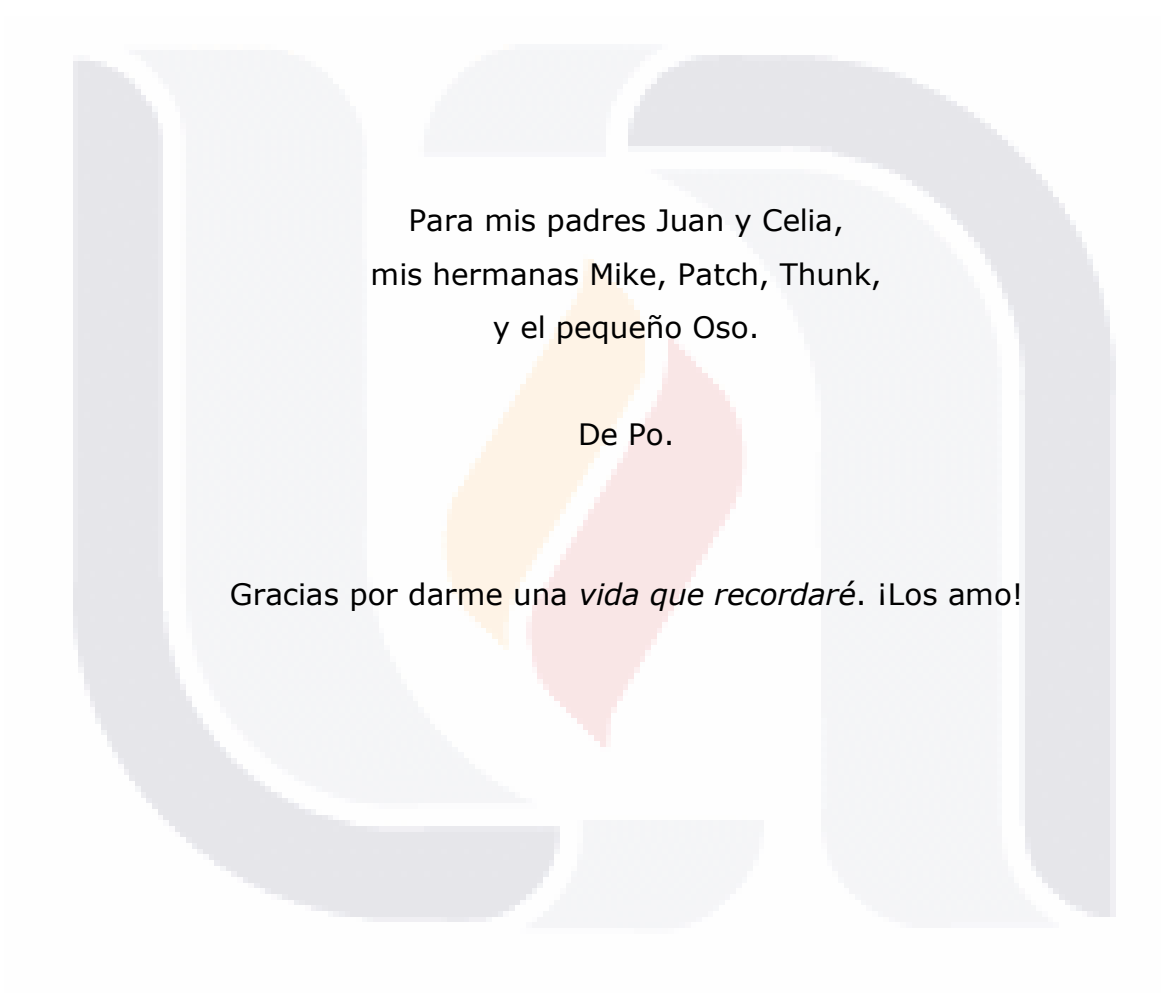
Al el **M. en C. Otilio Vázquez Martínez** por su apoyo, confianza, tiempo, dedicación y generosidad hacia mí, por ser mi tutor en licenciatura y maestría, por enseñarme a abrir mi mente a todas las posibilidades, aunque éstas parezcan difíciles o alocadas, y a no cerrarla a sólo lo que se ha reportado hasta ahora, y en especial por ser mi mentor en el fascinante mundo del cultivo de tejidos.

A el **Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch** por ser mi tutor, involucrarme en el mundo de la biotecnología vegetal y hacer que me apasione, por su tiempo, paciencia, confianza y ayuda incondicional que me brindó durante el posgrado. Gracias por compartir siempre sus conocimientos.

A el **Dr. José Francisco Morales Domínguez** por formar parte de esta tesis a pesar de las dificultades administrativas, por brindarme su ayuda, tiempo y conocimientos durante el posgrado, y enseñarme las bases de la biología molecular.

A **Los Chidos y M-a** que más que mis compañeros, mis amigos, por los buenos momentos durante el posgrado.

DEDICATORIA



Para mis padres Juan y Celia,
mis hermanas Mike, Patch, Thunk,
y el pequeño Oso.

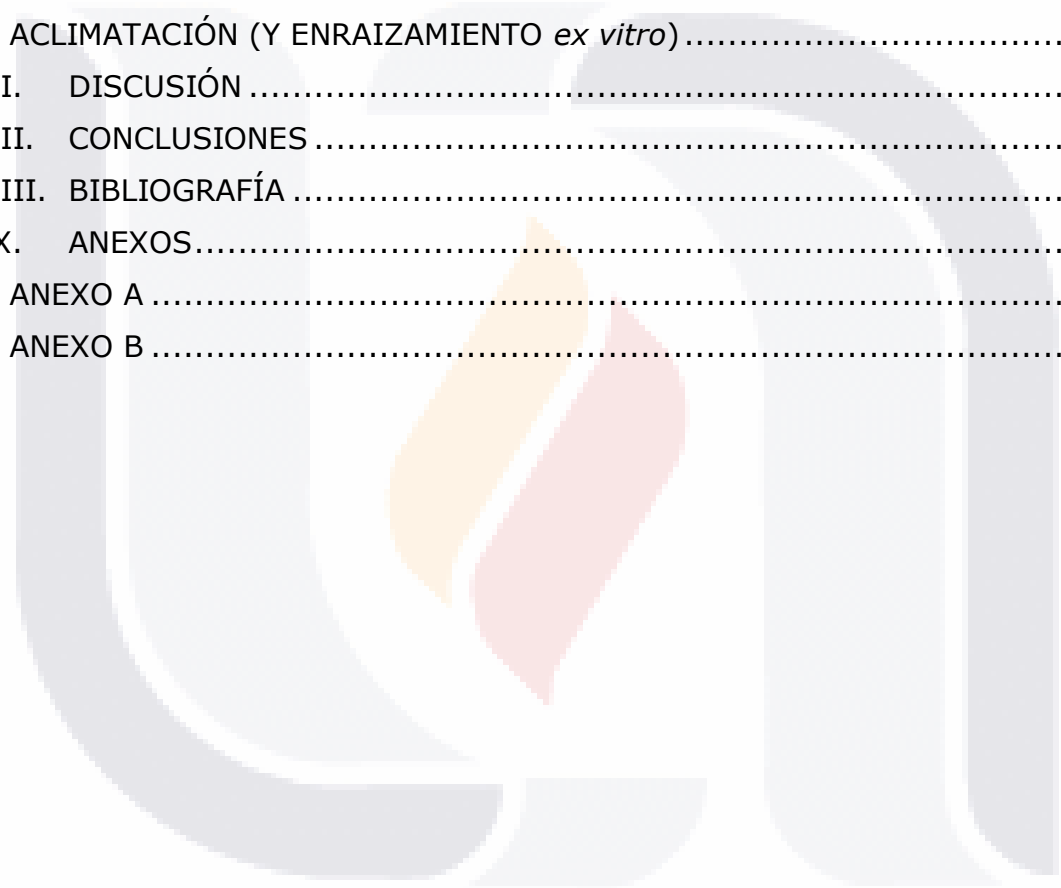
De Po.

Gracias por darme una *vida que recordaré*. ¡Los amo!

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE CUADROS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
NOMENCLATURA	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	9
I. MARCO TEÓRICO	11
1. LA PITAHAYA (<i>Hylocereus</i> spp.)	11
1.1 Características Botánicas.....	11
1.2 Importancia	12
1.3 Distribución.....	14
1.4 Variedades de Pitahaya	15
2. MICROPROPAGACIÓN.....	17
2.1 Etapa 0: Selección y Preparación de la Planta Madre.....	18
2.2 Etapa I: Establecimiento de un Cultivo Aséptico	18
2.3 Etapa II: Multiplicación	19
2.4 Etapa III: Preparación Para el Crecimiento <i>ex vitro</i>	20
2.5 Etapa IV: Transferencia a Condiciones de Invernadero.....	21
3. ANTECEDENTES SOBRE EL CULTIVO <i>in vitro</i> DE PITAHAYA	22
II. JUSTIFICACIÓN	39
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	40
OBJETIVO GENERAL	40
Objetivos Específicos	40
HIPÓTESIS	40
IV. METODOLOGÍA	41
MATERIAL VEGETAL	41
ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO EN CONDICIONES <i>in vitro</i>	41
EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CITOCININAS EN LA PRODUCCIÓN DE BROTOS (MULTIPLICACIÓN)	42

ENRAIZAMIENTO <i>in vitro</i>	43
ACLIMATACIÓN (Y ENRAIZAMIENTO <i>ex vitro</i>).....	43
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
V. RESULTADOS	45
ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO A CONDICIONES <i>in vitro</i>	45
EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CITOCININAS EN LA PRODUCCIÓN DE BROTOS (MULTIPLICACIÓN)	46
ENRAIZAMIENTO <i>in vitro</i>	52
ACLIMATACIÓN (Y ENRAIZAMIENTO <i>ex vitro</i>).....	54
VI. DISCUSIÓN	55
VII. CONCLUSIONES	63
VIII. BIBLIOGRAFÍA	64
IX. ANEXOS.....	70
ANEXO A	70
ANEXO B	71



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Eficiencia del protocolo de desinfección y de la presencia de BA sobre el porcentaje de contaminación y de brotación.45

Cuadro 2. Efecto de la concentración de AIB en medio MS modificado sobre el porcentaje de enraizamiento en Pitahaya Fiusha.52



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Brotes obtenidos a partir de aréolas desinfectadas de Pitahaya (Hylocereus spp.). De izquierda a derecha: Blanca en 7.0 mg/L BA; Fiusha en 3.0 mg/L BA; Roja en 7.0 mg/L BA; y Jenny en 4.5 mg/L BA.46

Figura 2. Efecto del origen del explante y la concentración de BA sobre el número de brotes de Pitahaya Fiusha (media \pm desviación estándar; n= 40). Barras negras: segmentos apicales, barras grises: segmentos decapitados. Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).46

Figura 3. Efecto de la concentración de BA sobre el no. de brotes de Pitahaya Fiusha (mediana \pm IQR; n= 80). Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Dunn ($\alpha=0.05$).47

Figura 4. Efecto de la concentración de BA sobre la cantidad y morfogénesis de los brotes producidos en Pitahaya Fiusha. Tamaño de los cuadros= 1 cm².....48

Figura 5. Efecto de la concentración de BA sobre el no. de brotes de Pitahaya Jenny (mediana \pm IQR; n= 30). Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Dunn ($\alpha=0.05$).49

Figura 6. Efecto de la concentración de BA sobre la cantidad y morfogénesis de los brotes producidos en Pitahaya Jenny. Tamaño de los cuadros= 1 cm².49

Figura 7. Efecto de la concentración de Cin sobre el no. de brotes de Pitahaya Jenny (mediana \pm IQR; n= 20). Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Dunn ($\alpha=0.05$).50

Figura 8. Efecto de la concentración de Cin sobre la cantidad y morfogénesis apariencia de los brotes producidos en Pitahaya Jenny. Tamaño de los cuadros= 1 cm².50

Figura 9. Efecto de la concentración de TDZ sobre el no. de brotes de Pitahaya Jenny (mediana \pm IQR; n= 30). Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Dunn ($\alpha=0.05$).51

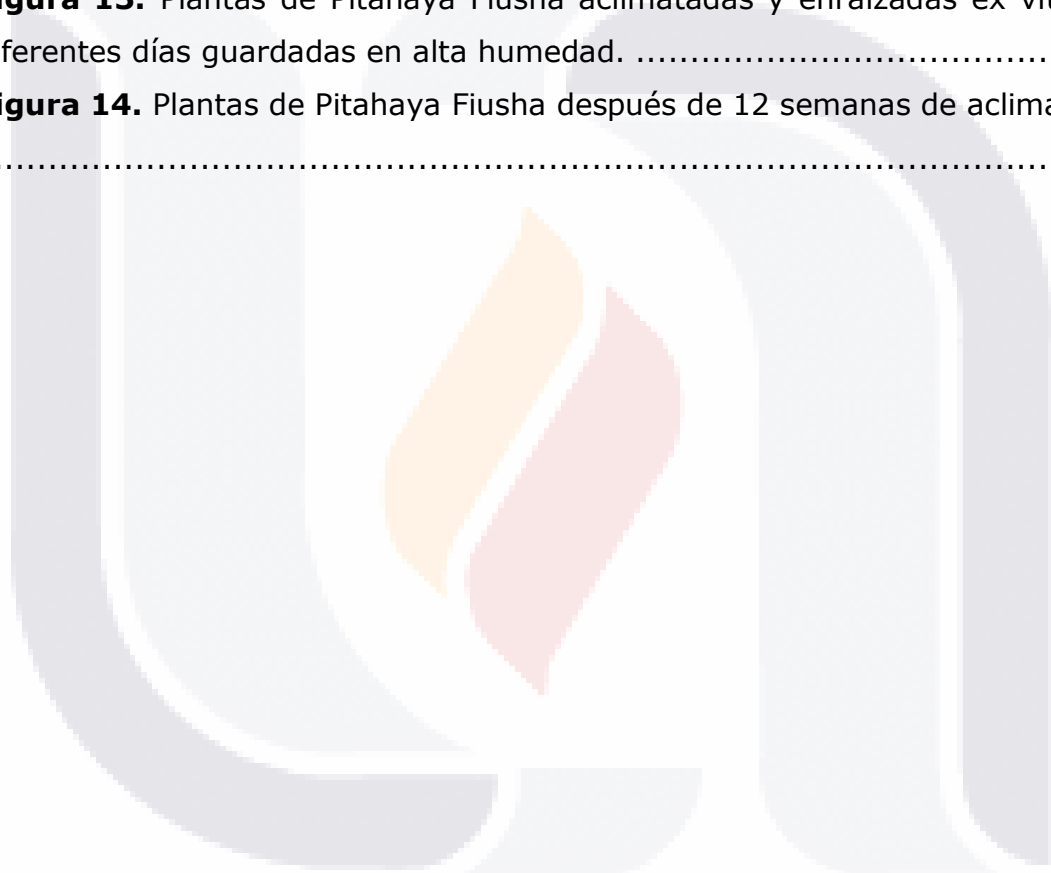
Figura 10. Efecto de la concentración de TDZ sobre la cantidad y morfogénesis de los brotes producidos en Pitahaya Jenny. Tamaño de los cuadros= 1 cm². 52

Figura 11. Efecto de la concentración de AIB en medio MS modificado sobre el porcentaje de enraizamiento en Pitahaya Fiusha. Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Comparación de Proporciones ($\alpha=0.05$).....53

Figura 12. Efecto del medio MS modificado y de la concentración de AIB sobre el enraizamiento *in vitro* en brotes de pitahaya Fiusha. Tamaño de los cuadros= 1 cm².53

Figura 13. Plantas de Pitahaya Fiusha aclimatadas y enraizadas ex vitro con diferentes días guardadas en alta humedad.54

Figura 14. Plantas de Pitahaya Fiusha después de 12 semanas de aclimatadas.54



NOMENCLATURA

%	Por ciento	L	Litro
°C	Grado centígrado	m	Metro
μmol	Micromol	m ²	Metro cuadrado
2iP	N6-(delta 2-isopentenyl)-adenina	mg	Miligramo
AIA	3-Ácido indolacético	min	Minuto
AIB	Ácido 4-indol-3-butírico	mL	Mililitro
ANA	Ácido 1-naftalenacético	mm	Milímetro
BA	6-Benciladenina	MS	Murashige & Skoog
Ca(ClO) ₂	Hipoclorito de Calcio	mT	meta-Topolina
CAM	Metabolismo Ácido de las Crasuláceas	NaOCl	Hipoclorito de Sodio
Cin	Cinetina	NPK	Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K)
cm	Centimetro	p	Peso
CE	Conductividad eléctrica	Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
g	Gramo	psi	Libra por Pulgada Cuadrada
GA ₃	Ácido Giberélico	RCV	Regulador de Crecimiento Vegetal
ha	Hectárea	SAd	Sulfato de Adenina
HgCl ₂	Cloruro de Mercuríco	s	segundo
Kg	Kilogramo	v	Volumen
		ZEA	Zeatina

RESUMEN

Pitahaya o "fruta del dragón", son los nombres que reciben los frutos producidos en las cactáceas del género *Hylocereus*; éstas se caracterizan por ser epifitas con un crecimiento trepador. Los frutos son globosos con escamas foliáceas; su tamaño, sabor, color o forma dependen de la especie y variedad. Es un fruto llamativo por su forma y sabor, de reciente impacto y alto valor monetario. Actualmente existen variedades seleccionadas atractivas para productores y consumidores al contar con diferentes sabores, colores y tamaños. Es importante la producción de plantas sanas y que mantengan el genotipo de la variedad seleccionada, por ello, el objetivo de esta investigación fue desarrollar protocolos para establecer y propagar *in vitro* variedades comerciales de pitahaya a partir de ejemplares adultos.

Se realizaron las cinco etapas de la micropropagación; se partió de cladodios jóvenes de 10-20 cm de largo de las variedades Fiusha, Roja, Blanca y Jenny, los cuales fueron tomados de un predio agrícola; se trataron con etanol al 80 % por un min e NaOCl al 20 % (v/v) con 0.1 % de Tween 80 durante 15 min. Las aréolas individuales fueron colocadas sobre medio MS suplementado con BA (0.0, 3.0, 4.5 y 7.0 mg/L). Se obtuvo entre 6.25 y 15.63 % de contaminación; la brotación ocurrió en la presencia de BA. Para la multiplicación se emplearon segmentos de tallo de 0.5 cm de las variedades Fiusha y Jenny sembrados sobre medio MS suplementado con BA (0.0, 1.0, 3.0 y 6.0 mg/L), Cin (0.0, 1.0, 3.0 y 6.0 mg/L) o TDZ (0.0, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/L), donde se obtuvo una mayor respuesta morfogénica en 1.0 mg/L de BA, produciendo en promedio 3.52 y 5.6 brotes por explante, respectivamente. El enraizamiento *in vitro* de la variedad Fiusha no mostró diferencias significativas al emplear medio 1/3 MS suplementado con AIB (0.0, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/L). En ambas variedades la aclimatación y enraizamiento *ex vitro* ocurrió en el 100 % de los brotes empleando como sustrato perlita y turba en proporción 3:2 y humedecido con una solución de fertilizante NPK (13:40:13) con una CE de 2.20 μ S/cm, la solución contenía 0.5 mg/L IBA y un pH ajustado a 6.5. Después de dos meses las plantas completaron su aclimatación.

ABSTRACT

Pitahaya or "dragon fruit" are the names given to the fruits produced in cacti of the genus *Hylocereus*; these are characterized by being epiphytes with a climbing growth. The fruits are globose with leafy scales; its size, flavor, color or shape depend on the species and variety. It is a striking fruit for its shape and flavor, of recent impact and high monetary value. Currently there are attractive selected varieties for producers and consumers as they have different flavors, colors and sizes. The production of healthy plants that maintain the genotype of the selected variety is important, therefore, the objective of this research was to develop protocols to establish and propagate commercial pitahaya varieties *in vitro* from adult specimens.

The five stages of micropropagation were carried out; it was started from young cladodes 10-20 cm long of the varieties Fiusha, Roja, Blanca and Jenny, which were taken from an agricultural property; they were treated with 80 % ethanol for one minute and 20 % NaOCl (v / v) with 0.1 % Tween 80 for 15 minutes. Individual areoles were placed on MS medium supplemented with BA (0.0, 3.0, 4.5 and 7.0 mg / L). Between 6.25 and 15.63% contamination was obtained; sprouting occurred in the presence of BA. For the multiplication, 0.5 cm stem segments of the Fiusha and Jenny varieties were sown on MS medium supplemented with BA (0.0, 1.0, 3.0 and 6.0 mg / L), Cin (0.0, 1.0, 3.0 and 6.0 mg / L) or TDZ (0.0, 0.1, 0.5 and 1.0 mg / L), where a greater morphogenic response was obtained in 1.0 mg / L of BA, producing on average 3.52 and 5.6 shoots per explant, respectively. The *in vitro* rooting of the Fiusha variety did not show significant differences when using 1/3 MS medium supplemented with IBA (0.0, 0.1, 0.5 and 1.0 mg / L). In both varieties, acclimatization and rooting *ex vitro* occurred in 100 % of the shoots using perlite and peat in a 3:2 ratio as substrate and moistened with a NPK fertilizer solution (13:40:13) with a CE of 2.20 μ S/cm, the solution contained 0.5 mg/L IBA and a pH adjusted to 6.5. After two months the plants completed their acclimatization.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La agricultura, actividad en la cual el hombre maneja recursos para producir y reproducir vegetales, es un sector fundamental que proporciona alimentos, empleo y una derrama económica. Sin embargo, actualmente enfrenta diversos desafíos resultado de factores bióticos, procedentes de plagas, malezas y enfermedades, y abióticos, como sequías, inundaciones, suelos no aptos para el cultivo, variabilidad climática y eventos climáticos más extremos (Hernández-Xolocotzi, 1988; Hurlbert, 2018). Estos fenómenos están aumentando en frecuencia e intensidad, trayendo bajos rendimientos, o en ocasiones, impidiendo perpetuar el cultivo de algunas especies. México es afectado por dichos fenómenos; de entre ellos la sequía es uno de los factores que más daño provoca debido a que poco más de la mitad del territorio nacional presenta climas áridos o semiáridos (Esparza, 2014). La sequía provoca una disminución de la humedad y un aumento de la temperatura, que a nivel agrícola es perjudicial para los principales cultivos ya que al no existir humedad suficiente en el terreno las plantas se atrofian hasta su marchitez (Ojeda-Bustamante *et al.*, 2011).

Se ha optado por innovar en estrategias que permitan sobrepasar los problemas asociados por la sequía y la falta de agua. Entre ellos se encuentran: la modernización de las tecnologías agrícolas empleadas (Singh, 2018), el uso de variedades tolerantes a la sequía, captación de agua, establecimiento de policultivos, agroforestería (Altieri y Nicholls, 2009), y más recientemente la introducción de cultivos más adaptados al clima árido. La pitahaya, fruto procedente de una cactácea (*Hylocereus spp.*), se ha venido cultivando como alternativa en regiones con escasez de agua al brindar un alto impacto económico y al ser capaz de desarrollarse en diferentes tipos de suelos y bajo condiciones climáticas desfavorables para otro tipo de cultivos (Doan *et al.*, 2018), además se adapta a los climas tropicales, subtropicales y semiáridos de México (Legaria-Solano *et al.*, 2005). Bajo condiciones desfavorables, como las

de sequía, la planta se sigue desarrollando debido a que es una especie xerófita, por lo que metabólicamente y morfológicamente ha desarrollado mecanismos que retienen y evitan la pérdida de agua. Algunos que presenta son: el desarrollo de sistemas radicales grandes, tallos con una cutícula gruesa, bajo número de estomas presentes en el tallo, y la acumulación de agua gracias al desarrollo de un parénquima acuífero (Montesinos-Cruz *et al.*, 2015). Además, al ser una cactácea, posee un mecanismo fotosintético CAM que les permite abrir sus estomas por la noche y mantenerlos cerrados en el día, lo que conlleva un ahorro considerable de agua al disminuir la transpiración.

El cultivo de pitahaya económicamente es muy rentable, ya que trajo una alza a los ingresos en regiones donde en ocasiones se perdían cultivos tradicionales por la sequía o por la falta de insumos. En México, el impacto económico en las últimas tres décadas es sorprendente, pues la fruta (exótica) por su sabor, forma y color se comercializa fácilmente en mercados regionales, nacionales y hasta internacionales en Europa, Asia y América, donde se tiene una alta demanda y alcanza un buen precio (Legaria-Solano *et al.*, 2005; García-Rubio *et al.*, 2015; Montesinos-Cruz *et al.*, 2015).

Para establecer un nuevo cultivo de la cactácea se requiere un gran número de plantas por hectárea, que en ocasiones es difícil obtenerlas por los métodos convencionales, además se requiere que sean plantas sanas y mantengan el genotipo de variedades comerciales que han sido seleccionadas. El cultivo de tejidos se ofrece como una alternativa mediante la aplicación de la micropropagación, pues brinda distintas ventajas aprovechables, como las condiciones asépticas (plántulas libres de enfermedades), y permite mantener el genotipo de la variedad si se establece el cultivo a partir de la desinfección de aréolas. Por lo anterior, el objetivo de esta tesis es desarrollar un protocolo para establecer y propagar *in vitro* variedades comerciales de pitahaya (*Hylocereus* spp.) a partir de plantas adultas cultivadas en predios agrícolas.

I. MARCO TEÓRICO

1. LA PITAHAYA (*Hylocereus* spp.)

Pitahaya o “fruta del dragón”, son los nombres que reciben los frutos producidos en las cactáceas del género *Hylocereus*. Actualmente este género está conformado por diecinueve especies, dado que a la pitahaya amarilla (anteriormente *Selenicereus megalanthus*) ya se le considera dentro de dicho género, por lo ahora se le conoce como *Hylocereus megalanthus* (Mejía *et al.*, 2013).

1.1 Características Botánicas

Las plantas del género *Hylocereus* se caracterizan por ser epifitas con un crecimiento trepador mediante raíces aéreas. Los cladodios son verdes (fotosintéticos), suculentos y trialados, con espinas de dos a cuatro milímetros sobre las aréolas dispuestas en los crestados bordes (le-Bellec *et al.*, 2006; Mejía *et al.*, 2013; García-Rubio *et al.*, 2015; Montesinos-Cruz *et al.*, 2015).

La inflorescencia se produce a partir de las aréolas; las flores son las más grandes de la familia Cactaceae, son aromáticas y generalmente presentan una coloración blanca, tienen numerosos estambres y presentan una antesis nocturna (Mejía *et al.*, 2013; García-Rubio *et al.*, 2015; Montesinos-Cruz *et al.*, 2015).

Los frutos se distinguen por ser globosos con escamas foliáceas o puntiagudas con espina, tienen un exocarpo de color amarillo, rojo, magenta, naranja, o fusha, y un endocarpo blanco, amarillo, magenta, rosado o fusha, con numerosas semillas diminutas en color negro que en cantidad están correlacionadas con el tamaño del fruto (García-Rubio *et al.*, 2015; Osuna-Enciso *et al.*, 2016). Las características que presente el fruto como tamaño, sabor, color

o forma dependen tanto de la especie como de la variedad (le-Bellec *et al.*, 2006).

Las especies del género *Hylocereus* son diploides, pero *H. megalanthus* es alotetraploide, posiblemente derivado de una hibridación en la naturaleza entre dos especies diploides (le-Bellec *et al.*, 2006; Mejía *et al.*, 2013).

1.2 Importancia

1.2.1 Importancia Económica

Económicamente el cultivo de pitahaya es muy rentable, sobre todo en regiones donde se presentan sequías, existe escasez de agua y los suelos son pobres nutricionalmente, debido a que es un cultivo tolerante a dichas condiciones y es una planta de rápido crecimiento y fructificación (Montesinos-Cruz *et al.*, 2015).

En México, para el 2017, la superficie sembrada era de 1,683.11 ha, de las cuales 936.89 ya estaban en edad de cosecharse. La producción fue de 5,530.42 toneladas, las cuales dejaron una derrama económica de \$ 77,571,730 (SIAP, 2017).

1.2.2 Importancia Ecológica

Al igual que todas las cactáceas, las especies del género *Hylocereus* son importantes en sus áreas donde se distribuyen de manera natural, debido a que son vitales en el flujo de materia y energía en ciclos biogeoquímicos y cadenas tróficas de no sólo ecosistemas áridos como la mayoría de las cactáceas, sino además de zonas tropicales y subtropicales donde se les encuentra mayormente (Ceroni-Stuva *et al.*, 2006). Estas cactáceas requieren pequeñas cantidades de agua y son capaces de tolerar sequias, el calor, el frío y suelos deficientes de nutrientes, debido a la modificación de su tallo para almacenar agua, la ausencia

de hojas, la presencia de cutículas cerosas y la apertura nocturna de los estomas para la captación de dióxido de carbono (proceso CAM) (Lim, 2012).

En su hábitat natural se desarrollan trepando árboles o rocas (Lim, 2012), y durante su temporada de floración diversas especies de aves, mamíferos e insectos se alimentan de sus recursos florales y polinizan a éstas, que posteriormente al formarse en fruto sirve como alimento para dichas especies y éstas diseminan la semilla (Guerrero *et al.*, 2011). Los cladodios sirven como fuente de alimento para algunas especies, debido a que proveen agua y nutrientes.

1.2.3 Importancia Nutricional

Las especies del género *Hylocereus* poseen un alto valor nutricional, y aunque sus frutos han sido mayormente estudiados, los cladodios también son ricos nutricionalmente. Los cladodios de *Hylocereus* se utilizan en la gastronomía de algunas regiones de México donde elaboran numerosos guisados similares a los que emplean el nopal (*Opuntia* spp.). Al igual que los nopales, los cladodios de pitahaya se emplean cuando son inmaduros.

De acuerdo con estudios realizados sobre la composición nutricional de cladodios tiernos, en dos genotipos de *H. undatus* (CP-171 y CP-182) colectados de una plantación experimental ubicada en Tepoztlán, Estado de Morelos, México, se encontró un contenido de proteína cruda de 11.08 y 12.15 g/100 g de biomasa seca, cenizas de 12.36 y 10.80 g/100 g de biomasa seca, 8.11 y 7.86 g/100 g de biomasa seca de fibra cruda; además de 0.20 y 0.24 % de P, 4.82 y 2.31 % de K, y 0.43 y 0.48 % de Ca (Juárez-Cruz *et al.*, 2012). Mientras que en cladodios de pitahaya de cáscara y pulpa roja (*Hylocereus* sp.) se encontró un contenido de proteína cruda de 1.07 g/100 g de biomasa seca, cenizas de 1.53 g/100 g de biomasa seca, y 1.55 g/100 g de biomasa seca de fibra cruda (ASERCA, 2000). La composición nutricional de los cladodios en pitahaya varía

debido a los genotipos, a factores ambientales, la época del año, la etapa de crecimiento y la edad de las plantas (Juárez-Cruz *et al.*, 2012).

Al igual que en los cladodios, el contenido nutricional varía entre los frutos principalmente por el color de la pulpa, los pigmentos que les dan color se conocen como betalainas, y su cantidad es diferente entre variedades. Estos pigmentos comprenden betacianinas de color rojo-púrpura y contribuyen principalmente a la actividad antioxidante para la protección contra ciertos trastornos relacionados con el estrés oxidativo. En general tienen un contenido de proteína de 1 g/ 100 g de biomasa, 8.3 a 13.5 g/ 100 g de biomasa de carbohidratos, un contenido mineral relativamente alto con potasio, el ion más frecuente, seguido de magnesio y calcio. Y vitaminas A y C principalmente, presentado la A en frutos de pulpa roja-purpura y la C en los de pulpa blanca (ASERCA, 2000; le-Bellec *et al.*, 2006; Lim, 2012; Montesinos-Cruz *et al.*, 2015).

1.3 Distribución

El género *Hylocereus* Britton y Rose (Cactaceae) es nativo de América Latina, muy posiblemente de México. Sin embargo, actualmente se encuentra por las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, siendo *H. undatus* la especie más cosmopolita (le-Bellec *et al.*, 2006; García-Rubio *et al.*, 2015).

En México se pueden encontrar algunas especies en estado silvestre, en Chiapas se ha encontrado a *H. aff. escuintlensis*, *H. ocamponis* se encuentra en Colima, Guerrero, Jalisco y Michoacán, *H. purpusii* en Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí y Sinaloa. La especie *H. undatus* se encuentra en estados de México como Campeche, Chiapas, Guanajuato, Hidalgo, Quintana Roo, Yucatán, Tabasco, Veracruz, Guerrero, Querétaro, Estado de México, Puebla, Oaxaca, Michoacán, Jalisco, San Luis Potosí, Colima y Sinaloa (García-Rubio *et al.*, 2015).

Como cultivo extensivo y/o intensivo se encuentra en distintos países alrededor del mundo, como Vietnam, Colombia, México, Costa Rica, Nicaragua, Australia, Israel, Isla Reunión (Francia), España, E.U.A., Indonesia, Malasia, Taiwán, Tailandia, Filipinas, Sudáfrica, Guatemala, entre otros. El éxito que ha tenido es, entre otras características, por los colores y formas atractivas que tiene el fruto, además de las políticas comerciales de los países productores y exportadores (le-Bellec *et al.*, 2006).

1.4 Variedades de Pitahaya

Dentro de las 19 especies del género *Hylocereus* se presenta una gran cantidad de polimorfismos en el ADN debido a que es la cactácea trepadora de mayor distribución a nivel mundial, lo que implica una probable variación fenotípica en una misma especie (Montesinos-Cruz *et al.*, 2015). Y a pesar de sólo encontrar a nivel comercial algunas especies de pitahaya, se presenta un número incierto de variedades alrededor del mundo.

A pesar de existir una gran cantidad de variedades e incluso híbridos entre éstas, se han identificado en algunas regiones las más representativas. Lobo *et al.* (2016) identificaron las mejores variedades de América Latina y E.U.A., con el objetivo de tener un catálogo muy completo y actualmente las mantienen por propagación asexual. Las características que se utilizan para la identificación de especies son: número de espinas por areola, forma de las espinas, contorno del margen del tallo, la dureza relativa del margen del tallo, y el tamaño y el color del exocarpio del fruto. Para la identificación por variedad se considera el color de la pulpa (Mejía *et al.*, 2013).

En las secciones 1.4.1 a 1.4.2 se describen las variedades empleadas en este trabajo.

1.4.1 Variedad Fiusha (*Hylocereus polyrhizus*)

Esta variedad fue seleccionada y propagada por la empresa Pitamex Pitahaya, su nombre fue dado debido a que el color de su pulpa, al igual que el de su cascara, es de un color rosa fiusha intenso. Es de una baja producción, puesto que produce 5 Kg/planta del fruto, su temporada de producción comprende el periodo de los meses mayo-septiembre. Los frutos son en promedio de 300 g y dulces con un promedio de 16 °Brix.

1.4.2 Variedad Jenny (*Hylocereus* sp.)

Esta variedad fue obtenida en el municipio de Calvillo, Aguascalientes, México donde se cultiva bajo condiciones de campo. Su origen radica en el mismo municipio donde se ha mantenido como huerto de traspatio durante dos generaciones. La actual propietaria del huerto lleva como nombre Jenny, misma que le dio el nombre a la variedad. Su fruto presenta tanto la cascara como la pulpa de un color rosa fiusha intenso.

2. MICROPROPAGACIÓN

La propagación vegetal es una práctica común y necesaria en la horticultura, la fruticultura, silvicultura, entre otros (Bhojwani y Dantu, 2013). En ella se multiplican especies vegetales de manera sexual o asexual, en la primera ocurre una recombinación entre gametos parentales y por lo tanto surge una plántula con una nueva combinación de genes. Sin embargo, en ocasiones se desea preservar caracteres de variedades seleccionadas y se recurre a la propagación asexual a través de esquejes o injertos, pero esta segunda forma de propagación presenta inconvenientes como bajas y lentas tasas de propagación, indisponibilidad de material vegetal todo el año debido a la latencia inverna y la probable diseminación de enfermedades (Anderson, 1980; Bhojwani y Dantu, 2013; Mondal, 2014).

El cultivo de tejidos se ofrece como solución hacia los problemas que se presentan en la propagación convencional mediante la micropropagación. Esta técnica permite: obtener una gran cantidad de plantas en un corto tiempo y espacio, tener una continua alta tasa de multiplicación debido a que es posible controlar eficazmente luz, temperatura, cantidad de nutrientes y reguladores de crecimiento, mantener o incluso eliminar patógenos presentes dentro o sobre los tejidos, y las plantas pueden llegar a adquirir nuevos rasgos que pudieran ser aprovechados agronómicamente (Bhojwani y Dantu, 2013).

La micropropagación es una técnica que forma parte del cultivo de tejidos. Se define como la propagación verdadera de un genotipo seleccionado utilizando técnicas de cultivo *in vitro* (Debergh y Read, 1991). Por los años setentas, T. Murashige desarrolló los conceptos de inicialmente cuatro etapas que van desde el establecimiento *in vitro* del cultivo, hasta la aclimatación de múltiples clones a condiciones de invernadero (Anderson, 1980). Más tarde se agregó la etapa cero en la que se prepara la planta madre antes de ser establecida en condiciones *in vitro* (Debergh y Read, 1991).

La micropropagación comprende cinco etapas (0-4) las cuales se describen de la sección 2.1 a 2.5, cada una tiene requerimientos específicos: Etapa 0: etapa donde se selecciona y prepara la planta que proporcionará explantes; Etapa 1: se inicia el cultivo aséptico; Etapa 2: multiplicación vegetativa; Etapa 3: desarrollo y enraizamiento de brotes; y Etapa 4: transferencia de plantas a condiciones de invernadero (Bhojwani y Dantu, 2013). En la sección 3 se mencionan algunos trabajos ya realizados para la micropropagación en pitahaya.

2.1 Etapa 0: Selección y Preparación de la Planta Madre

La planta madre es aquella donadora de tejidos para su posterior cultivo *in vitro*. En esta etapa se cuida dicha planta en condiciones más higiénicas para reducir los problemas de contaminación en el cultivo *in vitro*, especialmente los relacionadas con hongos (Debergh y Read, 1991). Además se incluyen cuidados relacionados con luz y temperatura, y el uso de reguladores de crecimiento para obtener brotes limpios y jóvenes (Bhojwani y Dantu, 2013).

Se debe prestar especial atención a la selección de las plantas madre de dos maneras, la primera es que deben estar libres de cualquier síntoma de enfermedad (George, 2008), debido a que la micropropagación requiere condiciones asépticas. La segunda son los rasgos fenotípicos que muestra, ya que en la micropropagación se obtendrán clones de ella y, si es posible, deben presentar los mejores rasgos posibles.

2.2 Etapa I: Establecimiento de un Cultivo Aséptico

El propósito de esta etapa es obtener cultivos asépticos (sin la presencia de microorganismos) del material vegetal seleccionado (Debergh y Read, 1991). Un factor importante es la elección del explante, generalmente se usan brotes apicales, que, aunque se encuentran casi libres de patógenos y presenten una respuesta rápida, tienden a oxidarse con mayor facilidad (Anderson, 1980).

El éxito en esta etapa requiere que los explantes se transfieran a un medio de cultivo libre de contaminantes microbianos y pudiendo o no contener reguladores de crecimiento que induzcan una respuesta (brotación o formación de callo). Después de un corto período de incubación, se descarta cualquier contenedor que tenga explantes sin brotes o el medio contaminado (George, 2008).

2.3 Etapa II: Multiplicación

En esta etapa el cultivo suministra brotes para producir nuevas plantas o segmentos nodales que, cuando se separan del cultivo, pueden dar lugar a plantas completas (Debergh y Read, 1991; George, 2008). La multiplicación se puede llevar a cabo a partir de brotes axilares o adventicios recién obtenidos, embriones somáticos o depósitos de almacenamiento en miniatura u órganos reproductores (George, 2008), pero independientemente de la manera ocurren mutaciones que pueden ser toleradas ocasionalmente o no dependiendo del interés de la planta (Debergh y Read, 1991).

Los reguladores de crecimiento apropiados y su concentración intervienen en el desarrollo adecuado de las plantas y su tipo de organogénesis. Principalmente se emplean dos grupos, citocininas y auxinas; la elección de cada una de ellas es fundamental para alcanzar una máxima producción de brotes. Entre las citocininas comercializadas se encuentra a las sintéticas como cinetina (Cin), N⁶-benciladenina (BA), y tidiazuron (TDZ), además de otras naturales como Ng-isopenteniladenina (2iP), zeatina (Zea) y meta-topolina (MT). Las auxinas utilizadas en la proliferación axilar y adventicia son ácido indol-3-acético (IAA), ácido indol-3-butírico (IBA) y ácido naftaleneacético (NAA), siendo ésta última sintética (Anderson, 1980).

Para elegir la citocinina y/o auxina adecuada para obtener el número máximo de brotes por subcultivo se realizan experimento variando las concentraciones de las dos hormonas, generalmente se emplean diez tratamientos con diez

replicas. Consisten en un control de citocinina, y concentraciones bajas, medias y altas por litro de cada una, y la auxina ausente o presente en una concentración basal. Después de encontrar una concentración basal los posteriores subcultivos se realizan en el mismo tratamiento (Anderson, 1980).

Esta etapa incluirá la inducción previa de centros meristemáticos a partir de los cuales se pueden desarrollar órganos adventicios. Algunos de los segmentos nodales producidos se pueden usar como base para otros ciclos de multiplicación, ya que generalmente se pueden cultivar nuevamente (subcultivar) para aumentar su número (George, 2008). Bajo tales condiciones, los tejidos pueden permanecer en esta etapa durante varias generaciones (Debergh y Read, 1991).

2.4 Etapa III: Preparación Para el Crecimiento *ex vitro*

Los brotes o las plántulas derivadas de la Etapa II son pequeños y aún no son capaces de sostenerse por sí mismos sobre un sustrato, por lo que en esta etapa se toman medidas para que estas plantas sean capaces de llevar a cabo la fotosíntesis, y la supervivencia sin un suministro artificial de carbohidratos. Como originalmente propuso Murashige, se pueden enraizar *in vitro* los brotes antes de su transferencia al suelo (George, 2008).

Los métodos para inducir el enraizamiento y aumentar el tamaño de los brotes que se emplean, principalmente son: a) bajas concentraciones de sales inorgánicas en el medio, b) el empleo de auxinas, c) la adición de adsorbentes como carbón activado, d) el empleo de bajas concentraciones de gelificante en el medio, y e) el uso de luz roja para estimular el enraizamiento (Anderson, 1980).

2.5 Etapa IV: Transferencia a Condiciones de Invernadero

En esta etapa final, las plantas se trasplantan a un medio de enraizamiento adecuado (como una composta de turba) y se mantienen durante varios días en condiciones de alta humedad e intensidad de luz reducida (George, 2008). Si no se realiza con cuidado esta etapa, se puede perder una cantidad significativa del material propagado y en esta etapa la eficiencia es muy importante (Debergh y Read, 1991; George, 2008). También las plantas deben lavarse a fondo para eliminar cualquier rastro del medio de cultivo, pues pudiera contribuir al crecimiento de microorganismos que pueden llegar a evitar el correcto desarrollo de la planta (Anderson, 1980).

Las plántulas cultivadas *in vitro* deben lavarse a fondo para eliminarles el medio y así inhibir el crecimiento de microorganismos. Las plantas desarrolladas *in vitro* requieren de condiciones similares cuando se les extrae del recipiente, por lo que se debe hacer un retorno gradual a las condiciones de invernadero (Debergh y Read, 1991). Las plantas *in vitro* presentan varios cambios comparados con una planta en condiciones normales, las cultivadas *in vitro* tienen menos cera cuticular, los estomas pueden ser atípicos e incapaces del cierre completo, y debido a que se les suministra una fuente de carbono no son completamente autótrofas. Por ello se les tiene que aclimatar gradualmente hasta que sean autótrofas (George, 2008).

3. ANTECEDENTES SOBRE EL CULTIVO *in vitro* DE PITAHAYA

Infante (1992) multiplicó *H. setaceus* vía organogénesis directa e indirecta (embriogénesis somática). Para el establecimiento emplearon semillas, las cuales desinfectaron con NaOCl al 10 % durante 15 min, después les realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Posterior a la germinación, colocaron los epicótilos sobre medio MS suplementado con ANA (0.01, 0.05 ó 0.1 mg/L) y BA (0.5 ó 1.0 mg/L) con la presencia o ausencia del ápice. El enraizamiento lo realizaron transfiriendo los brotes a medio MS suplementado con 0.02 mg/L de AIB (Infante, 1997) y después aclimataron las plantas a condiciones de invernadero. Para la inducción de tejido calloso colocaron los cotiledones y raíces sobre medio MS suplementado con ANA (0.5 ó 1.0 mg/L). Después de obtener embriones somáticos transfirieron los explantes a medio sin la presencia de RCV. En el establecimiento no obtuvieron contaminación y la tasa de germinación fue del 94 %. En la multiplicación el mejor tratamiento fue 1.0 mg/L de BA más 0.05 mg/L de ANA tanto para explantes con o sin ápice, dando un promedio de 6.0 y 7.8 brotes por explante, respectivamente. El enraizamiento comenzó después de dos semanas y fue óptimo a la cuarta semana. En el otro experimento obtuvieron zonas con tejido calloso después de una semana a partir de la región de corte; para la octava semana observaron embriones somáticos que comenzaron a germinar, dando lugar a los cotiledones, epicótilo y radícula.

Drew y Azimi (2002) micropropagaron pitahaya roja (*H. undatus*) a partir de areolas obtenidas de brotes recientes. La desinfección la realizaron con etanol caliente (40 °C) al 70 % por dos min, seguido de NaOCl al 1 % durante 20 min, y tres enjuagues con agua destilada estéril. Para la multiplicación emplearon distintos explantes (tallo con areolas, tallo sin areolas, areolas individuales, ápices) cultivados sobre medio MS suplementado con 2iP (0, 0.4 y 1.0 mg/L), además evaluaron el efecto del número de areolas por explante en un medio sin RCV, así como la influencia de la densidad en el recipiente de cultivo sobre el desarrollo de los brotes. El enraizamiento lo realizaron empleando 2.0 mg/L de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

AIB con una exposición de cero a siete días. Encontraron que la brotación se llevaba a cabo en un menor tiempo conforme aumentaba la cantidad de 2iP, siendo mejor la concentración 1.0 mg/L, además que los explantes requieren segmentos de tallo con areolas para la obtención de brotes, los cuales generalmente surgen de las areolas más superiores, y que dejando un solo espiral se obtenían en promedio 2.7 brotes por explante (1 ó 0.7 brotes más que el resto de los tratamientos). En cuanto a la densidad, a pesar de obtener un porcentaje mayor de respuesta y un mayor promedio de brotes por explante cuando sólo se colocaba uno por recipiente, los brotes obtenidos por recipiente no justifican su uso, debido al costo que esto implicaría y la cantidad de brotes que se obtienen por recipiente en el resto de los tratamientos. En cuanto al enraizamiento no obtuvieron un efecto significativo del AIB y el promedio de raíces producidas por explante varió entre 1.75 a 2.2.

Mohamed-Yasseen (2002) estableció y multiplicó *in vitro* *Hylocereus undatus* a partir de brotes extraídos de plantas adultas, los cuales trató en un principio con el detergente Alconox[®], después los colocó en etanol (70 % v/v) por 15 s, una inmersión en una solución de NaOCl (0.79 % v/v) por 10 minutos, y tres enjuagues con agua destilada estéril. Colocó las areolas sobre medio MS suplementado con 0.1 mg/L de ANA y 0.11 mg/L de TDZ. Una vez que obtuvo brotes trialados, los decapitó y seccionó longitudinalmente en segmentos monocrestados, los cuales colocó en medio MS suplementado con ANA y TDZ, una vez obtenidos los brotes los creció con 0.1 mg/L de ANA y 0.11 mg/L de TDZ. Los brotes fueron elongados y enraizados en medio MS sin reguladores y la aclimatación la realizaron sobre tierra de maceta. Encontró que el mejor tratamiento fue emplear segmentos sólo decapitados y colocados sobre medio MS adicionado con 0.1 mg/L de ANA y 0.11 mg/L de TDZ donde obtuvo el 100 % de respuesta, un promedio de 8.7 brotes por explante con un tamaño aproximado de 22.2 milímetros.

Pelah *et al.* (2002) desarrollaron un protocolo de regeneración a partir de diferentes tejidos de pitahaya amarilla (*H. megalanthus*) para más adelante ser

empleado como parte del proceso de mejorar el germoplasma a través de la transformación genética. El establecimiento lo realizaron a partir de plántulas de 10 días de germinadas, las cuales colocaron en etanol al 70 % (v/v) durante un min, después en NaOCl al 1.5 % con gotas de Tween 20 durante 10 min., seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Dividieron los cotiledones hipocótilos y epicótilos en segmentos distales y proximales, y los colocaron en medio MS suplementado con TDZ a 0, 18.62, 37.24 ó 74.48 mg/L. Después de 30 días transfirieron los callos a medio sin RCV para el alargamiento de los brotes, y éstos los colocaron en medio MS con 1.0 mg/L de ANA para su enraizamiento. La aclimatación la realizaron sobre turba, perlita y vermiculita (1:1:1) como sustrato. Encontraron que en los tratamientos que tenían TDZ se producía tejido calloso de color verde amarillento después de 14 días sólo en los segmentos proximales de cotiledones, siendo mejor a una concentración de 37.24 mg/L dando en promedio casi 8 brotes por explante; además probaron alargar los brotes con BA o GA₃, pero obtuvieron mejor resultado en medio sin RCV, el 100 % de los brotes fueron enraizados con ANA y en la aclimatación obtuvieron un 90 % de supervivencia después de 2 meses.

Benega-Garcia *et al.* (2009a) determinaron los efectos de la concentración de sacarosa y del genotipo sobre el cultivo *in vitro* de óvulos no fecundados de los genotipos E-123 y J-80 de *H. megalanthus*, 89-028 de *H. polyrhizus*, y el 89-024 de *H. undatus*. Además, regeneraron plantas dihaploides de los genotipos del alotetraploide *H. megalanthus* a través de ginegénesis directa e indirecta. Esterilizaron botones florales comenzando con una inmersión en etanol al 70 % durante 1 min, seguido de una solución de Ca(ClO)₂ al 1.5 % durante 10 min, les realizaron tres enjuagues con agua didestilada estéril. Eliminaron pétalos y sépalos, y colocaron los óvulos inmaduros sobre medio MS suplementado con 2,4-D/TDZ (0.5 mg/L de cada uno), y variaron la concentración de sacarosa (0.09, 0.18 y 0.26 M); además los incubaron en oscuridad. Una vez que obtuvieron óvulos agrandados los transfirieron a medio MS suplementado con 0.2 mg/L de 2,4-D más 0.5 mg/L de TDZ, cuando observaron embriones y callos gineogénicos transfirieron los explantes a un medio sin RCV. Los brotes que

obtuvieron los transfirieron a una mezcla de turba, perlita y vermiculita en partes iguales. Analizaron mediante citometría de flujo plántulas bien desarrolladas para determinar el nivel de ploidía. La mejor respuesta ovular varió entre los genotipos, pero la formación de tejido calloso y embriogénesis sólo la observaron en los genotipos E-123 y J-80. Observaron dos vías morfogénicas de embriones ginegénicos, es decir, la indirecta donde ocurre desdiferenciación celular, proliferación de callos y diferenciación de las células, y la directa donde la ginegénesis ocurrió sin la presencia de tejido calloso. Mediante la citometría de flujo encontraron que obtuvieron plantas dihaploides, triploides y tetraploides.

Benega-García *et al.* (2009b) obtuvieron plantas haploides a través de la embriogénesis directa y la conversión de plantas a partir del cultivo de anteras de los genotipos J-80 de *H. megalanthus*, 89-028 de *H. polyrhizus*, y el 89-024 de *H. undatus*. Esterilizaron botones florales comenzando con una inmersión en etanol al 70 % durante 1 min, seguido de una solución de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ al 1.5 % durante 10 min., les realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Eliminaron pétalos y sépalos, y colocaron las anteras sobre medio MS suplementado con TDZ, 2,4-D o Picloram/BA. Obtuvieron una respuesta embrionaria androgénica directa en el genotipo J-80 sin Picloram/BA, mientras que en el genotipo 89-028 obtuvieron un único embrión con 0.1 mg/L de TDZ. Aclimataron las plantas con éxito y mediante citometría de flujo encontraron que obtuvieron plantas monoploides, haploides, dihaploides y mixoploides.

Avalos-Esparza (2010) propagó *in vitro* pitahaya de pulpa blanca (*Hylocereus undatus*) a partir de su establecimiento por semillas, las cuales trató con jabón aséptico Dermoclean[®], un lavado con etanol (70 % v/v) durante 30 s, una desinfección con NaOCl (Cloralex[®]) al 20 % durante 20 a 30 min y tres enjuagues con agua destilada. Las semillas fueron sembradas sobre medio MS con 3 % de sacarosa y 10 g/L de agar. Después de la germinación, cuando los brotes alcanzaron una altura de 0.6 – 1.0 cm los multiplicó con diferentes citocininas, obteniendo hasta 12 brotes por explante con *mT* a 1.5 mg/L y colocando los explantes de manera horizontal. El mejor tratamiento para el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

enraizamiento fue MS normal y para la aclimatación empleó como sustrato una mezcla de tierra de hoja más vermiculita en una relación de 3:1, obteniendo un 50 % de supervivencia de las plantas a condiciones de invernadero.

Dahanayake y Ranawake (2011) regeneraron brotes de *H. undatus* a partir de hojas y tallos obtenidos de plantas germinadas *in vitro*. Para el establecimiento desinfectaron las semillas con etanol al 70 % durante 2 min y con una solución de NaOCl al 1 % más Tween 20® al 6 %, y las enjuagaron con agua destilada estéril. Para la regeneración emplearon medio MS suplementado con 0.01 mg/L de ANA más tres concentraciones de BA (2, 2.5, 3 mg/L); para tallos cortaron segmentos de 0.5 cm, y las hojas en cuadros de 0.5 cm² y colocadas con la parte adaxial hacia el medio. El enraizamiento lo realizaron colocando brotes de un tamaño superior a 1.5 cm sobre medio MS suplementado con 0.01 mg/L de ANA. Encontraron que el tipo de explante influye en la capacidad de regeneración, puesto que cuando el medio contenía 0.01 mg/L de ANA más 2.5 mg/L de BA los tallos produjeron 18 brotes, mientras que las hojas sólo 3. Las raíces surgieron después de dos semanas y éstas fueron delgadas, ramificadas y de color marrón.

de Feria *et al.* (2012) establecieron y multiplicaron una variedad silvestre en peligro de extinción de *H. purpusii* a partir de semillas extraídas de frutos cosechados de plantas silvestres. Realizaron experimentos para la desinfección variando la concentración de NaOCl (1, 1.5 y 2 %), en la germinación variando la concentración del medio MS (25, 50, 75 y 100 % de sales), y en la multiplicación emplearon segmentos apicales de 5 cm de largo colocados sobre medio MS suplementado con BA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ó 3.0 mg/L), segmentos basales y apicales como fuente de explante, y variando la concentración de AIA (0.2, 0.4 y 0.6 mg/L) en combinación con BA. Encontraron que el mejor tratamiento de desinfección consistió en un lavado con NaOCl (1.0 % p/v) por 15 min pues obtuvieron un 90 % de germinación y sólo 13.3 % de contaminación, en la concentración de sales del medio no encontraron diferencias entre los tratamientos. En la multiplicación empleando sólo BA, a

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pesar de tener un mayor número de brotes con 2.0 mg/L de BA, fueron de un tamaño promedio de 0.67 cm, mientras que en la concentración de 2.5 mg/L se obtuvieron 6.9 brotes de un tamaño promedio de 1.75 cm. Sin embargo, encontraron que con la adición de AIA (0.6 mg/L) y manteniendo la concentración de BA en 2.0 mg/L, la producción de brotes se mantenía en 8.8, pero su tamaño aumentaba a 2.75 cm, por lo que se le consideraron el mejor tratamiento. Después de dos meses del inicio de la aclimatación, obtuvieron una supervivencia superior al 98 %. Finalmente, después de seis meses de crecimiento, las trasplantaron a campo.

Menezes *et al.* (2012) micropropagaron pitahaya roja (*H. undatus*) y verificaron la endoreduplicación (duplicación del genoma sin división celular, que resultó en células mononucleadas autoploides) de brotes obtenidos *in vitro* utilizando citometría de flujo. El establecimiento lo realizaron a partir de semillas y emplearon plantas de 120 días de germinadas para la multiplicación, la cual fue realizada en medio MS suplementado con 0.1 mg/L de ANA en combinación con 1.0, 5.0 ó 10.0 mg/L de BA o Cin, además realizaron la incubación en presencia o ausencia de luz. Encontraron que los explantes no tenían desarrollo en ausencia de luz y que el mejor tratamiento para la obtención de brotes es medio MS suplementado con 5.0 mg/L de Cin y 0.1 mg/L de ANA, dando en promedio 2.39 brotes por explante, con un tamaño de 1.74 cm y sin la presencia de tejido calloso. Observaron endoreduplicación en todos los tratamientos, siendo mayor en el tratamiento de medio MS suplementado con 10 mg/L de BA y 0.1 mg/L de ANA.

Ojeda-Zacarías *et al.* (2012) multiplicaron *in vitro* pitahaya de pulpa blanca (*Hylocereus undatus*) a partir de semillas, las cuales germinaron sobre charolas de germinación y cuando obtuvieron plántulas tomaron los ápices para establecerlos *in vitro*. Para la desinfección emplearon etanol al 70 % durante 30 s y NaClO al 10 % por 10 min, y tres enjuagues con agua destilada estéril, después los establecieron sobre medio MS suplementado con Zea, Cin y BA (1 ó 2 mg/L), en la multiplicación emplearon el mismo medio y los mismos

reguladores en diferentes combinaciones. Posterior a la desinfección obtuvieron 0 % de contaminación y en todos los tratamientos produjeron brotes; por otra parte, en la multiplicación encontraron que cuando se empleaba en el medio 2 mg/L de BA + 1 mg/L de Zea ó 2 mg/L de BA + 1 mg/L de Cin obtenían un promedio de 21.35 brotes por explante después de 12 semanas. Dejando los mismos experimentos pero durante un periodo de 24 semanas obtuvieron un promedio de 97.83 y 81.83 brotes por explante, respectivamente.

Viñas *et al.* (2012) micropropagaron el cultivar Cebra (*Hylocereus costaricensis*) a partir de cladodios de plantas adultas. Pretrataron a los tallos con una solución fungicida/bactericida antes del establecimiento *in vitro*. Posteriormente realizaron experimentos con el protocolo de desinfección (variando la concentración de NaOCl en 1.0 ó 1.5 %), el tamaño del explante al momento de la desinfección (1-2 cm ó 5-7 cm), el medio inicial (suplementado con 0, 1.12, 3.38, 6.76, 10.14 ó 13.5 mg/L de BA), la posición de la aréola en el cladodio (distal, central o basal), las concentraciones de BA para la multiplicación (0, 0.22, 0.45, 1.12, 3.38 ó 6.76 mg/L), los sustratos para aclimatación (vermiculita más turba, perlita más turba, o perlita sola), y además compararon el desarrollo en campo entre plantas micropropagadas y las propagadas convencionalmente. Encontraron que el mejor protocolo de desinfección consistió empleando segmentos de 5-7 cm y tratados con: un lavado con Extran® (0.1 % p/v) por 10 minutos, seguido de uno con etanol (70 % v/v) por 30 s, después una inmersión en una solución de Agromycin + Benomyl (2 g/L de cada uno) durante 30 minutos, otro paso con NaOCl (1.0 % p/v) + Tween 20® (1 gota/100 mL) por 15 minutos y tres enjuagues con agua destilada; ya que no obtuvieron contaminación. Además obtuvieron mejor resultado tomando aréolas de la región media del cladodio con una respuesta de 82.5 %, y estableciéndolas en un medio con 6.76 mg/L de BA, después multiplicar en uno con 0.22 mg/L de BA para obtener un promedio de 3 ± 0.3 brotes por explante, aclimatar las plántulas sobre sustrato Perlita + Turba (2:1) con 96.4 % de supervivencia y observaron que las plantas obtenidas por micropropagación crecieron y

fructificaron hasta seis meses más rápido que las propagadas convencionalmente.

Cisneros *et al.* (2013) desarrollaron una técnica para rescatar embriones y regenerar plantas después de cruza interespecíficas interploides entre los genotipos 90-001 y 90-003 de *H. megalanthus* con los genotipos de *H. monacanthus* 89-027 y 89-028, o el 89-024 de *H. undatus* (4x × 2x). Realizaron polinizaciones manuales y controladas siempre empleando a *H. megalanthus* como progenitor femenino, después buscaron el momento óptimo para el rescate del óvulo 10 o 30 días después de la polinización. Esterilizaron los frutos en desarrollo con una inmersión en una solución de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ al 1.5 % durante 10 min, y les realizaron tres enjuagues con agua didestilada estéril. Eliminaron los ovarios con su funículo y tejido placentario, y colocaron los óvulos fertilizados sobre medio MS suplementado con 100 mg/L de glutamina, 0.1 mg/L de ANA, 0.08 mg/L de TDZ y 0.17 M de sacarosa. Los embrioides en desarrollo los transfirieron a medio MS con la mitad de sus sales sin RCV. Aclimataron las plantas empleando perlita como sustrato y al final las analizaron con citometría de flujo y técnicas de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) para verificar que fueran híbridas. Encontraron que la mejor respuesta del óvulo se registró a los 30 días después de la polinización, además que el desarrollo del embrión se ve afectado por la concentración de sacarosa, siendo más eficiente con 0.17 M. Obtuvieron una supervivencia de más del 70 % de los híbridos. El análisis de citometría de flujo reveló que obtuvieron plantas diploides, triploides y tetraploides; mientras que el análisis por AFLP las identificó como híbridos genuinos.

Qing-Jie *et al.* (2013) multiplicaron *in vitro* el cultivar de pitahaya roja 'Zihonglong' (*H. undatus*) vía organogénesis directa e indirecta, y para detectar cualquier variación somaclonal entre las plantas obtenidas analizaron los brotes a través de 422 marcadores de Inter-Secuencias Simples Repetidas (ISSR). Emplearon brotes de entre 3 y 4 cm, y los colocaron en etanol al 75 % (v/v) durante 40 s; la esterilización la realizaron mediante una inmersión en una

solución de HgCl₂ al 0.1 % (v/v) durante 8 minutos, realizaron hasta cinco enjuagues, después los colocaron sobre medio MS suplementado con 0.17 mg/L de GA₃. La regeneración la realizaron con MS suplementado con BA (0.11, 0.22, 0.33, 0.45 ó 0.56 mg/L), Cin (0.1, 0.21, 0.32, 0.43 ó 0.54 mg/L) o TDZ (0.09, 0.18, 0.28, 0.37 ó 0.47 mg/L) y en combinación con 0.09 mg/L de ANA, después realizaron los mismos experimentos pero sin la presencia de ANA. Cuando encontraron un medio óptimo (0.45 mg/L de BA más 0.09 mg/L de ANA), realizaron quince subcultivos. El enraizamiento lo realizaron en medio MS líquido con la mitad de sus sales, adicionado con AIB (0.08, 0.16 ó 0.32 mg/L), ANA (0.07, 0.15 ó 0.3 mg/L) o AIA (0.07, 0.14 ó 0.28 mg/L) y con perlita como soporte. La aclimatación la hicieron con plántulas enraizadas y libres de medio y perlita, emplearon como sustrato una mezcla de tierra para maceta y arena (1:1). Para la detección de los marcadores de ISSR seleccionaron 47 brotes al azar. Después del establecimiento la contaminación no supero el 5 %; el mejor tratamiento fue 0.45 mg/L de BA más 0.9 mg/L de ANA, puesto que obtuvieron un 90 % de explantes con respuesta y un promedio de 8.2 brotes por explante. El mejor tratamiento de enraizamiento *in vitro* fue el uso de ½ MS suplementado con 0.15 mg/L de ANA, puesto que obtuvieron 8.6 raíces con un tamaño de 6.8 cm, además de que los brotes eran vigorosos y las raíces fuertes. Después de comparar genéticamente la planta madre con los brotes obtenidos después de 15 subcultivos no obtuvieron bandas polimórficas; es decir, no se detectaron *loci* aberrantes entre los brotes multiplicados a través de 15 ciclos, lo que demostró que se puede garantizar una alta fidelidad genética utilizando la regeneración y conservación del germoplasma. En la aclimatación obtuvieron un 93 % de supervivencia y todas las plantas transferidas a campo sobrevivieron.

Caetano-Nunez *et al.* (2014) enraizaron y multiplicaron *in vitro* pitahaya amarilla (*H. megalanthus*) vía organogénesis indirecta. Emplearon cladodios de un genotipo seleccionado, los cuales desinfectaron con Tween 20 (1 %) durante 10 min, después en etanol al 70% por 1 min y NaOCl al 3 % por 10 min. A partir de brotes crecidos bajo condiciones *in vitro* utilizaron 2,4-D (0.0000005, 0.00000072 y 0.00000094 mg/L), BA (0.0000005 mg/L) y TDZ (0.000037,

0.000056 y 0.000074 mg/L) en medio MS en luz u oscuridad para obtener tejido calloso, después emplearon otros medios para obtener brotes, y con medio MS que contenía 1.0 mg/L de ANA las enraizaron. Los tratamientos que produjeron callo regenerante fueron los que contenían BA y TDZ, tanto en luz como oscuridad, a excepción de unas porciones no regenerantes en tratamientos con luz. En todos los tratamientos de regeneración obtuvieron en promedio un brote por explante, pero en un medio sin RCV obtuvieron 0.13 y 0.23 más brotes/callos. Además confirmaron mediante un análisis histológico la vía de regeneración al observar la formación de estructuras primordiales a partir del tejido calloso.

Mukminah *et al.* (2014) micropropagaron *H. costaricensis* variando la formulación del medio al agregar dos fertilizantes (Gandasil D y Growmore), para encontrar un medio adecuado. El establecimiento lo realizaron a partir de semillas, el medio basal para la multiplicación fue MS con Gandasil D y/o Growmore (1 ó 2 g). Encontraron que el medio MS suplementado con 1 g de Growmore y 1 g de Gandasil D producía brotes en menor tiempo (6.13 días); y a pesar de que el número de raíces no se ve afectado por el medio, lo largo fue mejor con este medio, además de que produjo plantas con mayor biomasa.

Suárez-Román *et al.* (2014) multiplicaron pitahaya amarilla (*H. megalanthus*) y roja (*H. polyrhizus*) vía organogénesis somática a partir de hojas cotiledonares y fragmentos de epicótilos. Inicialmente sembraron sobre sustrato semillas certificadas y después de 20 días de germinadas tomaron los epicótilos y cotiledones, para desinfectarlos emplearon primero una solución de Tween 20, seguido de etanol al 70 % y después NaOCl al 3 % durante 10 min, finalizaron con tres enjuagues con agua destilada estéril. Los establecieron en medio MS suplementado con ANA más alguna citocinina (BA, BA, Cin), para la multiplicación emplearon los mismos medios y dividieron los explantes en la posición del tallo (apical, intermedio y basal). Las plantas con al menos un brote las trasplantaron a sustrato y colocaron en humedad relativa alta o en condiciones de invernadero. Posterior al establecimiento obtuvieron un máximo de cuatro brotes a partir de hojas y entre tres y nueve a partir de tallo, en medio

MS suplementado con 2 mg/L de BA y Cin, o en el medio que empleaba ANA más BA (3.0 + 0.1 mg/L ó 0.1 + 3.0 mg/L, respectivamente). Para la obtención de brotes encontraron que el empleo de 2.0 mg/L de BA y Cin daba una mayor cantidad de brotes, siendo aproximadamente 3 para cada especie, pero si se empleaban segmentos sin ápice podía incrementar hasta 9. En cuanto a la aclimatación obtuvieron el 100 % de ésta, obteniendo mayor cantidad de brotes en un ambiente con humedad relativa alta y una mayor cantidad de raíces empleando arena y vermiculita como sustrato.

Hua *et al.* (2015) desarrollaron un sistema de multiplicación *in vitro* de las cultivares Guangming no. 2 (*H. undatus*), Hongbaoshi (*H. polyrhizus*) y seis híbridos obtenidos de la cruce entre ellas (*H. polyrhizus* × *H. undatus*). Las establecieron a partir de brotes recientes como explante, emplearon etanol al 75 % (v/v) por un min y HgCl₂ al 1 % (p/v) durante 10 min, los enjuagaron cinco veces agua destilada estéril y fueron sembrados sobre medio MS sin RCV, una vez que obtuvieron brotes, tomaron explantes de 0.5 cm y los multiplicaron y enraizaron empleando 0 – 7.0 mg/L de Zea, 0 – 2.5 mg/L de TDZ, 0 – 3.0 mg/L de 2,4-D y 0 – 7.0 mg/L de BA, 0.25 – 0.5 mg/L de AIB o 0.1 – 0.25 mg/L de ANA bajo diferentes combinaciones. El mejor tratamiento para la multiplicación fue emplear medio MS con 3.0 mg/L de Zea y 0.5 mg/L de AIB, que produjo en promedio más de seis brotes por explante con un tamaño de 2 cm para todos los cultivares, sin la presencia de tejido calloso. Las plantas enraizadas las mantuvieron en condiciones normales y después las transfirieron al campo con una tasa de supervivencia del 100 %. Además, realizaron pruebas con marcadores moleculares para detectar variaciones genotípicas después de once subcultivos, encontraron que el genoma se mantenía, por lo que el protocolo de multiplicación era adecuado.

Thinesh y Seran (2015) generaron tejido calloso *in vitro* de *H. undatus* para más adelante generar brotes vía organogénesis indirecta, el establecimiento lo realizaron a partir de brotes y segmentos de tallo, los cuales enjuagaron con agua destilada estéril, seguido de otro con etanol al 70 % durante un min, y la

esterilización la realizaron usando NaOCl al 5.25 % con 1 mL de Tween 20® durante 20 min. Para los experimentos emplearon medio MS suplementado con BA o TDZ (2.0, 3.0 mg/L) más 0.5 mg/L de ANA. Obtuvieron una contaminación mayor en los brotes (31 %) que en los segmentos de tallo, pero el mejor tratamiento fue para ambos explantes el medio MS suplementado con 3 mg/L de TDZ y 0.5 mg/L de ANA en el que el porcentaje de 62 y 65%, respectivamente; siendo en el primero la obtención de pequeñas yemas y en el segundo la formación de tejido calloso friable.

Zambrano-Forero *et al.* (2015) propagaron *in vitro* la pitahaya amarilla (*H. megalanthus*) a partir de segmentos nodales, evaluaron diferentes combinaciones y concentraciones de las citocininas BA (0.5, 1.0 y 1.5 mg/L) y Cin (0.5, 1.0 y 1.5 mg/L), y la auxina AIA (0.3 mg/L), sobre medio MS. Partieron de plantas ya establecidas a condiciones *in vitro* y como explante usaron segmentos de 1 cm que tenían un brote. Encontraron que el mejor tratamiento para la multiplicación fue 1.0 mg/L de BA que producía en promedio 5.30 brotes por explante de un tamaño superior a 1 cm; para la elongación el tratamiento de 0.5 mg/L de BA produjo brotes de más de 2 cm pero en menor cantidad (3.25 brotes por explante). Para el enraizamiento el tratamiento que resultó en un mayor número de raíces fue 1.0 mg/L de Cin + 0.3 mg/L de AIA dando un promedio de 5.2 raíces por explante de un tamaño superior a los 6 cm.

Lopes *et al.* (2016) indujeron tejido calloso de pitahaya roja de pulpa blanca (*H. undatus*) y determinaron su curva de crecimiento, además evaluaron su potencial embriogénico mediante análisis citoquímicos y verificaron su estabilidad genética mediante citometría de flujo. El establecimiento lo hicieron a partir de la siembra de semillas sobre medio MS; como explante emplearon segmentos de cladodios provenientes de plantas con 70 días de edad, y los colocaron sobre medio MS suplementado con 2,4-D (2 y 4 mg/L) y glutamina (100 y 200 mg/L) en distintas combinaciones. El crecimiento del tejido calloso lo evaluaron con la prueba Scott-Knott, y el potencial embriogénico con microscopio óptico. Mediante un análisis de citometría de flujo evaluaron la

estabilidad genética del tejido calloso. El mejor tratamiento para la inducción de tejido calloso fue 4.0 mg/L de 2,4-D, dando callos en promedio de 4.6 g; la glutamina no influyo en la generación de éste. A los 49 días obtuvieron tejido calloso friable, el cual tiene potencial embriogénico. Mediante la citometría de flujo observaron el fenómeno de la endoreduplicación, el cual se caracteriza por la presencia de células con múltiples ploidías dentro del mismo tejido, lo que sugiere que los callos pueden tener mixoploidía o variación somaclonal.

Montiel-Frausto *et al.* (2016) propagaron *in vitro* *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Britton y Rose para obtener material vegetal sano con potencial económico para los productores de zonas áridas y semiáridas del estado de Oaxaca, México. El establecimiento lo realizaron a partir de semillas, las cuales desinfectaron con una solución al 0.6 % de NaClO por 10 min y las sembraron en medio MS con el 50 % de las sales. Después de 35 días seleccionaron aquellas que tenían un tamaño superior a 1 cm y subcultivaron a medio MS con BA/AIA como tratamiento para la obtención de brotes, que posteriormente fueron enraizados sobre medio MS con diferentes concentraciones de macronutrientes y AIB, finalmente las aclimataron en macetas individualmente. Obtuvieron un 6 % de contaminación microbiana, además el mejor tratamiento para la obtención se brotes era cuando se le adicionaba al medio 1 mg/L de BA donde produjeron alrededor de 20 brotes por explante. En cuanto al enraizamiento *in vitro* obtuvieron un 100 % en todos los tratamientos, y el uso de AIB simplemente alargaba las raíces de forma significativa, recomendando emplear 0.1 mg/L de este regulador. La supervivencia en la aclimatación que obtuvieron fue de 97.1 %.

Lopes *et al.* (2017) establecieron y propagaron pitahaya de pulpa blanca (*Hylocereus undatus*) a partir de semillas, las cuales trataron con Tween 20® durante 1 min, después en alcohol al 70 % v/v durante otro min y en NaOCl al 1 % v/v por 20 min, bajo agitación constante; al final las enjugaron con agua destilada estéril. Las sembraron sobre medio MS y las incubaron con o sin luz. Una vez que obtuvieron brotes los subcultivaron en medio MS con BA (0.0, 0.5,

1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mg/L) para la obtención de brotes, y éstos fueron colocados con distintas concentraciones de AIB para su enraizamiento. Encontraron que la germinación *in vitro* es mejor en presencia de luz y en medio MS diluido a una cuarta parte; la adición de 1.0 mg/L de BA es la más eficiente para la obtención de brotes, dando un promedio de 12.2 brotes. Y colocar los brotes *in vitro* con la adición de 4.0 mg/L de AIB promueve hasta 15.3 raíces con una longitud de 2.9 cm en promedio.

Moreira-Palacios y Sánchez-Rodríguez (2017) compararon la respuesta hacia reguladores de crecimiento vegetal bajo condiciones *in vitro* de dos especies de *Hylocereus* que tienen diferentes hábitos de crecimiento, puesto que *H. ocamponis* crece en ecosistemas secos occidentales de Ecuador, mientras que *H. triangularis* en el bosque tropical lluvioso de la región amazónica del mismo país. Emplearon semillas para el establecimiento, iniciaron lavándolas con 200 mL de agua destilada que contenía 5 gotas de jabón, después una inmersión en etanol al 70 % por 30 s, y NaOCl al 1 % durante 10 min, finalmente las enjuagaron con agua destilada estéril. Una vez obtenidos los brotes, los dividieron en cuatro tipos de explante; apical, medio apical, medio basal y basal, y fueron sembrados sobre medio MS con diferentes RCV. Emplearon TDZ (0.19 y 0.09 mg/L), BA (0.22 y 1.12 mg/L) solas o combinadas con ANA (0.09 mg/L), además como medio inductor de tejido calloso usaron 2.0 mg/L de 2,4-D más 1.0 mg/L de Cin. El tratamiento que emplearon para la desinfección de semillas no resultó en más de 5 % en ninguna de las dos especies. Encontraron que *H. triangularis* responde en mayor proporción que *H. ocamponis*, donde la necrosis fue mayor, además la respuesta fue similar en todos los tipos de explante, a excepción del apical donde el enraizamiento fue mayor. Aunque no fueron demasiados, en *H. triangularis* obtuvieron en promedio de 1.5 brotes por explante al usar 0.09 mg/L TDZ + 0.09 mg/L ANA; mientras que en *H. ocamponis* obtuvieron 0.48 con 1.12 mg/L de BA.

Qin *et al.* (2017) micropropagaron una pitahaya roja (*Hylocereus polyrhizus*) a partir de cladodios maduros con yemas dormantes para su establecimiento *in*

vitro. Iniciaron colocando los explantes en detergente y enjuagando hasta retirar cualquier rastro de tierra, después realizaron una inmersión en etanol al 75 % durante 45 s; para la desinsectación emplearon HgCl₂ a 0.1 y 0.2 % (p/v), finalmente realizaron hasta 8 enjuagues con agua destilada estéril. Emplearon medio MS con BA (4.0, 4.5, 5.0, 5.5 mg/L) y ANA (0.06, 0.08, 0.10, 0.12 mg/L) para el establecimiento y la obtención de brotes. Para enraizar usaron brotes de 2.0 cm de largo y los colocaron sobre medio MS con la mitad de sus sales, además de adicionarlo con ANA (0.3, 0.4, 0.5 mg/L) y AIB (0.1, 0.2, 0.3 mg/L). Una vez que obtuvieron plantas enraizadas les dieron un lavado con fungicida (Bavistin®) al 10 % por 10 min y emplearon humus como sustrato. Sus resultados mostraron que el procedimiento óptimo para la desinfección fue el tratamiento con HgCl₂ al 0.2 % durante 7 min, puesto que obtuvieron sólo un 15 % de contaminación. El mejor tratamiento para la obtención de brotes fue el medio MS suplementado con 5.5 mg/L de BA más 0.1 mg/L de ANA, dando un promedio de 6.4 brotes con una altura de 2.8 cm después de 30 días. Lo mejor para enraizar *in vitro* fue el medio MS a la mitad con 0.5 mg/L de ANA y 0.3 mg/L de AIB, dando un 92 % de enraizamiento con un promedio de 7.21 raíces por explante. En la aclimatación obtuvieron el 100 % de supervivencia.

Potti *et al.* (2019) desarrollaron un método de micropropagación para *H. undatus*. Partieron de plantas crecidas en invernadero y tomaron areolas individuales, las cuales lavaron con una solución de Tween 20 durante tres minutos y desinfectaron con HgCl₂ 0.1 % (v/v) durante un minuto. Emplearon medio MS suplementado con Cin (0.2, 1.5 y 2.0 mg/L), SAd (0.5 mg/L), BA (0.4 mg/L), AIA (0.1 mg/L), ANA (0.1 mg/L) bajo diferentes combinaciones en la multiplicación. El enraizamiento lo realizaron en medio MS suplementado con AIA (0.1.6 mg/L), BA (0.1 mg/L), y ANA (0.1, 0.2 mg/L) bajo diferentes combinaciones. Las plantas enraizadas las transfirieron a un sustrato estéril compuesto por turba y vermicompost (1:1). El mejor tratamiento que obtuvieron en la multiplicación fue en medio MS suplementado con Cin (0.2 mg/L), BA (0.4 mg/L), AIA (0.1 mg/L) y ANA (0.1 mg/L), donde obtuvieron una respuesta del 85 % con promedio de seis brotes por explante que medían más de 2 cm. En el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

enraizamiento obtuvieron una ó dos raíces por brote, llegando a medir hasta casi 10 cm con la adición de 1.6 mg/L de AIA. En la aclimatación obtuvieron una tasa de supervivencia de más del 82 %.

Bozkurt *et al.* (2020) desarrollaron métodos de micropropagación para la obtención de pitahayas de los cultivares American Beauty (*H. guatemalensis*), Halley's Comet (*H. undatus* x *H. guatemalensis*), Vietnam White (*H. undatus*) y Bloody Mary (*H. polyrhizus*). Enjuagaron primero los segmentos de estaca e iniciaron dando un lavado rápido con detergente, después los sumergieron en etanol al 70 % durante 20 s, posteriormente realizaron la desinfección con NaOCl al 1.5 % durante 20 min, finalmente los enjuagaron con agua destilada estéril. Emplearon BA (2.0 y 4.0 mg/L) para inducir la brotación y para la multiplicación, en el enraizamiento emplearon AIB y GA₃ por separado o en combinación. No obtuvieron contaminación después del establecimiento; en la multiplicación el mejor tratamiento fue el uso de medio MS con la adición de 2.0 mg/L de BA para Halley's Comet donde obtuvieron 5.41 brotes, en American Beauty y Bloody Mary con 4.0 mg/L obtuvieron 4.12 y 5.41 brotes, respectivamente; y en Vietnam White obtuvieron un promedio de ~2.0 brotes por explante en ambas concentraciones. El mejor medio para enraizar fue el MS con 1.0 mg/L de AIB, donde obtuvieron un porcentaje de enraizamiento igual o superior al 90 % para todos los cultivares, dando raíces de 2 a 6 cm, también los brotes se desarrollaron de mayor tamaño que en el resto de los tratamientos.

Gonçalves *et al.* (2020) multiplicaron *in vitro* pitahaya roja de pulpa blanca (*H. undatus*) empleando dos medios de cultivo. El establecimiento lo realizaron a partir de segmentos de plantas germinadas *in vitro*. Emplearon el medio de cultivo MS y el QL modificado, además los suplementaron con BA (0, 1.0 y 2.0 mg/L). Encontraron que el medio MS suplementado con 1.0 ó 2.0 mg/L de BA y el QL modificado sin la adición de BA producía entre 4 y 5 brotes por explante, siendo más largos (~2 cm) en los medios que no tenían BA. El mayor número de raíces, así como su longitud fueron mejores en ambos medios sin la adición

de BA, siendo ligeramente mejor en el medio QL modificado, por lo que recomiendo este medio para la multiplicación y enraizamiento.

Ng *et al.* (2020) micropropagaron *H. polyrhizus* adicionando al medio agua de coco, debido a que contiene aminoácidos, minerales y fitohormonas; además variaron la concentración de sacarosa. Partieron de plantas ya establecidas a condiciones *in vitro*, las cuales seccionaron en explantes de 2 cm y los colocaron en medio MS con vitaminas B₅, mismo que suplementaron con 0.03 mg/L de BA y 0.01 mg/L de ANA para la multiplicación, donde además variaron la concentración de agua de coco (0, 2, 4 y 6 % v/v) y de sacarosa (0, 1, 2 y 3 %).

El agua de coco a una concentración de 4 % con la sacarosa en 3 % producía brotes más largos (2.45 ± 0.04 cm); en el enraizamiento aumentaba el número de raíces por brote (11.67 ± 3.32), pero el resultado era mejor cuando se adicionaba 6 % de agua de coco (20.42 ± 2.34), sin embargo, este resultado es comparado con el medio sin la presencia de agua de coco. Sus resultados sugieren que el efecto del agua de coco fue más pronunciado en el alargamiento de los brotes, mientras que la sacarosa influyó más en la fase de enraizamiento.

II. JUSTIFICACIÓN

La pitahaya (*Hylocereus* spp.) es un fruto exótico, llamativo, de reciente impacto y alto valor monetario, puesto que en México las 5,530.42 toneladas del fruto producidas durante el 2017 generaron una derrama económica de \$ 77,571,730. El fruto es producido por una cactácea trepadora capaz de tolerar condiciones adversas como la sequía, el calor, el frío y suelos pobres nutricionalmente, además tiene una baja demanda de agua debido a que la almacena en sus cladodios y abre sus estomas durante la noche para la captación de dióxido de carbono (proceso CAM). Actualmente existe una gran cantidad de variedades seleccionadas, que, al contar con diferentes sabores, colores y tamaños, las vuelve atractivas tanto para los productores, como para los consumidores. Sin embargo, para establecer un nuevo cultivo se requiere de 1,500 a 3,000 plantas/ha sanas y que preserven el fenotipo de la variedad comercial. Dado que la propagación asexual por esquejes requiere una gran cantidad de material vegetal y no asegura la sanidad, y la propagación por semillas no garantiza la preservación de la variedad, con este proyecto se pretende desarrollar un paquete tecnológico para el establecimiento y la propagación asexual masiva *in vitro* de variedades comerciales de pitahaya. Esto partiendo de plantas de campo adultas, garantizando la preservación de la variedad comercial productora del fruto así como su sanidad.

III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar protocolos para establecer y propagar *in vitro* variedades comerciales de pitahaya a partir de ejemplares adultos.

Objetivos Específicos

- ❖ Establecer cultivos *in vitro* de por lo menos dos variedades de interés comercial de pitahaya a partir de la desinfección e inoculación en medio de cultivo de tejidos vegetativos de plantas adultas.
- ❖ Desarrollar sistemas para la propagación masiva *in vitro* de por lo menos dos variedades de interés comercial a través de la producción de brotes por activación de aréolas.
- ❖ Evaluar tratamientos para la inducción de raíces *in vitro* o *ex vitro* y establecer estrategias para aclimatar las plántulas a condiciones de invernadero.

HIPÓTESIS

Los tejidos vegetativos de plantas adultas de pitahaya (*Hylocereus* spp.) permiten la propagación *in vitro* de variedades comerciales.

IV. METODOLOGÍA

MATERIAL VEGETAL

Cladodios de ~30 cm de largo provenientes de plantas de pitahaya en etapa de producción de la variedad Fiusha (*H. polyrhizus*), cultivada bajo condiciones de campo en el municipio de Moroleón, Guanajuato, México (N 20.109008, O -101.200077); y cladodios de la variedad Jenny (*Hylocereus* sp.) cultivada bajo las mismas condiciones en el municipio de Calvillo, Aguascalientes, México (N 21.886237, O -102.670711), fueron colocados en bolsas de polietileno negro con 1 kg de tierra de maceta como sustrato, y mantenidas en condiciones de invernadero hasta su enraizamiento y obtención de nuevos brotes.

ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO EN CONDICIONES *in vitro*

Se colectaron brotes tiernos, de crecimiento activo de las dos variedades de 10-20 cm de largo y se seccionaron en segmentos de crestas de aproximadamente 1-2 cm con una aréola en la parte central. Antes de desinfectar las aréolas, se les dio un lavado de 1 minuto con jabón líquido antiséptico Dermoclean® (10 % v/v) y varios enjuagues con agua corriente, posteriormente se sumergieron durante 1 minuto en etanol al 80 % v/v. La desinfección se realizó sumergiendo las aréolas en un blanqueador comercial a base de NaClO (Clorálex®) al 20 % (v/v) adicionando 0.1 % de Tween 80® (polyoxietilen sorbitán; SIGMA) durante 15 min en agitación constante, después dentro de una campana de flujo laminar se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril durante tres min (1 enjuague por min).

Antes de sembrar las aréolas se retiraron los bordes dañados por la desinfección hasta dejar aréolas individuales con una porción alrededor de cladodio de ~5 mm. Posteriormente fueron sembradas individual y verticalmente en tubos de 25 × 150 mm con 10 mL de medio MS (Murashige y Skoog, 1963), adicionado

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con 3 % de sacarosa, ajustando el pH en 5.8 antes de la adición de agar (0.8 %) y esterilizando en autoclave a 121°C (15 psi) durante 15 min. Fueron empleados cuatro tratamientos con diferentes concentraciones de BA (0.0, 3.0, 4.5 y 7.0 mg/L). Los cultivos se incubaron a 25 ± 2 °C, con una iluminación de $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16 h luz. Los resultados de contaminación se tomaron dos semanas después de la siembra, y se usaron diez areolas para cada tratamiento de cada variedad.

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CITOCININAS EN LA PRODUCCIÓN DE BROTES (MULTIPLICACIÓN)

A partir de cultivos asépticos se obtuvieron pequeños brotes de aproximadamente 0.5 – 1.0 cm de altura que contenían entre ocho y doce areolas. Brotes de la variedad Fiusha se segmentaron en explantes de 0.5 cm, dividiéndolos en apicales y decapitados; se colocaron sobre el medio MS con 3 % de sacarosa, 8 g L^{-1} de agar y pH a 5.8, esterilizado en autoclave a 121 °C y 15 psi de presión durante 15 min., empleando un tratamiento con BA bajo distintas concentraciones (0.0, 1.0, 3.0 y 6.0 mg/L) y se incubaron a 25 °C bajo condiciones de fotoperiodo (16/8) y $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica. El resultado del número de brotes obtenidos por explante se tomó dos meses después de la siembra.

En la variedad Jenny se empleó el medio mencionado anteriormente al igual que sus condiciones, pero se realizaron tres tratamientos con diferente concentración de las citocininas BA (0.0, 1.0, 3.0 y 6.0 mg/L), Cin (0.0, 1.0, 3.0 y 6.0 mg/L) y TDZ (0.0, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/L). Los resultados de número de brotes obtenidos por explante se tomaron dos meses después de la siembra.

ENRAIZAMIENTO *in vitro*

Los brotes bien diferenciados con tamaño mayor a 1.5 cm de la variedad Fiusha se colocaron sobre medio MS modificado (ANEXO B) con 3 % de sacarosa, pH a 5.8; 0.8 % de agar, esterilizado en autoclave a 121 °C y 15 psi de presión durante 15 min., y con diferentes concentraciones de AIB (0.0, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/L). Posteriormente los explantes se incubaron a 25 °C bajo condiciones de fotoperiodo (16/8) y 32 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica. Se colocaron un total de 30 cladodios por tratamiento. Los resultados de porcentaje de enraizamiento y número de raíces por explante se tomaron cuatro semanas después de la siembra.

ACLIMATACIÓN (Y ENRAIZAMIENTO *ex vitro*)

La transferencia a suelo de las plantas se realizó después de la etapa de multiplicación, siendo el enraizamiento *ex vitro* llevado a cabo al mismo tiempo que la aclimatación. Se separaron las masas de brotes en tallos individuales de la variedad Fiusha y se dejaron en un recipiente con alta humedad durante 0, 1, 3 y 6 días. Posteriormente se fue pasando cada brote a charolas de germinación de 98 cavidades (25 cm³ por cavidad) que tenían como sustrato perlita:turba en proporción 3:2 y humedecido con una solución de fertilizante NPK (13:40:13) con una CE de 2.20 $\mu\text{S/cm}$, que contenía 0.5 mg/L IBA y un pH ajustado a 6.5.

Después de la transferencia progresiva de las plantas, se sellaron las charolas con tapas de plástico transparente para mantener la alta humedad relativa. A partir de la segunda semana se comenzó a perforar la tapa hasta que después de dos semanas se destaparon completamente y se llevaron a invernadero. Los resultados de porcentaje de supervivencia se tomaron ocho semanas después de la siembra.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de establecimiento *in vitro* y aclimatación se analizaron estadísticamente mediante una comparación de proporciones con el paquete estadístico MINITAB® 17 STATISTICAL SOFTWARE (2014) con un nivel de confianza del 95 % ($\alpha=0.05$). Y los de multiplicación y enraizamiento *in vitro* se analizaron mediante un análisis de varianza con el paquete estadístico MINITAB® 17 STATISTICAL SOFTWARE (2014) con un nivel de confianza del 95 % ($\alpha=0.05$). Para cualquier valor de $\alpha > \text{valor } P$, se aceptó H_0 , y para cualquier valor de $\alpha \leq \text{valor } p$ se rechazó H_0 .



V. RESULTADOS

ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO A CONDICIONES *in vitro*

El objetivo en esta primera etapa de la micropropagación fue obtener brotes regenerados bajo condiciones asépticas, por lo que se desinfectó las aréolas con una porción de cladodio de las variedades Fiusha, Blanca, Roja y Jenny. El porcentaje de contaminación se consideró bajo para las cuatro variedades; mientras que la brotación sólo ocurrió cuando el medio estaba suplementado con BA (cuadro 1).

Cuadro 1. Eficiencia del protocolo de desinfección y de la presencia de BA sobre el porcentaje de contaminación y de brotación.

Variedad	Porcentaje de Contaminación	Porcentaje de Brotación por Concentración de BA			
		0.0 mg/L	3.0 mg/L	4.5 mg/L	7.0 mg/L
Blanca (<i>H. undatus</i>)	6.25	0 ^b	62.5 ^a	87.5 ^a	75.0 ^a
Fiusha (<i>H. polyrhizus</i>)	12.5	0 ^b	62.5 ^a	75.0 ^a	62.5 ^a
Roja (<i>H. ocamponis</i>)	15.63	0 ^b	50.0 ^{ab}	75.0 ^a	62.5 ^a
Jenny (<i>Hylocereus</i> sp.)	12.5	0 ^b	62.5 ^a	75.0 ^a	75.0 ^a

Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Comparación de Proporciones ($\alpha=0.05$).

No se encontró diferencia significativa entre los tratamientos que tenían BA en el medio, sino sólo entre la presencia y ausencia de esta citocinina, a excepción de la variedad Roja. A pesar de no ser significativa, se notó una mejora en el porcentaje de brotación cuando la concentración de BA fue de 4.5 mg/L. Sin embargo, los brotes obtenidos en cada tratamiento presentaron características

morfogénicas cualitativamente adecuadas, puesto que se notaban elongados y con espinas bien desarrolladas y diferenciadas (Fig. 1). El tamaño de los brotes fue entre 0.5 y 1.0 cm en todas las variedades.

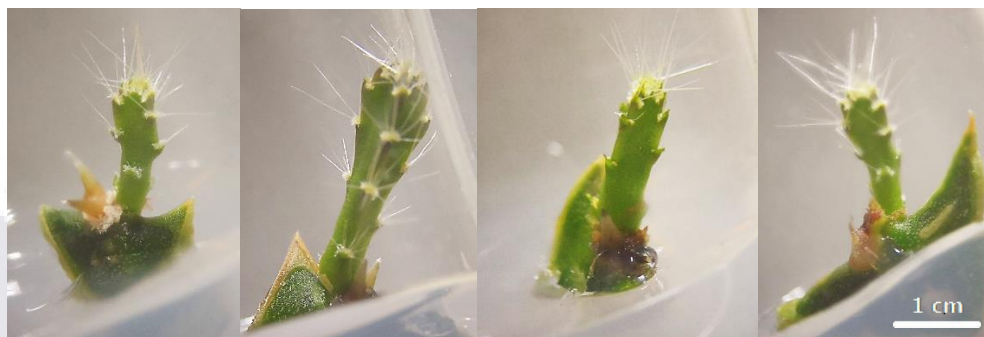


Figura 1. Brotes obtenidos a partir de aréolas desinfectadas de Pitahaya (*Hylocereus* spp.). De izquierda a derecha: Blanca en 7.0 mg/L BA; Fiusha en 3.0 mg/L BA; Roja en 7.0 mg/L BA; y Jenny en 4.5 mg/L BA.

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CITOCININAS EN LA PRODUCCIÓN DE BROTES (MULTIPLICACIÓN)

En un principio se probó en la variedad Fiusha si el origen del explante tenía efecto sobre el número de brotes, empleando segmentos apicales y decapitados. Se encontró que dicho origen no influía en el número de brotes obtenidos, sino que es dado por la presencia de BA en el medio (Fig. 2).

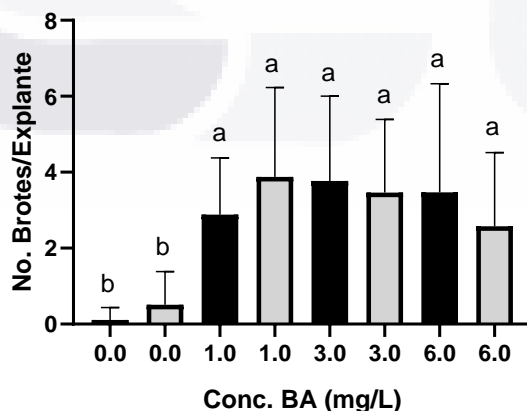


Figura 2. Efecto del origen del explante y la concentración de BA sobre el número de brotes de Pitahaya Fiusha (media ± desviación estándar; n= 40). Barras negras: segmentos apicales, barras grises: segmentos decapitados. Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

A pesar de que se pudieron haber empleado segmentos nodales sin importar su origen, para los siguientes experimentos se desechó el ápice en el resto de las variedades. Nuevamente la variedad Fiusha fue probada bajo diferentes concentraciones de BA, donde al presentarse una distribución uniforme de los datos, la prueba de Kruskal-Wallis indicó diferencias significativas ($P= <0.0001$) sólo cuando la citocinina estaba presente o ausente (Fig. 3). Se encontró en el tratamiento control, en su mayoría, explantes con un brote, en los demás tratamientos se obtuvo una mayor cantidad en medio MS suplementado con 1.0 mg/L de BA, dando 3.52 brotes por explante; y aunque no se encontraron diferencias significativas con los tratamientos que tenían 3.0 mg/L (3.489) y 6.0 mg/L (2.835) de BA, se deben tomar en cuenta las características morfogénicas para elegir el mejor tratamiento.

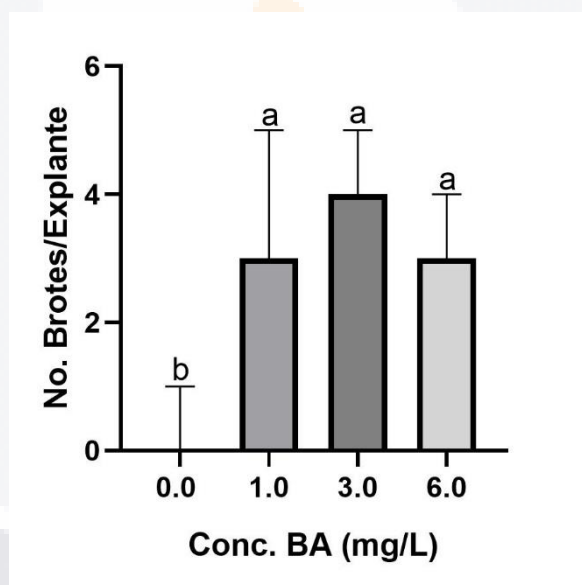


Figura 3. Efecto de la concentración de BA sobre el no. de brotes de Pitahaya Fiusha (mediana \pm IQR; $n= 80$). Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Dunn ($\alpha=0.05$).

Tomando en cuenta las características morfogénicas de los brotes producidos por tratamiento, se observó que los de mayor tamaño, diferenciación y con ausencia de vitrificación fue el tratamiento con 1.0 mg/L de BA (Fig. 4). A partir de este tratamiento se notaron efectos negativos, como la disminución del tamaño de los brotes conforme aumentaba la concentración de BA, además de aumentar la apariencia vidriosa y el tamaño del callo en la base del explante.

Dichos efectos son indeseables puesto que los brotes no pueden adaptarse a condiciones *ex vitro*.

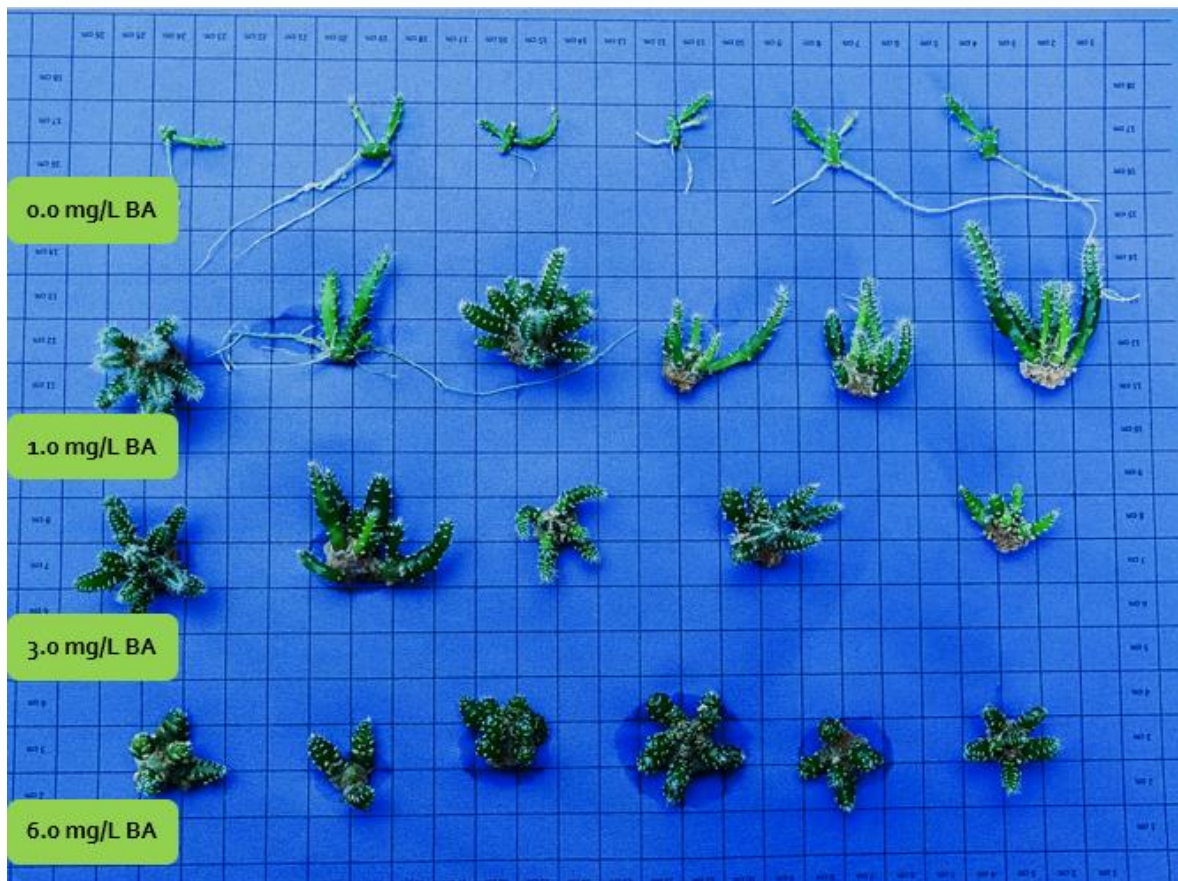


Figura 4. Efecto de la concentración de BA sobre la cantidad y morfogénesis de los brotes producidos en Pitahaya Fiusha. Tamaño de los cuadros= 1 cm².

Al igual que la variedad Fiusha, la variedad Jenny se multiplicó empleando, además de BA, a las citocininas Cin y TDZ. Cada concentración y citocinina dio una cantidad y apariencia distinta entre los brotes. La BA se comportó de la misma manera que en la variedad Fiusha, mostrando diferencias significativas entre cuando está ausente a cuando está presente (Fig. 5), siendo el mejor tratamiento 1.0 mg/L, que además de dar un promedio de 5.6 brotes por explante, éstos tenían una apariencia más favorable para poder ser llevados a condiciones *ex vitro* (Fig. 6). También se observó que la altura era similar en todos los tratamientos, incluyendo el control.

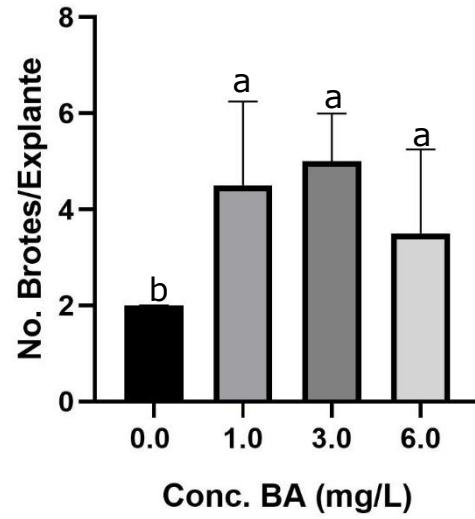


Figura 5. Efecto de la concentración de BA sobre el no. de brotes de Pitahaya Jenny (mediana ±IQR; n= 30). Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Dunn ($\alpha=0.05$).

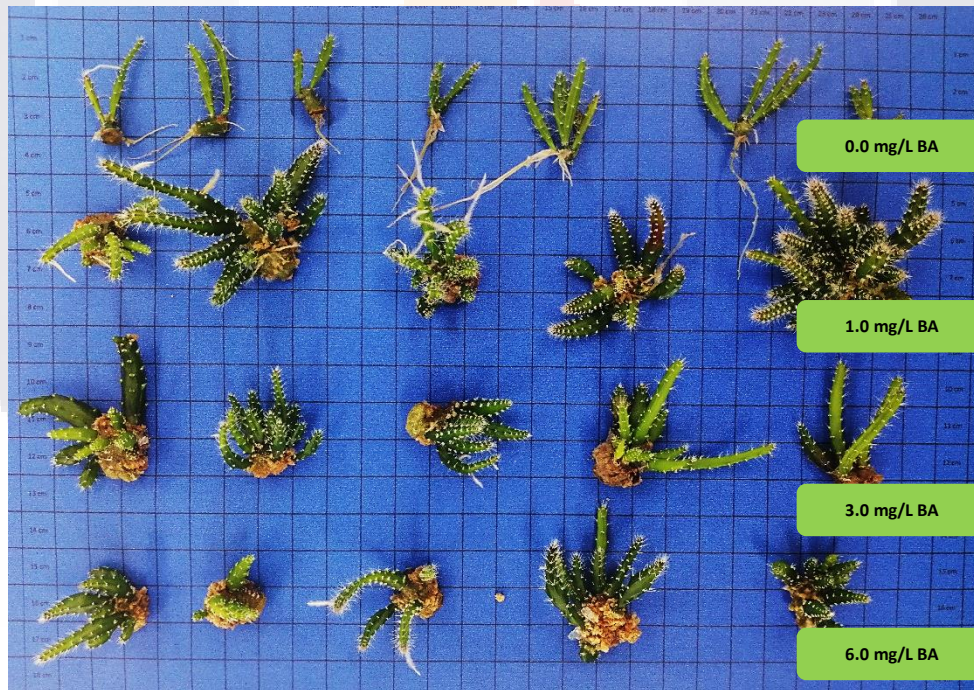


Figura 6. Efecto de la concentración de BA sobre la cantidad y morfogénesis de los brotes producidos en Pitahaya Jenny. Tamaño de los cuadros= 1 cm².

Los efectos de la Cin y el TDZ en la variedad Jenny no fueron muy favorables comparados con los obtenidos cuando se empleó BA. En la Cin, a pesar de obtener un mayor número de brotes por explante a una concentración de 1.0

mg/L (3.3), no fue significativa la diferencia con el resto de los tratamientos (Fig. 7).

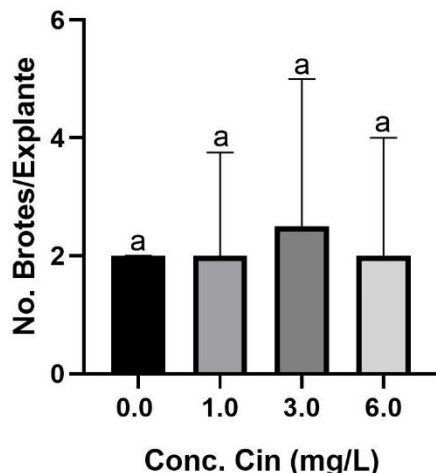


Figura 7. Efecto de la concentración de Cin sobre el no. de brotes de Pitahaya Jenny (mediana ±IQR; n= 20). Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Dunn ($\alpha=0.05$).

Morfológicamente los brotes obtenidos en medio MS suplementado con Cin produjeron raíces y no mostraban tanta diferencia entre ellos, incluso el tamaño fue muy similar, a excepción de algunos casos a una concentración de 1.0 mg/L donde además presentaban un mayor grosor (fig. 8).

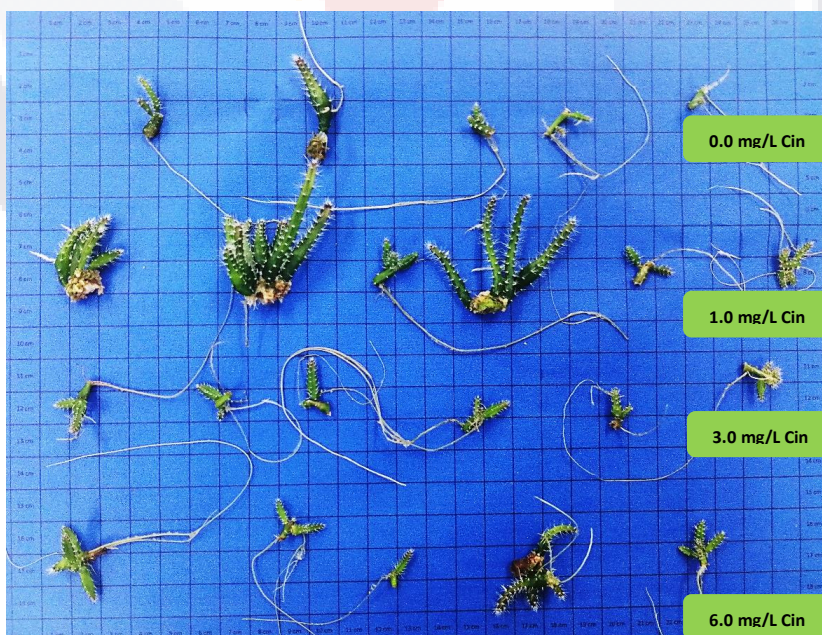


Figura 8. Efecto de la concentración de Cin sobre la cantidad y morfogénesis apariencia de los brotes producidos en Pitahaya Jenny. Tamaño de los cuadros= 1 cm².

La última citocinina empleada en la variedad Jenny fue el TDZ, ya que a pesar de requerir pequeñas cantidades para producir algún efecto, éste no fue muy óptimo en las concentraciones empleadas. La mejor concentración que resultó fue 0.1 mg/L, dando un promedio de 3.87 brotes por explante, además a mayores concentraciones como 1.0 mg/L la formación de brotes decrece (fig. 9).

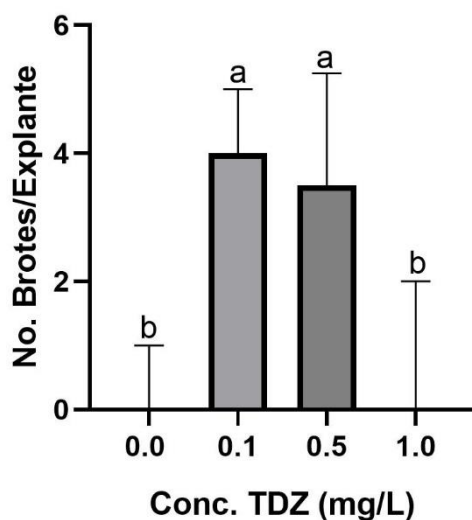


Figura 9. Efecto de la concentración de TDZ sobre el no. de brotes de Pitahaya Jenny (mediana \pm IQR; n= 30). Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Dunn ($\alpha=0.05$).

A concentraciones mayores fue evidente la formación de callo sobre el explante inicial, por lo que la producción de brotes diferenciados fue reducida. Los brotes de la concentración 0.1 mg/L de TDZ fueron bien diferenciados y elongados, siendo éste el mejor tratamiento tanto por la cantidad y calidad de los brotes (fig. 10). La producción de tejido calloso no permitió saber si el origen de los brotes producción sobre medio MS suplementado con 0.5 ó 1.0 mg/L de TDZ era a partir de las areolas o de la regeneración del cladodio, por lo que para este trabajo se descartó su uso en la multiplicación.

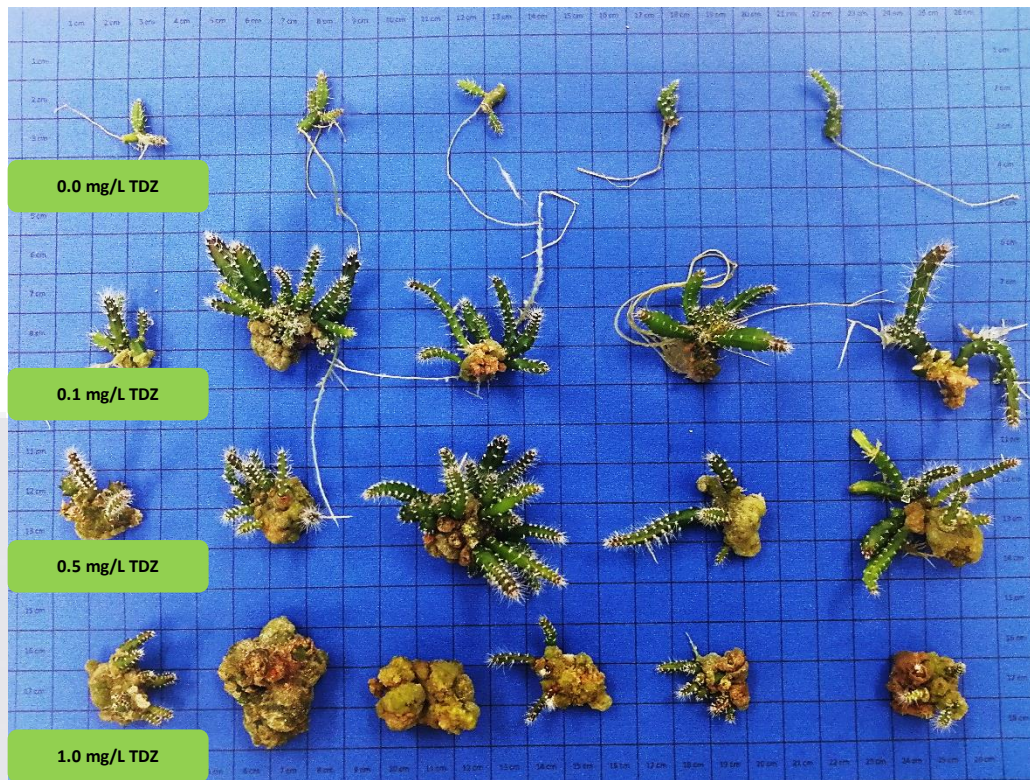


Figura 10. Efecto de la concentración de TDZ sobre la cantidad y morfogénesis de los brotes producidos en Pitahaya Jenny. Tamaño de los cuadros= 1 cm².

ENRAIZAMIENTO *in vitro*

La formación de raíces en pitahaya var. Fiusha no se indujo completamente en todos los brotes, teniendo un porcentaje de inducción de raíces diferente entre los tratamientos, pero no fue significativa (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de la concentración de AIB en medio MS modificado sobre el porcentaje de enraizamiento en Pitahaya Fiusha.

Tratamiento AIB (mg/L)	Porcentaje de Plantas Enraizadas
0.0	72.22 ^a
0.1	52.78 ^a
0.5	61.11 ^a
1.0	72.22 ^a

Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Comparación de Proporciones ($\alpha=0.05$).

El número de raíces por brote no fue significativamente diferente entre tratamientos, pero el tratamiento que produjo un más alto promedio fue 1.0 mg/L AIB con un promedio de 2.62 (Fig. 11).

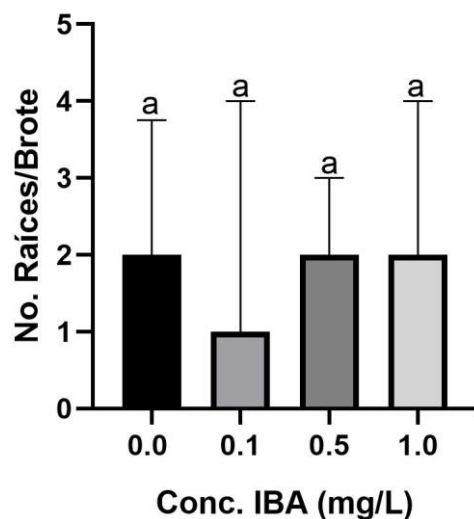


Figura 11. Efecto de la concentración de AIB en medio MS modificado sobre el porcentaje de enraizamiento en Pitahaya Fiusha. Diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba de Comparación de Proporciones ($\alpha=0.05$).

Las raíces eran de coloración blanca, un tamaño variable entre los mismos tratamientos y se produjeron, por lo general, en la base de los brotes (ig. 12).

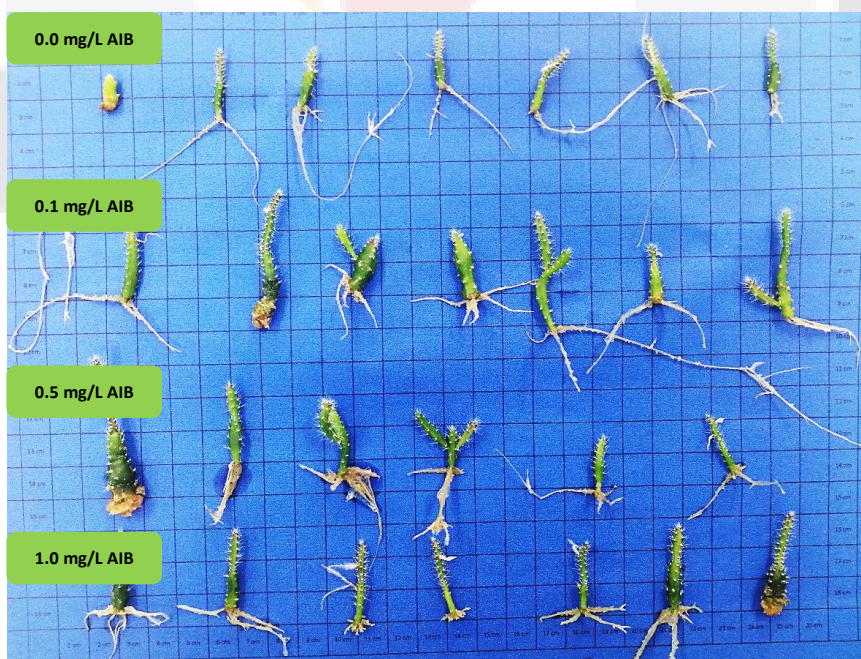


Figura 12. Efecto del medio MS modificado y de la concentración de AIB sobre el enraizamiento *in vitro* en brotes de pitahaya Fiusha. Tamaño de los cuadros= 1 cm².

ACLIMATACIÓN (Y ENRAIZAMIENTO *ex vitro*)

El 100 % de los brotes pasados a condiciones de invernadero, se aclimataron y produjeron raíces, independientemente de los días que se dejaron en alta humedad (Fig. 13). Aunque fue imposible sacar las raíces completas por lo adheridas que estaban al sustrato.

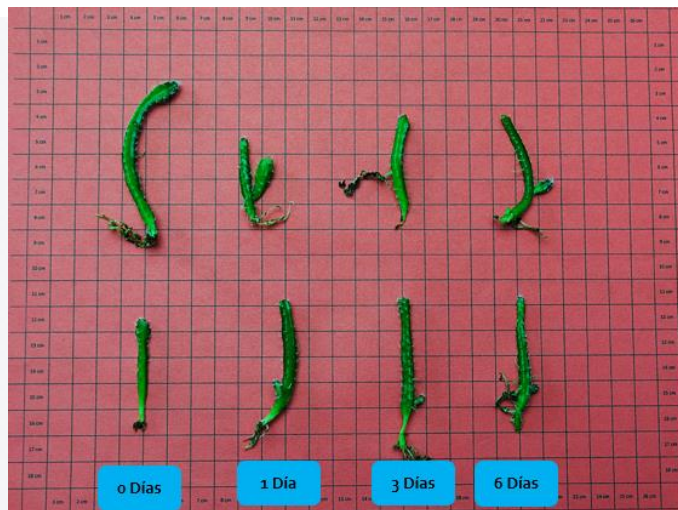


Figura 13. Plantas de Pitahaya Fiusha aclimatadas y enraizadas *ex vitro* con diferentes días guardadas en alta humedad.



Figura 14. Plantas de Pitahaya Fiusha después de 12 semanas de aclimatadas.

VI. DISCUSIÓN

En la agricultura muchas plantas han sido descubiertas y perpetuadas como cultivares; para mantener el genotipo con las características seleccionadas es necesario obtener clones, y la única manera es la propagación vegetativa asexual, donde células totipotentes se dividen a través de la mitosis para dar lugar a una planta con el mismo genotipo (Hartmann y Kester, 1987). La pitahaya no es la excepción, puesto que se han seleccionado cultivares con potencial uso comercial (Viñas *et al.*, 2012) a partir de ejemplares silvestres o cultivos de traspatio en base a caracteres de fruto y tallo (Montesinos-Cruz *et al.*, 2015), alta y constante producción de frutos, periodo juvenil corto, y resistencia a plagas y enfermedades (Infante, 1997). Por ello, para obtener clones de los cultivares empleados en este trabajo, para su establecimiento se partió de aréolas, un tipo de tejido meristemático característico de las cactáceas (Pérez-Molphe Balch *et al.*, 2015), que se ha demostrado, que en cactáceas produce plantas con un alto grado de uniformidad fenotípica (Infante, 1997) que es importante cuando se quiere multiplicar rápidamente clones de élite de especies frutales (Drew y Azimi, 2002); aunque con frecuencia se observan variaciones genómicas durante el cultivo de tejidos (Qing-Jie *et al.*, 2013).

Además de emplear explantes que garanticen la fidelidad genética, el empleo del cultivo de tejidos permite propagar rápidamente plantas sanas y libres de patógenos en un tiempo relativamente corto, y un espacio pequeño (Hua *et al.*, 2015). Así mismo, se ha observado que bajo estas condiciones se acelera significativamente el crecimiento de las plantas (Ojeda-Zacarías *et al.*, 2012), el cual es muy notorio en las cactáceas. Esto es probablemente debido a las alteraciones del metabolismo CAM, porque las plantas pueden fijar CO₂ continuamente, en luz y oscuridad (Viñas *et al.*, 2012), además de la alta humedad relativa y alta concentración de azúcares que facilitan un incremento en el rango fotosintético (Moreira-Palacios y Sánchez-Rodríguez, 2017).

El desarrollo de un protocolo de micropropagación eficiente para cactáceas es propio entre cada especie, incluso entre cultivares, por ello se requiere de experimentos para definir la composición específica de sales minerales y RCV (Viñas *et al.*, 2012), esta variabilidad puede deberse al hábitat del que provienen las plantas, su genotipo, y el balance de auxinas y citocininas endógenas (Moreira-Palacios y Sánchez-Rodríguez, 2017). La pitahaya, al poseer diversos antecedentes genéticos, responde de manera diferente al mismo medio de cultivo (Hua *et al.*, 2015).

Independientemente del explante inicial, son muchos los trabajos reportados sobre la propagación *in vitro* de varias especies y cultivares de pitahaya, ya sea mediante organogénesis directa o indirecta. Se han desarrollado protocolos para *H. setaceus* (Infante, 1992), *H. undatus* (Drew y Azimi, 2002; Mohamed-Yasseen, 2002; Dahanayake y Ranawake, 2011; Menezes *et al.*, 2012; Ojeda-Zacarías *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2017; Potti *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2020), *H. megalanthus* (Pelah *et al.*, 2002; Caetano-Nunez *et al.*, 2014; Suárez-Román *et al.*, 2014; Zambrano-Forero *et al.*, 2015), *H. purpusii* (de Feria *et al.*, 2012), *H. costaricensis* (Mukminah *et al.*, 2014), *H. polyrhizus* (Suárez-Román *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2017; Ng *et al.*, 2020), *H. ocamponis* (Moreira-Palacios y Sánchez-Rodríguez, 2017), *H. triangularis* (Moreira-Palacios y Sánchez-Rodríguez, 2017) e *H. monacanthus* (Montiel-Frausto *et al.*, 2016). Cultivares comerciales con los que también se ha trabajado son el Cebra (*H. costaricensis*) (Viñas *et al.*, 2012), Zihonglong (*H. undatus*) (Qing-Jie *et al.*, 2013), Guangming no. 2 (*H. undatus*), Hongbaoshi (*H. polyrhizus*), seis híbridos obtenidos de la cruce entre ellas (*H. polyrhizus* × *H. undatus*) (Hua *et al.*, 2015), American Beauty (*H. guatemalensis*), Halley's Comet (*H. undatus* × *H. guatemalensis*), Vietnam White (*H. undatus*) y Bloody Mary (*H. polyrhizus*) (Bozkurt *et al.*, 2020).

Aunque el establecimiento *in vitro* de cactáceas a partir de la activación de aréolas es complicado por la presencia de espinas que contienen espacios de aire, que pudieran guardar esporas de hongos, y que evitan el contacto del agente desinfectante con el tejido (Viñas *et al.*, 2012; Moreira-Palacios y

Sánchez-Rodríguez, 2017), los porcentajes de contaminación fueron bajos al estar por debajo del 20% en las cuatro variedades. Varios autores han empleado un método de desinfección similar mediante el uso de NaOCl en pitahaya, y han obtenido porcentajes de contaminación nulos o por debajo del 5% (Viñas *et al.*, 2012; Qing-Jie *et al.*, 2013; Bozkurt *et al.*, 2020) al emplear brotes nuevos crecidos en condiciones de laboratorio o invernadero. También se debe a que las cactáceas del género *Hylocereus* tienen pocas espinas sobre las aréolas y el tallo tiene una superficie lisa (Drew y Azimi, 2002). Aun así, Thinesh y Seran (2015) obtuvieron una contaminación del 31% empleado segmentos de tallo de *H. undatus*. Por otra parte, no siempre se usan brotes recientes para el establecimiento, además de que para obtenerlos es necesario que estén en determinada época del año, por lo que en ocasiones se tiene que partir de material de años de edad, Qin *et al.* (2017) usaron aréolas provenientes de plantas adultas en condiciones de campo y obtuvieron un 15% de contaminación, sin embargo, el agente desinfectante empleado fue el HgCl₂.

Para iniciar el cultivo se colocaron las aréolas con una porción de cladodio sobre medio suplementado con una citocinina, encontrando brotación sólo cuando ésta se encontraba presente. El hecho de emplear concentraciones de BA entre 3 y 6 mg/L, fue debido a que autores como Viñas *et al.* (2012) mencionan que altos niveles de citocinina activan las aréolas en *H. costarisensis*, donde observaron brotación con BA a partir de una concentración de ~3.38 mg/L, y aunque en este trabajo no se realizaron experimentos con concentraciones menores a 3.0 mg/L, posiblemente no se habrían obtenido brotes en el tiempo establecido. Cada aréola cultivada produjo un brote; Mohamed-Yasseen (2002) obtuvo el mismo resultado al emplear 0.1 mg/L de ANA y 0.11 mg/L de TDZ en la activación de *H. undatus*. Bozkurt *et al.* (2020) reportaron que en cuatro cultivares lograron iniciar el cultivo empleando 2.0 y 4.0 mg/L de BA. Aun así, Hua *et al.* (2015) obtuvieron brotes en un medio sin RCV en distintos cultivares. Otro RCV diferente a las citocininas que ha sido empleado es el GA₃ con una concentración de ~0.17 mg/L, donde obtuvieron brotes del cultivar Zihonglong después de tres semanas (Qing-Jie *et al.*, 2013).

La inducción de brotes bajo condiciones *in vitro* ocurre debido al desequilibrio hormonal inducido por concentraciones adecuadas y equilibradas de RCV añadidos al medio de cultivo (Lopes *et al.*, 2017), pero existen factores involucrados en la producción de brotes adventicios en pitahaya, como el tamaño inicial del explante, el número de aréolas que contiene, si hubo algún daño a las aréolas durante la manipulación del explante (Mohamed-Yasseen, 2002), la edad fisiológica del explante, así como la sección de tallo de donde se tomó, ya que la porción baja suele ser menos productiva (Suárez-Román *et al.*, 2014). En el primer experimento no se encontró diferencia significativa al emplear ápices o segmentos decapitados como explante; Infante (1992) tampoco encontró mucha diferencia entre uno u otro, pero fue ligeramente mejor en explantes sin ápice, pero observó la producción de tejido calloso en explantes apicales, debido a que es la zona de producción de auxina, haciendo que interactúe con la citocinina exógena.

En este trabajo sólo se emplearon citocininas en la etapa de multiplicación. Se tomó como mejor tratamiento una concentración de 1.0 mg/L de BA, donde se obtuvieron en promedio 3.52 y 5.6 brotes por explante para las variedades Fiusha y Jenny, respectivamente. Empleando la misma concentración de BA, Zambrano-Forero *et al.* (2015) obtuvieron en *H. megalanthus* 5.30 brotes en promedio, Lopes *et al.* (2017) 12.2 brotes en *H. undatus*, y Montiel-Frausto *et al.* (2016) produjeron alrededor de 20 brotes por explante de *H. monacanthus*. Sin embargo, Viñas *et al.* (2012) obtuvieron 3.03 brotes empleando ~0.22 mg/L de BA, pero elevando hasta una concentración de ~1.12 mg/L comenzaron a tener necrosis apical y formación de tejido calloso en el explante inicial, pero Moreira-Palacios y Sánchez-Rodríguez (2017) obtuvieron a esta concentración de BA obtuvieron 0.48 brotes en *H. ocamponis*; por lo que no siempre la misma concentración y regulador son favorables para cada especie y/o cultivar. Con concentraciones entre 2.0 y 4.0 mg/L Bozkurt *et al.* (2020) obtuvieron 5.41 brotes en Halley's Comet, 4.12 en American Beauty, 5.41 brotes en Bloody Mary, y ~2.0 brotes por explante en Vietnam White. Otro rasgo importante para evaluar es el medio empleado, como Gonçalves *et al.* (2020) donde obtuvieron

entre 4 y 5 brotes de *H. undatus* en medio MS suplementado con 1.0 ó 2.0 mg/L de BA, pero obtuvieron los mismos en medio QL modificado aún sin la adición de RCV, posiblemente debido a la concentración de RCV endógenos eran suficientes para estimular la formación de nuevos brotes.

Otra observación, es que entre más concentración de BA tenía el medio, los brotes fueron reduciendo su tamaño en la variedad Fiusha; Lopes *et al.* (2017) también vieron el mismo efecto ocasionado por BA en *H. undatus*. Además la hiperhidricidad fue incrementando, esto es debido a que este fenómeno es inducido principalmente por las citocininas (Moreira-Palacios y Sánchez-Rodríguez, 2017). Este fenómeno se caracteriza por producir brotes de apariencia vidriosa y número reducido de espinas, los cuales no pueden sobrevivir a condiciones *ex vitro* (Pérez-Molphe Balch *et al.*, 1998).

La generación de brotes adventicios está regulada por interacciones entre citoquininas y auxinas (Hua *et al.*, 2015), y en ocasiones se emplea una auxina en baja concentración para mejorarla. Infante (1992) obtuvo 7.8 brotes en *H. setaceus* usando, además de 1.0 mg/L de BA, 0.05 mg/L de ANA. de Feria *et al.* (2012) obtuvieron 8.8 brotes en *H. purpusii* de un tamaño cercano a los tres cm al emplear 2.0 mg/L de BA más 0.6 mg/L de AIA. Qin *et al.* (2017) obtuvieron 6.4 brotes de *H. polyrhizus* con 5.5 mg/L de BA más 0.1 mg/L de ANA. Ng *et al.* (2020) con 0.03 mg/L de BA y 0.01 mg/L de ANA, además de la adición de agua de coco a una concentración de 4% obtuvieron brotes largos (2.45 ± 0.04 cm) de *H. polyrhizus*. Otras citocininas empleada para la obtención de brotes han sido 2iP y Zea, donde con una concentración de 1 mg/L de 2iP obtuvieron en promedio 2.7 brotes por explante en *H. undatus* (Drew y Azimi, 2002), mientras que Hua *et al.* (2015) con 3 mg/L de Zea y 0.5 mg/L de IBA produjeron en promedio más de seis brotes por explante con un tamaño de 2 cm en varios cultivares.

Empleando Cin en pitahaya Jenny no se obtuvieron resultados significativos. Aun así, Menezes *et al.* (2012) obtuvieron un mejor resultado en *H. undatus* al

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

emplear medio MS suplementado con 5 mg/L de Cin y 0.1 mg/L de ANA al producir en promedio 2.39 brotes por explante, con un tamaño de ~1.74 cm y sin la presencia de tejido calloso. Potti *et al.* (2019) también emplearon Cin (0.2 mg/L) junto con BA (0.4 mg/L), AIA (0.1 mg/L) y ANA (0.1 mg/L), y obtuvieron una respuesta del 85% con promedio de seis brotes por explante que medían más de 2 cm también en *H. undatus*. Sin embargo, en *H. megalanthus* tampoco se obtuvo un crecimiento eficiente al emplear esta citocinina (Zambrano-Forero *et al.* 2015).

Empleando 0.1 mg/L de TDZ, se obtuvieron en promedio 3.87 brotes por explante. Otros autores han empleado también este regulador, Pelah *et al.* (2002) obtuvieron casi 8 brotes de *H. megalanthus* por explante con 0.11 mg/L de TDZ, con un nulo o ligero alargamiento. Mohamed-Yasseen (2002) y Moreira-Palacios y Sánchez-Rodríguez (2017) obtuvieron 8.7 brotes de *H. undatus* y 1.5 de *H. triangularis*, respectivamente, con 0.1 mg/L de TDZ más 0.1 mg/L de ANA empleando segmentos sin ápice.

El tejido calloso producido en algunos tratamientos es indeseable cuando se desea obtener clones (Infante, 1997), debido a que este tejido se caracteriza por tener mayor variabilidad genética (Moreira-Palacios y Sánchez-Rodríguez, 2017) y se pueden regenerar brotes a partir de éste, aunque es un método que puede ser usado en programas de mejoramiento (Infante, 1997). Al emplear segmentos de tallo como explante se debe tener cuidado con la formación de tejido calloso, ya que se ha observado que los cladodios son los explantes más regenerantes en pitahaya (Dahanayake y Ranawake, 2011). También se ha visto que los RCV que más producen tejido calloso en este género son TDZ, ANA y 2,4-D (Zambrano-Forero *et al.*, 2015).

Aunque en este trabajo no se verificó la variación genética en los brotes obtenidos *in vitro*, ya ha sido reportada en *Hylocereus*, la cual se ha observado o no dependiendo de la técnica empleada. Mediante pruebas moleculares como Inter-Secuencias Simples Repetidas (ISSR) (Qing-Jie *et al.*, 2013) y marcadores

dirigidos al codón de inicio (SCoT) (Hua *et al.*, 2015) no se ha observado variabilidad después de más de 10 subcultivos. Pero empleando citometría de flujo reportan endoreduplicación (Menezes *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2016). Esta variabilidad encontrada probablemente se deba a la acumulación de metabolitos secundarios presentes en los brotes, que pueden interferir con el contenido de ADN celular (Menezes *et al.*, 2012). Además, reguladores como la BA o TDZ provocan variabilidad, la BA incrementa el número de replicaciones durante la fase S del ciclo celular y por ello tiene un buen efecto sobre la brotación y elongación, pero puede inhibir la metilación del ADN, provocando alteraciones en la transcripción genética sin alterar la secuencia del ADN, por lo que hace imposible detectar la variabilidad mediante los métodos moleculares reportados (Moreira-Palacios y Sánchez-Rodríguez, 2017). Por su parte, el TDZ genera estrés en las plantas y las obliga a modificar procesos metabólicos para poder sobrevivir, dicha adaptación reinicia su programa genético y epigenético con el fin de soportar el ambiente hormonal (Moreira-Palacios y Sánchez-Rodríguez, 2017).

El enraizamiento *in vitro* no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, aún con la dilución de las sales del medio y la adición de AIB, se obtuvo entre el 52.78 y 72.22% de brotes enraizados, lo cual es bajo comparado con otros trabajos. Pelah *et al.* (2002) obtuvieron el 100% de enraizamiento en *H. megalanthus* empleando 0.1 mg/L de ANA, al igual que Dahanayake y Ranawake (2011) en *H. undatus*; Qing-Jie *et al.* (2013) también obtuvieron el 100% en *H. undatus* pero con 0.15 mg/L de ANA, además emplearon ½ MS y perlita como soporte en lugar de agar. Lopes *et al.* (2017) también obtuvieron el 100% de enraizamiento en *H. undatus* empleando medio MS diluido (50, 75 y 100 %) y suplementado con 0.1 mg/L de AIB. Qin *et al.* (2017) obtuvieron un 92% en *H. polyrhizus* empleando ½ MS con 0.5 mg/L de ANA y 0.3 mg/L de AIB. Bozkurt *et al.* (2020) obtuvo un enraizamiento igual o superior al 90% en cuatro cultivares al emplear 1.0 mg/L de AIB. Teóricamente, la presión osmótica del medio de cultivo influye directamente en la formación y maduración de las raíces (Qin *et al.*, 2017), pero la adición de auxinas también la promueve, aunque se

han obtenido enraizamientos muy buenos aún si la adición de alguna auxina (Drew y Azimi, 2002), como la obtenida por Feria *et al.* (2012) en *H. purpusii*.

También se demostró que ninguno de los cultivares empleados requiere de tiempo de secado de la herida o enraizamiento *in vitro* para la supervivencia a condiciones *ex vitro*. Es debido a que cuando se corta la pitahaya, ésta libera un polisacárido viscoso el cual sella rápidamente el corte y evita la pérdida de agua por la transpiración, permitiendo a los brotes sobrevivir un largo periodo (Moreira-Palacios y Sánchez-Rodríguez, 2017). Aun así, el brote entra en estrés, pero al ser un género adaptado a los ecosistemas secos, está programado genéticamente para formar una masa radicular como estrategia de supervivencia (Moreira-Palacios y Sánchez-Rodríguez, 2017), permitiendo enraizar y aclimatar al mismo tiempo.

En la aclimatación se obtuvo un 100% de supervivencia en ambas variedades empleando como sustrato perlita y turba en proporción 3:2, que fue igual a la obtenida por: Suárez-Román *et al.* (2014) en *H. megalanthus* e *H. polyrhizus* al usar arena con vermiculita como sustrato, Hua *et al.* (2015) en varios cultivares al emplear turba, y Qin *et al.* (2017) en *H. polyrhizus* empleando humus. Otros autores obtuvieron menores porcentajes como: de Feria *et al.* (2012) con un 98% en *H. purpusii*, Montiel-Frausto *et al.* (2016) obtuvieron un 97.1% en *H. monacanthus* usando perlita y turba (1:1), Viñas *et al.* (2012) un 96.4% en *H. costaricensis* usando perlita más turba (2:1), Qing-Jie *et al.* (2013) un 93% en el cultivar Zihonglong empleando arena con tierra de maceta (1:1), Pelah *et al.* (2002) un 90% en *H. megalanthus* empleando turba, perlita y vermiculita (1:1:1), y Potti *et al.* (2019) obtuvieron una tasa de supervivencia de más del 82% en *H. undatus* usando vermi-compost y turba (1:1). En general se han obtenido altos porcentajes de supervivencia después de la aclimatación, esto es debido a que los tallos suculentos y el metabolismo del ácido crasuláceo (CAM) del género *Hylocereus*, minimizan el estrés hídrico durante la aclimatación. Además de que ayuda mucho usar sustratos con la capacidad de retener agua (Viñas *et al.*, 2012).

VII. CONCLUSIONES

El método de desinfección permitió el establecimiento a condiciones *in vitro* de pitahaya de las variedades Blanca, Fiusha, Roja y Jenny. Su brotación ocurre sobre medio MS suplementado con BA en una concentración de 3.0 – 6.0 mg/L. La adición de citocininas al medio indujo un mayor número de brotes en pitahaya Fiusha y Jenny, siendo mejor con 1.0 mg/L de BA. La inducción de raíces *in vitro* ocurre en el medio MS modificado aún sin la presencia de AIB en pitahaya Fiusha. Y es posible realizar al mismo tiempo la inducción de raíces *ex vitro* y aclimatación en pitahaya Fiusha y Jenny, además de que no se requiere mantener en alta humedad los brotes para la cicatrización de la herida.

El protocolo de micropropagación desarrollado en esta tesis tiene una tasa de multiplicación de 3.52 y 5.6 para las variedades Fiusha y Jenny, respectivamente. Tasa que permite obtener el 100% de las plantas adaptadas a condiciones de suelo en sólo seis meses; por lo tanto, partiendo del establecimiento con al menos 100 muestras, se obtiene la cantidad de plantas suficiente para una hectárea del cultivo en sólo ocho meses, pero adicionando dos meses más se tendría suficiente cantidad de plantas para establecer cuatro hectáreas. Para evitar la aparición de variaciones, que pudieran ser positivas o negativas, se recomienda no dar más de cuatro ciclos a la etapa de multiplicación, aun así, la cantidad de plantas producidas alcanzaría para tener 20 hectáreas del cultivo en menos de un año.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios (ASERCA). (2000). Producción y Comercialización de Pitahayas en México. 10, 13 pp.
- Altieri, M.A. & Nicholls, C.I. (2009). Cambio climático y agricultura campesina: impactos y respuestas adaptativas. LEISA revista de agroecología. 5.
- Anderson, W.C, 1980. Mass Propagation by Tissue Culture: Principles and Techniques. In: Proceedings of the Conference on Nursery Production of Fruit Plants through Tissue Culture - Applications and Feasibility. U.S.D.A., Beltsville, 1-8 pp.
- Avalos-Esparza, R.E. (2010). Cultivo y Propagación *in vitro* de Cactáceas de los Géneros *Hylocereus* y *Selenicereus*. Tesis de Maestría. UAA, Aguascalientes, Ags. 36-37, 49, 51-52 pp.
- Benega-Garcia, R., Cisneros, A., Schneider, B. & Tel-Zur, N. (2009a). Gynogenesis in the vine cacti *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). Plant Cell Reports. 28: 719–726.
- Benega-Garcia, R., Schneider, B. & Tel-Zur, N. (2009b). Androgenesis in the vine cacti *Selenicereus* and *Hylocereus* (Cactaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 96: 191–199.
- Bhojwani, S.S. & Dantu P.K. (2013). Micropropagation. In: Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer, India. 245, 249 pp.
- Bozkurt, T., İnan, S., & Dündar, İ. (2020). Micropropagation of Different Pitaya Varieties. International Journal of Agricultural and Natural Sciences. 13(1): 39-46.
- Caetano-Nunez, D.G., Escobar, R., Caetano, C.M. Vaca-Vaca, J.C. (2014). Estandarización de un protocolo de regeneración en pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran). Acta Agronómica. 63(1): 31-41.

- Ceroni-Stuva, A., Calderón-Moya Méndez, N. & Castro-Cepero, V. (2006). Taxonomía, Ecología y Conservación *ex situ* de las Cactáceas de Lima. Zonas Áridas. 10: 116.
- Dahanayake, N. & Ranawake, A.L. (2011). Regeneration of Dragon Fruit (*Hylecereus undatus*) Plant-Lets From Leaf and Stem Explants. Tropical Agricultural Research & Extension. 14(4): 85-89.
- de Feria, M., Rojas, D., Chávez, M., Reyna, M., Quiala, E., Solís, J. & Zurita, F. (2012). *In vitro* propagation of *Hylocereus purpusii* Britton & Rose, a mexican species in danger of extinction. Biotecnología Vegetal. 12(2): 77-83.
- Debergh, P.C. & Read, P.E. (1991). Micropropagation. In: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. (Eds.) Micropropagation Technology and Application. Kluwer Academic Publishers Ed. Dordrecht. 1-2, 4, 6, 9-11 pp.
- Doan, M.N.T., Dao, C.T., Nguyen, N.T., Nguyen, H.T.T., Tran, H.L.T. & Le, S.T. (2018). Research on the Potential Environmental Zonation of Red Flesh Dragon Fruit in Vinh Phuc Province. In: Otjacques, B., Hitzelberger, P., Naumann, S., Wohlgemuth, V. (eds) From Science to Society. Progress in IS. Springer, Cham. 14-15 pp.
- Drew, R.A. & Azimi, M. (2002). Micropropagation of Red Pitaya (*Hylocereous undatus*). ISHS Acta Horticulturae. 575: 93-98.
- Esparza, M. (2014). La sequía y la escasez de agua en México. Situación actual y perspectivas futuras. Secuencia. 89: 196-197.
- García-Rubio, L.A., Vargas-Ponce, O., Ramírez-Mireles, F.J., Munguía-Lino, G., Corona-Oceguera, C.A. & Cruz-Hernández, T. 2015. Distribución geográfica de *Hylocereus* (cactaceae) en México. Botanical Sciences. 93(4): 922.
- George, E.F. (2008). Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J. (Eds.) Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Edition. Springer Ed. Dordrecht. 1, 33-35 pp.
- Gonçalves, M.J., Camargo, S.S., Arruda, A.L. & Rufato, L. (2020). Rápida produção de mudas de pitaia (*Hylocereus undatus*, Cactaceae) por meio da técnica da micropropagação. Acta Biológica Catarinense. 7(1): 75-81.

- Guerrero, P.C., Carvalho, G.O., Nassarc, J.M., Rojas-Sandoval, J. & Sanz, V. & Medel, R. (2011). Ecology and evolution of negative and positive interactions in Cactaceae: lessons and pending tasks. *Plant Ecology & Diversity*. 5(2): 2.
- Hartmann, H.T. & Kester, D.E. (1987). *Propagación de Plantas: Principios y Prácticas*. 1º Edición. Prentice Hall (Ed.). México. 219-221 pp.
- Hernández-Xolocotzi, E. (1988). La agricultura tradicional en México. *Comercio Exterior*. 38(8): 673.
- Hua, Q., Chen, P., Liu, W., Ma, Y., Liang, R., Wang, L., Wang, Z., Hu, G. & Qin, Y. (2015). A protocol for rapid *in vitro* propagation of genetically diverse pitaya. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 120(2): 741-745.
- Hurlbert, M.A. (2018). *Adaptive Governance of Disaster: Drought and Flood in Rural Areas*. Springer. India. 1p.
- Infante, R. (1992). *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 31: 155-159.
- Infante, R. (1997). Micropropagation of *Mediocactus coccineus* S.D. (Yellow Pitaya). In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Volume 40. Springer. Berlin, Heidelberg. 206-213 pp.
- Juárez-Cruz, A., Livera-Muñoz, M., Sosa-Montes, E., Goytia-Jiménez, M.A., González-Hernández, V.A. & Bárcena-Gama, R. (2012). Composición química de tallos inmaduros de *Acanthocereus* spp. e *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose. *Revista fitotecnia mexicana*. 35(2): 171 - 174.
- le-Bellec, F., Vaillant, F. & Imbert, E. (2006). Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. *Fruits*. 61(4): 237-240, 244.
- Legaria-Solano, J.P., Alvarado-Cano, M.E. & Gaspar-Hernández, R. (2005). Diversidad genética en pitahaya (*Hylocereus undatus* Haworth. Britton y Rose). *Revista Fitotecnia Mexicana*. 28(3): 179.
- Lim, T.K. (2012). *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. Volume 1, Fruits. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. 641, 645, 651, 653 pp.

- Lobo, R., Tanizaki, G. & Fernandez-de Soto, J. (2016). Pitahaya (Dragon Fruit). In: Gasic, K., Preece, J.E. & Karp, D. (eds) Register of New Fruit and Nut Cultivars List 48. HortScience. 51(6): 641-643.
- Lopes, C.A., Gomes-Dias, G.M., da Silveira, F.A., Rodrigues, F.A., Salles-Pio, L.A. & Pasqual, M. (2017). Propagação *in vitro* de pitaya vermelha. Plant Cell Culture & Micropropagation. 13(1):21-27.
- Lopes, C.A., Gomes-Dias, G.M., Salles-Pio, L.A., da Silveira, F.A., Rodrigues, F.A., & Pasqual, M. (2016). Indução de calos, potencial embriogénico e estabilidade genética em pitaya vermelha. Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias. 11(1): 21-15.
- Mejía, H.A., Muriel-Ruiz, S.B., Montoya, C.A. & Reyes-Sequeda, C. (2013). In situ Morphological Characterization of *Hylocereus* spp. (Fam.: Cactaceae) Genotypes from Antioquia and Córdoba (Colombia). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. 66: 6845-6854.
- Menezes, T.P. de, Gomes, W.A., Pio, L.A.S., Pasqual, M., & Ramos, J.D. (2012). Micropropagação e endorreduplicação em pitaya vermelha. Bioscience Journal. 28(6): 868-876.
- Mohamed-Yasseen, Y. (2002). Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et rose). In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 38: 427–429.
- Mondal, T. (2014). Micropropagation. In: Breeding and Biotechnology of Tea and its Wild Species. Springer, New Delhi. 35 p.
- Montesinos-Cruz, J.A., Rodríguez-Larramendi, L., Ortiz-Pérez, R., Fonseca-Flores, M.A., Ruíz-Herrera, G. & Guevara-Hernández, F. (2015). Pitahaya (*Hylocereus* spp.) un recurso fitogenético con historia y futuro para el trópico seco mexicano. Cultivos Tropicales. 36: 69-70, 72-73.
- Montiel-Frausto, B.L., Enríquez-del Valle, J.R. & Cisneros, A. (2016). Propagación *in vitro* de *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Britton y Rose. Biotecnología Vegetal. 16(2).
- Moreira-Palacios, M & Sánchez-Rodríguez, A. (2017). Estudio comparativo *in vitro* de estrategias adaptativas en especies de *Hylocereus*, Cactaceae, con distribución ecológica contrastada. Bionatura. 3.

- Mukminah, F., Asnawi, B. & Novi, T.T. (2014). Growth Response of Dragon Fruit (*Hylocereus costaricensis*) on MS Medium with Gandasil and Growmore *in vitro*. International Workshop on Tropical Bio-resources for Sustainable Development. 13-15: 122-126.
- Ng, Z.C., Tan, S.H., Shiekh-Mahmud, S.H.R., & Ma, N.L. (2020). Preliminary Study on Micropropagation of *Hylocereus polyrhizus* with Waste Coconut Water and Sucrose. Materials Science Forum. 981: 316–321.
- Ojeda-Bustamante, W., Sifuentes-Ibarra, E., Íñiguez-Covarrubias, M. & Montero-Martínez, M.J. (2011). Impacto del cambio climático en el desarrollo y requerimientos hídricos de los cultivos. Agrociencia. 45(1): 2.
- Ojeda-Zacarías, M.C., Vázquez-Alvarado, R.E., Santos-Haliscak, J.A., Moreno-Degollado, G., Aguirre-Arzola, V., Iracheta-Donjuan, L., López-Gómez, P. & Castellanos-Juárez, M. (2012). Micropropagación de Pitahaya, *Hylocereus Undatus* (Haworth). Revista Salud Pública y Nutrición. 4: 119-128.
- Osuna-Enciso, T., Valdez-Torres, J.B., Sañudo-Barajas, J.A., Muy-Rangel, M.D., Hernández-Verdugo, S., Villarreal-Romero, M. & Osuna-Rodríguez, J.M. (2016). Fenología reproductiva, rendimiento y calidad del fruto de pitahaya (*Hylocereus undatus* (how.) britton and rose) en el valle de Culiacán, Sinaloa, México. Agrociencia 50: 63.
- Pelah, D., Kaushik, R.A., Mizrahi, Y. & Sitrit1, Y. (2002). Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 71: 81–84.
- Pérez-Molphe Balch, E., Pérez-Reyes, M.E., Villalobos-Amador, E., Meza-Rangel, E., Morones-Ruiz, L.R. & Lizalde-Viramontes, H.J. (1998). Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 34: 131–135.
- Pérez-Molphe Balch, E., Santos-Díaz, M.S., Ramírez-Malagón, R., & Ochoa-Alejo, N. (2015). Tissue culture of ornamental cacti. Scientia Agricola. 72(6): 540-561.
- Potti, R.B., Motamarr, S., Roopa, M & Paladugu, A. (2019). In vitro Clonal Micropropagation of *Hylocereus Undatus*: A Palatable Dragon Fruit. International Journal of Current Agricultural Sciences. 9(5): 397-400.

- Qin, J., Wang, Y., He, G., Chen, L., He, H., Cheng, X., Xu, K., & Zhang, D. (2017). High-efficiency Micropropagation of Dormant Buds in Spine Base of Red Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) for Industrial Breeding. *International Journal of Agriculture and Biology*. 19(1): 193-198.
- Qing-Jie, F., Si-Cheng, Z., Feng-Xia, Y., Bing-Xee, Z., Guang, Q. & Xiao-Peng, W. (2013). Efficient regeneration of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) and an assessment of the genetic fidelity of *in vitro*-derived plants using ISSR markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 88(5): 631-637.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2017). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola 2017.
- Singh, S. (2018). Institutional Innovations in the Delivery of Farm Services in India: A Smallholder Perspective. Springer. India. 1 p.
- Suárez-Román, R.S., Caetano, C.M., Ramírez, H. & Morales-Osorio, J.G. (2014). Multiplicación de *Selenicereus megalanthus* (pitahaya amarilla) e *Hylocereus polyrhizus* (pitahaya roja) vía organogénesis somática. *Acta Agronómica*. 63(2): 272-281.
- Thinesh, A. & Seran, T.H. (2015). *In Vitro* Callogenesis From Bud and Stem Explants of Dragon Fruit (*Hylocereus undatus*). *Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology*. 4(5): 253-256.
- Viñas, M., Fernández-Brenes, M., Azoifeifa, A. & 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(5): 469-477.
- Zambrano-Forero, C.J., Ríos-Osorio, J.A., Beltrán Pedroza, D.A. & Mesa-López, N. (2015). Evaluación de reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *Hylocereus megalanthus* (pitahaya amarilla). *Revista Tumbaga*. 10: 76-87.

IX. ANEXOS

ANEXO A

Composición nutricional del medio MS (Murashige y Skoog, 1962)

Compuesto	Fórmula MS (mg/L)
Macroelementos	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ 2H ₂ O	440
MgSO ₄ 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Microelementos	
Solución A	
MnSO ₄ H ₂ O	15
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
Solución B	
KI	0.83
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
Solución C	
H ₃ BO ₃	6.2
Na ₂ MoO 2H ₂ O	0.25
Hierro	
FeEDTA	40
Vitaminas	
Ácido Nicotínico	0.5
Glicina	2.0
Myo-Inositol	100.0
Piridoxina	0.5
Tiamina	0.1

ANEXO B

Composición nutricional del medio MS a 1/3 (Murashige y Skoog, 1962)

Compuestos	Fórmula	Preparación (g/L ó mL/L)		
Sacarosa (mg/L)		<i>I/II Litro</i>	<i>I Litro</i>	<i>II Litros</i>
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	20000	10.0	20.0	40.0
Macroelementos (mg/L)		<i>I/II Litro</i>	<i>I Litro</i>	<i>II Litros</i>
NH ₄ NO ₃	550	0.275	0.550	1.100
KNO ₃	633	0.317	0.633	1.266
MgSO ₄ 7H ₂ O	123	0.062	0.123	0.246
KH ₂ PO ₄	57	0.029	0.057	0.114
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	170	0.085	0.170	0.340
CaCl ₂ 2H ₂ O	220	0.110	0.220	0.440
Hierro (mg/L)		<i>I/II Litro</i>	<i>I Litro</i>	<i>II Litros</i>
FeNaEDTA	43	0.022	0.043	0.086
Microelementos (mg/L)		<i>I/II Litro</i>	<i>I Litro</i>	<i>II Litros</i>
Solución A				
MnSO ₄	7.5	0.25	0.5	1.0
ZnSO ₄ 7H ₂ O	4.3			
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.0125			
Solución B				
KI	0.415	0.25	0.5	1.0
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.0125			
Solución C				
H ₃ BO ₃	3.1	0.25	0.5	1.0
Na ₂ MoO 2H ₂ O	0.125			
Vitaminas (mg/L)		<i>I/II Litro</i>	<i>I Litro</i>	<i>II Litros</i>
Ácido Nicotínico	0.5	5.0	5.0	10.0
Glicina	2.0			
Myo-Inositol	100.0			
Piridoxina	0.5			
Tiamina	0.1			