



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES  
Centro de Ciencias Básicas

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**“CULTIVO Y PROPAGACIÓN IN VITRO DE CACTÁCEAS  
DE LOS GÉNEROS *Hylocereus* Y *Selenicereus*”.**

TESIS QUE PRESENTA:

**L. A.Q.B. REBECA ELENA AVALOS ESPARZA**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE  
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

Asesor de Tesis: Dr. en C. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch

Aguascalientes, Ags.

Agosto de 2010

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por mi parte, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia y desesperación.

Agradecer hoy y siempre a mi familia porque está claro que si no fuese por el esfuerzo, apoyo y sustento realizado por ellos, todos mis estudios no hubiesen sido posibles. A mis padres María Elena y J. Benito, por las valiosas enseñanzas de vida a base del ejemplo, comunicación y tenacidad; a mi hermano Benito Antonio por su comprensión y por su confianza en todo momento; a mi abuelita Rebeca, porque a pesar de la distancia y el tiempo que nos separan, me logró enseñar el valor de la familia, de la unión a base de cariño, del apoyo incondicional y de la fortaleza para siempre seguir adelante; a mis primos René y César, por brindarme ese ejemplo que me impulsa siempre para mejorar; a Grecia mi pequeña prima que me anima para ser su ejemplo; a mis tías Rebeca y Lore por el ánimo, apoyo y alegría que siempre me brindan para seguir adelante; a todos ustedes, parte importante de mi corazón muchísimas gracias por siempre creer en mí.

A Rafael, por darme siempre ánimo brindándome su tiempo y compañía en los momentos en que parecían difíciles, pero que terminaron siendo solo un reto alcanzable; por ser la persona que ha compartido el mayor tiempo de este trabajo a mi lado, porque en su compañía las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe.

De igual manera mi más sincero agradecimiento y admiración a mi Director de Tesis, Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch, y a mi Comité Tutorial la Dra. Nora Vasco y la M. en C. Ma. de Lourdes de la Rosa Carrillo por su paciencia y los valiosos aportes que me enriquecieron para crecer y formarme académicamente en este nivel. Muchas Gracias por brindarme su apoyo, ánimo y colaboración en todo momento y sobre todo cuando más lo necesitaba sin poner nunca peros o darme negativas, sino todo lo contrario.

Así también a todo el personal y amigos del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, ya que dentro de los ámbitos que a cada uno le competen me han apoyado de manera amigable y desinteresada, siempre encontrando en ellos una sonrisa. A mis compañeros de la Maestría por hacerme reír, por su ayuda y amistad desde el primer momento y siempre.

Al CONACyT por el apoyo otorgado para la realización completa y satisfactoria de este proyecto. Igualmente a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por brindarme una vez más la oportunidad de formar parte de esta prestigiosa casa de estudios que se ha vuelto mi casa.

Al SNTE Sección I y al Instituto de Educación de Aguascalientes (IEA) por el enorme apoyo que me brindaron durante estos dos años, gracias por confiar en mí y por darme la oportunidad de llevar este mensaje de aprendizaje hasta las aulas.

Centro de Ciencias Básicas

**L.A.Q.B. REBECA ELENA AVALOS ESPARZA  
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS  
EN EL ÁREA DE BIOTENOLOGÍA VEGETAL,  
P R E S E N T E .**

Estimado (a) Alumno (a) Avalos:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o trabajo práctico titulado: **"CULTIVO Y PROPAGACIÓN IN VITRO DE CACTÁCEAS DE LOS GÉNEROS *Hylocereus* Y *Selenicereus*"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., 16 de agosto de 2010

"LUMEN PROFERRE"

EL DECANO

DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ RODRÍGUEZ

c.c.p.- Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES



DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ RODRÍGUEZ  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
P R E S E N T E :

Estimado Dr. Álvarez:

Por este medio le comunico que la L.A.Q.B. REBECA ELENA AVALOS ESPARZA, egresada de la Maestría en Ciencias en el Área de Biotecnología Vegetal, ha concluido satisfactoriamente, tanto su trabajo de tesis, como el escrito derivado del mismo. Asimismo, le informo que después de revisar el escrito, así como las correcciones hechas al mismo, considero que ya se tiene una versión final satisfactoria y se puede proceder al examen de grado.

A T E N T A M E N T E  
"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags. a 16 de Agosto de 2010

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch  
Tutor de Tesis

Departamento de Química  
Centro de Ciencias Básicas





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

16 Agosto del 2010

**Dr. Francisco Javier Álvarez Rodríguez**  
Decano del Centro de Ciencias Básicas  
Presente.

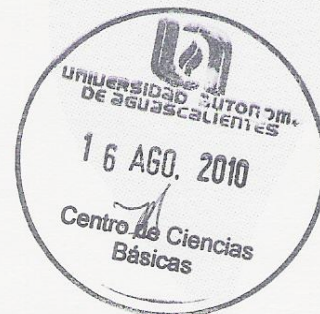
Estimado Dr. Álvarez Rodríguez, deseo hacer de su conocimiento que la alumna **Rebeca Elena Ávalos Esparza**, adscrita al programa de maestría en el *Posgrado en Biotecnología Vegetal y Toxicología*, concluyó de forma satisfactoria la tesis de título **“CULTIVO Y PROPAGACIÓN IN VITRO DE CACTÁCEAS DE LOS GÉNEROS *Hylocereus* Y *Selenicereus*”**. El Dr. en C. Eugenio Pérez Molphe Balch es el director de tesis y yo formo parte del comité tutorial.

Por lo antes mencionado, manifiesto estar conforme con el contenido de la tesis y doy mi Voto Aprobatorio para la impresión de la tesis y que la alumna pueda proseguir con los trámites requeridos para realizar el examen de grado correspondiente.

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Nora Lilia Vasco Méndez  
Profesora e Investigadora del  
Centro de Ciencias Básicas  
Departamento de Química.





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES



DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ RODRÍGUEZ  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
PRESENTE:

Estimado Dr. Álvarez:

Por este medio le comunico que la L.A.Q.B. REBECA ELENA AVALOS ESPARZA, quien es egresada de la Maestría en Ciencias en el Área de Biotecnología Vegetal, terminó satisfactoriamente, tanto su trabajo de tesis, como el escrito derivado del mismo, cuyo título es: "CULTIVO Y PROPAGACIÓN IN VITRO DE CACTÁCEAS DE LOS GÉNEROS *Hylocereus* Y *Selenicereus*".

Asimismo, le informo que después de revisar el escrito, así como las correcciones hechas al mismo, considero que ya se tiene una versión final satisfactoria y se puede proceder al examen de grado.

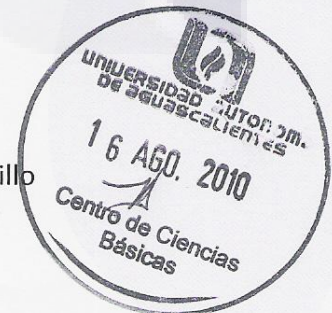
Sin otro particular, le envío un cordial saludo

ATENTAMENTE  
"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags. a 16 de Agosto de 2010

M. en C. Laura María de Lourdes de la Rosa Carrillo

Comité Tutorial  
Departamento de Química  
Centro de Ciencias Básicas



**“CULTIVO Y PROPAGACIÓN IN VITRO DE CACTÁCEAS DE LOS GÉNEROS *Hylocereus* Y  
*Selenicereus*”. Rebeca Elena Avalos Esparza  
RESUMEN**

Las cactáceas son autóctonas del Continente Americano; distribuidas en regiones áridas y semiáridas desde Canadá hasta Argentina. México es el país que alberga la mayor cantidad de especies. Los frutos de la mayoría son comestibles; su importancia alimenticia radica en su alto contenido de azúcares y vitaminas. El interés en *Hylocereus* y *Selenicereus* ha aumentado por su potencial económico prometedor en cosechas de frutas exóticas. Conocidos como pitahayas, estos frutos están bien establecidos en los mercados domésticos e internacionales. El objetivo de este proyecto fue contribuir a mejorar y explotar racionalmente especies de los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus* (Cactaceae) a través del desarrollo de métodos biotecnológicos que permiten su cultivo y propagación masiva *in vitro*. Se ha establecido un protocolo para desinfección e inoculación, logrando el establecimiento de tejidos *in vitro* de *Selenicereus validus* y de *Hylocereus undatus*. Se han desarrollado sistemas para la propagación masiva *in vitro* a través del establecimiento de los tejidos en medios tratados con varios reguladores del crecimiento vegetal: CIN, 2iP, TDZ, mT y BA; probando el tipo y la concentración óptima de citocinina para generación de brotes. Se han obtenido brotes de *S. validus* que a su vez se han enraizado *in vitro* y se han elongado *ex vitro*. En todos los casos experimentales se ha utilizado medio MS al 100%, pH 5.7, 3% de sacarosa, gelificado con 11 g/L de agar. De acuerdo a los resultados obtenidos por el ANOVA, se establece como mejor tratamiento *in vitro* sobre *S. validus*, el 2iP, a concentraciones de 1.0 mg/L y 1.5 mg/L; observando que no influye la posición del explante. Se obtuvieron 20 brotes promedio por explante. Se establece como mejor tratamiento *in vitro* sobre *H. undatus*, la mT, a concentración de 1.5 mg/L en posición horizontal; obteniendo 12 brotes promedio por explante. Se observaron diversas respuestas morfogénicas sobre ambas especies al combinar auxinas y citocininas; los resultados variaron de acuerdo a la especie y concentración empleada. El tratamiento de enraizamiento se realizó sobre ambas especies logrando la mejor respuesta *in vitro* con el empleo de medio MS. La sobrevivencia en suelo fue en promedio del 50% para ambas especies estudiadas. Finalmente se realizó una verificación para determinar de manera cualitativa, la probable presencia de metabolitos secundarios, en concreto pigmentos del grupo de las betalainas, en ambas especies estudiadas. El método empleado (Espectrofotometría) nos ayudó a determinar su presencia en muestras de tejido calloso de *H. undatus* y de *S. validus*. Además se emplearon controles de betabel (*B. vulgaris*) y de la cáscara del fruto de Pitahaya. *Hylocereus undatus* y *Selenicereus validus* han sido poco estudiadas, lo cual ha frenando su mejoramiento y aprovechamiento; la Biotecnología Vegetal podría aportar herramientas valiosas en este sentido.

**ÍNDICE GENERAL**

AGRADECIMIENTOS.....i

CARTAS DE LIBERACIÓN.....ii

RESUMEN.....vi

ÍNDICE GENERAL.....vii

ÍNDICE DE FIGURAS.....ix

ÍNDICE DE TABLAS.....xii

LISTA DE ABREVIATURAS.....xiii

I. ANTECEDENTES

    I.1. Cultivo de Tejidos Vegetales ..... 1

        I.1.1.Composición del Medio de Cultivo..... 4

        I.1.2. Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV)..... 8

        I.1.3. Micropropagación de Plantas..... 11

    I.2. Colorantes.....12

    I.3. Metabolitos Secundarios.....15

    I.4. Betalaínas.....19

    I.5. Generalidades sobre las Cactáceas..... 21

    I.6. Cultivo de Tejidos de Cactáceas..... 23

II. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES SELECCIONADAS

    II.1 Género *Hylocereus*..... 26

    II.2 Género *Selenicereus*..... 28

III. JUSTIFICACION..... 34

IV. HIPÓTESIS..... 34

V. OBJETIVOS..... 35

VI. METODOLOGÍA

    VI.1. Material Vegetal..... 36

    VI.2. Establecimiento de los Cultivos Axénicos..... 36

        VI.2.1. Desinfección de las semillas de *Hylocereus undatus*.....36

        VI.2.2. Generación de las semillas de *Hylocereus undatus*..... 36

        VI.2.3 Obtención de explantes..... 37

    VI.3. Desarrollo del Método de Propagación *in vitro* de las especies *Selenicereus validus* y *Hylocereus undatus* por la activación de yemas axilares.....37

        VI.3.1. Efecto de las citocininas.....37

        VI.3.2. Tipos de explantes.....37

        VI.3.3. Elongación y Enraizamiento.....37

        VI.3.4. Adaptación y Transferencia a suelo.....37



|   |    |
|---|----|
| VI.3.5. Descripción de los tratamientos realizados para la especie <i>Hylocereus undatus</i> para la activación de yemas axilares.....  | 38 |
| VI.3.6. Descripción de los tratamientos realizados para la especie <i>Selenicereus validus</i> para la activación de yemas axilares.....  | 39 |
| VI.4. Diseño de medios de cultivo para conocer las respuestas morfogénicas de las especies seleccionadas, por inducción de Organogénesis y Embriogénesis somática directa e indirecta.....  | 41 |
| VI.5. Metodología para la extracción de tejido caloso pigmentado de ambas especies seleccionadas para verificar de manera preliminar la posible producción de metabolitos secundarios en los tejidos cultivados <i>in vitro</i> ..... | 42 |
| VII. ANÁLISIS DE DATOS .....  | 43 |
| VIII. RESULTADOS  |    |
| VIII.1. <i>Hylocereus undatus</i> .....   | 44 |
| VIII.1.1 Enraizamiento y condiciones <i>ex vitro</i> .....  | 51 |
| VIII.1.2 Supervivencia de las plantas <i>ex vitro</i> .....   | 52 |
| VIII.2. <i>Selenicereus validus</i> .....   | 53 |
| VIII.2.1 Enraizamiento y condiciones <i>ex vitro</i> .....  | 58 |
| VIII.2.2 Supervivencia de las plantas <i>ex vitro</i> .....   | 59 |
| VIII.3 Respuestas morfogénicas de las especies seleccionadas por inducción de Organogénesis y Embriogénesis somática directa e indirecta.....   | 60 |
| VIII.4. Verificación de manera preliminar la posible producción de metabolitos secundarios en los tejidos cultivados <i>in vitro</i> .....  | 66 |
| IX. DISCUSIÓN.....  | 72 |
| X. CONCLUSIONES.....  | 81 |
| XI. BIBLIOGRAFÍA.....   | 82 |

## ÍNDICE DE FIGURAS.

- **FIGURA 1.** Pérez-Molphe, B. E., Ramírez, M. R., Núñez, P. H. y Ochoa, A. N. 1999. Introducción al cultivo de Tejidos Vegetales. 1ª ed. UAA. México. Pp. 9-13; 15-16; 71-78.
- **FIGURA 2.** Pérez-Molphe, B. E., Ramírez, M. R., Núñez, P. H. y Ochoa, A. N. 1999. Introducción al cultivo de Tejidos Vegetales. 1ª ed. UAA. México. Pp. 9-13; 15-16; 71-78.
- **FIGURA 3.** Estructura general de las betalainas (Alacid *et al.* 2006).
- **FIGURA 4.** Roca, M. W., Mroginski, A. L. 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Publicación CIAT No. 151. Colombia. pp. 960.
- **FIGURA 5.** Estructura de las betacianinas y de las betaxantinas (Alacid *et al.* 2006).
- **FIGURA 6.** Textos Científicos (E.U.A.). [sitio de fotografías en línea]. Disponible desde internet en: < [http://www.sciencephoto.com/images/download\\_lo\\_res.html?id=697701841](http://www.sciencephoto.com/images/download_lo_res.html?id=697701841)> [con acceso en mayo-2009].
- **FIGURA 7.** Textos Científicos (E.U.A.). [sitio de fotografías en línea]. Disponible desde internet en: < [http://stokestropicals.com/images/max\\_image/493-270.jpg](http://stokestropicals.com/images/max_image/493-270.jpg) > [con acceso en mayo-2009].
- **FIGURA 8.** Textos Científicos (E.U.A.). [sitio de fotografías en línea]. Disponible desde internet en: < [http://www.koehres-kaktus.de/galerie/kakteen/k\\_r\\_z\\_img/Selenicereus%20validus%2001.jpg.jpg](http://www.koehres-kaktus.de/galerie/kakteen/k_r_z_img/Selenicereus%20validus%2001.jpg.jpg) > [con acceso en mayo-2009].
- **FIGURA 9.** Textos Científicos (E.U.A.). [sitio de fotografías en línea]. Disponible desde internet en: < <http://www.nybg.org/bsci/herb/selenicereusgrand.jpg> > [con acceso en mayo-2009].
- **FIGURA 10.** Textos Científicos (E.U.A.). [sitio de fotografías en línea]. Disponible desde internet en: < [http://pagesperso-orange.fr/cactusepiphytes/Photos13\\_pitaya\\_reunion/pitaya\\_jaune.jpg](http://pagesperso-orange.fr/cactusepiphytes/Photos13_pitaya_reunion/pitaya_jaune.jpg) > [con acceso en mayo-2009].
- **FIGURA 11.** Textos Científicos (E.U.A.). [sitio de fotografías en línea]. Disponible desde internet en: < <http://biolife.files.wordpress.com/2008/01/types-of-dragon-fruits.jpg> > [con acceso en mayo-2009].
- **FIGURA 12.** *Hylocereus undatus*. Se muestra en A. la posición de las semillas en el medio MS. En B. C. D. y E. se observan los brotes germinados de la semilla *in vitro*.
- **FIGURA 13.** *Hylocereus undatus* se muestra en A. B. C. D. E. F. G. H. I. J. los brotes germinados establecidos en medio MS + 0.5 mg/L BA
- **FIGURA 14.** *Hylocereus undatus* se muestra en A. y B. las semillas llevadas a tierra de macetas en condiciones de invernadero. En C. y D. se observa la germinación de las semillas.
- **FIGURA 15.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de BA como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.
- **FIGURA 16.** *Hylocereus undatus*. Respuesta de los explantes tratados con BA a concentraciones de 2.0 mg/L (vertical). Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.
- **FIGURA 17.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de CIN como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.
- **FIGURA 18.** *Hylocereus undatus*. Respuesta de los explantes tratados con CIN a concentraciones de 2.0 mg/L (A. horizontal y B. vertical). Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.
- **FIGURA 19.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de 2iP como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.

- **FIGURA 20.** *Hylocereus undatus*. Respuesta de los explantes tratados con 2iP a concentraciones de 2.0 mg/L (vertical). Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.
- **FIGURA 21.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de mT como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.
- **FIGURA 22.** *Hylocereus undatus*. Respuesta de los explantes tratados con mT a concentraciones de 1.5 mg/L (horizontal). Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.
- **FIGURA 23.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de TDZ como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.
- **FIGURA 24.** *Hylocereus undatus*. Respuesta de los explantes tratados con mT a concentración de 2.0 mg/L (vertical). Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.
- **Figura 25.** *Hylocereus undatus*. Presencia de las raíces formadas en medio enriquecido con 2g/L de Carbón Activado. En las figuras A1 y A2 se puede ver la longitud de las plantas y de las raíces formadas; mientras que la figura A3 muestra como enraizaron en el medio.
- **Figura 26.** *Hylocereus undatus*. Presencia de las raíces formadas en medio MS. En las figuras A1 y A3 se puede ver la longitud de las plantas y de las raíces formadas; mientras que la figura A2 muestra como enraizaron en el medio. En la figura A4 se observa las condiciones *ex vitro* a las cuales se colocaron las plantas.
- **Figura 27.** *Hylocereus undatus*. Brotes que sobreviven y continúan creciendo en condiciones de invernadero.
- **FIGURA 28.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de BA como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.
- **FIGURA 29.** *Selenicereus validus*. Respuesta de los explantes tratados con BA a concentraciones de 2.0 mg/L (A. horizontal y B. vertical). Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.
- **FIGURA 30.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de CIN como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.
- **FIGURA 31.** *Selenicereus validus*. Respuesta de los explantes tratados con CIN a concentraciones de 2.0 mg/L (A. horizontal y B. vertical). Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.
- **FIGURA 32.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de 2iP como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.
- **FIGURA 33.** *Selenicereus validus*. Respuesta de los explantes tratados con 2iP a concentración de 1.0 mg/L (A. horizontal y B. vertical). Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.
- **FIGURA 34.** *Selenicereus validus*. Respuesta de los explantes tratados con 2iP a concentración de 1.5 mg/L (A. horizontal y B. vertical). Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.
- **FIGURA 35.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de mT como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.
- **FIGURA 36.** *Selenicereus validus*. Respuesta de los explantes tratados con mT a concentración de 0.5 mg/L en posición vertical. Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.

- **FIGURA 37.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de TDZ como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.
- **FIGURA 38.** *Selenicereus validus*. Respuesta de los explantes tratados con TDZ a concentración de 0.5 mg/L en posición vertical. Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.
- **FIGURA 39.** *Selenicereus validus*. Presencia de las raíces formadas en medio enriquecido con 2g/L de Carbón Activado. En las figuras A1 y A4 se puede ver la longitud de las plantas y de las raíces formadas; mientras que las figuras A2 y A3 muestran como enraizaron en el medio.
- **FIGURA 40.** *Selenicereus validus*. Presencia de las raíces formadas en medio MS. En las figuras A1 y A4 se puede ver la longitud de las plantas y de las raíces formadas; mientras que las figuras A2 y A3 muestran como enraizaron en el medio. En la figura A5 se observa las condiciones *ex vitro* a las cuales se colocaron las plantas.
- **FIGURA 41.** *Selenicereus validus*. Brotes que sobreviven y continúan creciendo en condiciones de invernadero.
- **FIGURA 42.** Muestras de material empleado para la extracción de posibles pigmentos (condiciones asépticas). A) Tejido calloso proveniente de *H. undatus*; B) Tejido calloso proveniente de *S. validus*; C) Tejido de Betabel y D) Tejido de la cáscara de Pitahaya.
- **FIGURA 43.** Extracción de posibles pigmentos (condiciones asépticas). A) Betabel; B) Tejido calloso de *S. validus*; C) Cáscara de Pitahaya y D) Tejido calloso de *H. undatus*.
- **FIGURA 44.** Extractos obtenidos para la verificación de posibles metabolitos secundarios mediante espectrofotometría. 1) Control de Betabel; 2) Tejido calloso de *S. validus*; 3) Tejido calloso de *H. undatus* y 4) Testigo de Pitahaya (cáscara del fruto).
- **FIGURA 45.** Barrido Espectrofotométrico de Betabel (*B. vulgaris*).
- **FIGURA 46.** Barrido Espectrofotométrico de *S. validus*.
- **FIGURA 47.** Barrido Espectrofotométrico de *H. undatus*.
- **FIGURA 48.** Barrido Espectrofotométrico de la cáscara de Pitahaya.

## ÍNDICE DE TABLAS

- **TABLA 1.** Relación entre la luz absorbida y el color observado (Primo, 1996).
- **TABLA 2.** Número de semillas y de brotes establecidos de la especie *Hylocereus undatus*, en diferentes medios de cultivo.
- **TABLA 3.** Concentración de citocininas utilizadas para cada tratamiento empleado en el diseño de los experimentos a los que se sometió *H. undatus*.
- **TABLA 4.** Número de explantes utilizados para el análisis estadístico en cada uno de los tratamientos y para cada uno de los RCV utilizados; considerando también la posición del explante en el medio de cultivo.
- **TABLA 5.** Concentración de citocininas utilizadas para cada tratamiento utilizado en el diseño de los experimentos a los que se sometió *S. validus*.
- **TABLA 6.** Número de explantes utilizados para el análisis estadístico en cada uno de los tratamientos y para cada uno de los RCV utilizados; considerando también la posición del explante en el medio de cultivo.
- **TABLA 7.** Concentración en mg/L, de los tratamientos con citocinina (2iP) y auxina (ANA) utilizadas para la especie *S. validus*.
- **TABLA 8.** Concentración en mg/L, de los tratamientos con citocinina (mT) y auxina (ANA) utilizadas para la especie *H. undatus*.
- **TABLA 9.** Escala de medición para el registro de las respuestas morfogénicas presentadas en los explantes de ambas especies en estudio.
- **TABLA 10.** Respuesta morfogénica de los explantes tratados con citocinina (mT) y auxina (ANA) a diferentes concentraciones para la especie *H. undatus*, luego de 60-65 días.
- **TABLA 11.** Respuesta morfogénica de los explantes tratados con citocinina (2iP) y auxina (ANA) a diferentes concentraciones para la especie *S. validus*, luego de 60-65 días.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|           |  |
|-----------|--|
| AIA       | Ácido indolacético                               |
| AIB       | Ácido indolbutírico                              |
| ANA       | Ácido naftalenacético                            |
| BA        | Benciladenina o 6-Bencilaminopurina              |
| CA        | Carbón activado                                  |
| CTV       | Cultivo de Tejidos Vegetales                     |
| 2iP       | 2-isopentil-adenina                              |
| CIN       | Cinetina   |
| TDZ       | Tidiazurón [1-Fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il)urea] |
| mT        | Meta-Topolina                                    |
| RCV       | Reguladores de Crecimiento Vegetal               |
| MS        | Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962)     |
| HCl       | Ácido Clorhídrico                                |
| g         | Gramos   |
| (h)       | Explante colocado en posición horizontal         |
| (v)       | Explante colocado en posición vertical           |
| $\lambda$ | Longitud de onda                                 |

**Nota:** Siempre que se mencionen concentraciones de los reguladores de crecimiento vegetal y no se indique lo contrario, las concentraciones serán expresadas en mg/L.

### I.1. Cultivo de Tejidos Vegetales.

Durante los últimos años, el cultivo de tejido de plantas ha emergido como una herramienta poderosa para la efectiva propagación de cactus (Pérez-Molphe et al. 2002). Hoy en día, la biotecnología es una de las herramientas biotecnológicas de mayor aplicación en la agricultura, ya que resuelve una gran cantidad de problemas que antes se tenían. Mediante el cultivo de tejidos vegetales (CTV), llamado también cultivo *in vitro*, se puede llegar a la producción masiva de nuevos individuos deseables bajo condiciones físicas y químicas controladas (Garza et al. 2005). Así, el cultivo de tejidos vegetales presenta varias aplicaciones no sólo en la conservación de germoplasma y propagación de las especies, sino que abarca la producción de metabolitos secundarios, el mejoramiento genético, entre otros (Murashige, 1974).

El cultivo de tejidos *in vitro* y la micropropagación ofrecen alternativas útiles para la multiplicación y conservación de especies de cactus. Estas técnicas tienen el potencial de producir muchas plantas en un periodo corto de tiempo, en un espacio reducido y su funcionalidad se ha demostrado para muchas especies de cactus. Sin embargo, cada especie responde de manera diferente a las condiciones establecidas para la multiplicación *in vitro*, el enraizamiento y la aclimatación; por tal motivo es necesario optimizar estas condiciones de cultivo para cada especie de cactus que deba ser micropropagada. Una ventaja adicional de la micropropagación es que el desarrollo *in vitro* de plántulas de cactus puede ser extremadamente rápido en comparación con siembra *ex vitro* (Pérez-Molphe et al. 2002).

Se le llama Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) al conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas (Pérez-Molphe et al. 1999). El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una serie de técnicas empleadas actualmente para hacer estudios de fisiología, bioquímica, morfogénesis y anatomía, entre otros, así como contribuciones prácticas en la multiplicación y mejoramiento de plantas útiles (Villalobos, 1990) y en peligro de extinción. El CTV también se ha empleado ampliamente en estudios de síntesis (Nabeta et al. 1983) y biotransformación de metabolitos secundarios (Ambid et al. 1983).

Los cultivos *in vitro* pueden iniciarse prácticamente a partir de cualquier parte de la planta (tallo, hoja, semilla, fruto, embrión, cotiledones, raíz, etc.). Comúnmente se seleccionan aquellas

partes de la planta que se encuentran en división activa, como las regiones meristemáticas. Para la generación de metabolitos secundarios por medio de CTV, principalmente se emplea el Cultivo de tejidos y Cultivo de células en suspensión. En el primero, se utilizan pequeños segmentos de tejido inoculados en medios semisólidos, en los cuales, dependiendo de los reguladores de crecimiento utilizados, es posible inducir con cierta facilidad la formación de callos (Ochoa, 1990).

La productividad de los cultivos puede incrementarse modificando las condiciones ambientales (temperatura, pH, luz), los componentes del medio (metales, sacarosa, aminoácidos) o la densidad del inóculo (Charlwood *et al.*, 1990; Zhong *et al.*, 1995; Luczkiewicz *et al.* 2001). El estrés biótico, inducido por adición de extractos crudos o fracciones purificadas de paredes de hongos y bacterias (potenciadores), promueve la síntesis de metabolitos secundarios (Becker *et al.* 1990). Además, a través de cultivo de tejidos se pueden obtener compuestos de menor complejidad y eliminar productos indeseables (Charlwood *et al.* 1990).

Haberlandt en 1902, fue el que realizó los experimentos más importantes respecto al cultivo de tejidos, asimismo, fue el primero en emplear el concepto de callo para definir una masa amorfa de células (Villalobos, 1990). En el caso de los cultivos en suspensión, los callos se mantienen en medio líquido y en agitación continua. Los cultivos en suspensión son atractivos por su rápido crecimiento, fácil manipulación y “simplicidad” debido a la uniformidad y número limitado de tipos celulares, para la producción de metabolitos secundarios (Ochoa, 1990).

En la actualidad se practican varios tipos de cultivos de tejidos vegetales que varían en mayor o menor grado entre ellos; algunos de los más importantes son:

1. Cultivo de plantas completas: En este caso se trabaja con individuos completos, aunque cultivados bajo condiciones artificiales.
2. Cultivo de órganos: Esta modalidad del cultivo *in vitro* se refiere al cultivo de órganos vegetales aislados. Otro caso es el cultivo de embriones.
3. Cultivos de tejidos o segmentos de órganos: Dentro de esta categoría se encuentra el cultivo de tejido calloso.
4. Cultivo de células: Un primer tipo es el cultivo de células en suspensión; un segundo tipo es el cultivo de protoplastos y finalmente es posible el cultivo de células gemáticas aisladas.
5. Cocultivo: Se le da este nombre al cultivo de cualquier tejido vegetal junto con otro organismo, generalmente un microorganismo (Pérez-Molphe *et al.* 1999).

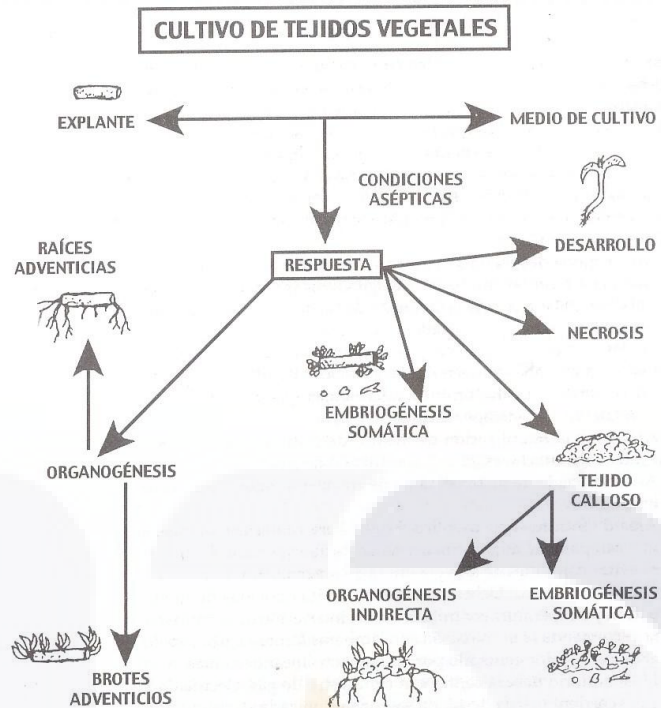


TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

El CTV se basa en el concepto de totipotencia, término que se aplica a que todas las células de una planta tienen la capacidad de regular la división celular y diferenciación para crecer y así regenerar una nueva planta (Teutonico *et al.* 1984). Además, el **CTV se basa en tres principios básicos, de cuya comprensión y manipulación depende el éxito o fracaso de cualquier trabajo en este campo. Los principios básicos son los siguientes** (Figura 1):

1. Elección del explante: Se le llama explante al órgano, tejido o segmento de tejido vegetal que va a ser utilizado para iniciar el cultivo. Éste puede ser una semilla, un embrión aislado, un segmento de hoja, de tallo, de cotiledón, de raíz o de órganos reproductores, entre otros. En teoría, cualquier segmento de tejido vegetal que contenga células vivas puede ser utilizado como explante. Sin embargo, se debe tener en cuenta que del tipo de explante elegido depende el tipo de respuesta en el cultivo.
2. Elección del medio y condiciones de cultivo: El medio de cultivo junto con el tipo de explante determina la respuesta que se obtendrá del mismo. A grandes rasgos, el medio de cultivo consiste en dos grupos de componentes; los primeros son los esenciales y el segundo grupo son los opcionales.
3. Condiciones asépticas: Para que el cultivo de cualquier tejido vegetal prospere de la manera deseada, debe excluirse del mismo a cualquier tipo de organismo contaminante. Tanto el material vegetal, como el medio de cultivo debe esterilizarse para evitar cualquier tipo de contaminación (Pérez-Molphe *et al.* 1999).

Como los cultivos *in vitro* tienen una capacidad fotosintética reducida o nula, debe proveerse a estos de una fuente de carbono orgánico. La mayoría de los medios de cultivo utilizan sacarosa en concentraciones del 2-3%, aunque varía según las especies. La sacarosa tiene además un papel importante como regulador del potencial osmótico del medio de cultivo. En condiciones normales, las plantas tienen la capacidad de sintetizar todas las vitaminas requeridas para su metabolismo, sin embargo los tejidos vegetales cultivados *in vitro* por alguna razón pierden total o parcialmente esta capacidad y se vuelven dependientes del suministro externo de nutrientes. Todas las células cultivadas *in vitro* requieren tiamina y en algunos casos resulta benéfica la adición de piridoxina, ácido pantoténico, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico, ácido ascórbico, etc. Además del nitrógeno inorgánico algunos medios utilizan una fuente adicional de nitrógeno orgánico como complemento, como mezclas complejas de aminoácidos o sustancias individuales (Pérez-Molphe *et al.* 1999).



**FIGURA 1.** Principios básicos del CTV y comportamiento de los cultivos (Pérez-Molphe et al. 1999).

Como puede apreciarse, la respuesta de un tejido al cultivo *in vitro* depende de la interacción entre el explante, el medio y las condiciones de cultivo. Esta respuesta se puede dar como **organogénesis** (formación de órganos adventicios como raíces y brotes), **embriogénesis somática** (formación de embriones a partir de células somáticas), formación de **tejido calloso** o simplemente **desarrollo del tejido**. Una respuesta no deseable, pero que suele presentarse, es la necrosis del tejido, la cual es producto de una elección errónea del explante y/o del medio de cultivo. Cuando se va a cultivar un tejido vegetal se busca que el medio en el cuál se va a colocar contenga todos los elementos necesarios para la supervivencia del tejido aislado, además si se desea obtener una excelente respuesta la elección y la formulación adecuada del medio es esencial (Pérez-Molphe et al. 1999).

**I.1.1. Composición del Medio de Cultivo.**

Para crecer, las células requieren una variedad de nutrimentos orgánicos e inorgánicos; estos requerimientos se demuestran fácilmente en órganos y tejidos extirpados de plantas superiores e inferiores. Los nutrimentos orgánicos, al igual que los inorgánicos, se requieren en dos niveles: uno macro y otro micro. Generalmente, las células en crecimiento pueden fabricar sus proteínas a partir de fuentes adecuadas de nitrógeno y carbohidratos suministrados por el medio de cultivo; sin embargo, existe además una cantidad de sustancias orgánicas adicionales

que se requieren en cantidades mínimas y que son muy activas en el crecimiento (Roca *et al.* 1993).

En teoría, los requerimientos nutricionales de los tejidos vegetales cultivados *in vitro* deben ser similares a los que se presentan en la planta completa bajo condiciones normales. En la actualidad, se ha desarrollado una gran cantidad de medios de cultivo diferentes que cumplen con los requerimientos nutricionales necesarios para sostener el crecimiento de los tejidos vegetales cultivados *in vitro*. Algunos de estos medios son específicos y se adaptan a un solo tipo de tejido o a una determinada especie vegetal. Otros medios de cultivo son de uso más general, es decir, pueden ser aplicados al cultivo de una amplia gama de especies y tejido diferentes (Pérez-Molphe *et al.* 1990).

El primer objetivo en la preparación de un medio de cultivo es suministrar los nutrimentos minerales en concentraciones adecuadas. Se deben incluir los macroelementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca y Mg) y los microelementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, Cl); además, existe evidencia de que se debería añadir níquel en la lista (Roca *et al.* 1993). Los **macronutrientes** son todos aquellos que utilizan las plantas en condiciones normales:

- **Calcio. Ca**, este se requiere para formar pectato de calcio, el cual forma parte integral de la pared celular, ayuda a controlar la permeabilidad y facilita el movimiento de los hidratos de carbono y aminoácidos a través de la planta, promueve el desarrollo de la raíz e interviene en el crecimiento y desarrollo así como en la asimilación de nitrógeno. La falta de calcio puede traer como consecuencia muerte en las puntas de las raíces. Se adiciona en forma de Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ ), nitrato de calcio  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + 4\text{H}_2\text{O}$  en concentraciones de 1 a 3 mM.
- **Magnesio. Mg**, se emplea bajo la forma de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), a una concentración de 1 a 3 mM. Se encuentra presente en la clorofila. Una deficiencia de Magnesio es causa de clorosis en hojas adultas.
- **Azufre. S**, se requiere bajo la forma de sulfatos ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), en concentraciones de 1 a 3 mM. Está presente en aminoácidos y proteínas, en vitaminas y promueve el crecimiento de raíces y follaje verde.
- **Nitrógeno. N**, influye en la proporción de crecimiento de la planta, es esencial para formar ácidos nucleicos, proteínas, clorofila, aminoácidos, alcaloides y algunas hormonas vegetales. Cuando falta nitrógeno esta se observa por la presencia de clorosis en las hojas y la falta de crecimiento, mientras que un exceso se traduce en un crecimiento vigoroso,

una deficiencia suprime el desarrollo del fruto. Se utiliza bajo la forma de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y de amino ( $\text{NH}_4^+$ ), a concentraciones de 25 a 40 mM y 2 a 20 mM respectivamente.

- **Potasio. K**, es necesario para el intercambio celular y para promover el crecimiento meristemático, ayuda a la síntesis de hidratos de carbono y proteínas, en la manufactura de clorofila y para la reducción de nitratos. Su carencia origina crecimiento débil y anormal. Se suministra bajo la forma de nitratos ( $\text{KNO}_3$ ), fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ó cloruros ( $\text{KCl}$ ) a una concentración que varía de 20 a 30 mM.
- **Fósforo. P**, tiene un papel muy importante en el desarrollo de la planta, pues, se utiliza en la síntesis de ácidos nucleicos y compuestos de alta energía, participa en la actividad de diversas enzimas, se suministra al medio como fosfato diácido de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) ó fosfato diácido de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a una concentración de 1 a 3 mM (Evans, 1983).

Los **micronutrientes** tienen función como cofactores enzimáticos y en los sistemas de transporte de electrones. La concentración a la que se utilizan los micronutrientes deben encontrarse dentro de rangos determinados, ya que existen casos en los que pueden ser muy tóxicos si se agregan en exceso y otros casos, como el uso del Hierro, que debido a su tendencia a precipitarse, se suministra al medio como citrato, tartrato ó quelato con EDTA:

- **Boro. B**, interviene en el movimiento de azúcar, agua y hormonas; está involucrado en el metabolismo del Nitrógeno. Su concentración en el medio es de 25 a 100 mM.
- **Manganeso. Mn**, esencial en la membrana del cloroplasto. Su concentración en el medio es de 20 a 90 mM.
- **Cobre. Cu**, involucrado en la conversión de energía, síntesis de clorofila y síntesis de enzimas. Su concentración en el medio es de 0.1 mM.
- **Molibdeno. Mo**, participa en la conversión de nitrógeno en amonio y en fijación de nitrógeno. Su concentración en el medio es de 1 mM.
- **Cobalto. Co**, es esencial en la fijación de nitrógeno. Su concentración en el medio es de 0.1 mM.
- **Hierro. Fe**, interviene en la síntesis de clorofila y en la conversión de energía. Su concentración en el medio es de 1 mM.
- **Zinc. Zn**, involucrado en la síntesis de clorofila y auxinas (Evans, 1983).

En cuanto a los tejidos de plantas, desde 1940 se ha desarrollado una gran cantidad de trabajos sobre sus requerimientos nutricionales en medios estrictamente definidos. En términos generales, la mayor parte de tales tejidos se pueden cultivar exitosamente en un medio que contenga cualquiera de varias mezclas de sales minerales diseñadas para mantener el crecimiento

en soluciones salinas relativamente simples a menos que se complementen con ciertos micronutrientes, vitaminas y otras sustancias promotoras del crecimiento de naturaleza completamente indefinida, tales como el agua de coco (AC), la caseína hidrolizada (CH), los extractos de levadura y de malta, el endospermo líquido de la castaña de Indias, y otros semejantes (Roca *et al.* 1993).

Además de los macro y micronutrientes un medio de cultivo requiere de otros elementos que permitan el desarrollo de la planta, estos son: Sacarosa, Vitaminas, Fuentes de Nitrógeno Orgánico, Complejos orgánicos, Reguladores de Crecimiento Vegetal y Gelificantes:

- **Sacarosa.** Es la fuente de carbono que suple en un cultivo *in vitro* al carbono que la planta toma de la atmósfera como CO<sub>2</sub>. Además juega un papel muy importante como regulador del potencial osmótico del medio de cultivo. La concentración varía de 2 a 3%. Pudiendo incrementarse dependiendo de la especie. Se han probado otros azúcares diferentes a la sacarosa como fructosa, almidón, maltosa, lactosa y galactosa con resultados inferiores a la sacarosa.
- **Vitaminas.** Una planta en condiciones normales sintetiza las vitaminas que requiere pero en condiciones artificiales pierden esta capacidad parcial o totalmente por lo que se les deben suministrar. Entre las vitaminas que deben adicionarse al medio están: tiamina, piridoxina, biotina, ácido *p*-aminobenzóico, ácido Nicotínico, ácido Ascórbico, etc.
- **Fuente de Nitrógeno Orgánico.** Esta fuente es aparte a la suministrada como nitrógeno inorgánico. Como fuente de este nitrógeno utiliza aminoácidos de manera individual o como mezcla. Entre las mezclas más utilizadas están los hidrolizados proteicos como el de caseína a una concentración de 2 a 10 g/L. Los aminoácidos glicina, glutamina y asparagina son los más ampliamente utilizados de manera individual.
- **Complejos orgánicos.** Los complejos orgánicos se emplean en ciertos casos para estimular el crecimiento de los tejidos, aunque su uso no es muy recomendado por contener sustancias no identificadas. Algunos ejemplos son agua de coco, extracto de levadura, extracto de plátano, entre otros.
- **Gelificantes.** Como en condiciones artificiales y axénicas se requiere un medio semisólido este puede obtenerse utilizando un gelificante que no sea reactivo y no sea digerible por el tejido vegetal. Los agentes gelificantes más utilizados son: agar (0.5 a 1%) y phytagel ó gelrite (0.2 al 0.3%) (Pérez-Molphe *et al.* 1999).

Actualmente los medios de cultivo más utilizados son el MS (Murashige y Skoog, 1962), el LS (Linsmaier y Skoog, 1965) y el medio B5 (Gamborg, 1968). Estos medios se usan generalmente

cuando el objetivo es la regeneración *in vitro* de plantas. Otros medios que también se utilizan frecuentemente con otros objetivos son el NN (Nitsch y Nitsch, 1969) y el N6 (Chu, 1978). Los medios WMP (Lloyd y McCown, 1980) y el DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) son frecuentemente usados en el cultivo de especies leñosas (Pérez-Molphe et al. 1990).

Uno de los medios más utilizado en micropropagación es el MS (Murashige y Skoog, 1962) porque contiene macro y micronutrientes; además es suplementado con vitaminas, myo-inositol, reguladores de crecimiento, entre otros componentes. Se han empleado diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento para la micropropagación de cactáceas, por ejemplo Morales, (2000) utilizó bencilaminopurina 2 mg/L y 1 mg/L de cinetina para inducir la germinación y brotación de *Hylocereus undatus* (Garza et al. 2005).

### **I.1.2. Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV).**

Debido a que las plantas han evolucionado de forma diferente que los animales y que crecen arraigadas al suelo, además de que tienen forma de crecimiento y diferenciación abierta, presencia de pared celular, y hábito autotrófico, se puede explicar porque tienen sitios múltiples de producción de hormona. Las fitohormonas son sustancias que ocurren naturalmente, son efectivas en pequeñas cantidades, actúan como señales para estimular o inhibir el crecimiento o regular alguno de los programas del desarrollo de las plantas y son consideradas como señales químicas que facilitan la comunicación intercelular. Los niveles hormonales en plantas están modulados por factores ambientales como la luz, fotoperíodo, y la gravedad, los que pueden afectar su biosíntesis, su destrucción y su distribución (Pimienta et al. 2006).

El desarrollo de cualquier tejido vegetal es un proceso sumamente complejo en el cual interviene un gran número de factores externos e internos cuyos mecanismos precisos de acción en muchos casos aún no están claros. Entre los factores internos que controlan el desarrollo de los diferentes tejidos de una planta destacan los llamados reguladores de crecimiento vegetal (RCV), también conocidos como hormonas vegetales o fitohormonas. Los RCV son compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta, que en muy pequeñas cantidades alteran el crecimiento o los patrones de desarrollo de los tejidos vegetales (Pérez-Molphe et al. 1990).

Los Reguladores de Crecimiento Vegetal son aquellos compuestos orgánicos que en cantidades bajas (lo cual excluye a los factores de nutrición) estimulan, inhiben o modifican de otra manera los procesos fisiológicos (Overbeek, 1954).

Cada hormona ocasiona una amplia variedad de respuestas morfogénicas y de crecimiento, y cada una es pleotrópica en sus efectos. Por ejemplo, las auxinas participan en la regulación de la división celular, crecimiento celular, dominancia apical, respuesta a estímulos direccionales (respuestas trópicas), y en el asentamiento de los frutos, respuestas que son diferentes unas de las otras. No todas las respuestas son estimuladoras. Las auxinas promueven el crecimiento del tallo, pero en concentraciones relativamente altas inhiben el crecimiento de las raíces (Pimienta *et al.* 2006).

Las hormonas vegetales son activas en concentraciones pequeñas, usualmente en el rango nanomolar, aunque unas respuestas empiezan aun en bajas concentraciones (10 a 100 pM). Además las hormonas vegetales son sintetizadas en diferentes sitios en la planta, y no en una glándula específica o tejido. Una hormona vegetal es un compuesto orgánico que se sintetiza en alguna parte de la planta y que se transporta a otra parte en donde concentraciones muy bajas causan una respuesta fisiológica. La respuesta en el órgano blanco no necesita ser promotora, ya que procesos como crecimiento o diferenciación en ocasiones se ven inhibidos por hormona, en especial el ácido abscísico (Pimienta *et al.* 2006).

Los RCV se clasifican en 5 grupos básicos dependiendo de su estructura química y su efecto fisiológico: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. Hasta hace pocos años se tenía la creencia de que la mayoría de los fenómenos relacionados con el desarrollo de los vegetales podían ser explicados sobre la base de simples cambios en las concentraciones y tipos de estos compuestos presentes en un tejido. Actualmente se sabe que el papel de la concentración de estos compuestos en un tejido, aunque importante, no es tan determinante como llegó a suponerse, pues hay otro tipo de consideraciones a tomar para explicar el proceso del desarrollo en las plantas. A pesar de lo anterior, los RCV tienen aún una gran importancia en campos como la agricultura; otro campo en donde destaca el uso de los RCV es el Cultivo de Tejidos Vegetales, ya que mediante el manejo de los tipos, concentraciones y combinaciones de estos compuestos en un medio de cultivo se pueden manipular hasta cierto grado los patrones de desarrollo de los tejidos y obtener las respuestas deseadas como la formación de tejido calloso, brotes, embriones somáticos y raíces. Por lo anterior, el correcto manejo de los RCV en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales suele ser determinante para el éxito o fracaso del sistema (Pérez-Molphe *et al.* 1990).

Los RCV más utilizados en los cultivos *in vitro* son los pertenecientes a los grupos de las auxinas y de las citocininas, ya que son los que regulan en gran medida los procesos de

crecimiento y desarrollo organizado en los cultivos de tejidos vegetales. En menor grado se utilizan algunos reguladores no pertenecientes a estos grupos como las giberelinas y el ácido abscísico (Pérez-Molphe *et al.* 1990).

#### **AUXINAS.**

Las auxinas son un grupo de compuestos derivados comúnmente del triptófano, sintetizados por lo general en los ápices, y que están implicados en varios eventos relacionados con el crecimiento y diferenciación celular. Se sabe que participan en la regulación de algunos procesos que ocurren en los tejidos vegetales como el crecimiento celular, la acidificación de la pared celular, el inicio de la división celular, la formación de tejidos no diferenciados (tejido calloso), la diferenciación del tejido vascular y la formación de órganos (raíces). En las plantas completas las auxinas tienen que ver con la dominancia apical, afecta la senescencia y la abscisión de las hojas y coordinan algunas respuestas tóxicas. La auxina natural más común es el ácido indolacético (AIA), pero dependiendo de la especie, edad de la planta, estación del año y condiciones de crecimiento pueden aparecer otras auxinas naturales en los tejidos como por ejemplo el ácido indolbutírico (AIB). El AIA y el AIB se utilizan frecuentemente en los medios de cultivo; tienden a ser metabolizados por los tejidos, además se desnaturalizan con relativa rapidez en el medio. Estos hacen que la disponibilidad real de estas auxinas en el medio de cultivo disminuya paulatinamente, lo cual resulta útil en aquellos procesos que requieren altas concentraciones de auxinas sólo para la inducción inicial de los mismos (por ejemplo el enraizamiento) (Pérez-Molphe *et al.* 1990).

#### **CITOCININAS.**

Las citocininas generalmente son derivados de la adenina y son sintetizadas en tejidos jóvenes y raíces. Poseen dos propiedades que las hacen muy útiles para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales; por un lado estimulan la división celular y por otro rompen la latencia de las yemas axilares haciéndolas brotar. En las plantas completas, las citocininas promueven la brotación de yemas axilares, estimulan la expansión de las hojas y retardan la senescencia. Junto con las auxinas, la citocininas regulan la división celular. Debido a lo anterior, el balance entre auxinas y citocininas en un cultivo *in vitro* suele ser determinante para el patrón de desarrollo que sigue el tejido (Pérez-Molphe *et al.* 1990).

Las citocininas naturales más comunes son la zeatina, la iso-pentiladinina (2iP) y el ribósido de zeatina. La citocininas sintéticas benciladenina (BA) y cinetina son las más utilizadas en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Además de las auxinas y citocininas que son con mucho los

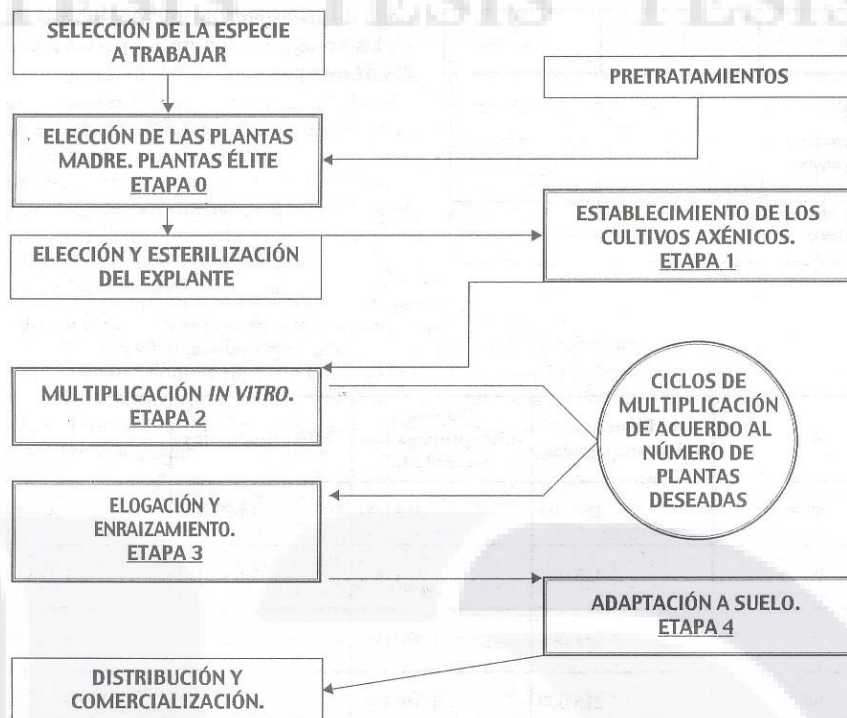


RCV más utilizados en los cultivos *in vitro*, el ácido giberélico y el ácido abscísico tienen algunas aplicaciones en procesos fisiológicos en los tejidos. El ácido giberélico puede utilizarse en algunos casos para la elongación de estructuras como brotes, así como para acelerar la brotación en ciertos tipos de yemas y meristemos. Por su parte el ácido abscísico se utiliza en raras ocasiones para inhibir la germinación de embriones somáticos o como para completar el proceso de maduración de los mismos (Pérez-Molphe *et al.* 1990).

### **I.1.3. Micropropagación de Plantas.**

Se le llama micropropagación a la propagación asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*. Ésta es una de las aplicaciones más utilizadas de entre todas las técnicas que componen la llamada biotecnología vegetal, ello se debe a su enorme productividad al comparársele con las técnicas tradicionales de propagación de plantas. La micropropagación de cualquier especie vegetal consta de cinco etapas básicas, cada una de ellas fundamental para el éxito del sistema (Figura 2):

1. Etapa 0: Selección de las plantas madre. Se trata de una etapa preparativa, en la cual se seleccionan y acondicionan las plantas madre que serán utilizadas para iniciar los cultivos *in vitro*.
2. Etapa 1: Establecimiento de los cultivos axénicos. Consiste básicamente en la elección del explante y la esterilización del mismo para iniciar un cultivo axénico.
3. Etapa 2: Multiplicación del tejido. Aquí es en donde se realiza verdaderamente la micropropagación, obteniéndose un gran número de nuevos brotes a partir de cantidades mínimas de tejido.
4. Etapa 3: Elongación y enraizamiento. Se pretende que los brotes formen su sistema radical al mismo tiempo que se elonguen para facilitar su manipulación y hacer más probable su adaptación a las condiciones ambientales externas.
5. Etapa 4: Adaptación al medio ambiente. Etapa de regulación de las condiciones necesarias para el éxito de la adaptación (Pérez-Molphe *et al.* 1990).



**FIGURA 2.** Esquema general de un sistema de micropropagación. (Pérez-Molphe *et al.* 1990).

La vida humana desde sus orígenes, en común con el resto del reino animal, ha estado íntimamente asociada a la vida vegetal, ya que el hombre obtiene de las plantas múltiples satisfactores para su sobrevivencia (Phillipson, 1990). Las plantas le han brindado al hombre la gran mayoría de sus alimentos, así como muchas materias primas indispensables para la industria como la madera, fibras y combustibles, entre otros (Hall, 1979).

## I.2 Colorantes.

Vivimos en un mundo de color, lo vemos en los árboles, en nuestra ropa, en nuestra casa y en los alimentos que ingerimos diariamente; tal es así, que los consumidores primero califican la calidad de un alimento por su color. Por ello la funcionalidad de los colorantes al ser aplicados a un alimento tiene un doble interés, dar un valor estético y diferenciar uno de otro. El consumo de colorantes artificiales se ha visto restringido en muchos países, después de haber encontrado estudios clínicos que han demostrado que muchos de estos que todavía se utilizan, son potencialmente dañinos para el ser humano, ya que actúan como tóxicos crónicos, acumulativos y en general por su actividad cancerígena, por lo que, muchas investigaciones en los últimos años han estado dirigidas a la búsqueda de pigmentos naturales que puedan sustituir a los colorantes artificiales que tanto se usan (Márquez *et al.* 2007).

Un colorante es un compuesto químico que imparte color, puede ser definido como la sustancia obtenida de los vegetales, animales o minerales, o por síntesis, empleada para impartir a acentuar el color de los alimentos (Mandujano, 2006).

Los colorantes naturales pueden ser de origen animal, vegetal y mineral y se encuentran representados por los 3 colores primarios (rojo, verde y azul) y muchas de sus combinaciones se observan en casi todos los colores del espectro visible por ejemplo amarillo, naranja, violeta, etc. En el caso de los alimentos coloreados a partir de extractos de plantas, frutas, etc., también se consideran como natural al igual que los colorantes producidos por fermentación y los sintetizados por algunos microorganismos (levaduras, hongos y bacterias) en diferentes medios de cultivos, por ejemplo, los carotenoides y las antocianinas. La mayoría de los colorantes naturales para alimentos se clasifican en cinco grupos básicos: tetrapirroles (clorofila); isoprenoides o carotenoides (carotenos, licopeno y xantofilas); benzopireno (antocianinas y flavonoides); betalaínas (betacianinas y betaxantinas) y otros derivados de algún proceso (caramelo y siropes) (Márquez *et al.* 2007).

El ojo humano solo puede percibir el color cuando su energía corresponde a una longitud de onda entre 380 y 780nm. Por lo tanto el color es parte de la energía radiante que el hombre puede percibir mediante sensaciones visibles que se generan por estimulación de la retina del ojo, es la percepción por el ojo humano de los productos coloreados. Cabe mencionar que en los alimentos, la variedad de color es atractivo e implica diversidad de sabores y texturas aunque, las variaciones en la intensidad del color pueden sugestionar al consumidor dándole la idea de que el alimento estuvo sujeto a un proceso mal controlado (Mandujano, 2006).

Muchos colorantes naturales tienen enlaces dobles conjugados; algunos ejemplos son: vitamina A, amarilla, tiene seis con cinco metilos; el licopeno, colorante del tomate, tiene 11, con 10 metilos; entro otros. Cuanto mayor es el número de enlaces dobles conjugados, mayor es la longitud de onda de la luz absorbida, y mayor la intensidad de la banda de absorción; los sustituyentes donadores de electrones aumentan el efecto. El color observado es el complementario de la luz absorbida. En la tabla 1 se muestra la relación entre la luz absorbida y el color observado (Primo, 1996).

| $\lambda$ de la luz absorbida (nm) | Zona del espectro visible | Color observado |
|------------------------------------|---------------------------|-----------------|
| 400-430                            | Violeta, añil             | Amarillo        |
| 430-470                            | Azul                      | Naranja         |
| 470-500                            | Azul, verde               | Rojo            |
| 500-520                            | Verde                     | Púrpura         |
| 520-540                            | Verde, amarillo           | Violeta         |
| 540-590                            | Amarillo                  | Añil            |
| 590-610                            | Naranja                   | Azul            |
| 610-700                            | Rojo                      | Verde           |

**TABLA 1.** Relación entre la luz absorbida y el color observado (Primo, 1996).

El sistema conjugante fundamental o típico de un colorante se llama “grupo cromóforo” y en los azocolorantes éste es el grupo  $-N=N-$ , con seis electrones “móviles”, que une a los anillos aromáticos. Pero en la molécula se introducen además, otros grupos llamados “auxocrómicos” que cuando son donantes de electrones aumentan la resonancia, intensifican la absorción de luz y desplazan el máximo del espectro a longitudes de onda ( $\lambda$ ) más largas (fotones de menor energía) y el color a tonos azulados y verdes; estos grupos, que se llaman “batocrómicos”, son los grupos que atraen electrones y los sustraen a la resonancia, desplazan la absorción a longitudes de onda más cortas y el color a tonos amarillos y anaranjados y se llaman “hipsocrómicos”. La presencia de grupos auxocrómicos y la extensión del sistema resonante definen conjuntamente el tono del color. Además, en las moléculas de los colorantes industriales se introducen grupos ácidos, básicos, alquilos u otros que les den buenas propiedades para el teñido de fibras específicas y resistencia al lavado y a la luz (Primo, 1996).

Los colorantes se pueden clasificar de acuerdo a varios criterios; según su **origen**:

- Orgánicos o naturales: procedentes de plantas o animales, tales como la clorofila, carotenos, betalaínas, flavonoides y antocianinas entre otros.
- Minerales: tales como lacas, sulfato de cobre y cromato de potasio entre otros; no se usan en alimentos porque llevan iones metálicos.
- Artificiales: obtenidos por síntesis química.

De acuerdo a su **solubilidad** son hidrosolubles y liposolubles (Mandujano, 2006).

### I.3. Metabolitos Secundarios.

Durante muchos años, los colorantes artificiales se han venido utilizando para reemplazar a los colorantes naturales de los alimentos que se descomponen durante su procesado. Sin embargo, recientemente, el número de colorantes apropiados para el procesado de alimentos se ha reducido drásticamente, como consecuencia de diversos estudios toxicológicos, en los que se han encontrado problemas de salud derivados del uso de ciertos colorantes artificiales. En la actualidad, existe bastante recelo hacia el consumo de alimentos que contengan colorantes sintéticos. Se prefieren los colorantes naturales. Sin embargo, para su producción industrial, los colorantes naturales se han de extraer del material que los contiene, lo que los hace más caros, menos estables, y con menor poder colorante que sus correspondientes artificiales (Alacid *et al.* 2006).

El uso de los colorantes alimentarios está regulado por la legislación de cada país. La betanina es un colorante natural que se utiliza como aditivo de color rojo. También se conoce como "rojo remolacha" o aditivo E-162 en la Unión Europea, y aditivo 73.40 de la sección CFR 21 de la "Food and Drugs Administration" de Estados Unidos. La betanina es un componente hidrosoluble que proporciona a los alimentos un color rojo-púrpura. Se obtiene de las variedades rojas de la remolacha, *Beta vulgaris*. Generalmente, se usa en alimentos que no requieren tratamientos térmicos, como yogures, golosinas, jarabes, helados y salchichas. Es componente de un grupo de pigmentos llamados betacianinas, de la familia de las betalainas. Las betalainas son pigmentos vegetales derivados del ácido betalámico, con aminas cuaternarias, tal como se muestra en la Figura 3. (Alacid *et al.* 2006).

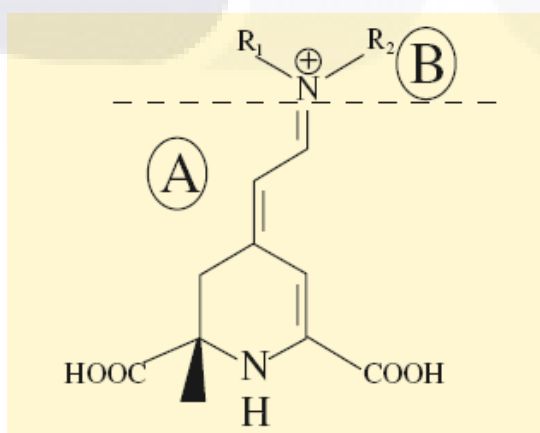


FIGURA. 3. Estructura general de las betalainas (Alacid *et al.* 2006).

Por otra parte, las plantas aportan otro tipo de compuestos indispensables para un sinnúmero de procesos igualmente importantes para el bienestar humano. Estas sustancias tienen una importancia trascendental para la vida diaria de los seres humanos, pues a pesar de los grandes avances en la síntesis de compuestos orgánicos, en la actualidad todavía el 25% de los fármacos prescritos en los Estados Unidos de Norteamérica se obtienen directamente de plantas cultivadas en el campo o de plantas que crecen en forma silvestre y que se colectan en las selvas, desiertos, bosques y otros ecosistemas. El potencial que ofrecen los vegetales es enorme, puesto que de las cerca de 300,000 especies de plantas vasculares que se conocen, sólo entre el 1 y 5% de ellas se han investigado para la producción comercial de productos. Cada año se reportan en la literatura científica unos 1,500 nuevos productos obtenidos de los vegetales, de los cuales más del 20% presentan una actividad biológica importante (Pérez-Molphe *et al.* 1990).

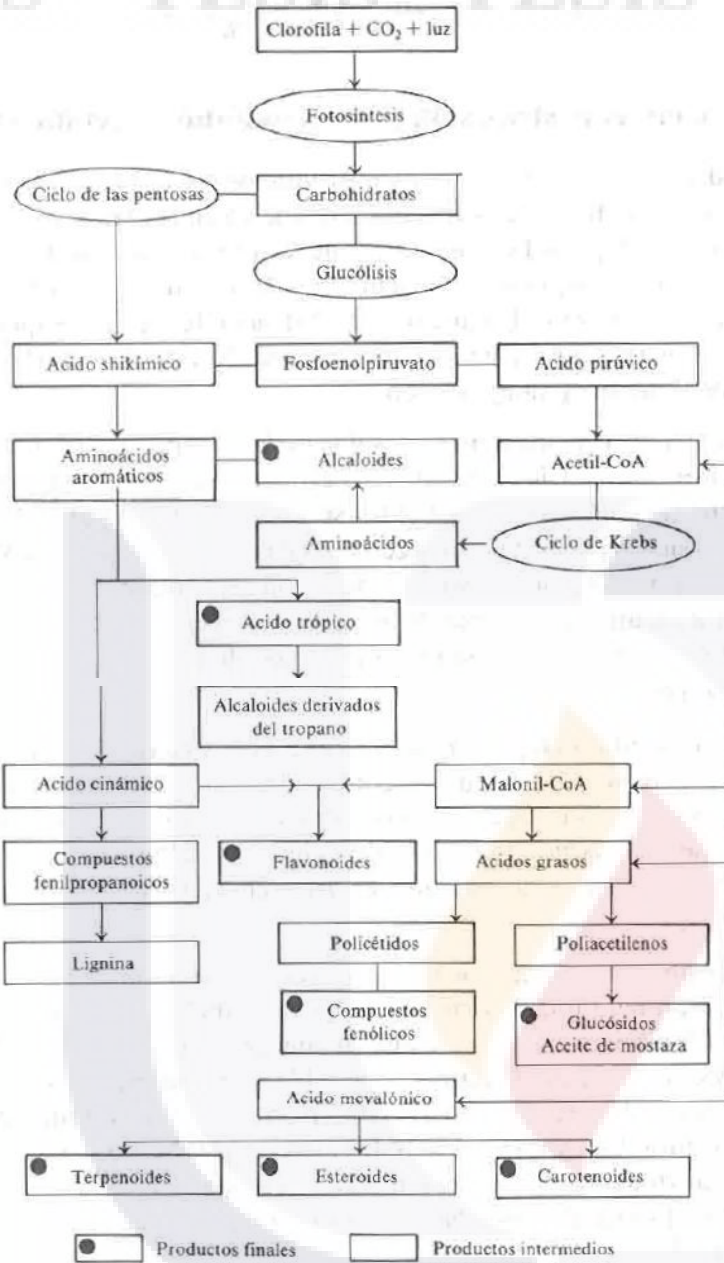
La inmensa mayoría de los compuestos que pertenecen a los grupos antes mencionados provienen del llamado metabolismo secundario que tiene lugar en casi todos los organismos vivos, incluyendo a las plantas. Los metabolitos secundarios se sintetizan y acumulan únicamente en determinadas etapas del desarrollo y de la diferenciación celular; éstos son una manifestación de la individualidad del organismo propio que los produce (Pérez-Molphe *et al.* 1990).

Se definen como metabolitos secundarios aquellos compuestos que no tienen una función reconocida en el mantenimiento de los procesos fisiológicos fundamentales de los organismos que los sintetizan. Puesto que las plantas no se desplazan de un lugar a otro, han desarrollado una gran cantidad de estrategias para sobrevivir, y en este sentido los metabolitos secundarios desempeñan las siguientes funciones importantes: protegerlas contra los depredadores, permitirles competir ventajosamente por el hábitat con otras plantas, atraer polinizadores y simbioses y, tal vez, brindarles protección contra los diferentes tipos de estreses a los que se ven sometidas (Roca *et al.* 1993).

Dentro de los metabolitos secundarios más estudiados se encuentran las antocianinas y las betalaínas (Figura 4). Las betalaínas, compuestos nitrogenados solubles en agua localizadas en las vacuolas de las células, se dividen en betacianinas (rojas) y betaxantinas (amarillas). Las betalaínas adquieren más importancia en la industria alimentaria ya que se usan en la producción de yogurt, helados, jaleas, aderezos y bebidas frías (Spears, 1988). La acumulación de betalaínas se ha descrito en *Beta vulgaris* (Girod *et al.* 1991), *Amaranthus* (Elliot, 1979), y *Myrtillocactus geometrizans* (Colomas *et al.* 1978).

La importancia biológica de estos compuestos es variada y se ha determinado que pueden presentar actividad antiviral y antibacterial, ser marcadores taxonómicos y filogenéticos, estar involucrados en el papel de atracción de dispersores de semillas y/o polinizadores, además de ser pigmentos naturales de alimentos. Sin embargo por ser moléculas de gran sensibilidad química, su aprovechamiento integral está limitado en la industria alimentaria; amerita controles enzimáticos eficientes, procedimientos adecuados de extracción y atmósferas controladas (Viloria *et al.* 2002).

Este grupo de componentes se puede dividir según su estructura química y sus propiedades colorantes: Los pigmentos amarillos, llamados betaxantinas, se forman por condensación del ácido betalámico con aminas o aminoácidos. El más representativo es la indicaxantina. Los pigmentos rojo-morados se forman por condensación del ácido betalámico con derivados de ciclo-DOPA. Muchos están glicosilados y varían en los grupos acilo y en la posición de la glucosa. La betanidina es la unidad básica estructural de la mayoría de las betacianinas, seguida de la isobetanidina, que es su isómero C15. Estos compuestos son metabolitos secundarios, sintetizados en el citoplasma y almacenados en la vacuola. En las plantas superiores se acumulan sólo en ciertos tejidos y en estados específicos del desarrollo. Así, las betalaínas dan color a diferentes órganos, como flores, frutos, hojas, raíces, etc., donde producen colores rojo, amarillo, naranja, rosa, etc. (Figura 5). En las plantas superiores están presentes sólo en familias del orden *Caryophyllales*. Se ha estudiado la producción de pigmentos en algunas especies de las familias *Amarantaceae*, *Chenopodiaceae* y *Cactaceae*, pertenecientes al mencionado orden (Alacid *et al.* 2006).



**FIGURA 4.** Principales vías del metabolismo secundario en células vegetales (Roca et al. 1993).

El género *Amaranthus* contiene especies que se utilizan para alimentación y forraje, como plantas ornamentales y también para la producción de pigmentos. El género *Amaranthus* contiene especies que se utilizan para alimentación y forraje, como plantas ornamentales y también para la producción e isoamarantina, solubles en agua. Los extractos acuosos no tienen aroma ni sabor desagradable, lo que supone una ventaja para su utilización como aditivos (Alacid et al. 2006).

En la familia *Chenopodiaceae*, la remolacha (*Beta vulgaris*) se utiliza principalmente para la producción de azúcar. Algunas variedades son coloreadas, acumulándose los pigmentos principalmente en tallos y raíces. Éstas se comercializan para el consumo como remolacha de



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mesa y también por sus pigmentos. El colorante natural E-162 se obtiene de la remolacha roja, y se presenta en el mercado en forma de polvo o de extracto acuoso. Tiene un olor característico, producido por la presencia de geosmina, que puede limitar sus aplicaciones en alimentos, o requerir tratamientos para la eliminación del olor. La remolacha roja contiene pigmentos rojos y amarillos, betacianinas y betaxantinas, respectivamente. Las betaxantinas son vulgaxantina I y II, mientras que las betacianinas son betanina y su isómero isobetanina (Alacid *et al.* 2006).

La tercera familia, *Cactaceae*, es una familia con muchos géneros. Algunas especies del género *Opuntia* se consumen como fruta fresca o como forraje. También se pueden encontrar en mermeladas, caramelos, licores, zumos, etc. Las betalaínas aparecen principalmente en flores y frutos. Estas plantas están extendidas por los países mediterráneos y América, siendo originarias de América del Norte. La mayoría de las especies son silvestres, y sólo unas pocas se cultivan para su producción comercial. Así, *Opuntia ficus-indica* se cultiva en países como Argentina, Chile, Israel, Italia, USA, México, España y Sudáfrica. Estas plantas crecen en regiones semiáridas y tienen un bajo requerimiento de agua. Sus cultivos son una alternativa para el desarrollo agrícola de regiones áridas. Los frutos rojos de *Opuntia* tienen un alto contenido en betalaínas, tanto los pigmentos amarillos, betaxantinas, como los rojos, betacianinas; ambos son fácilmente extraíbles con agua. El extracto acuoso de frutos de *Opuntia* tiene un aroma agradable a fruta fresca (Alacid *et al.* 2006).

#### **I.4. Betalaínas.**

Son conjugados del ácido betalámico con ciclo-dopa y aminoácidos o aminas, respectivamente. Comprenden las betacianinas (rojo-violeta) y las betaxantinas (amarillo) (Moreno *et al.* 2007).

Los pigmentos que se encuentran en los vegetales juegan papeles importantes en su metabolismo así como para atracción visual en la naturaleza, en cuanto a las propiedades antioxidantes, se han hecho diferentes estudios sobre varios pigmentos. Algunos estudios han demostrado que las betalaínas del betabel, tienen actividad antioxidante (Reynoso *et al.* 1997) y las betacianinas han sido recientemente reconocidas como agentes antirradicales (Stintzing *et al.* 2005). Las betalaínas son una clase de pigmentos que proveen los colores a una amplia variedad de flores y frutos, incluyen dos clases; betacianinas (rojo-violeta) y betaxantinas (amarillas) (Kanner *et al.* 2001).

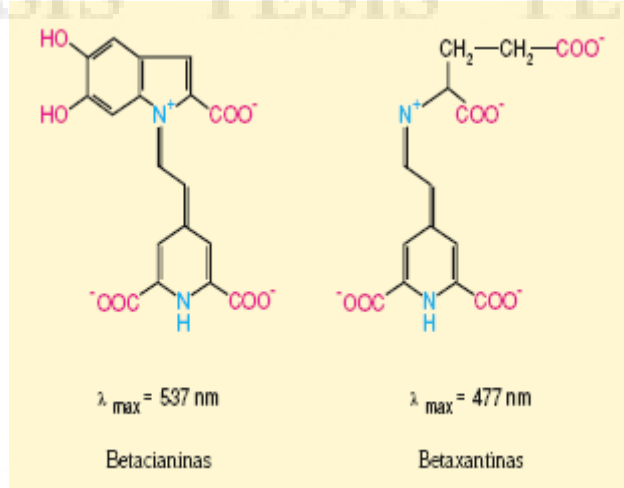
Se conocen más de 50 betalaínas y todas tienen la misma estructura básica (Fig. 3). Su color se le atribuye a los dobles enlaces conjugados en resonancia del núcleo aromático -R sustituido con el cromóforo del 1,7-diazoheptametina. Cuando 'R no amplía la conjugación del sistema 1,7-diazoheptametina, el compuesto exhibe un máximo de absorción de luz aproximadamente a 480nm, característico de las betaxantinas amarillas. Si la conjugación se amplía a 'R, el máximo de absorción de luz se desplaza aproximadamente a 540nm, característico de las betacianinas rojas (Sánchez, 2006).

Las **Betacianinas** y las **Betaxantinas** (Figura 5), son un pequeño grupo de pigmentos de color rojo y amarillo respectivamente, que se encuentran principalmente en el betabel, ciertos frutos de cactus y la remolacha roja (*Beta vulgaris* L.). El término betalaínas describe una gran familia de sustancias químicas, las que pueden ser convenientemente subdivididas en dos clases: betacianinas de color rojo y las betaxantinas de coloración amarilla (Márquez *et al.* 2007).

La betanina es el pigmento rojo mayoritario de las betacianinas, contribuyendo del 75 al 95% de este color. Los otros pigmentos de interés dentro de este grupo son prebetanina, isobetanina, isobetanidina e isoprebetanina. El pigmento amarillo mayoritario de las betaxantinas es la vulgaxantina (I), contribuyendo aproximadamente el 95% de este color. El otro pigmento importante en este grupo es la vulgaxantina (II) (Márquez *et al.* 2007).

Se ha demostrado que la velocidad de degradación de las betaninas responde a una cinética de primer orden, ya sea en los jugos, la pulpa, los polvos o en las soluciones modelos. De hecho, el color de las betaninas resulta más estable en los extractos que en las formas purificadas (Márquez *et al.* 2007).

La estabilidad al calor de las betaninas en solución y en los alimentos, tiene una fuerte dependencia del pH, la temperatura, oxígeno y tipo de ácido, encontrándose la máxima estabilidad a pH entre 5 y 6. Por otra parte hay que destacar que la luz es un factor significativo en la aceleración de la degradación de estos pigmentos, lo que trae consigo la necesidad de proteger los productos que contienen betaninas de largas exposiciones a la luz y al aire, así como realizar las extracciones y almacenamiento en atmósfera de nitrógeno (Márquez *et al.* 2007).



**FIGURA 5.** Estructura de las betacianinas y de las betaxantinas (Alacid *et al.* 2006).

### I.5. Generalidades sobre las Cactáceas.

Las cactáceas son autóctonas del Continente Americano, donde se encuentran distribuidas especialmente en las regiones áridas y semiáridas desde Canadá hasta Argentina (García, 1993; Ortega *et al.* 2006). Esta familia, con cerca de 2000 especies, está constituida por aproximadamente 125 géneros. Por sus condiciones de latitud, topografía y clima, México alberga la mayor cantidad de especies de cactáceas, con un número estimado de 800 (García, 1993). Además México presenta un alto índice de endemismo a nivel genérico (73%) y a nivel específico (78%). La mayor parte de las especies habitan en las regiones áridas y semiáridas del país, particularmente en la porción sureste del Desierto Chihuahuense, incluyendo la Zona Árida Queretano-Hidalguense. México concentra un total de 48 géneros y 800 especies reconocidas. Del total de los géneros que existen en este país, 15 (31.3%) están estrictamente restringidos a sus límites territoriales, y 20 más son casi endémicos. En este último caso, una o varias de las especies de un género determinado extienden su distribución a áreas adyacentes al territorio mexicano, especialmente en el suroeste de los Estados Unidos de América (Hernández *et al.* 1994).

La Región del Desierto de Chihuahua es el principal centro de distribución de cactus mexicanos. Los centros secundarios se encuentran en el Desierto de Sonora, en los Valles de Tehuacan y Cuicatlán, en la Región Mixteca, en el extremo sur del Istmo de Tehuantepec y en Guerrero y Michoacán (Gómez *et al.* 2000).

En sus ecosistemas de crecimiento, los cactus juegan un papel importante debido a las numerosas interacciones biológicas establecidas con otras plantas y animales. Además, algunas especies de cactus representan importantes fuentes de alimento para los humanos (frutas y

verduras) (Ortega *et al.* 2006). Por otro lado son empleadas como forrajes, materiales para diversas construcciones, ornamentales y fuente de metabolitos secundarios como los alcaloides, betalainas, triterpenos y esteroides (González *et al.* 2006).

En una vista hacia el pasado, los precursores de la evolución de los cactus fueron, probablemente, las plantas tropicales cuyo clima se volvió más y más árido, resultando en la selección y finalmente supervivencia de aquellas especies capaces de conservar agua. Las características físicas y fisiológicas que dan a los cactus y plantas relacionadas, llamadas plantas suculentas, la habilidad de tolerar los ambientes desérticos, son las mismas características que las hacen tan atractivas (Robbins, 2003).

Estas plantas tienen la característica de que utilizan de manera eficiente el agua (con eficacias de cinco a diez veces mayores que los cultivos convencionales), lo que ocasiona que el requerimiento de agua sea bajo. Esta característica, se debe a la vía fotosintética para esta familia, la vía del metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). En las plantas CAM, los estomas se abren de noche y capturan así el dióxido de carbono cuando la transpiración es baja (Esquivel, 2004).

En investigaciones anteriores, ya se ha reportado que los frutos de la mayoría de las especies cactáceas, con excepción de los pertenecientes a la subfamilia *Pereskioideae*, son comestibles. En general, la pulpa, integrada por los funículos de las semillas que al madurar el fruto se llena de líquidos azucarados, constituyen un alimento fresco y dulce, muy gustado en el país. Su importancia alimenticia radica en su alto contenido de azúcares y cantidades considerables de vitaminas B, C y E (Bravo, 1978).

Se han registrado numerosas especies de cactáceas que producen frutos utilizados por el hombre como alimento, las cuales pertenecen principalmente a los géneros *Pereskioopsis*, *Opuntia*, *Hylocereus*, *Escontria*, *Heliabrava*, *Pachycereus*, *Stenocereus*, *Carnegiea*, *Machaerocereus*, *Neobuxbaumia*, *Myrtillocactus*, *Polaskia*, *Echinocereus*, *Ferocactus* y *Mammillaria*, pero los de mayor importancia económica, por ser los más utilizados, son los de *Opuntia*, *Hylocereus* y *Stenocereus* (Bravo, 1978).

Entre las cactáceas existen alrededor de 35 especies que tienen potencial como cultivo para obtención de frutos, vegetales o forraje. Algunas de las especies de mayor interés en este sentido se muestran en el Cuadro 1 (Esquivel, 2004).

**Cuadro 1.** Cactaceae con potencial para ser utilizadas como cultivos nuevos para el mercado de exportación israelí. (adaptado de Mizrahi y Nerd, 1996)

| Nombre botánico   | Nombre común (Inglés) | Distribución            |
|---|-----------------------|-------------------------|
| <i>Acanthocereus tetragonus</i> (L.) Humlk                | Acanthocereus         | México                  |
| <i>Cereus peruvianus</i> (L.) Miller                      | Apple cactus (Pitaya) | America del Sur (Norte) |
| <i>Escontria chiotilla</i> (Weber) Britt. & Rose          | Pitaya (Jiotilla)     | México                  |
| <i>Hylocereus costarricensis</i> (Weber) Br. & R.         | Pitahaya              | America Central         |
| <i>Hylocereus paolyrhi</i> (Weber) Br. & R.               | Pitahaya              | America Central         |
| <i>Hylocereus polyrhizus</i> (Weber) Br. & R.             | Pitahaya              | America Central         |
| <i>Hylocereus purpusii</i> (Weber) Br. & R.               | Pitahaya              | America Central         |
| <i>Hylocereus undatus</i> (Weber) Br. & R.                | Pitahaya              | America Central         |
| <i>Myrtilloactus geometrizans</i> (Mart.) Cons.           | Pitaya                | México                  |
| <i>Nopalea cochenillifera</i> (L.) Salm-Dyck              | Nopalito, Nopalea     | México                  |
| <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Millar                   | Prickly pear          | America Tropical        |
| <i>Opuntia streptacantha</i> Lem.                         | Prickly pear          | America Tropical        |
| <i>Pachycereus pringlei</i> (Berger) Br. & R.             | Cardon pelon          | Desierto Sonoran        |
| <i>Selenicereus megalanthus</i> (Schum.) Br. & R.         | Pitaya                | Colombia                |
| <i>Stenocereus griseus</i> (Engelm.) Gilbs.               | Pitaya                | Oaxaca, México          |
| <i>Stenocereus gummosus</i> (Engelm.) Gilbs.              | Pitaya agria          | Desierto Sonoran        |
| <i>Stenocereus stellatus</i> (Pfeiff.) Riccob.            | Pitaya                | México                  |
| <i>Stenocereus thurberi</i> (Engelm.) Buxb.               | Pitaya dulce          | México                  |
| <i>Stenocereus thurberi</i> var. <i>litoralis</i> (E.) B. | Pitaya dulce          | México                  |

### I.6. Cultivo de Tejidos de Cactáceas.

Hicks en 1980 describe la propagación *in vitro* como una variedad de secuencias complejas en desarrollo como resultado de la manipulación experimental de partes de plantas. De esta forma podemos seleccionar una especie deseable y establecer los protocolos de desarrollo. Actualmente, para la propagación de cactáceas se emplean dos tipos: los tradicionales y aquellos con desarrollo de biotecnología mediante el cultivo de tejidos vegetales (Garza *et al.* 2005). Las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* se han desarrollado en una medida suficiente para la propagación asexual de varios cactus (Dávila *et al.* 2005).

La Biotecnología junto con el apoyo de sus métodos avanzados puede facilitar el desarrollo de las especies de cactáceas. Algunos estudios han reportado cultivo de tejidos y formación de plantas de diferentes especies de *Hylocereus*. Se ha investigado el potencial del cultivo de tejidos para la propagación de ciertos cactus incluyendo *H. calcaratus*. Además, Infante (1992) ha reportado un método para la proliferación de brotes axilares y formación de embriones a partir de explantes en algunas especies de pitahaya amarilla. El thidiazurón [N-fenil-N-(1,2,3 thiadiazol-5-il) urea; TDZ] induce múltiples brotes en plantas de pitahaya que crecen en suelo (Yasseen, 2002).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Las cactáceas pueden reproducirse de manera tradicional por semillas, por propagación vegetativa, por esqueje y por injerto, sin embargo, estos métodos son poco exitosos cuando la germinación y el índice de crecimiento son bajos. Una alternativa potencial para el cultivo de cactáceas es la tecnología de cultivo *in vitro*, la cual puede ser de gran valor en la preservación y utilización de especies de cactáceas en vías de extirpación, ya que por estos métodos es posible obtener cientos o miles de plantas al año (Johnson *et al.* 1979).

La propagación de cactáceas por vías tradicionales tiene como principal inconveniente el largo tiempo que media entre la obtención de las nuevas posturas hasta su siembra en condiciones de campo, así como las bajas tasas de multiplicación que dificultan la disponibilidad de gran cantidad de posturas. Las técnicas de cultivo de tejidos resultan atractivas para la propagación de cactáceas, debido a las altas tasas de multiplicación que se obtienen y al reducido material vegetal de partida requerido. Las técnicas de cultivo de tejidos han sido aplicadas en la propagación de diferentes géneros de cactáceas (Quiala *et al.* 2007). Los métodos convencionales son inadecuados para especies con dormancia en las semillas, con bajos índices de germinación, con esterilidad propia, entre otras. Los sistemas de micropropagación han sido desarrollados para más de 35 especies de cactus, representando 20 géneros (Santos *et al.* 2007).

Las especies variadas de cactus son importantes como ornamentales y, recientemente, algunas especies han sido introducidas como campos de frutas comerciales. Las plantas de estas familias tienen bien establecidos sus protocolos en estudios *in vitro*. Los brotes cultivados de muchas especies de cactus han sido obtenidos utilizando semillas o fragmentos de tallo como material de inicio (Wika *et al.* 2006). El cultivo de tejidos vegetales ha surgido como una excelente herramienta para la micropropagación y ha sido empleado en diferentes géneros como *Cereus*, *Equinocereus*, *Ferocactus*, *Mammillaria*, *Opuntia* y otros (García *et al.* 2005).

Los cactus poseen un tipo único de brotes inactivos (areolas) que consisten en racimos de espinas dorsales o de otros accesorios que se puedan activar *in vitro* para formar brotes (Wika *et al.* 2006). Este método resulta muy adecuado para la conservación de las características genotípicas de las especies, ya que no genera variación somaclonal, como sí lo pueden hacer los métodos indirectos de regeneración, cuya primera etapa es la producción de tejido calloso. La activación de areolas se logra mediante la adición de citocininas al medio de cultivo, siendo las más usadas la 6-bencilaminopurina o benciladenina (BA), la 6- (γ-γ-dimetilalilamino) purina o 2-isopenteniladenina (2iP) y la furfurilaminopurina o cinetina (Retes *et al.* 2007).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Alternativamente, los brotes se pueden producir indirectamente derivando de la vía del callo como explante, aunque esta vía es menos favorecida pues son probables las inestabilidades genéticas. La embriogénesis somática también se ha reportado para varias especies (Wika *et al.* 2006). A pesar del gran número de especies mexicanas de cactáceas de importancia ecológica, o con un uso potencial interesante, sólo se han establecido protocolos para la multiplicación *in vitro* de una fracción muy pequeña de ellas (Retes *et al.* 2007).

El único trabajo reportado sobre la proliferación de brotes y embriogénesis somática en pitahaya amarilla es el de Infante (1992), quien empleó epicotilos como explantes en un medio de cultivo que contenía varias combinaciones de ácido naftalenacético (ANA) y 6-benciladenina (BA). Con esta metodología, algunas dificultades fueron observadas, tales como la carencia o muerte del callo. Por lo tanto, un segundo método es el que se ha empleado, utilizando tidiazurón (TDZ) un sustituto de fenilurea (Pelah *et al.* 2002). Diversos medios y hormonas se han probado para la propagación de los cactos, pero solamente en pocos casos se han comprobado como útiles con éxito en una sola especie. En cambio, se ha sugerido que cada especie de cacto puede requerir una combinación única de hormonas (Giusti *et al.* 2002).

Hay algunos informes sobre el cultivo *in vitro* de cactos. En el caso de plantas con el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), los cactos son afectados altamente por los ambientes artificiales en el cultivo de tejidos. Las plantas CAM crecen *ex vitro* incorporando CO<sub>2</sub> a los ácidos orgánicos en la noche y cierran sus estomas durante el día para reducir pérdida de agua. La absorción del CO<sub>2</sub> de manera *in vitro* en cactos en medio de cultivo, sucede continuamente en la luz y la oscuridad, por lo tanto el crecimiento de los cactos puede ser considerablemente acelerado por el medio de cultivo *in vitro*. La elevada humedad relativa y un medio rico en nutrientes pueden alterar el crecimiento del tejido, incluso en ausencia de reguladores de crecimiento exógenos (Poljuha *et al.* 2003).

Muchos cactos producen un exceso de auxinas bajo condiciones de cultivo *in vitro*, estimulando la producción de callo, una negativa para la micropropagación. La mayor concentración de citocininas, es muy adverso en el enraizamiento. Este efecto adverso puede ser disminuido por el traspaso a un medio de cultivo libre de hormonas para ayudar a reducir el transporte de citocinas, antes del uso de tratamientos especializados (Lígia *et al.* 2005).

## II. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES SELECCIONADAS.

### II.1. Género *Hylocereus*.

*Hylocereus* (A. Berger) Britton & Rose 1909

*Cereus* subgenera. *Hylocereus* A. Berger 1905

*Wilmattea* Britton & Rose 1920

Subfamilia Cactoideae, tribu Hylocereeae. Son plantas trepadoras, escaladoras o epífitas, libremente ramificadas, arbustivas, y producen raíces aéreas, creando a menudo plantas enormes de 10 m (33 ft) o más de altura. Usualmente presentan tres hijuelos en la parte aérea o tres en forma angular, segmentados, verdes. Presentan pocas o ningunas espinas cortas. Sus flores son muy largas, en forma cónica (embudo), comúnmente abiertas en la noche, blancas o algunas rojas muy raras; tienen una malta de pericarpios y tubos florales, con amplias hojas de forma triangular y en escala; areolas florales comúnmente desnudas; y tienen una serie continua de estambres. Su fruto es globoso y oblongado, generalmente rojo, carnoso, cubierto con amplias escalas, a menudo comestible, apertura irregular, grande; la flor persistente o de hojas caducas. Las semillas son pequeñas y alargadas formando un riñón, de color negro brillante, suaves o con leve textura. Su distribución se establece en el Sureste de México, Caribe, América Central y al norte de Sudamérica (Anderson, 2001).

Los frutos del género *Hylocereus* (Figura 6 y Figura 7) resisten hasta siete días a temperatura ambiente y a temperaturas de 10-12 °C se pueden almacenar durante 14 días. El tiempo de almacenamiento se puede aumentar a temperaturas más bajas, pero al transferirse a temperatura ambiente los frutos tienden a desarrollar síntomas de daño por frío, tales como oscurecimiento de la cáscara (Esquivel, 2004). El índice de madurez más determinante es el color de la cáscara, hasta una coloración completamente roja. Los aspectos importantes durante el momento de la cosecha son, además del color, el contenido de sólidos solubles, la acidez y el tiempo que transcurre desde la floración hasta la cosecha (alrededor de 32 días) (Esquivel, 2004).





**FIGURA 6.** *Hylocereus*.



**FIGURA 7.** *Hylocereus*.

Aparte de la pitahaya roja (*Hylocereus*), se comercializa la pitahaya amarilla, la cual es de igual manera una cactácea trepadora de origen tropical, pero pertenece a otro género (*Selenicereus megalanthus*), cuyo cultivo se realiza en mayor medida en Colombia e Israel, siendo originaria de Sudamérica. La cáscara es de color amarillo, a lo que debe su nombre y la pulpa de color blanco con un sinnúmero de pequeñas semillas negras (Pelah *et al.* 2002). La pitahaya amarilla es un fruto no climatérico y presenta su mejor calidad cuando la maduración es total, esto se logra con la cosecha del fruto al presentar una coloración completa. Igualmente la pitahaya amarilla es sensible a daños por frío. Es la fruta proveniente de cactáceas que ofrece el sabor más agradable, por lo que es una de las que obtiene mejores precios de venta (Esquivel, 2004).

El investigador David Hunt (1989) comenta, “de los cuatro géneros principales de los cactus hyloceroides de floración nocturna... *Selenicereus* es el más complejo”, más que *Epiphyllum*, *Hylocereus*, o *Weberocereus*, sin embargo, las investigaciones todavía no han clarificado si el género, reconocido por el Grupo Internacional de la Sistemática de los Cactus, es natural o artificial; de tal manera que *Selenicereus* sigue siendo un grupo mal definido de 28 especies (Anderson, 2001).

## II.2. Género *Selenicereus*.

***Selenicereus*** (A. Berger) Britton & Rose 1909

*Cereus* subgénero. *Selenicereus* A. Berger 1905

*Strophocactus* Britton & Rose 1913

*Deamia* Britton & Rose 1920

*Mediocactus* Britton & Rose 1920

*Cryptocereus* Alexander 1950

En los trabajos realizados en 1909 por Nathaniel Britton y Joseph Rose lograron describir a *Selenicereus* (tipo, *Cactus grandiflorus* = *S. grandiflorus*), estableciendo que el nombre es derivado del de la diosa griega de la luna, Selene, refiriéndose al hecho de que las flores son abiertas por la noche; por lo tanto, algunas especies de *Selenicereus* son llamadas cera de la luna (Anderson, 2001).

Subfamilia Cactaoideae, tribu Hylocereeae. Son plantas arbustivas trepadoras o escaladoras, epífitas o litofíticas. Presentan numerosas raíces aéreas. Con hijuelos delgados, 5 m (16 ft) o más de longitud. De 2 a 12 costillas o alas. Areolas con pelos cortos y espinas finas. Las espinas cortas son erizadas o como pelos, raramente acicular (o ausente). Sus flores suelen ser de 12-40 cm (4.7 – 16 in) de largo, y de 10-20 cm (3.9-7.9 in) de diámetro, forma cónica (ovalada), se abre por la noche, la parte interna es blanca, las partes externas van de amarillo a rosa hasta llegar a pardusco; sus pericarpios y tubos florales tienen vellosidades, cerdas o espinas. Su fruto es globoso y oblongado, generalmente rojo, carnoso, de 6-8 cm (2.4 – 3.1 in) de largo, cubierto con amplias espinas. Semillas ovoides y alargadas formando un riñón, de color negro brillante. Su distribución se establece en el sur de Estados Unidos, todo el sur de México, dentro del Caribe y en el Sur de Sudamérica (Anderson, 2001).

El investigador Hunt (1989) describió cinco secciones de *Selenicereus* (Figura 8 y Figura 9), las cuáles creyó que indicaban los grupos naturales incluidos en el género: *Cryptocereus*, *Deamia*, *Salmodyckia*, *Selenicereus* y *Strophocactus* (Anderson, 2001).



*Selenicereus validus*

**FIGURA 8.** *Selenicereus*

En estos últimos años, el interés en los cactus de florecimiento nocturno de los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus* (Cactaceae), ha aumentado grandemente debido a su potencial económico prometedor como cosechas de frutas exóticas. Conocidas como pitahayas, estas especies de cactus están bien establecidas en los mercados domésticos e internacionales en donde alcanzan altos precios. Los cactus con la ruta del metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) son excepcionalmente tolerantes a la sequía, un importante atributo para la biodiversidad agrícola en regiones con fuentes limitadas de agua. Como un importante ejemplo se han establecido tres especies introducidas y cultivadas en Israel: *S. megalanthus* con pulpa blanca y cáscara amarilla, *H. polyrhizus* con pulpa morada y cáscara roja, y *H. undatus* con pulpa blanca y cáscara roja. Las especies de *Hylocereus* presentan frutas grandes con un sabor pobre, en cambio, la fruta espinosa de *S. megalanthus* tiene un sabor superior pero es inferior en tamaño, producción y apariencia (Benega *et al.* 2009).



Flower and fruit of *Selenicereus grandiflorus*  
Drawing by Mary Eaton

**FIGURA 9.** *Selenicereus*.

El género *Hylocereus* comprende 16 especies y el género *Selenicereus* comprende 20 especies. Por su apariencia tan cercana, recientemente la taxonomía de estos grupos fue revisada. Y se han realizado observaciones citológicas que muestran que *H. cubensis* (sinónimo de *H. triangularis*), *H. guatemalensis*, *H. monacanthus*, (incluyendo *H. polyrhizus*), *H. ocamponis* (sinónimo de *H. purpusii*), *H. triangularis* (incluyendo *H. cubensis*), *H. trigonus*, *H. undatus*, *S. grandiflorus*, *S. grandiflorus*, subsp. *Hondurensis* (sinónimo de *S. hondurensis*), *S. pteranthus* y *S. spinulosus* son diploides, mientras que *H. megalanthus* es triploide. Por lo anterior, ya se ha provisto una descripción detallada de la morfología de *H. megalanthus*, el cual tiene un vástago triangular como el de *Hylocereus*, y las frutas espinosas como las de *Selenicereus* (Figura 8). Por esta razón se clasificó en un género separado llamado *Mediocactus*, que incluye a ambos en un nivel intermedio morfológico y taxonómico. Esta colocación refleja la afinidad cercana entre la taxonomía tetraploide y la especie diploide de *Hylocereus* (Tel-Zuri *et al.* 2004).

A los frutos de diversas cactáceas pertenecientes a las tribus *Hylocereeae*, *Pachycereeae* y *Echinocereae* se les designa en México con el nombre genérico de “pitaya”, voz de origen quichua (antillano), introducida al país por los conquistadores españoles. De esta voz han derivado diversas formas ortográficas y fonéticas, tales como “pitahaya”, “pitalla”, “pithalla”, “pitajaya”, etc., aplicados indistintamente a todos ellos, aunque algunos autores piensan que no son sinónimos (Bravo, 1978).



**FIGURA 10.** *Selenicereus*.

Los frutos de cactáceas trepadoras (Hylocereeae), se conocen en Latinoamérica como pitahayas; a diferencia del fruto de la tuna, los de este grupo contienen pequeñas semillas digeribles y no presentan las espinas típicas de la tuna (gloquideo), que provocan problemas durante la cosecha y manejo de los frutos. *Hylocereus undatus* es la especie de cactus trepador más distribuido a nivel mundial (Esquivel, 2004). Los cactus que son trepadores, tales como *Hylocereus* y *Selenicereus*, así como *Stenocereus eruca*, producen solamente raíces adventicias en los puntos donde los vástagos entran en contacto con un sustrato. Una de las más grandes de todas las flores pertenece a *Hylocereus* y *Selenicereus* (*S. rubineus*, por ejemplo) de 40 cm (16 in) de diámetro y con muy largos tubos florales (Anderson, 2001). Los cactus epífitos tropicales tienen dos centros de diversidad. El primero es la selva tropical atlántica del sureste de Brasil, un secundario en Bolivia, con una gran diversidad de *Rhipsalideae*. El segundo son los bosques de América Central, con su característica Hylocereeae (Anderson, 2001).

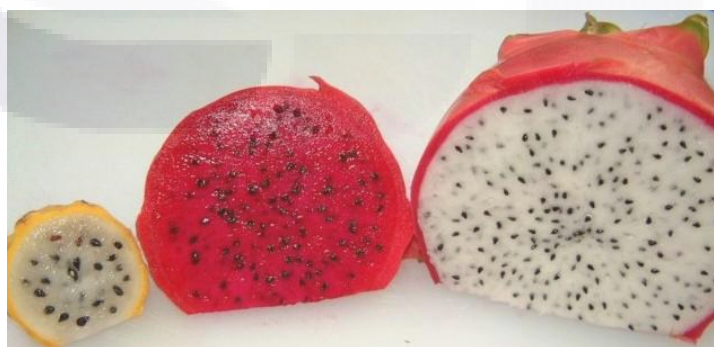
*Hylocereus* fue descrito por Alwin Berger en 1905 como un subgénero de *Cereus*, Britton y Rose lo elevaron al nivel de género (tipo, *Cactus triangularis*= *H. triangularis*) en 1909. El nombre es derivado del griego *hyle*, bosque, así es el cirio del bosque, creyendo que describe el hábitat de *Hylocereus*. Sin embargo, algunas especies son localizadas en áreas relativamente secas, áreas arboledas abiertas que reciben únicamente precipitación estacional (Anderson, 2001). La pitahaya del género *Hylocereus*, es un miembro de las cactáceas, el cual incluye varias especies productoras de frutos. Los nombres comunes en inglés incluyen: “night-blooming cereus”, “strawberry pear”, “queen of the night” y “Honolulu Queen”. Tradicionalmente, la propagación de las especies de *Hylocereus* se realiza por semillas o esquejes (Yasseen, 2002).

Los investigadores Britton y Rose también describieron *Wilmattea* con una sola especie, *W. minutiflora*, que el Grupo Internacional de la Sistemática de los Cactus ha puesto en *Hylocereus*, como *H. minutiflorus*. Myron Kimnach (1983) sin embargo discrepa, creyendo que es

distinto. *Hylocereus* tiene las flores más largas en la familia de las cactáceas, pero muchas especies crecen tan rápidamente y se vuelven tan largas que se vuelven difíciles para ser cultivadas (Anderson, 2001).

En los trabajos realizados por Stintzing *et al.* (2001), lograron separar 10 betacianinas a partir de frutos de pitahaya de la especie *H. polyrhizus*. A diferencia de las antocianinas, el color de los pigmentos de la pitahaya (betalaínas) mantiene su apariencia en un ámbito de pH más amplio. Esta propiedad los hace ideales para su uso como colorantes en productos alimenticios de baja acidez. Debido a la diversidad estructural de las betacianinas (rojo-púrpura) y de las betaxantinas (amarillo-naranja), las cactáceas representan una fuente promisorio de colorantes naturales (Esquivel, 2004).

Todos estos frutos son comestibles (Figura 11), jugosos, frescos y ricos en azúcares, y varias de las especies que los producen son objeto de cultivo, más o menos intensivo, en distintas regiones del país (Bravo, 1978). Algunos estudios han demostrado que los frutos de la pitahaya son una buena fuente de minerales, glucosa, fructosa, fibra y vitaminas (Yasseen, 2002). Entre otros estudios, Majdoub *et al.* (2001) caracterizaron los polisacáridos de la cáscara del fruto, considerando la extracción de pectina como una posibilidad para el aprovechamiento de la cáscara. Con su contenido de azúcares utilizables, alto contenido de vitamina C, contenido mineral, la presencia de polifenoles, aminoácidos, un sabor y color agradables, la fruta del cactus tiene un futuro promisorio en su utilización para preparaciones de alimentos funcionales (Esquivel, 2004).

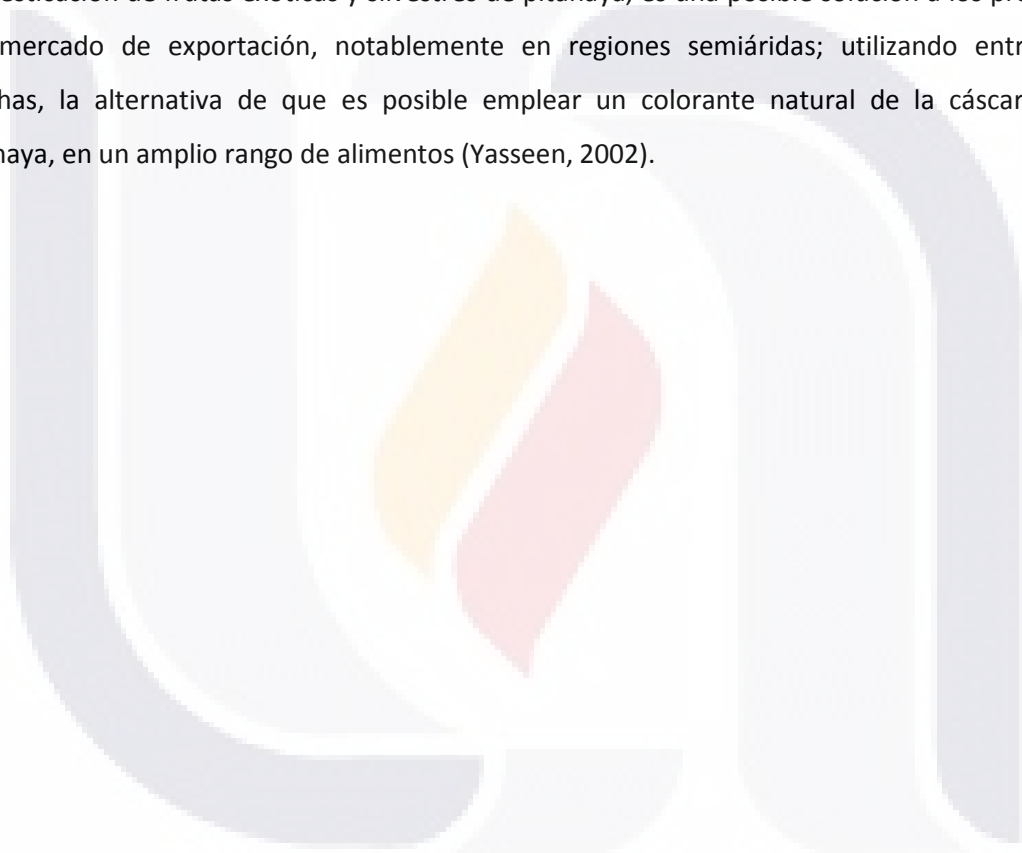


**FIGURA 11.** Frutos de *Hylocereae*.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Sin embargo, poco se ha estudiado tanto del fruto como de los aspectos agronómicos de las cactáceas columnares y trepadoras. Considerando el alto potencial de estos frutos para su uso industrial, así como los indicios que se tienen de su valor nutricional; por lo tanto, es importante impulsar la investigación en este campo y así poder fomentar el aprovechamiento de este tipo de frutos de origen latinoamericano (Esquivel, 2004).

La pitahaya tiene un alto potencial para el desarrollo de la horticultura, especialmente en áreas en donde la sequía es un factor limitante para la producción de frutas más comunes. La planta crece en condiciones en las que otras plantas no sobrevivirían. La introducción y domesticación de frutas exóticas y silvestres de pitahaya, es una posible solución a los problemas del mercado de exportación, notablemente en regiones semiáridas; utilizando entre otras muchas, la alternativa de que es posible emplear un colorante natural de la cáscara de la pitahaya, en un amplio rango de alimentos (Yasseen, 2002).



### III. JUSTIFICACIÓN.

La amplia familia de las Cactáceas constituye uno de los grupos de vegetales más interesantes de América. Su importancia radica en su papel ecológico y su adaptación, a través de un complejo proceso evolutivo, a los ambientes extremos. Esto además de su importante uso desde tiempos remotos y hasta nuestros días. Sin embargo, muchas de las especies que presentan gran potencial se encuentran aún subexplotadas. Tal es el caso de las llamadas Cactáceas trepadoras de los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus*. Estas especies centran su mayor importancia por su gran valor ornamental, debido a la gran belleza de sus flores. Así mismo, a través del tiempo han ido adquiriendo un nuevo valor en la rama hortícola por sus frutos tan peculiares y apreciados llamados “Pitahayas”, debido a que la fruta fresca es de sabor muy agradable y de colores atractivos para el mercado local, y tiene una demanda potencial para su comercialización en mercados nacionales e internacionales. Por lo tanto, impulsar estas nuevas alternativas productivas que pueden contribuir al desarrollo socioeconómico de las poblaciones rurales es una necesidad primordial para su cultivo y aprovechamiento masivo. A pesar de dicha importancia e interés, estas especies han sido muy poco estudiadas, por lo que la información en torno a ellas es poca e insuficiente, lo cual ha frenado su mejoramiento y aprovechamiento sostenible. Una de las disciplinas que podría aportar herramientas valiosas en este sentido es la Biotecnología Vegetal. Por tales razones, con este proyecto se pretende generar las herramientas biotecnológicas que puedan ser utilizadas para el mejoramiento y conservación de éstas cactáceas. Para ello, se elaborarán y establecerán sistemas de cultivo y propagación masiva *in vitro* de algunas especies o híbridos de los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus*.

### IV. HIPÓTESIS.

Es posible desarrollar y establecer metodologías adecuadas que permitan el cultivo y la propagación masiva *in vitro* de algunas especies de Cactáceas de los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus*. Para tal fin, es necesario conocer el comportamiento y las respuestas morfogénicas de estas especies ante diferentes condiciones y reguladores de crecimiento empleados para el establecimiento de cultivos *in vitro*. El desarrollo adecuado de las técnicas pueden ser empleadas en el mejoramiento y uso de manera racional de estas cactáceas en cualquier nivel o campo de aplicación o establecimiento.



## V. OBJETIVOS DEL PROYECTO.

### General.

- ▶ Contribuir a mejorar y explotar racionalmente especies de los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus* (Cactaceae) a través del desarrollo de métodos biotecnológicos que permitan su cultivo y propagación masiva *in vitro*.

### Particulares:

- a) Establecer cultivos *in vitro* de especies de los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus* (Cactaceae).
- b) Desarrollar sistemas para la propagación masiva *in vitro* de las especies seleccionadas a través de la producción de brotes por activación de areolas.
- c) Inducir el enraizamiento de los brotes generados y establecer las plántulas obtenidas a condiciones *ex vitro*.
- d) Conocer las respuestas morfogénicas de las especies seleccionadas ante medios de cultivo diseñados para inducir la organogénesis y embriogénesis somática directas e indirectas.
- e) Verificar de manera preliminar la posible producción de metabolitos secundarios en los tejidos cultivados *in vitro*.

### VI. 1. Material Vegetal.

Como material vegetal se utilizaron semillas de *Hylocereus undatus* y tejido vegetal de *Selenicereus validus*; el cual ya estaba previamente establecido *in vitro*.

### VI.2. Establecimiento de los cultivos axénicos.

**VI.2.1. Desinfección de las semillas de *Hylocereus undatus*:** Las semillas se obtuvieron a partir de frutos seleccionados. Para su desinfección, éstas fueron colocadas en un vaso de precipitado con un agitador magnético y se lavaron con agua corriente con unas gotas de jabón líquido (Dermocleen). Se mantuvo una agitación constante por 3-5 minutos y posteriormente se filtraron cuidadosamente. Se repitió este procedimiento 5 veces más; cuidando durante todo el proceso la velocidad de agitación, ya que al emplear una velocidad elevada se pueden dañar las semillas. Paso continuo, se procedió a enjuagar las semillas con agua corriente, para luego proceder a lavar con etanol al 70% por 30 segundos (sin sobrepasar este tiempo); enjuagando al final del proceso con agua corriente. Posteriormente la semillas se sometieron a desinfección con una solución de blanqueador comercial a base de hipoclorito de sodio (Cloralex<sup>®</sup>) al 20%, bajo agitación suave constante durante 20 a 30 minutos. Se llenó el recipiente hasta 1.5 cm antes del borde, se tapó muy bien con papel aluminio y no se volvió a abrir hasta estar en la campana de flujo laminar. Transcurrido el tiempo, se llevó el vaso de precipitados aún tapado, a la campana de flujo laminar. Se eliminó la solución por filtración y se procedió a enjuagar las semillas 3 veces con agua destilada estéril. Para cada filtración se utilizó gasa esterilizada.

**VI.2.2. Germinación de las semillas de *Hylocereus undatus*:** Las semillas desinfectadas se distribuyeron en frascos de vidrio tipo Gerber<sup>®</sup> sobre el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) con 3% de sacarosa y 10gr/L de agar, con el pH ajustado a 5.7 y esterilizados en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Este medio estuvo libre de reguladores de crecimiento. Los frascos se colocaron en un cuarto de cultivo a  $54 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , durante un periodo de aproximadamente 20 a 30 días, con el cual los brotes alcanzaron unos 6-10 mm, tamaño suficiente para que este material vegetal fuera transferido a un nuevo medio enriquecido con RCV. En este caso, se transfirieron todos los brotes generados a un medio MS enriquecido con Benciladenina (BA) en una concentración de 0.5 mg/L. En estas condiciones permanecerán hasta que las plántulas alcancen un desarrollo de más brotes y mayor tamaño; es decir un tiempo promedio de 75 a 90 días aproximadamente. De esta manera se obtendrán explantes ideales para continuar con las pruebas.

**VI.2.3. Obtención de explantes:** Teniendo los tamaños necesarios, se tomaron los explantes apicales (extremo superior de la planta) y laterales (parte de la planta que queda al eliminar el ápice y la raíz, y que luego fue cortada longitudinalmente en varias partes de aproximadamente 1 cm).

**VI.3. Desarrollo del método de propagación *in vitro* de las especies *Selenicereus validus* y *Hylocereus undatus* por la activación de yemas axilares.**

**VI.3.1. Efecto de las citocininas:** Se procedió a probar el efecto de varios tipos y concentraciones de citocininas en la activación de yemas axilares. Las citocininas probadas fueron la Benciladenina (BA), Cinetina (CIN), 2-isopentil-adenina (2iP), Meta-topolina (mT) y Tidiazurón (TDZ); todas estas agregándose a diferentes concentraciones.

**VI.3.2. Tipos de explantes:** Se realizaron variaciones en cuanto a la posición del explante utilizado, para así poder definir cual tipo tenía la mejor respuesta ante los RCV utilizados para la formación de brotes en ambas especies. Los explantes utilizados para la propagación de las especies por activación de yemas axilares fueron de dos tipos, uno en posición vertical (v) y otro en posición horizontal (h). Ambas variantes se probaron para todos los RCV empleados.

**VI.3.3. Elongación y enraizamiento:** Para lograr la elongación y enraizamiento de los brotes generados de ambas especies se utilizaron dos medios de cultivo; uno fue el medio de cultivo MS con 2.0 g/L de carbón activado (CA) y el otro fue únicamente medio MS; de esta manera se llevó a cabo el enraizamiento de las cactáceas en estudio. En estos medios los brotes elongados y enraizados se obtuvieron luego de 4-6 semanas, después de lo cual se tomaron resultados midiendo el porcentaje de plántulas que formaron raíz y de ellas el porcentaje que tenía más de tres raíces con más de 1cm de longitud. Finalmente se procedió a adaptar las plántulas a condiciones *ex vitro*.

**VI.3.4. Adaptación y transferencia a suelo:** El desarrollo del sistema de adaptación a suelo de las cactáceas estudiadas fue un proceso realizado poco a poco y para lograrlo, primero se retiró el sello de los frascos y luego se aflojó la tapa de los mismos, manteniéndolos así durante 4 o 5 días; se procedió a sacar las plantas ya enraizadas enjuagando perfectamente la raíz con la finalidad de eliminar completamente el agar y evitar la proliferación de patógenos, principalmente de hongos; con la misma finalidad de evitar contaminación se impregnaron las raíces con un polvo enraizador y anti-fúngico. Luego de esto, se colocaron en tierra sobre una charola plástica con tapa. La mezcla utilizada consistió en una combinación de tierra de hoja más

vermiculita en una relación de 3:1. En este sustrato, las plantas estuvieron por 1 semana aproximadamente dentro de la cámara bioclimática, la tapa de la caja se fue abriendo poco a poco hasta que pudo eliminarse completamente para de esta manera colocar las plantas en el invernadero sin necesidad de taparlas por más tiempo.

**VI.3.5. Descripción de los tratamientos realizados para la especie *Hylocereus undatus* para la activación de yemas axilares:** Para este caso se inició el proceso a partir de la germinación de semillas de la especie *Hylocereus undatus* para después llevarlas al establecimiento en el medio de cultivo. Los resultados de germinación fueron:

| Número de semillas totales en medio MS | Número de brotes establecidos en medio MS + 0.5 mg/L de BA | Porcentaje de Germinación |
|--|--|---------------------------|
| 750                                    | 210  | 28%                       |

**TABLA 2.** Número de semillas y de brotes establecidos de la especie *Hylocereus undatus*, en diferentes medios de cultivo.

Se obtuvieron los cultivos axénicos a partir de las semillas germinadas *in vitro* en medio MS libre de reguladores de crecimiento. A los 30 días de cultivo (aproximadamente) se obtuvieron plántulas de unos 3 a 5 mm, las cuales fueron transferidas a medio MS con 0.5 mg/L de BA para favorecer su desarrollo. Luego de 45-60 días de cultivo las plántulas alcanzaron entre 1 y 2 cm de longitud y entonces se procedió a eliminar la parte basal, quedando así de cada brote un explante apical y lateral (segmentado) para ser empleado en el primer experimento con diferentes tratamientos de citocininas. El manejo de las especies siempre se realizó en condiciones de asepsia empleando campana de flujo laminar, pinzas y bisturí esterilizados.

Para el desarrollo del método de propagación por activación de yemas axilares para *H. undatus*, se realizaron una serie de tratamientos en los que se colocaron los explantes en posición tanto vertical como horizontal en medio MS con 10 g/L de agar y 3% de sacarosa. Para todos los experimentos realizados se usaron 6 explantes en forma horizontal y otros 9 en posición vertical, en cada uno de los recipientes con el medio seleccionado. Los totales de tratamientos así como las concentraciones de citocininas utilizadas en estos experimentos se muestran en la Tabla 5.

| RCV                  | TRATAMIENTOS |     |     |     |     |
|----------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|
|                      | BA           | CIN | 2iP | mT  | TDZ |
| Concentración (mg/L) | 0.5          | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
|                      | 1.0          | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
|                      | 1.5          | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
|                      | 2.0          | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |

**TABLA 3.** Concentración de citocininas utilizadas para cada tratamiento empleado en el diseño de los experimentos a los que se sometió *H. undatus*.

Para cada uno de los tratamientos con RCV, se dispusieron diferentes cantidades de explantes iniciales; así como dos diferentes posiciones del explante sobre el medio de cultivo. Debido a la contaminación presentada en algunos medios de cultivo, se procedió a registrar únicamente los explantes viables para el análisis estadístico. La principal contaminación presentada fue debida a alguna levadura presente en el medio. Finalmente el diseño para la toma de resultados se explica así:

| RCV | TRATAMIENTOS (mg/L) |         |         |         |         |         |         |         |
|-----|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|     | 0.5 (h)             | 0.5 (v) | 1.0 (h) | 1.0 (v) | 1.5 (h) | 1.5 (v) | 2.0 (h) | 2.0 (v) |
| BA  | 42                  | 136     | 40      | 92      | 42      | 19      | 16      | 160     |
| CIN | 22                  | 36      | 12      | 20      | 14      | 36      | 46      | 64      |
| 2iP | 16                  | 70      | 64      | 100     | 40      | 26      | 80      | 183     |
| mT  | 0                   | 60      | 68      | 146     | 140     | 150     | 70      | 46      |
| TDZ | 0                   | 0       | 4       | 0       | 0       | 0       | 0       | 6       |

**TABLA 4.** Número de explantes utilizados para el análisis estadístico en cada uno de los tratamientos y para cada uno de los RCV utilizados; considerando también la posición del explante en el medio de cultivo.

Para el caso particular de los explantes tratados con TDZ se observó contaminación en la mitad de los frascos, mientras que la otra mitad solo presentó abundante tejido calloso y pocos o casi nulos brotes.

**VI.3.6. Descripción de los tratamientos realizados para la especie *Selenicereus validus* para la activación de yemas axilares:** Se obtuvieron los cultivos axénicos a partir de tejido vegetal de la especie ya existente en el Banco de Germoplasma; a su vez estos cultivos ya existentes provinieron de semillas germinadas. De esta manera se pudieron utilizar las plántulas conservadas, las cuales ya tenían una antigüedad de aproximadamente un año y, por lo tanto su longitud era muy buena; así pues se emplearon como fuente de explantes para los experimentos subsiguientes.

Para el desarrollo del método de propagación por activación de yemas axilares para *S. validus*, se realizaron una serie de tratamientos en los que se colocaron los explantes en posición tanto vertical como horizontal en medio MS con 10 g/L de agar y 3% de sacarosa. Para todos los experimentos realizados se usaron 6 explantes en forma horizontal y otros 6 en posición vertical, en cada uno de los recipientes con el medio seleccionado. Los totales de tratamientos así como las concentraciones de citocininas utilizadas en estos experimentos se muestran en la Tabla 7.

|                         | TRATAMIENTOS |     |     |     |     |
|-------------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|
| RCV                     | BA           | CIN | 2iP | mT  | TDZ |
| Concentración<br>(mg/L) | 0.5          | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
|                         | 1.0          | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
|                         | 1.5          | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
|                         | 2.0          | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |

**TABLA 5.** Concentración de citocininas utilizadas para cada tratamiento empleado en el diseño de los experimentos a los que se sometió *S. validus*.

Para cada uno de los tratamientos con RCV, se dispusieron diferentes cantidades de explantes iniciales; así como dos diferentes posiciones del explante sobre el medio de cultivo. Debido a la contaminación presentada en algunos medios de cultivo, se procedió a registrar únicamente los explantes viables para el análisis estadístico. La principal contaminación presentada fue debida a alguna levadura presente en el medio. Finalmente el diseño para la toma de resultados se explica así:

| RCV | TRATAMIENTOS (mg/L) |         |         |         |         |         |         |         |
|-----|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|     | 0.5 (h)             | 0.5 (v) | 1.0 (h) | 1.0 (v) | 1.5 (h) | 1.5 (v) | 2.0 (h) | 2.0 (v) |
| BA  | 30                  | 30      | 8       | 8       | 15      | 15      | 30      | 30      |
| CIN | 20                  | 25      | 15      | 25      | 15      | 15      | 20      | 30      |
| 2iP | 20                  | 20      | 20      | 20      | 20      | 20      | 20      | 20      |
| mT  | 12                  | 12      | 12      | 8       | 8       | 12      | 12      | 12      |
| TDZ | 12                  | 8       | 8       | 12      | 12      | 12      | 12      | 12      |

**TABLA 6.** Número de explantes utilizados para el análisis estadístico en cada uno de los tratamientos y para cada uno de los RCV utilizados; considerando también la posición del explante en el medio de cultivo.

**VI.4. Diseño de medios de cultivo para conocer las respuestas morfológicas de las especies seleccionadas por inducción de Organogénesis y Embriogénesis Somática directas e indirectas.**

Para lograr este objetivo se utilizó medio MS con las mismas condiciones que las empleadas para la activación de yemas axilares, pero en este caso se usaron diferentes combinaciones de citocininas y auxinas. La citocinina empleada dependió de los resultados obtenidos previamente, de tal manera que fuera la de mejor respuesta de propagación sobre cada especie; la auxina empleada fue Ácido naftalenacético (ANA) a diferentes concentraciones.

Con esta finalidad se diseñaron cuadros de tratamientos de las hormonas a probar sobre cada una de las especies de cactáceas en estudio. Los reguladores del crecimiento están en mg/L:

- *Selenicereus validus*:

| 2iP \ ANA | 0   | 1.0 | 2.0 | 3.0 |
|-----------|-----|-----|-----|-----|
| 0         | T1  | T2  | T3  | T4  |
| 1.0       | T5  | T6  | T7  | T8  |
| 2.0       | T9  | T10 | T11 | T12 |
| 3.0       | T13 | T14 | T15 | T16 |

**TABLA 7.** Concentración en mg/L, de los tratamientos con citocinina (2iP) y auxina (ANA) utilizadas para la especie *S. validus*.

- *Hylocereus undatus*:

| mT \ ANA | 0   | 1.0 | 2.0 | 3.0 |
|----------|-----|-----|-----|-----|
| 0        | T1  | T2  | T3  | T4  |
| 1.0      | T5  | T6  | T7  | T8  |
| 2.0      | T9  | T10 | T11 | T12 |
| 3.0      | T13 | T14 | T15 | T16 |

**TABLA 8.** Concentración en mg/L, de los tratamientos con citocinina (mT) y auxina (ANA) utilizadas para la especie *H. undatus*.

Se comenzaron las pruebas partiendo del material vegetal seleccionado cuidadosamente, considerando siempre que fuera el mismo para evitar el efecto residual que se pudiera presentar. Todos los explantes fueron colocados en posición horizontal, puesto que ya no se estará probando la posición del mismo en los efectos resultantes.

**VI.5. Metodología para la extracción de tejido calloso pigmentado de ambas especies seleccionadas para verificar de manera preliminar la posible producción de metabolitos secundarios en los tejidos cultivados *in vitro*.**

En el caso de este último objetivo se trabajó en campana de extracción y en condiciones asépticas, en donde se tomaron pequeños fragmentos de tejido calloso pigmentado con pinzas. Estas muestras se tomaron de los frascos sellados de *S. validus* y *H. undatus* tratados con mezcla de auxinas y citocininas; los cuales se encontraban almacenados en el cuarto de cultivo durante mínimo 2 meses.

Además de los pigmentos de ambas especies, se extrajeron pigmentos del fruto de pitahaya y del betabel; de tal manera que fueron empleados como estándares o controles durante el proceso de análisis de resultados por espectrofotometría.

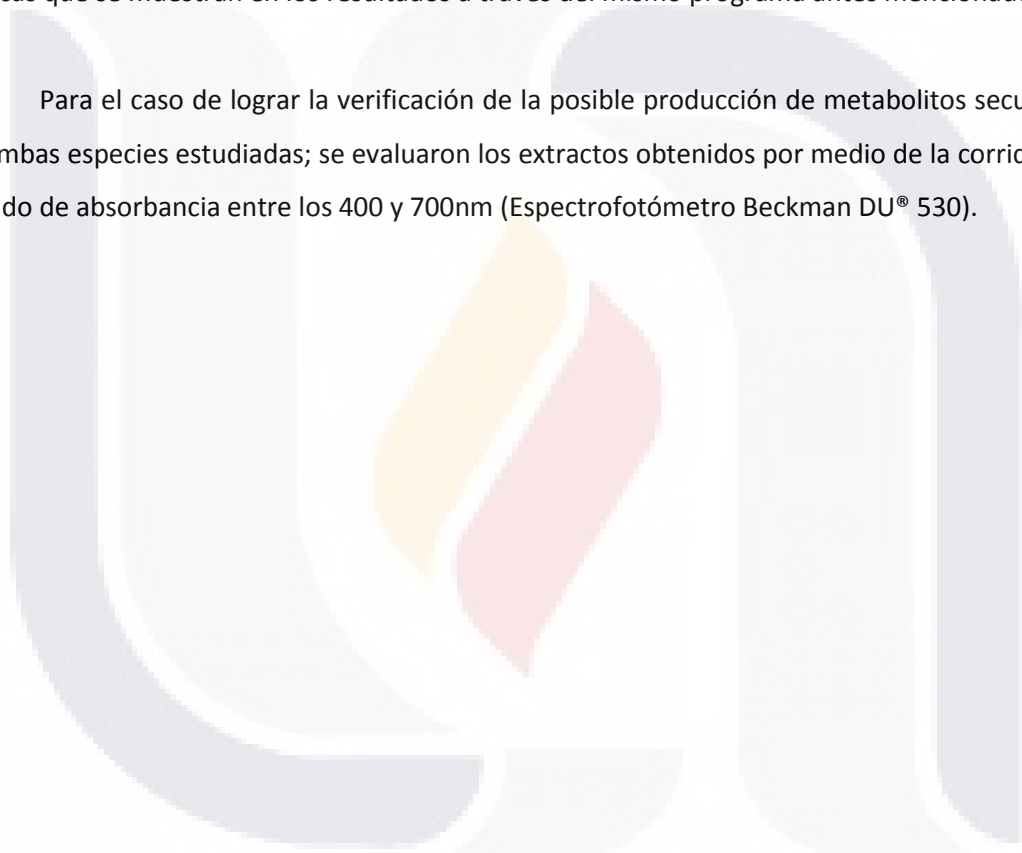
El tejido calloso pigmentado de cada especie se extrajo con una solución de Metanol: HCl en proporción 99:1 y dicho extracto fue transferido a tubos ependorf. El contenido de los tubos fue centrifugado a 4000 rpm por 10 min y de esta manera se logró separar el sobrenadante en otros tubos. El extracto se calentó en termoblock a 80°C por 5 min para evaporar y concentrar el pigmento. Se corrió un barrido de absorbancia de los extractos entre los 400 y 700nm (Espectrofotómetro Beckman DU® 530). Los extractos sobrantes se almacenan a temperaturas de refrigeración (0-4°C) en tubos cerrados y protegidos de la luz hasta su estudio posterior en el caso de no contar con el equipo o material requerido en el momento de la prueba.



## VII. ANÁLISIS DE LOS DATOS.

La respuesta que se evaluó en los experimentos realizados fue el promedio de brotes generados por explante ( $\pm$  error estándar); para de esta manera establecer estadísticamente cuál es el mejor tratamiento de RCV y cual su mejor concentración, sobre la respuesta de las especies *Selenicereus validus* y *Hylocereus undatus*. Estos valores se obtuvieron mediante el programa estadístico GraphPad Prism de GraphPad Software. Versión 3.00, empleando ANOVA de una vía, de donde se obtuvieron los promedios de brotes producidos por explante para cada experimento (tratamiento) realizado, así como el error estándar. Con estos datos obtenidos se realizaron las gráficas que se muestran en los resultados a través del mismo programa antes mencionado.

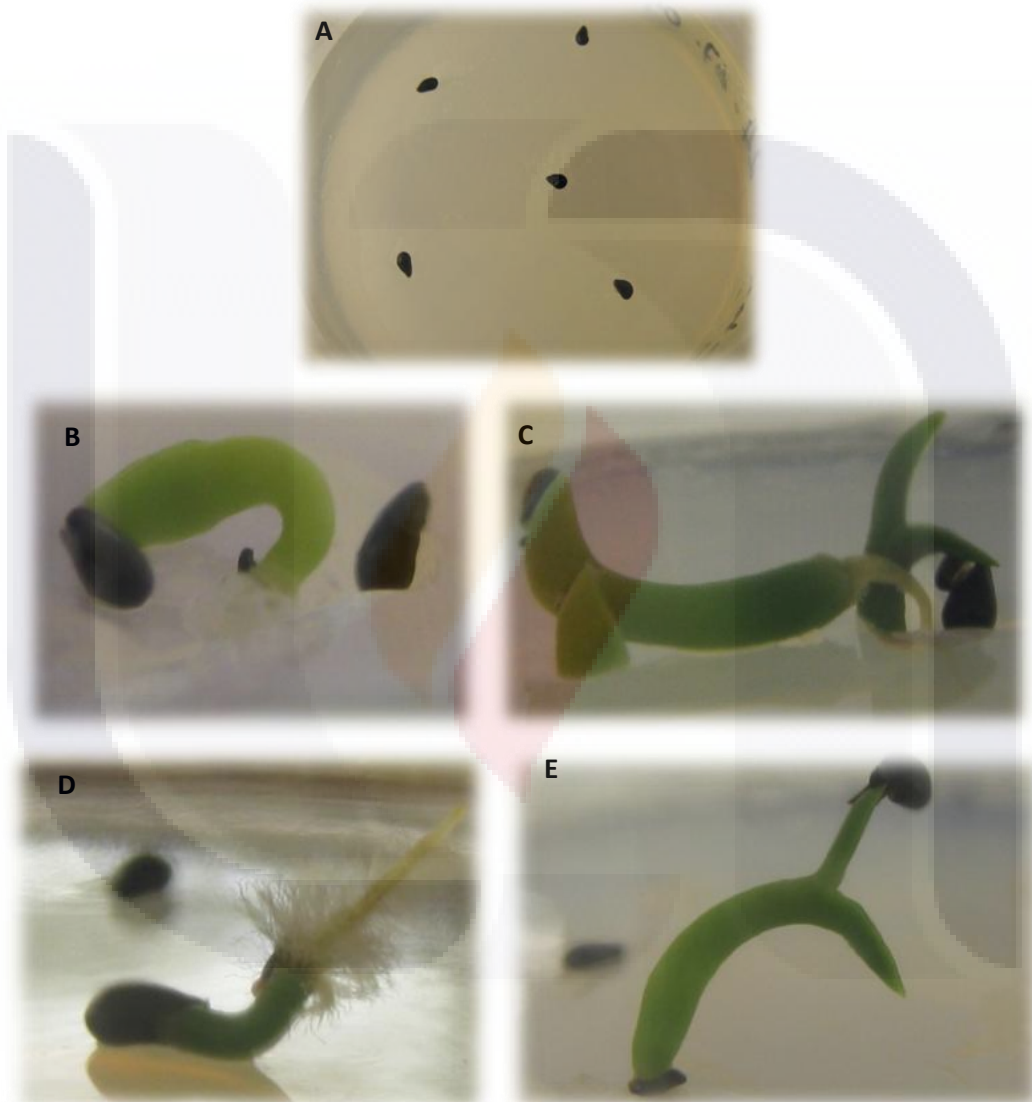
Para el caso de lograr la verificación de la posible producción de metabolitos secundarios en ambas especies estudiadas; se evaluaron los extractos obtenidos por medio de la corrida de un barrido de absorbancia entre los 400 y 700nm (Espectrofotómetro Beckman DU® 530).



VIII. RESULTADOS.

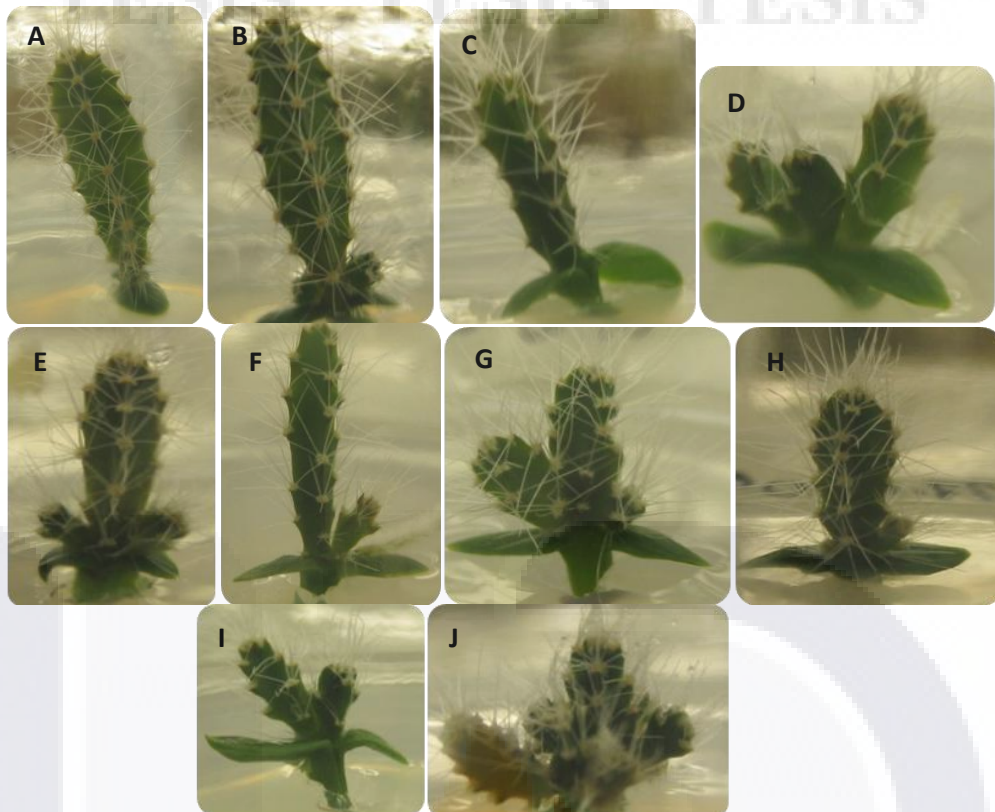
VIII. 1. *Hylocereus undatus*.

Después de 20 a 30 días aproximadamente de incubación, se hizo el conteo del número de semillas germinadas (Figura 12). Posteriormente, aquellos brotes germinados fueron colocados en medio MS enriquecido con 0.5 mg/L de BA; se sellaron y se colocaron en el cuarto de incubación.



**FIGURA 12.** *Hylocereus undatus*. Se muestra en A. la posición de las semillas en el medio MS. En B. C. D. y E. se observan los brotes germinados de la semilla *in vitro*.

Luego de 45 a 60 días aproximadamente de incubación, estos brotes que estaban establecidos en el medio MS con 0.5mg/L de BA adquirieron un mayor tamaño y se observaron con mayor firmeza y vigor. La coloración era muy verde y se logró apreciar también que en su base algunas plántulas estaban generando otros pequeños brotes (Figura 13).



**FIGURA 13.** *Hylocereus undatus* se muestra en A. B. C. D. E. F. G. H. I. J. los brotes germinados establecidos en medio MS + 0.5 mg/L BA

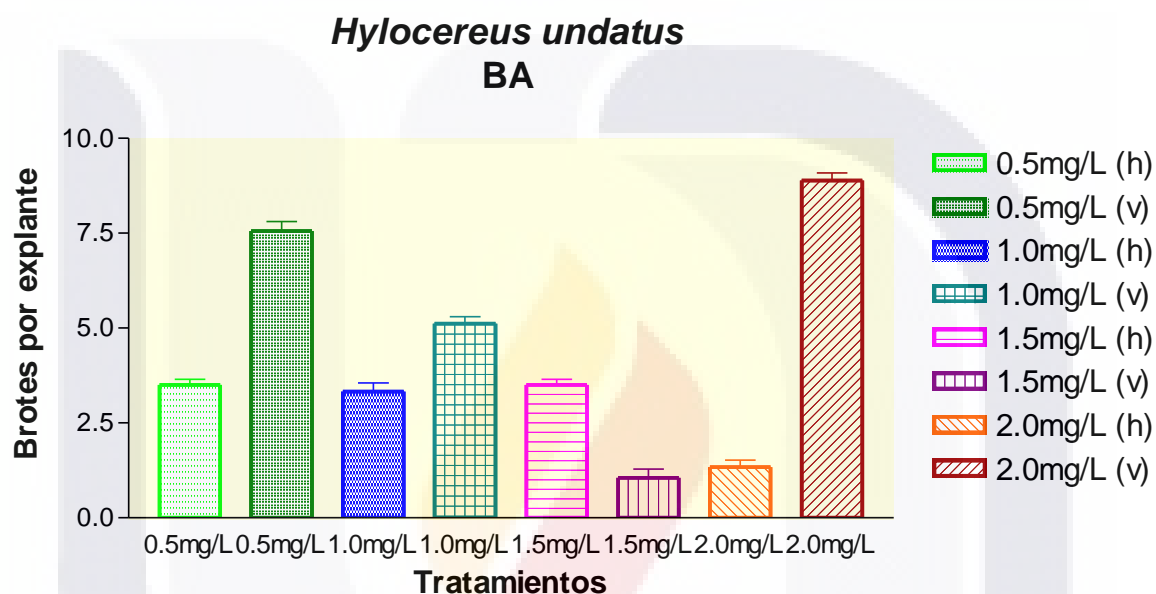
A la par de estas actividades, se llevaron semillas a tierra para crecer en el invernadero bajo condiciones controladas de humedad, luz y aire. Se obtuvieron pequeños brotes claramente viables a los 30 días aproximadamente de haber sido colocados en tierra para macetas (Figura 14).



**FIGURA 14.** *Hylocereus undatus* se muestra en A. y B. las semillas llevadas a tierra de macetas en condiciones de invernadero. En C. y D. se observa la germinación de las semillas.

Después de 70-75 días aproximadamente de incubación, se hizo el conteo del número de brotes generados por explante y con estos datos se realizó un análisis estadístico para determinar cuál fue el mejor tratamiento, los resultados fueron los siguientes:

Para los explantes que fueron tratados con **BA**, la concentración que resultó la mejor fue la de 2.0 mg/L en posición vertical, observándose influencia de la posición del explante en la generación de brotes (Figura 16). Esta concentración rindió un promedio de 9 brotes por explante con una  $p < 0.0001$  (Figura 15).

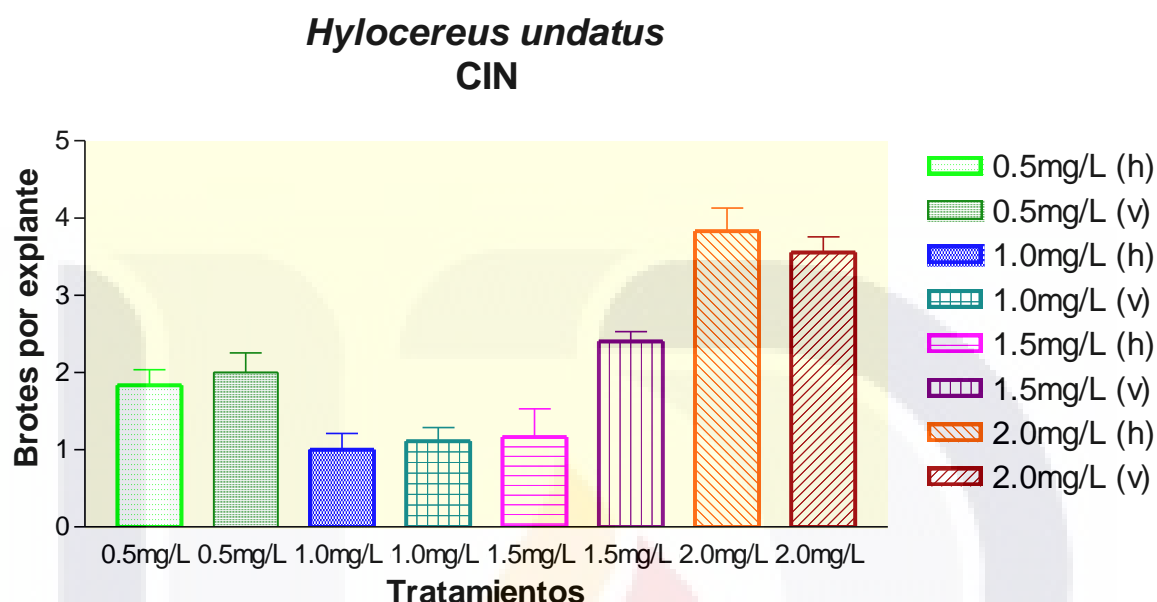


**FIGURA 15.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de BA como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.

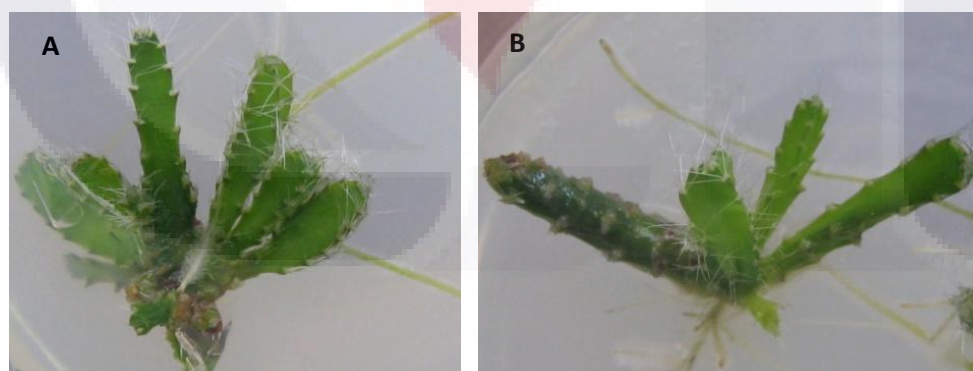


**FIGURA 16.** *Hylocereus undatus*. Respuesta de los explantes tratados con BA a concentraciones de 2.0 mg/L (vertical). Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.

Para los explantes que fueron tratados con **CIN**, la concentración que resultó la mejor fue la de 2.0 mg/L y no se observa ninguna influencia de la posición del explante en la generación de brotes bajo esta concentración (Figura 18). Esta concentración rindió un promedio de 4 brotes por explante con una  $p < 0.0001$  (Figura 17).



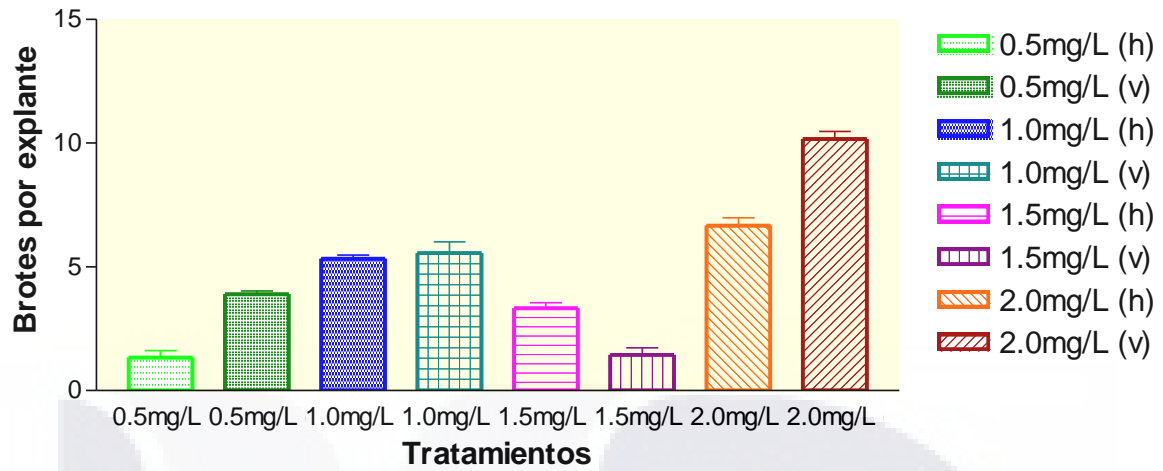
**FIGURA 17.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de CIN como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.



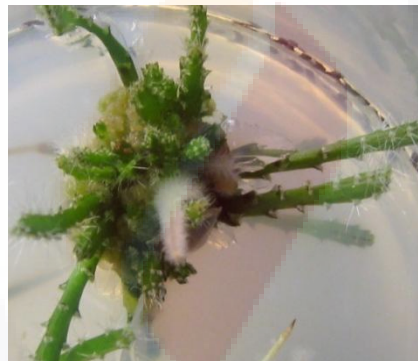
**FIGURA 18.** *Hylocereus undatus*. Respuesta de los explantes tratados con CIN a concentraciones de 2.0 mg/L (A. horizontal y B. vertical). Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.

Para los explantes que fueron tratados con **2iP**, la concentración que resultó la mejor fue la de 2.0 mg/L en posición vertical, observándose la influencia de la posición del explante en la generación de brotes bajo estas concentraciones (Figura 20). Esta concentración rindió un promedio de 10 brotes por explante con una  $p < 0.0001$  (Figura 19).

***Hylocereus undatus***  
**2iP**



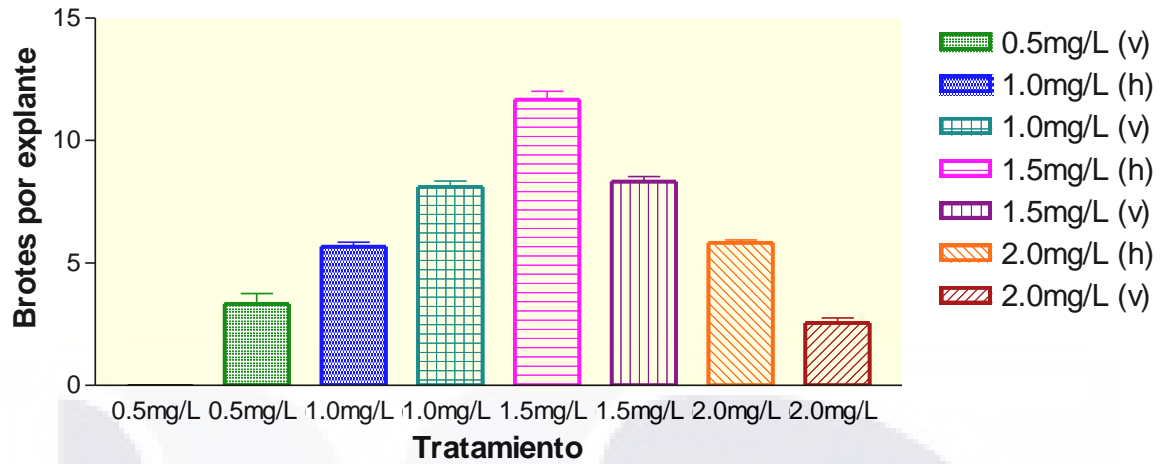
**FIGURA 19.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de 2iP como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.



**FIGURA 20.** *Hylocereus undatus*. Respuesta de los explantes tratados con 2iP a concentraciones de 2.0 mg/L (vertical). Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.

Para los explantes que fueron tratados con **mT**, la concentración que resultó la mejor fue la de 1.5 mg/L con posición del explante en horizontal, lo cual si influye en la generación de brotes bajo estas concentraciones (Figura 22). Esta concentración rindió un promedio de 12 brotes por explante con una  $p < 0.0001$  (Figura 21).

***Hylocereus undatus***  
mT



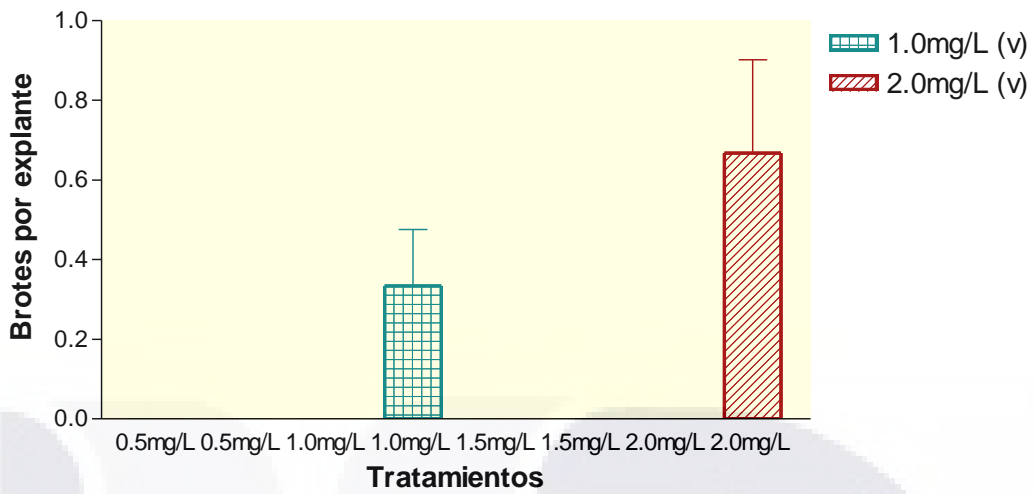
**FIGURA 21.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de mT como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.



**FIGURA 22.** *Hylocereus undatus*. Respuesta de los explantes tratados con mT a concentraciones de 1.5 mg/L (horizontal). Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.

Para los explantes que fueron tratados con **TDZ**, la concentración que resultó la mejor fue la de 2.0 mg/L con posición del explante en vertical, lo cual si influye en la generación de brotes bajo estas concentraciones (Figura 24). Esta concentración rindió un promedio de 1 brote por explante con una  $p < 0.0001$  (Figura 23).

*Hylocereus undatus*  
TDZ



**FIGURA 23.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de TDZ como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.



**FIGURA 24.** *Hylocereus undatus*. Respuesta de los explantes tratados con mT a concentración de 2.0 mg/L (vertical). Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.



VIII.1.1. Enraizamiento y condiciones *ex vitro*.

Para el enraizamiento de los brotes se probaron 2 tratamientos (Carbón activado y medio MS) y los resultados se muestran en la siguiente tabla (luego de 45 días) y se observa en las Figuras 25 y 26 las respuestas en formación de raíces:

➤ ***Hylocereus undatus*:**

| Carbón activado            |                           |                              |
|----------------------------|---------------------------|------------------------------|
| <u>Presencia de raíces</u> | <u>Ausencia de raíces</u> | <u>Sistema radical bueno</u> |
| 93.3%                      | 6.7%                      | 51.1%                        |



**FIGURA 25.** *Hylocereus undatus*. Presencia de las raíces formadas en medio enriquecido con 2g/L de Carbón Activado. En las figuras A1 y A2 se puede ver la longitud de las plantas y de las raíces formadas; mientras que la figura A3 muestra como enraizaron en el medio.

| Medio MS                   |                           |                              |
|----------------------------|---------------------------|------------------------------|
| <u>Presencia de raíces</u> | <u>Ausencia de raíces</u> | <u>Sistema radical bueno</u> |
| 100%                       | 0%                        | 80%                          |





**FIGURA 26.** *Hylocereus undatus*. Presencia de las raíces formadas en medio MS. En las figuras A1 y A3 se puede ver la longitud de las plantas y de las raíces formadas; mientras que la figura A2 muestra como enraizaron en el medio. En la figura A4 se observa las condiciones *ex vitro* a las cuales se colocaron las plantas.

- **NOTA:** Se consideró que el sistema radical bueno es aquel que presentó más de 3 raíces por explante y que además tuvieron más de 1 cm de longitud.

#### VIII.1.2. Supervivencia de las plantas *ex vitro*.

El porcentaje de supervivencia en suelo fue del **54%**. La figura 27 muestra las plántulas creciendo en condiciones de invernadero.

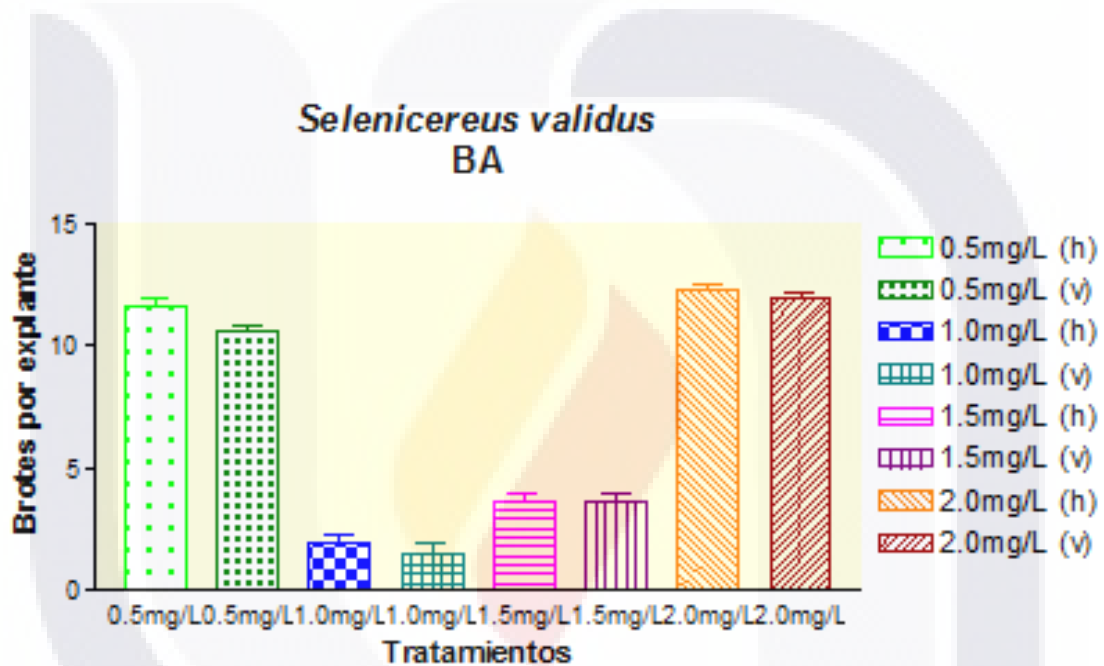


**FIGURA 27.** *Hylocereus undatus*. Brotes que sobreviven y continúan creciendo en condiciones de invernadero.

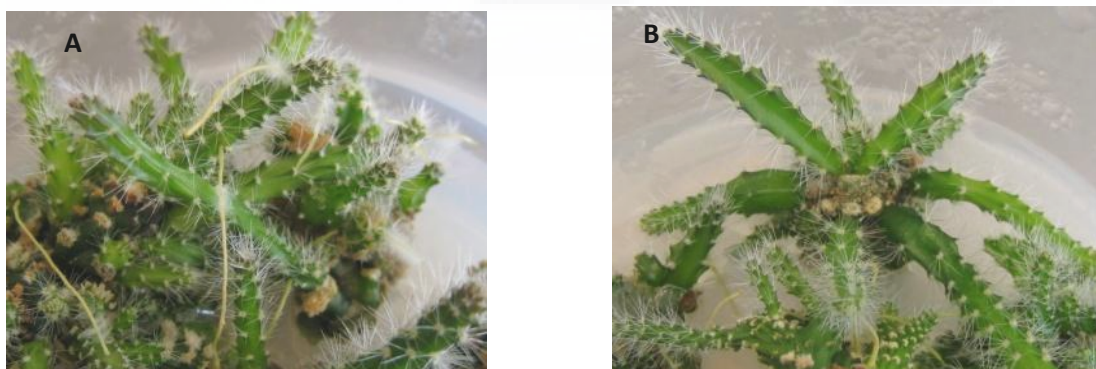
### VIII. 2. *Selenicereus validus*.

Después de 75 días aproximadamente de incubación, se hizo el conteo del número de brotes generados por explante y con estos datos se realizó un análisis estadístico para determinar cuál fue el mejor tratamiento, los resultados fueron los siguientes:

Para los explantes que fueron tratados con **BA**, la concentración que resultó la mejor fue la de 2.0 mg/L y no se observa ninguna influencia de la posición del explante en la generación de brotes por explante bajo esta concentración (Figura 29). Esta concentración rindió un promedio de 12.33 brotes por explante con una  $p < 0.0001$  (Figura 28).

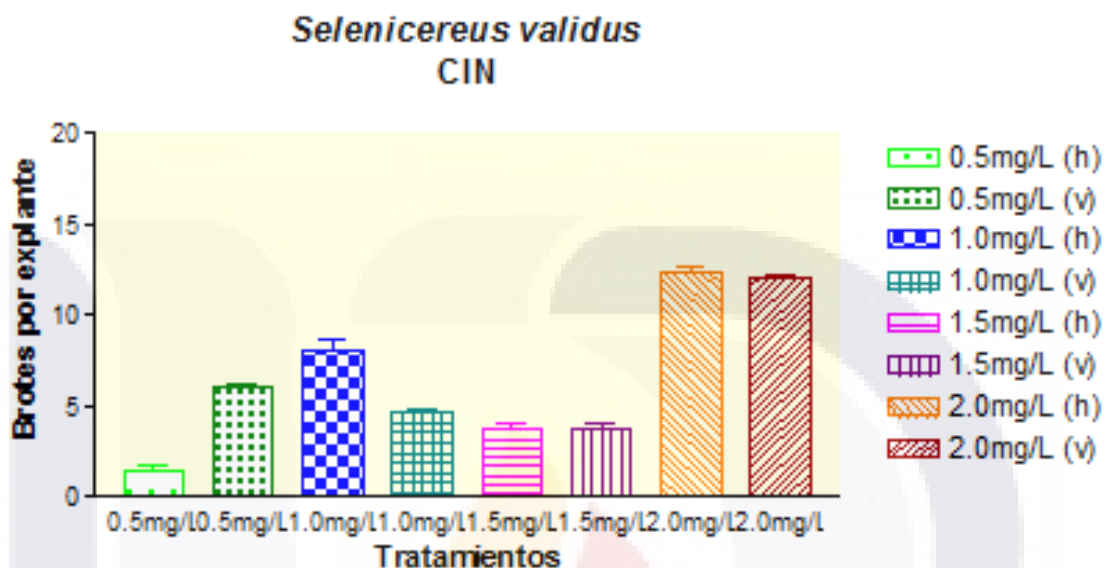


**FIGURA 28.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de BA como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.

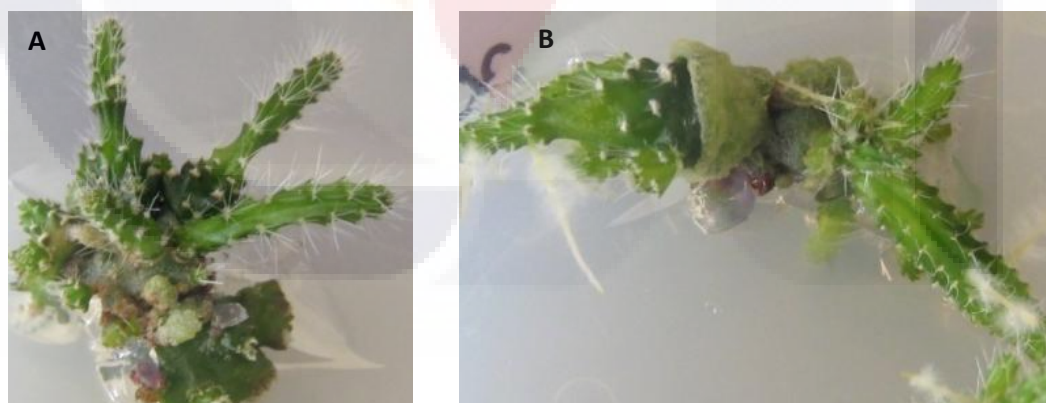


**FIGURA 29.** *Selenicereus validus*. Respuesta de los explantes tratados con BA a concentraciones de 2.0 mg/L (A. horizontal y B. vertical). Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.

Para los explantes que fueron tratados con **CIN**, la concentración que resultó la mejor fue la de 2.0 mg/L y no se observa ninguna influencia de la posición del explante en la generación de brotes bajo esta concentración (Figura 31). Esta concentración rindió un promedio de 12.35 brotes por explante con una  $p < 0.0001$  (Figura 30).

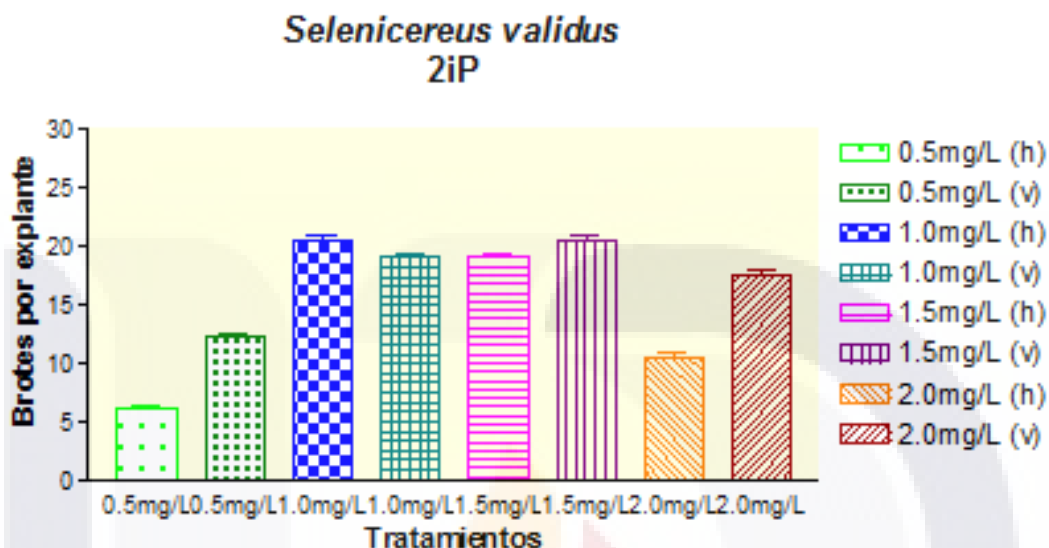


**FIGURA 30.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de CIN como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.

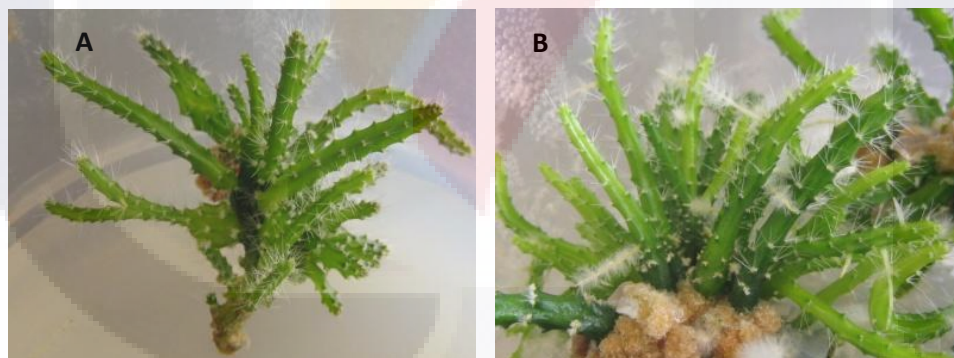


**FIGURA 31.** *Selenicereus validus*. Respuesta de los explantes tratados con CIN a concentraciones de 2.0 mg/L (A. horizontal y B. vertical). Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.

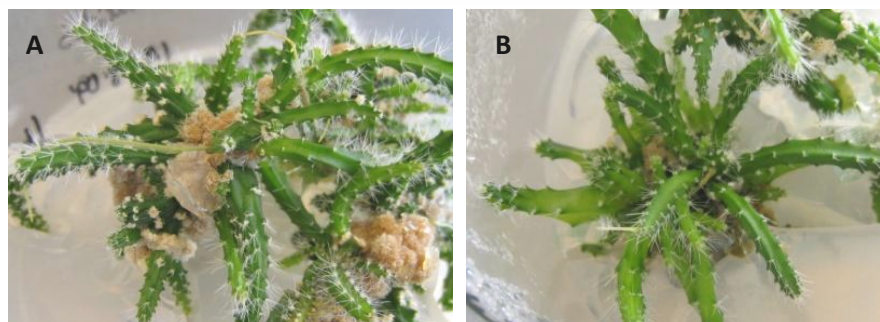
Para los explantes que fueron tratados con **2iP**, las concentraciones que resultaron las mejores fueron las de 1.0 mg/L y 1.5 mg/L; entre estas no se observa ninguna influencia de la posición del explante en la generación de brotes bajo estas concentraciones (Figura 33 y 34). Esta concentración rindió un promedio de 19 a 20.5 brotes por explante con una  $p < 0.0001$  (Figura 32).



**FIGURA 32.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de 2iP como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.

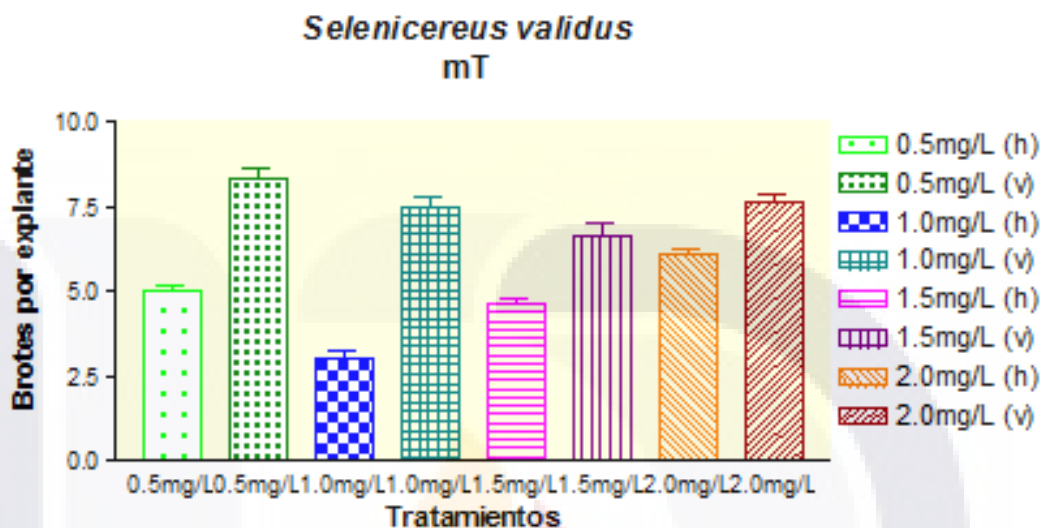


**FIGURA 33.** *Selenicereus validus*. Respuesta de los explantes tratados con 2iP a concentración de 1.0 mg/L (A. horizontal y B. vertical). Se observa la producción de brotes.



**FIGURA 34.** *Selenicereus validus*. Respuesta de los explantes tratados con 2iP a concentración de 1.5 mg/L (A. horizontal y B. vertical). Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.

Para los explantes que fueron tratados con mT, la concentración que resultó la mejor fue la de 0.5 mg/L con posición del explante en vertical, lo cual si influye en la generación de brotes bajo estas concentraciones (Figura 36). Esta concentración rindió un promedio de 8.33 brotes por explante con una  $p < 0.0001$  (Figura 35).

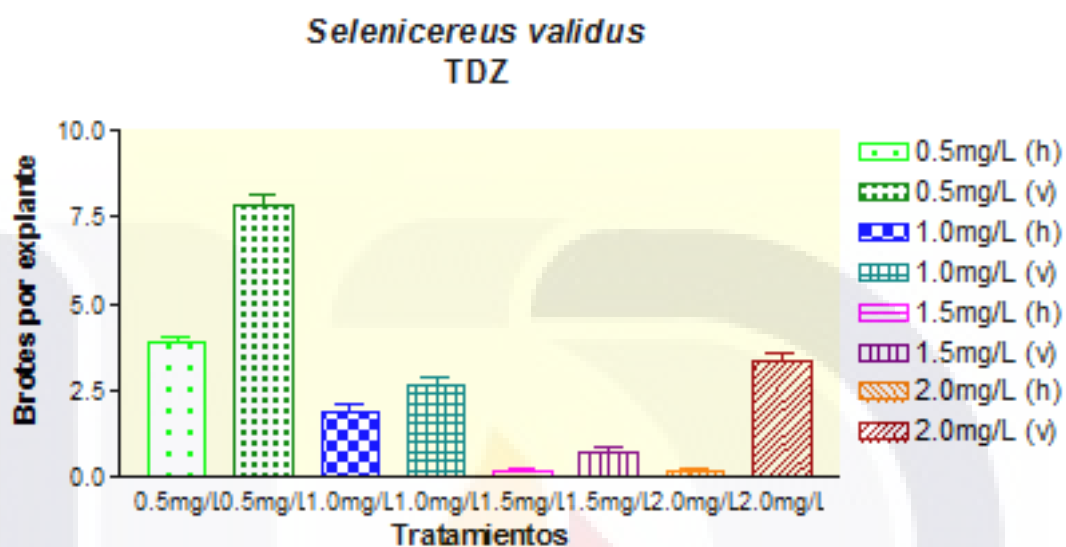


**FIGURA 35.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de mT como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.



**FIGURA 36.** *Selenicereus validus*. Respuesta de los explantes tratados con mT a concentración de 0.5 mg/L en posición vertical. Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.

Para los explantes que fueron tratados con **TDZ**, la concentración que resultó la mejor fue la de 0.5 mg/L con posición del explante en vertical, lo cual si influye en la generación de brotes bajo estas concentraciones (Figura 38). Esta concentración rindió un promedio de 7.875 brotes por explante con una  $p < 0.0001$  (Figura 37).



**FIGURA 37.** Gráfica de promedio de brotes producidos por explante ( $\pm$  error estándar) tratados con diferentes concentraciones de TDZ como RCV y con diferente posición del explante en el medio de cultivo.



**FIGURA 38.** *Selenicereus validus*. Respuesta de los explantes tratados con TDZ a concentración de 0.5 mg/L en posición vertical. Se observa la producción de brotes y la viabilidad del explante.

VIII.2.1. Enraizamiento y condiciones *ex vitro*.

Para el enraizamiento de los brotes se probaron 2 tratamientos (Carbón activado y medio MS) y los resultados se muestran en la siguiente tabla (luego de 45 días) y se observa en las Figuras 39 y 40 las respuestas en formación de raíces:

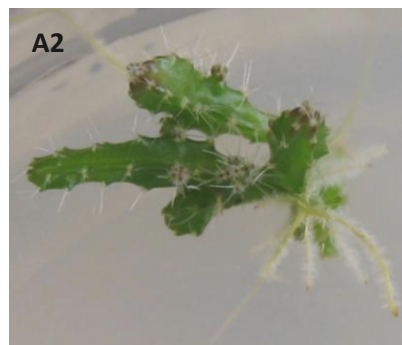
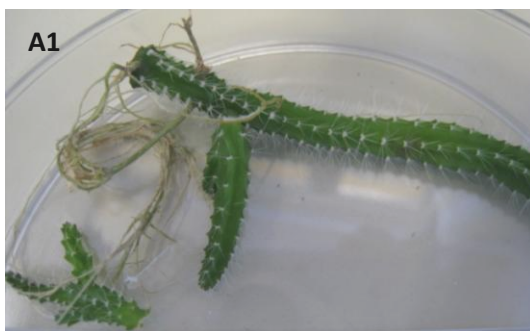
➤ *Selenicereus validus*:

| Carbón activado                    |                                 |                                     |
|------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| <u>Presencia de raíces</u><br>100% | <u>Ausencia de raíces</u><br>0% | <u>Sistema radical bueno</u><br>87% |



FIGURA 39. *Selenicereus validus*. Presencia de las raíces formadas en medio enriquecido con 2g/L de Carbón Activado. En las figuras A1 y A4 se puede ver la longitud de las plantas y de las raíces formadas; mientras que las figuras A2 y A3 muestran como enraizaron en el medio.

| Medio MS                            |                                   |                                     |
|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| <u>Presencia de raíces</u><br>99.5% | <u>Ausencia de raíces</u><br>0.5% | <u>Sistema radical bueno</u><br>96% |







**FIGURA 40.** *Selenicereus validus*. Presencia de las raíces formadas en medio MS. En las figuras A1 y A4 se puede ver la longitud de las plantas y de las raíces formadas; mientras que las figuras A2 y A3 muestran como enraizaron en el medio. En la figura A5 se observa las condiciones *ex vitro* a las cuales se colocaron las plantas.

- **NOTA:** El sistema radical bueno es aquel que presentó más de 3 raíces por explante y que además tuvieron más de 1 cm de longitud.

### VIII.2.2. Supervivencia de las plantas *ex vitro*.

El porcentaje de supervivencia en suelo fue del **61%**. La figura 41 muestra las plántulas creciendo en condiciones de invernadero.



**FIGURA 41.** *Selenicereus validus*. Brotes que sobreviven y continúan creciendo en condiciones de invernadero.




**VIII.3. Respuestas morfológicas de las especies seleccionadas por inducción de Organogénesis y Embriogénesis Somática directas e indirectas.**

A partir de los criterios establecidos en la Tabla 9 se registraron las respuestas obtenidas de los explantes sometidos a diferentes concentraciones de citocinias y auxinas:

| Callo (C)                          | Brotos (B)                                   | Raíces (R)                                   |
|------------------------------------|--|--|
| 0 - no hay callo                   | A – ausencia de brotes                       | X – ausencia de raíces                       |
| 1 - callo pequeño (menor a 1 cm)   | P – presencia de brotes (0 a 3 por explante) | √ - presencia de raíces (0 a 3 por explante) |
| 2 - callo mediano (entre 1 y 2 cm) |  |  |
| 3 – callo grande (mayor a 2 cm)    |  |  |

**TABLA 9.** Escala de medición para el registro de las respuestas morfológicas presentadas en los explantes de ambas especies en estudio.

- Hylocereus undatus:***

| TRATAMIENTO (Tx) | mT, ANA (mg/L) | RESPUESTA (C, B, R) | IMAGEN   |
|------------------|----------------|---------------------|--|
| 1                | 0, 0           | 0, A, √             |   |
| 2                | 1, 0           | 0, A, X             |  |
| 3                | 2, 0           | 1, P, X             |  |

4 3,0 0, P, X



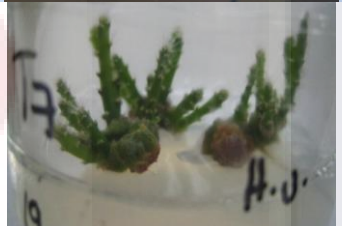
5 0,1 0, P, √



6 1,1 2, P, X



7 2,1 2, P, X



8 3,1 1, P, X






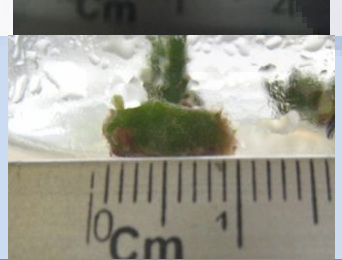


9 0,2 0, A, √









10 1,2 1, P, X



|    |      |         |  |
|----|------|---------|--|
| 11 | 2, 2 | 2, A, X |    |
| 12 | 3, 2 | 0, A, X |    |
| 13 | 0, 3 | 0, A, √ |    |
| 14 | 1, 3 | 0, P, √ |   |
| 15 | 2, 3 | 1, P, X |  |
| 16 | 3, 3 | 2, P, X |  |

**TABLA 10.** Respuesta morfológica de los explantes tratados con citocinina (mT) y auxina (ANA) a diferentes concentraciones para la especie *H. undatus*, luego de 60-65 días.

• *Selenicereus validus*:

| TRATAMIENTO (Tx) | ZiP, ANA (mg/L) | RESPUESTA (C, B, R) | IMAGEN   |
|------------------|-----------------|---------------------|--|
| 1                | 0,0             | 0, P, √             |    |
| 2                | 1,0             | 1, P, √             |    |
| 3                | 2,0             | 2, P, X             |   |
| 4                | 3,0             | 3, P, X             |  |
| 5                | 0,1             | 0, A, √             |  |
| 6                | 1,1             | 1, P, √             |  |

7 2, 1 1, P, √



8 3, 1 1, P, √



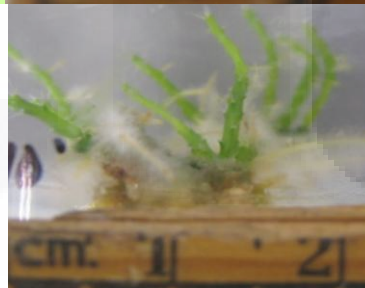
9 0, 2 0, A, √



10 1, 2 2, P, √


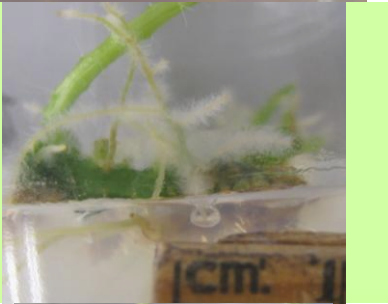




11 2, 2 2, P, √



12 3, 2 3, P, √

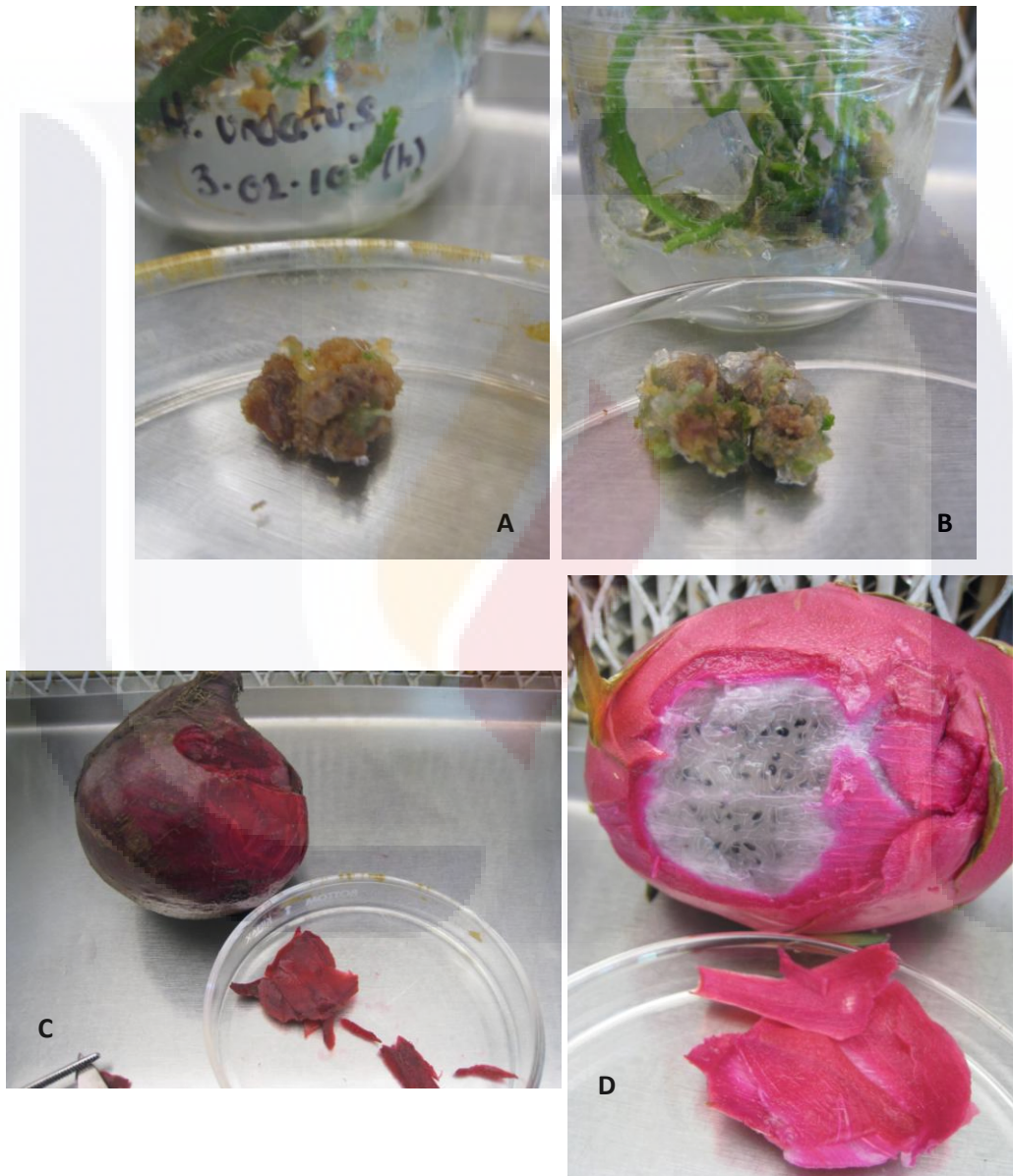


|    |      |         |   |
|----|------|---------|---|
| 13 | 0, 3 | 0, A, √ |   |
| 14 | 1, 3 | 1, P, √ |   |
| 15 | 2, 3 | 1, P, √ |   |
| 16 | 3, 3 | 2, P, √ |  |

**TABLA 11.** Respuesta morfogénica de los explantes tratados con citocinina (2iP) y auxina (ANA) a diferentes concentraciones para la especie *S. validus*, luego de 60-65 días.

VIII.4. Verificación de manera preliminar la posible producción de metabolitos secundarios en los tejidos cultivados *in vitro*.

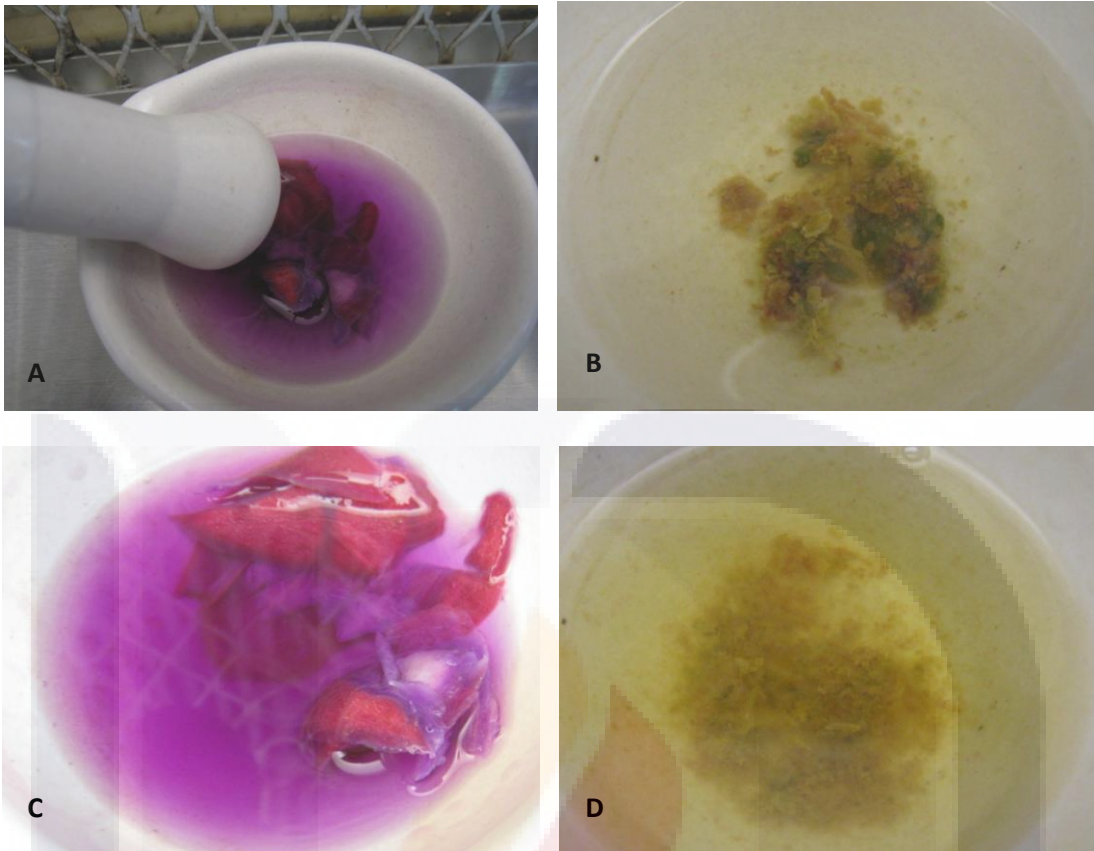
De los cultivos obtenidos en medio de auxinas y citocininas para las especies *S. validus* y *H. undatus*, se observó que no hubo mucha cantidad del tejido calloso. Para realizar la extracción (Molina, 2009) solo se utilizó aproximadamente 1 gr de tejido calloso de ambas especies (Fig. 42 A y B); la misma cantidad de muestra se empleó para el caso del betabel (*Beta vulgaris*) (Fig. 42 C) y para la cáscara de Pitahaya (Fig. 42 D).



**FIGURA 42.** Muestras de material empleado para la extracción de posibles pigmentos (condiciones asépticas). A) Tejido calloso proveniente de *H. undatus*; B) Tejido calloso proveniente de *S. validus*; C) Tejido de Betabel (*B. vulgaris*) y D) Tejido de la cáscara de Pitahaya.

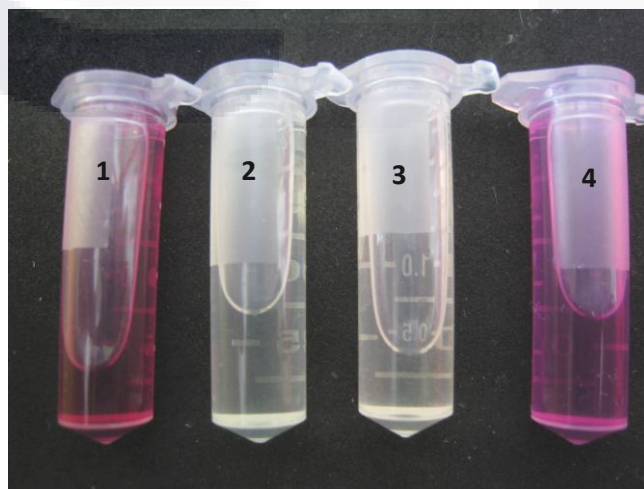


La adición de la solución de Metanol:HCl sobre cada muestra y la homogenización, favorecieron a la extracción de los posibles pigmentos presentes (Figura 43):



**FIGURA 43.** Extracción de posibles pigmentos (condiciones asépticas). A) Betabel; B) Tejido calloso de *S. validus*; C) Cáscara de Pitahaya y D) Tejido calloso de *H. undatus*.

Al colocar el extracto obtenido en tubos ependorf, se sometió a centrifugación y se separó el sobrenadante; colocando éste en el termoblock para favorecer la evaporación y concentración del posible pigmento (Figura 44).

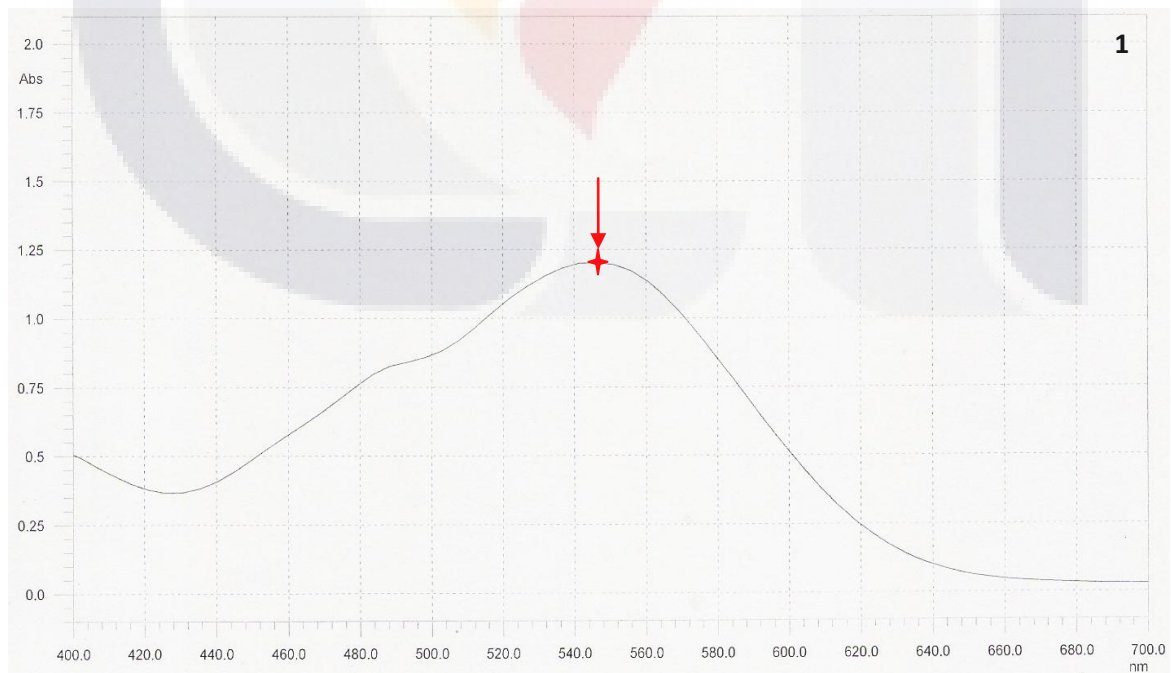


**FIGURA 44.** Extractos obtenidos para la verificación de posibles metabolitos secundarios mediante espectrofotometría. 1) Control de Betabel; 2) Tejido calloso de *S. validus*; 3) Tejido calloso de *H. undatus* y 4) Testigo de Pitahaya (cáscara del fruto).

El extracto resultante se llevó al análisis por un barrido espectrofotométrico desde 400 a 700nm. Para la lectura de cada una de las muestras se tomaron 3 diferentes tubos del extracto; de tal manera que se hicieron 3 barridos para asegurar los resultados y constatar que no había variantes entre las muestras.

Los resultados obtenidos mostraron la presencia de picos característicos de las betalaínas (entre 400 y 550nm). Para el caso del extracto del control de Betabel (*Beta vulgaris*) se observó un pico a los 550nm aproximadamente; lo cual es indicativo de presencia de betalaínas del tipo de las betacianinas (Fig. 45). Para el extracto del tejido calloso de *S. validus* se observó un pico sobresaliente a los 415nm aproximadamente; este resultado demuestra la presencia de betalaínas del tipo de las betaxantinas (Fig. 46).

En el caso del extracto del tejido calloso de *H. undatus* se observó un pico pequeño entre los 415 y 420nm; esto demuestra la presencia de betalaínas del tipo de las betaxantinas (Fig. 47). Para el extracto del testigo de la cáscara del fruto de Pitahaya se obtuvo un pico a los 545nm aproximadamente; esto es indicativo de la presencia de betalaínas del tipo de las betacianinas (Fig. 48).



**FIGURA 45.** Barrido Espectrofotométrico de Betabel (*B. vulgaris*).

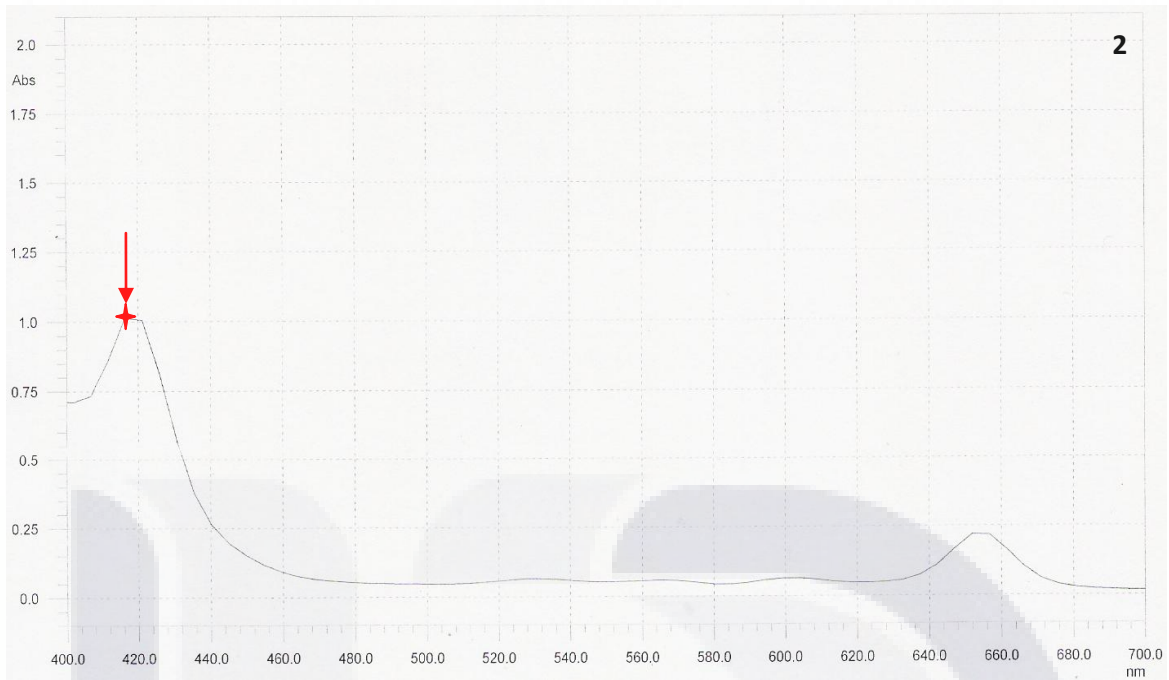


FIGURA 46. Barrido Espectrofotométrico de *S. validus*.

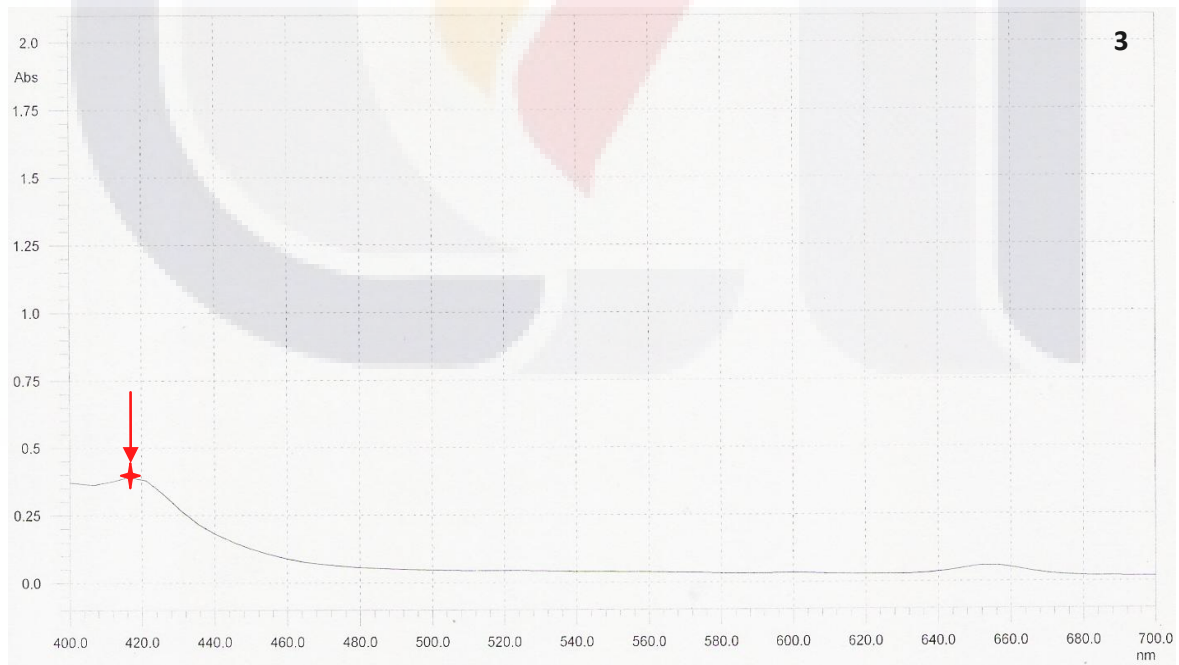
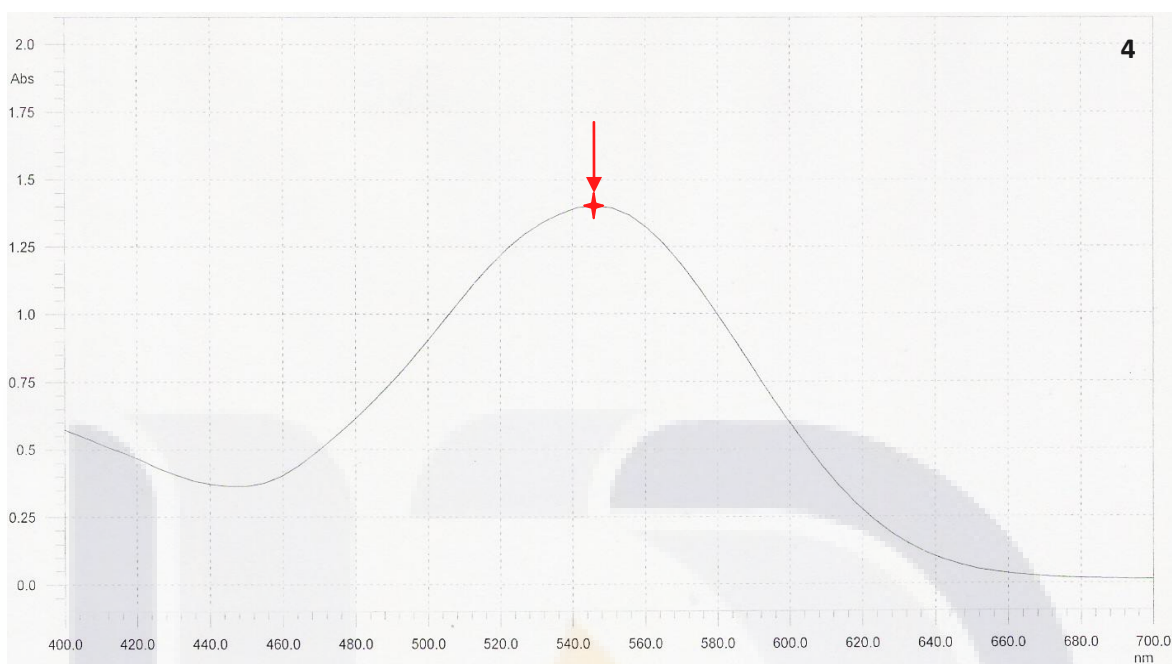


FIGURA 47. Barrido Espectrofotométrico de *H. undatus*.



**FIGURA 48.** Barrido Espectrofotométrico de la cáscara de Pitahaya.

## IX. DISCUSIÓN.

Una de las etapas más importantes en el proceso de propagación *in vitro* para el caso de semillas es la desinfección, ya que de su buen desarrollo y/o elección dependerá en gran medida la cantidad de material con el que se cuenta para todo el proceso de investigación. Lo anterior se pudo comprobar con el desarrollo del presente trabajo de investigación sobre *Hylocereus undatus*, ya que se obtuvieron muy altos niveles de contaminación (72%); sin embargo esto no fue algo que alterara el procedimiento posterior, ya que el porcentaje de semillas germinadas (28%) fue más que suficiente para el desarrollo de una buena cantidad de plántulas *in vitro* y sobre de ellas comenzar la micropropagación. Estos resultados son muy diferentes a los obtenidos por Morales *et al.* (2005), puesto que ellos lograron establecer *in vitro* semillas de *Stenocereus gummosus* con mayores niveles de germinación logrando un 70% y sin ninguna presencia de contaminación. Esto indica que el proceso de desinfección y el medio utilizado en este proyecto puede ser mejorado para favorecer la eliminación de la dormancia en las semillas de cactáceas sin dañarlas y lograr un mejor desarrollo y crecimiento de las plántulas al emplear correctamente la técnica señalada por Morales *et al.* (2005). Así mismo, el trabajo de Cuellar *et al.* (2006) logra analizar varias especies de cactáceas sometidas a germinación y establece diferencias importantes entre cada una de ellas: *S. queretaroensis* presentó un 84% de germinación, *S. gummosus* 60%, *S. griseus* un 15.2% y para *H. undatus* un 12.9%. Por lo tanto, coincide de manera importante con los resultados obtenidos en este proyecto, y se puede establecer que es posible la obtención de explantes asépticos de *S. queretaroensis*, *S. griseus*, *S. gummosus* e *Hylocereus undatus* en un medio MS (1962), y dependiendo de la respuesta esperada se puede adicionar o no BA y CIN (2:1mg/L) al medio (Cuellar *et al.* 2006).

Las plántulas obtenidas de las semillas cultivadas *in vitro* a un mes de iniciado el cultivo tenían una altura de entre unos 3 a 5 mm, y fueron estas las que se transfirieron a nuevo medio para aumentar su vigor. De esta manera se contó con suficiente material axénico para lograr reducir al mínimo posibles fuentes contaminantes. A pesar de los resultados obtenidos, debe mencionarse que el medio MS al 100% constituyó un buen medio de cultivo para la germinación de las semillas, y no se descarta la posibilidad de que existan otros elementos que podrían enriquecerlo para favorecer la germinación y disminuir la contaminación; esto se podría lograr empleando algún método descrito por Meza (2000), al poner en práctica dicha técnica ayudaría a germinar con mayor rapidez y sin tanta contaminación cualquier tipo de semilla de cactáceas.

El material axénico obtenido se estableció en medio de cultivo MS enriquecido con 0.5 mg/L de BA, para mantener la plántula y favorecer su crecimiento, de tal manera que alcanzara una altura adecuada para continuar con el proceso. Se logró observar que las plántulas establecidas *in vitro* a los dos meses de iniciado el cultivo tenían una altura de entre 1 a 2 cm y fue con estas con las que se comenzó a trabajar, pues la altura alcanzada fue buena para poder tomar el material con el que se continuaría trabajando.

Como una segunda etapa importante en el proceso de propagación *in vitro*, se encuentra la elección correcta del explante para el caso de tejidos que deben someterse a la activación de yemas axilares; igualmente, de esta elección depende el desarrollo y el tipo de respuesta que tendrá el explante sobre el medio de cultivo que se haya elegido. La importancia de esta etapa está comprobada en trabajos realizados por Pérez-Molphe *et al.* (1999) en donde señala además otra serie de factores que intervienen en el tipo de respuesta de un tejido *in vitro*. En el presente trabajo se realizaron una serie de tratamientos en los que se colocaron los explantes en posición tanto vertical como horizontal en medio MS con 10 g/L de agar y 3% de sacarosa. A pesar de que en ambas especies trabajadas en la activación de yemas axilares se utilizaron tratamientos iguales, pudo observarse que el número de brotes obtenidos, el porcentaje de respuesta, el porcentaje de enraizamiento, etc. son diferentes en cada una de las especies; es por ello que se discutirán estos resultados por separado.

En el caso de *Hylocereus undatus* el mayor número de brotes por explante obtenido, luego de dos meses y medio de incubación, en su mejor tratamiento fue de 12 con una concentración de 1.5 mg/L de mT, colocando el explante en posición horizontal sobre el medio de cultivo MS con 10 g/L de agar y 3% de sacarosa. Cabe mencionar que sobre esta especie en particular si influye la posición del explante para favorecer a la producción de brotes, siempre y cuando la fitohormona empleada sea la Meta-topolina. Es importante mencionar que en *H. undatus* generalmente hubo mayor respuesta sobre la producción de brotes al colocar los explantes sobre el medio en posición vertical, lo que demuestra que el tipo y la posición del explante utilizado es de mucha importancia al realizar la propagación *in vitro*. Este suceso coincide con lo que señala Rodríguez y Rubluo (1992) en donde menciona que la tasa de multiplicación está relacionada con el tipo de explante, concentración y tipo de fitohormonas utilizadas. Para este caso la fitohormona que mejores resultados generó sobre *H. undatus* fue la Meta-topolina (mT). Se debe mencionar que en general el tejido calloso fue prácticamente nulo, solo se observó en abundancia en los explantes sometidos a tratamiento con TDZ, mientras que en los demás tratamientos solo se observaban múltiples brotes y en algunos casos raíces. El callo obtenido fue

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

muy abundante lo cual, aparentemente para este tipo de fitohormona si influyó en la multiplicación de los brotes de *H. undatus*; además no se observó a simple vista coloración sobresaliente en alguna parte del tejido.

Los resultados obtenidos sobre *H. undatus* son sumamente importantes, ya que hasta el momento no existen muchos trabajos de investigación que utilicen a la Meta-topolina (mT) como citocinina predominante para favorecer la generación de brotes; la gran mayoría utilizan a la Benciladenina (BA); en este caso se ha encontrado que Sánchez *et al.* (2007) logró propagar *in vitro* *Browningia candelaris* (Cactaceae) utilizando mT y BA. La mejor respuesta establecida por Sánchez *et al.* (2007) fue una mayor producción de brotes alcanzada en medio MS con 0.5 mg/L de mT, donde se generó un promedio de 20.4 brotes por explante; mientras que para el caso de este proyecto sobre *Hylocereus undatus* la mayor producción de brotes se logró en medio MS con 1.5 mg/L de mT generando 12 brotes por explante; por lo tanto coincide en ambos el empleo de mT con resultados importantes y sobresalientes para la generación de brotes por explante.

En *Selenicereus validus* el mayor número de brotes por explante obtenido, luego de dos meses y medio de incubación, en su mejor tratamiento fue de 20.5, empleando concentraciones de 1.0 y 1.5 mg/L de 2iP, sin influir la posición en que es colocado el explante sobre el medio de cultivo MS con 10 g/L de agar y 3% de sacarosa. Este es un valor alto cuando se le compara con otros reportados para cactus, y solo es comparable con los 19.7 brotes por explante obtenidos en *Turbincarpus pseudopectinatus* en medio con BA (Dávila-Figueroa *et al.* 2005).

Cabe mencionar que debido a los resultados obtenidos, es recomendable para experimentos posteriores, emplear la menor concentración de fitohormona sobre el tejido que se desea micropropagar, ya que ambas concentraciones generaron los mismos resultados y, por lo tanto es deseable someter los explantes a menores concentraciones para disminuir, a la medida de lo posible cualquier tipo de variación genética. Es importante mencionar que en *S. validus* generalmente hubo mayor respuesta sobre la producción de brotes al colocar los explantes sobre el medio en posición vertical y horizontal, lo que demuestra que sobre esta especie el tipo y la posición del explante utilizado no es de mucha importancia al realizar la propagación *in vitro*; sin embargo, existen otros factores que influyen sobre la tasa de multiplicación, por ejemplo el tipo de explante utilizado, la concentración y tipo de fitohormonas utilizadas en el diseño de algún tratamiento.

Debido a que la fitohormona que mejores resultados generó sobre *S. validus* fue la 2-Isopentiladenina (2iP); es importante mencionar que tal resultado es poco común ya que generalmente la citocinina más empleada para generar brotes es la BA, puesto que se ha comprobado su eficiencia sobre ciertas cactáceas, como lo establece Santos D. (2005) en la inducción de la formación de brotes sobre *Ferocactus glaucescens*, encontrando que la BA a diferentes concentraciones produjo de 8 a 15 brotes por explante. Para el caso particular del proyecto se observó que la mejor respuesta es dada por la 2iP sobre *S. validus* generando 20.5 brotes por explante.

Es importante mencionar que en general el tejido calloso fue prácticamente nulo, solo se observó mayor cantidad en los explantes sometidos a tratamiento con TDZ, mientras que en los demás tratamientos solo se observaban múltiples brotes y en algunos casos raíces. El callo obtenido fue abundante lo cual, aparentemente para este tipo de fitohormona si influyó en la multiplicación de los brotes de *S. validus*; además no se observó a simple vista coloración sobresaliente en alguna parte del tejido. Con los resultados obtenidos se puede considerar que para ambas especies estudiadas el porcentaje de contaminación observado durante el proceso de micropropagación fue muy bajo, esto debido a que la técnica de desinfección y siembra, así como la manipulación del material empleado fue desarrollada de una buena manera.

Es claro que el tipo de explante utilizado es de suma importancia para la respuesta que se genera en la producción de brotes *in vitro* y que ésta dependerá de la concentración y tipo de reguladores empleados (exógenos), de la cantidad de fitohormonas endógenas (producidas por el propio tejido), del tipo de tejido que se haya tomado como explante, pero sobre todo de la especie que es sometida a estudio, ya que incluso esta respuesta varía dentro de un mismo género. De acuerdo a los resultados obtenidos, puede observarse que incluso a una misma concentración, cada tejido de cada una de las especies, respondió de manera diferente, esto debido principalmente a la cantidad de reguladores endógenos que contiene cada una de las especies y a la "sensibilidad" que cada tejido desarrolla ante cierto regulador de crecimiento específico; esta sensibilidad es determinada por la cantidad de receptores específicos para los reguladores de crecimiento. Por todo lo descrito, se puede mencionar que la respuesta de un tejido no está relacionada directamente con la cantidad de algún tipo de regulador exógeno que se aplique sobre el tejido en estudio, sino que en la respuesta obtenida intervienen diversos factores (genéticos, interacción entre reguladores, adaptación del tejido al medio, condiciones de luz, etc.), además de los ya mencionados como está señalada por Pérez-Molphe *et al.* (1999).



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Para la etapa de enraizamiento *in vitro* y condiciones *ex vitro*, se utilizaron dos medios distintos para probar y obtener la mejor sistema radical viables; debe entenderse por sistema radical viable aquel sistema que presenta más de tres raíces por explante y que además presentan una longitud mayor a 1 cm. Los medios a probar fueron con Carbón Activado al 3% y medio MS al 100%.

Sobre *H. undatus* el mejor tratamiento para lograr el enraizamiento generando un buen sistema radical fue MS, logrando obtener un 100% de raíces y generando un 80% con sistema radical bueno. Estos resultados son muy satisfactorios puesto que en investigaciones como la de Sánchez *et al.* (2007) solo se lograron enraizar de un 20 a un 68% de los brotes producidos y tratados con mT. Las plántulas que generaron un sistema radical bueno fueron llevadas a condiciones *ex vitro* en invernadero, en donde hay condiciones controladas de luz y humedad. Al registrar la respuesta obtenida luego de aproximadamente dos meses en invernadero, se notó que la sobrevivencia de las plántulas fue de un 54% del total; y al ser comparada con el 86% de plantas enraizadas sobreviviente en suelo por Sánchez *et al.* (2007) se observa que es menor, lo cual se relaciona con los primeros intentos para llevar a condiciones *ex vitro* *H. undatus*, pues siempre se obtenía un 0% de sobrevivencia debido a problemas físicos y medioambientales.

Para el caso de *S. validus* el mejor tratamiento para lograr el enraizamiento generando un buen sistema radical fue MS, logrando obtener un 99.5% de raíces y generando un 96% con sistema radical bueno. En los trabajos realizados por Pérez-Molphe *et al.* (2002), se ha encontrado que en el enraizamiento de tres especies distintas (*S. thurberi*, *C. gigantea* y *P. pringlei*) se obtuvo 96%, 92% y 88% de raíces respectivamente, por lo tanto los resultados obtenidos en este proyecto son muy importantes pues se destaca el empleo de 2iP favoreciendo la formación de brotes y además el enraizamiento sobre los mismos. Las plántulas que generaron un sistema radical bueno fueron llevadas a condiciones *ex vitro* en invernadero, en donde hay condiciones controladas de luz y humedad. Al registrar la respuesta obtenida luego de aproximadamente dos meses y medio en invernadero, se notó que la sobrevivencia de las plántulas de *S. validus* fue de un 61% del total. Este resultado no es tan bueno en comparación con lo obtenido por Pérez-Molphe *et al.* (2002), ya que establecen que las plántulas de las especies estudiadas para su caso tuvieron un 86% de sobrevivencia, lo cual en el caso particular de este proyecto con *S. validus*, se relaciona con las condiciones medioambientales y físicas a las que fueron expuestas las plántulas.

Por otro lado, las semillas que fueron colocadas como testigo directamente en el invernadero, respondieron a la formación de plántulas luego de 3 meses y después de eso su

adaptación se vio afectada; puesto que al transcurso de 9 meses aproximadamente estas plántulas tratadas *ex vitro* mostraron menos del 30% de sobrevivencia. Estos mismos efectos se observaron en el trabajo de Pérez-Molphe *et al.* (2002) pues se observó que las plántulas tratadas directamente *ex vitro* con mezcla de suelo y enraizadores comerciales solo lograron alcanzar un 36%, 32% y 40% sobre *C. gigantea*, *P. pringlei* y *S. thurberi* respectivamente. Debido a estos resultados está claro que el enraizamiento y sobrevivencia es más eficiente para *S. validus*.

Como se ha notado, es claro que existieron problemas para establecer las plántulas de ambas especies estudiadas en condiciones *ex vitro*, debe hacerse mención que se hicieron tres intentos para condiciones *ex vitro* sobre cada especie, probando en cada caso diferentes procedimientos de aclimatación de las plántulas antes de ser llevadas a invernadero. En el primer intento se optó por aclimatar a las plántulas abriendo los frascos (quitándoles el sello) y dejando la tapa sobrepuesta dentro del cuarto de incubación durante 2 a 3 días; posteriormente se continuaba extrayendo las plántulas cuidadosamente del medio de cultivo (MS) para no romper las raíces formadas, y luego se lavaron perfectamente con agua destilada para eliminar cualquier residuo de agar, debido a que éste favorece la proliferación de hongos en las raíces. Ya limpias las raíces se les dejó durante 2 o 3 días dentro de la cámara bioclimática en donde la temperatura oscila entre los 20 y 23 °C. Al paso de estos días se procede a sacar las plántulas a condiciones *ex vitro* no sin antes impregnar las raíces con fungicida para evitar proliferación de hongos y posteriormente se sembraron en suelo (40% tierra y 60% arena). Finalmente se agregó poco agua para mantener la humedad del suelo, se tapó haciendo pequeños orificios y se volvió a mantener en cámara bioclimática por 1 día; posteriormente se llevó a invernadero. El problema registrado en este primer intento se observó desde el momento de extraer las plántulas colocadas en suelo de la cámara bioclimática, ya que éstas se encontraban impregnadas de manera exagerada con hongos; por lo tanto no hubo ningún brote viable que pudiera sobrevivir. Las causas probables fueron que se registró una avería en la cámara y la temperatura del interior se encontraba sobre los 25°C.

En un segundo intento por transferir las plántulas a condiciones *ex vitro*, se procedió de una manera similar. En este caso directamente se extrajeron las plántulas cuidadosamente del medio de cultivo (MS) para no romper las raíces formadas, y luego se lavaron perfectamente con agua destilada para eliminar cualquier residuo de agar. Cuando estuvieron limpias se impregnaron las raíces con fungicida y posteriormente se sembraron en suelo (40% tierra y 60% arena). Se taparon las plántulas haciendo pequeños orificios y se les dejó 1 solo día dentro de la cámara bioclimática; posteriormente en un segundo día se retiró completamente la tapa y se dejó dentro

un día más en la cámara (20-23°C). Al tercer día se sacaron las plántulas a condiciones *ex vitro* (invernadero). Se registraron datos de sobrevivencia a los 5 días después y se observó una mortalidad total de las plántulas. El problema registrado en este segundo intento fue que al segundo día de ubicarse en el invernadero, las cortinas del mismo fueron cerradas, lo cual ocasionó que la temperatura dentro del invernadero subiera hasta más de 30°C, motivo por el cual las plántulas no resistieron y murieron en su totalidad.

En el tercer y último intento se optó por aclimatar a las plántulas abriendo los frascos (quitándoles el sello) y dejando la tapa sobrepuesta dentro del cuarto de incubación durante 2 a 3 días; posteriormente se continuaba extrayendo las plántulas cuidadosamente del medio de cultivo (MS) para no romper las raíces formadas, y luego se lavaron perfectamente con agua destilada para eliminar cualquier residuo de agar. Cuando estuvieron limpias se impregnaron las raíces con fungicida y posteriormente se sembraron en suelo (40% tierra y 60% arena). Se agregó agua para humedecer el suelo y se taparon las plántulas haciendo pequeños orificios y se les dejó un día afuera del laboratorio en condiciones medio ambientales normales (bajo sombra y sin luz directa, aproximadamente 22°C); al día siguiente se quitó por completo la tapa y se llevó a invernadero. Al registrar resultados de sobrevivencia después de 5 días se observó que las plántulas continuaban viables, conservando color y firmeza. Al paso de 2 meses y medio (en promedio) se registró la sobrevivencia total tanto para *S. validus* como para *H. undatus*.

En lo que se refiere a la evaluación de las respuestas morfogénicas de las especies sometidas a estudio por inducción de organogénesis y embriogénesis somática directas e indirectas, el proceso realizado para este trabajo partió de identificar las fitohormonas que mejor respuesta generaron durante el proceso de propagación de brotes por explante a las que fueron sometidas *H. undatus* y *S. validus*. Como se mencionó anteriormente, para *H. undatus* la hormona que mejor producción de brotes por explante generó fue la mT a 1.5 mg/L y para *S. validus* fue la 2iP a concentraciones de 1.0 y 1.5 mg/L. Partiendo de esta información se diseñaron diferentes tratamientos de citocinina/auxina a diferentes concentraciones (de 0.0 hasta 3.0 mg/L) para generar algún tipo de respuesta morfogénica del tejido que fue sometido.

Por lo tanto, para el caso de *H. undatus* los tratamientos de citocinina/auxina fueron diseñados empleando mT/ANA a diferentes concentraciones. Las respuestas obtenidas fueron varias y se registraron mediante una escala diseñada para callo, brotes y raíces. Para el caso de *S. validus* los tratamientos de citocinina/auxina fueron diseñados empleando 2iP/ANA a diferentes

concentraciones. Las respuestas obtenidas también fueron diversas siendo registradas, de igual forma mediante una escala para respuestas de callo, brotes y raíces.

Se lograron conocer las respuestas morfogénicas de ambas especies ante medios de cultivo diseñados para inducir la organogénesis y embriogénesis somática directas e indirectas. En lo que respecta a este apartado se hace evidente que con este estudio se abre la pauta para muchas más investigaciones posibles a realizarse a fin de lograr entender mucho mejor los procesos y comportamientos diversos de *S. validus* y de *H. undatus*.

Como objetivo final se planteo verificar de manera preliminar la posible producción de metabolitos secundarios en los tejidos cultivados *in vitro*. Para lo cual fue necesario extraer el posible pigmento que estuviera presente en tejido calloso formado por ambas especies en estudio. Además se establecieron testigos para comparar los resultados obtenidos de la extracción.

Los testigos utilizados fueron el tejido de betabel (*B. vulgaris*) y la pulpa de la cáscara de pitahaya (*H. undatus*). Moreno *et al.* (2002) establecen que *B. vulgaris* contiene betalaínas de color rojo principalmente, en forma de dos grupos principales, las betacianinas y betaxantina obtenidos de raíces de remolacha. Para el caso de la cáscara de pitahaya se toma como referencia que es un fruto de cactáceas y Vilorio *et al.* (2002) ha encontrado compuestos betalaínicos presentes en la pulpa de frutos de *Opuntia boldinghii* Br. et R. Por lo anteriormente descrito el betabel y la pulpa de pitahaya son buenos materiales para emplearse como testigos en el proceso de extracción y determinación de metabolitos secundarios del tipo de las betalaínas; además de que Bravo-Hollis, (1978) ha caracterizado perfectamente la coloración de muchas cactáceas entre ellas a las de las especies en estudio: *S. validus* y *H. undatus*, y ha determinado que por su coloración ambas especies deben contener algún tipo de metabolitos secundarios que le otorguen esta característica.

El proceso de extracción realizado se basó en lo ya descrito por Molina (2009) y es importante mencionar que las muestras de callo tomadas de *H. undatus* y de *S. validus* no presentaban mucha coloración en tonos rojos, se observó que predominaban colores entre amarillo y verde. Lo anterior es el resultado de someter a la planta a condiciones de cultivo "perfectas" y sin ningún tipo de estrés, como pasaría en condiciones reales o *ex vitro*. *In vitro*, las plantas obtienen todos sus requerimientos con facilidad, por lo tanto en ocasiones es difícil que produzcan metabolitos secundarios; ya que se debe recordar que éstos son producidos por las

plantas como un tipo de respuesta a ciertas condiciones del medio ambiente que le rodea, siendo consecuencia de algún tipo de precursor (clima, agentes químicos, agentes físicos, agentes biológicos, etc.), generando sobre la planta algún tipo de amenaza y provocando entonces que ésta active algún tipo de protección, que en este caso son los metabolitos secundarios (color, olor, agentes químicos, etc.).

Las muestras obtenidas de la extracción fueron sometidas a un barrido espectrofotométrico desde 400 a 700nm, ya que Moreno *et al.* (2002) y Viloría *et al.* (2002) establecen que los espectros visibles de betacianina y betaxantina aislada de betabel (*B. vulgaris*) y de tuna (*O. boldinghii*) se encuentran como pico máximo de la curva en un rango de entre 400 y 580nm.

En la figura 45 se muestra el espectro de absorción (400 a 700nm) del extracto metanólico de betabel que se utilizó como patrón de comparación. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de un pico característico a los 550nm aproximadamente; lo cual es indicativo de presencia de betalaínas del tipo de las betacianinas que corresponden a pigmentos rojos. De la misma manera Soriano *et al.* (2007) identificaron estos mismos compuestos en un extracto metanólico de tuna roja (*Opuntia ficus-indica*). De igual forma para el extracto del testigo de la cáscara del fruto de Pitahaya se obtuvo un pico a los 545nm aproximadamente; esto es indicativo de la presencia de betalaínas del tipo de las betacianinas (Fig. 48), lo cual es semejante a lo señalado por Viloría *et al.* (2002) para *Opuntia boldinghii*.

Para el caso de la figura 46, se puede observar en el espectro de absorción del extracto metanólico de *S. validus*, la presencia de un pico sobresaliente a los 415nm aproximadamente; este resultado demuestra la presencia de betalaínas del tipo de las betaxantinas que corresponden a pigmentos amarillos. En el caso del extracto de *H. undatus* se observó un pico pequeño entre los 415 y 420nm; esto demuestra la presencia de betalaínas del tipo de las betaxantinas que igualmente corresponde a pigmentos amarillos (Figura 47).

En su trabajo Moreno *et al.* (2002) muestra los espectros visibles de betacianina y betaxantina aislada de remolacha (*B. vulgaris L.*) y coinciden los picos con los resultados obtenidos de los espectros de absorción del presente trabajo, por lo cual se comprueba la presencia de betalaínas del tipo de las betaxantinas y de las betacianinas en *H. undatus* y en *S. validus*. Reafirmando lo descrito anteriormente, el trabajo de Santos *et al.* (2005) describe que las betaxantinas absorben a 477-486nm y las betacianinas a 538-552nm; de esta manera no hay duda

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

en que los resultados obtenidos con los espectros de absorción realizados en el presente trabajo, son los correspondientes a betalaínas.

El manejo eficiente de los extractos betalaínicos debe realizarse considerando las condiciones de temperatura, puesto que ésta es un factor importantísimo de deterioro, tal y como lo señala Moreno *et al.* (2002) en donde se describe que la degradación de betalaínas se relaciona directamente con la exposición a la luz y al almacenamiento a altas temperaturas (15°C); esto hace que el color decrezca, lo que se traduce en la disminución de la vida media de los compuestos de las betalaínas (betacianina y betaxantina). Por tal motivo es obligado el almacenamiento de los extractos a bajas temperaturas, de esta manera se favorece su conservación en caso de no ser analizadas inmediatamente.

Finalmente, con este proyecto se debe destacar con mayor ahínco que los sistemas de propagación *in vitro* desarrollados para *Hylocereus undatus* y para *Selenicereus validus* pueden ser una herramienta importante para la conservación y el uso racional de la especie. Hasta donde sabemos, este es uno de los primeros reportes acerca de la propagación *in vitro* de estas especies en donde se usa mT y 2iP. Por otro lado, se demostró que la mT y la 2iP pueden ser citocininas eficientes para la propagación *in vitro* de cactáceas a través de la activación de areolas.

## X. CONCLUSIONES.

- El sistema de esterilización empleado para la desinfección de las semillas de *H. undatus* fue lo suficientemente bueno para continuar con el proceso de investigación. El medio MS resultó ser el adecuado para la germinación de las semillas y el medio MS + 0.5mg/L BA fue el adecuado para favorecer el crecimiento de la plántula germinada.
- Los sistemas diseñados y establecidos para la propagación masiva *in vitro* a través de la producción de brotes por activación de areolas fueron satisfactorios para ambas especies: *Hylocereus* y *Selenicereus* (Cactaceae).
- De acuerdo a los resultados obtenidos por el Análisis Estadístico, se establece que el mejor tratamiento sobre la especie *H. undatus* es la Meta-topolina (mT) a una concentración de 1.5 mg/L y colocando el explante en posición horizontal; en este caso se comprueba que influye la posición en la que sea colocado el explante sobre el medio de cultivo; obteniendo 12 brotes promedio por explante.
- De acuerdo a los resultados obtenidos por el Análisis Estadístico, se establece que el mejor tratamiento sobre la especie *S. validus* es el 2-isopentil-adenina (2iP) a una concentración de 1.0 mg/L y 1.5 mg/L; en donde se observa que no influye la posición en la que sea colocado el explante sobre el medio de cultivo; obteniendo 20 brotes promedio por explante.
- El mejor medio para enraizar las plántulas de *H. undatus* es MS, logró obtener 100% de raíces sobre los explantes colocados, de los cuales un 80% generaron sistema radical bueno. La sobrevivencia de las plántulas en condiciones *ex vitro* (invernadero) fue de un 54% del total.
- El mejor medio para enraizar las plántulas de *S. validus* es MS, logró obtener 99.5% de raíces sobre los explantes colocados, de los cuales un 96% generaron sistema radical bueno. La sobrevivencia de las plántulas en invernadero (*ex vitro*) fue de un 61% del total.
- La respuesta morfogénica más abundante sobre los explantes de *H. undatus* tratados con diferentes concentraciones de citocinina (mT) y de auxina (ANA), fue la presencia de un callo pequeño (menor a 1 cm), presencia de brotes (más de 3 por explante) y ausencia de raíces.
- La respuesta morfogénica más abundante sobre los explantes de *S. validus* tratados con diferentes concentraciones de citocinina (2iP) y de auxina (ANA), fue la presencia de un callo pequeño (menor a 1 cm), presencia de brotes (más de 3 por explante) y presencia de raíces (más de 3 por explante y mayores a 1 cm de longitud).
- Se logró verificar de manera preliminar la posible producción de metabolitos secundarios en los tejidos cultivados *in vitro*; encontrando betalaínas del tipo betaxantinas (pigmentos color amarillo) en tejido calloso.

## XI. BIBLIOGRAFÍA.

- Aíra, de M. L., Cássia, S. de R., Gallo, L. A. 2005. In Vitro propagation of *Notocactus magnificus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer 84: 165-169.
- Alacid, M., Obón, J. M., Castellar, M. R. y Fernández, J. A. 2006. Colorantes naturales a partir de frutos de *Opuntia sp.* Cartagena (Murcia). Uniagro No.29.
- Ambid, C., Moisseeff, M. y Fallot, J. 1983. Interconversion des aldéhydes et des alcools monoterpéniques par des cellules de raisin Muscat cultivées *in vitro*. Physiol. Vég. 21: 87-92.
- Anderson, F. E. 2001. The Cactus Family. Ed. Timber Press, Inc. E.U.A. Pp. 30, 33, 40-41, 377, 631.
- Arruda-Ferrira, G. F., Fernandes, H. F., Barbata, S. P., Facó, O., De Paiva, C. F. 2006. Stomatic embryogenesis and plant regeneration in *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). Scientia Horticulturae. Elsevier 108: 15-21.
- Becker, H., and M. Sauerwein. 1990. Manipulating the biosynthetic capacity of plant cell cultures. *In: Secondary Products from Plant Tissue Culture*. Charlwood, V., and M. and C. Rhodes. (eds). Clarendon Press, Oxford, England. pp: 43-55.
- Benega, G. R., Schneider, B., Tel, Z. N. 2009. Androgenesis in the vine cacti *Selenicereus* and *Hylocereus* (Cactaceae). Plant Cell Tiss Organ Cult, Springer Science 96: 191-199.
- Biljana, B., Tkalec, M., Dubravko, P., Pevalek, K. B., Krsnik, R. M. 2008. Growth Conditions in *in vitro* culture can induce Oxidative Stress in *Mammillaria gracilis* Tissues. Springer Science.
- Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México. 2da. Edición. Vol. II. UNAM. México. Pp. 505, 510.
- Charlwood, V. B., K. A. Charlwood, J. Molina-Torres. 1990. Accumulation of secondary compounds by organized plant cultures. *In: Secondary Products from Plant Tissue Culture*. Charlwood, V., and M. J. C. Rhodes. Clarendon Press, Oxford, England. pp: 167-200.



Colomas, J., P. Barthe, C. Bulard. 1978. Separation et identification des betalaines synthetisees par les tissus de tige de *Myrtillocactus geometrizans* cultivés *in vitro*. Z. Pflanzenphysiology 87: 341-346.

Cuellar, Ch. L., Morales, R. E. y Treviño, N. J. 2006. La germinación *in vitro* una alternativa para obtener explantes en cactáceas. Zonas Áridas, No. 10. pp. 129.133.

Dávila, F. C., De la Rosa, C. M. L., Pérez-Molphe, B. E. 2005. In Vitro propagation of eight species or subspecies of *Turbincarpus* (Cactaceae). In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant 1-6.

Elías-Rocha, M. A., M. S. Santos-Díaz, and A. Arredondo-Gómez. 1999. Propagation of *Mammillaria candida* (Cactacea) by tissue culture techniques. Haseltonia Yearbook of the Cactus and Succulent Society of America 6: 96-101.

Elliot, D. C. 1979. Ionic regulation for cytokinin-dependent betacyanin synthesis in *Amaranthus* seedlings. Plant Physiol. 63: 264-268.

Esquivel, P. 2004. Los Frutos de las Cactáceas y su Potencial como Materia Prima. Mesoamerican Journal of Agronomy – Agriculture and Livestock. 15 (2): 215- 219.

Evans, Shap, Ammirato, Amada. 1983. Handbook of Plant Cell Culture. Mac Millan.

García R., H. 1993. Estimulación de la germinación de cinco especies de cactáceas consideradas en peligro de extinción. Tesis licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo Coahuila. Méx. 234 p.

García, S. P., Valdez, M. M., Valverde, M., Cruz, H. A., Paredes, L. O. 2005. Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. Plant Cell Tissue and Organ Culture. Springer 80: 215-219.

Garza, P. R. A., Morales, R. M. E., Treviño, N. J. F. 2005. Propagación “in Vitro” de *Acanthocereus occidentales* Britton and Rose. Biología Celular y Genética. Facultad de Ciencias Biológicas UANL. México. Vol. 2, No.3 Sep-Dic. 2005.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Girod, P. A., and J. P. Zryd. 1991. Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris*) cells: Differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 25: 1-12.

Giusti, P., Vitti, D., Fiocchetti, F., Colla, G., Saccardo, F., Tucci, M. 2002. In Vitro propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae*. Elsevier Science 95: 319-332.

González, D., Pérez, R. y Pérez, M. B. E. 2006. *In Vitro* análisis of susceptibility to *Agrobacterium rhizogenes* in 65 species of Mexican cacti. *Biologia Plantarum* 50 (3): 331-337.

Gómez, H. C. y Hernández, M. H. 2000. Diversity, geographical distribution, and conservation of Cactaceae in the Mier y Noriega region, Mexico. *Biodiversity and Conservation*; Kluwer Academia Publishers 9: 403-418.

Hall, L. 1979. World Biomass: An Overview. *Biomass for Energy*. UKISES. London. Pp. 114.

Hernández, M. H. y Godínez, A. H. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. Herbario Nacional. Instituto de Biología, UNAM. *Acta Botánica Mexicana*. 26: 33-52.

Infante, R. 1992. *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). *Plant Cell Tiss. Organ Cult* 31:155-159.

Jonson, J. L., Emimo. E. R. 1979. Tissue culture propagation in the cactacea. *Cactus and Succulent Journal* 51: 275- 277.

Kanner, J., Harel, S. y Granit, R. 2001. Betalains- A New Class of Dietary Cationized Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 49(11):5178-5185.

Luczkiewicz, M., and W. Cisowski. 2001. Optimization of the second phase of a two phase growth system for anthocyanin accumulation in callus culture of *Rudbeckia hirta*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 65: 57-68.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Majdoub, H., Roudesli, S., Deratani, A. 2001. Polissaccharides from prickly pear peel and nopals of *Opuntia Picus-indica*: extraction, characterization and polyextrolyte behaviour. *Polymer Internacional* 50: 552-560.

Mandujano, R.R. 2006. Estudio preliminar de los pigmentos presentes en cáscara de Pitaya de la región mixteca. Tesis (título de Ingeniero en alimentos). Universidad Tecnológica de la Mixteca. Huajuapán de León, Oaxaca. pp. 76.

Márquez, G. E. y García, V. Y. 2007. Colorantes Naturales de origen vegetal. *Ciencia y Tecnología de Alimentos* Vol. 17, No. 1. 68:74.

Meza, R. E. 2000. Desarrollo de sistemas para el Cultivo *in vitro* y Micropropagación de Cinco Especies de cactáceas: *Astrophytum ornatum*, *Coryphanta bumamma*, *Mammillaria bocasana*, *M. oteroi* y *Thelocactus hexaedrophorus*. Tesis (título Maestra en Ciencias en el Área de Biotecnología Vegetal). Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Química. Universidad Autónoma de Aguascalientes. pp. 87.

Morales, R., Verde, J. S., Oranday, A. C., Rivas, C. M., Arévalo, K. N., Cruz, D. E. V. y Treviño, J. N. 2005. Producción de callo de Pitaya agria y determinación de metabolitos secundarios en tallos y frutos. *Boletín Informativo de la SLCCS*. Vol. 2, No.1. pp. 4-5

Moreno, A. M. J., Vilorio, M. A. y Belén, C. D. 2002. Degradación de Betalaínas en Remolacha (*Beta vulgaris* L.) estudio cinpético. *Revista Científica, FCV-LUZ/* Vol. 12, No.2. 133-136.

Moreno, D., García, V. C., Gil, J. y Gil, I. A. 2007. Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. Springer Science Business Media. Murcia, España.

Molina, R. L. D. 2009. Inducción y Evaluación de la Formación de Betalaínas en Tejido Calloso de las especies *Turbnicarpus hoferi* y *Turbnicarpus valdezianus var. albiflorus*. Tesina (título Licenciado en Análisis Químico Biológicos). Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Química. Universidad Autónoma de Aguascalientes. pp. 36.

Nabeta, K., Ohnishi, Y., Hirose, T. y Sugisawa, H. 1983. Monoterpene biosíntesis by callus tisúes and suspension cells from *Perilla* species. *Phytochem.* 22: 423-425.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Ochoa-Alejo, N. 1990. Establecimiento de cultivos *in vitro*. En fundamentos teórico-prácticos de cultivo de tejidos vegetales. Editor Codmo H. Rossell y Víctor M. Villalobos. 23-27. Roma: FAO.

Ortega, B. P. y Godinez, A. H. 2006. Global diversity and conservation priorities in the Cactaceae. *Biodiversity and Conservation*; Springer 15: 817-824.

Pelah, D., Kaushik, R. A., Mizrahi, Y., Sitrit, Y. 2002. Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*; Kluwer Academia Publishers 71: 81-84.

Pérez-Molphe, B. E., Ramírez, M. R., Núñez, P. H. y Ochoa, A. N. 1999. Introducción al cultivo de Tejidos Vegetales. 1ª ed. UAA. México. Pp. 9-13; 15-16; 27-34; 71-78.

Pérez-Molphe, B. E., Pérez, R. M., Dávila, F. C., Villalobos, A. E. 2002. In Vitro Propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran Desert. *Hort Science* 37(4): 693-696.

Pérez-Molphe, B. E., Dávila, F. C. 2002. In Vitro Propagation of *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 38: 73-78.

Phillipson, G. 1990. Plants as a Sources of Valuable Products. In: Charlwood, B. V. and M. J. C. Rhodes (Eds.) *Secondary Products from Plant Tissue Culture*. Clarendon Press. Oxford. New York. USA. Pp. 1-288.

Pimienta, B. E., Muñoz, U. A., Ramírez, H. B., Méndez, M. L. 2006. *Desarrollo Vegetal*. 1ª ed. Universidad de Guadalajara. Méico. Pp. 58-61.

Poljuha, D., Balen, B., Bauer, A., Ljubes, N., Krsnik, R. M. 2003. Morphology and ultrastructure of *Mammillaria gracillis* (Cactaceae) in *in Vitro* culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 75: 117-123.

Primo, Y. E. 1996. *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*. Volumen 1. Ed. Reverte. Barcelona, España. 795 pp.

Quiala, E., Montalvo, G. Matos, J., Mederos, R. 2007. La biotecnología vegetal: Su aplicación para el manejo integrado de cactáceas cubanas amenazadas. Bo. Soc. Latin. Carib. Cact. Suc. 4 (3) sep-dic. 2007.

Retes, P. J., Valadez, A. M., Pérez. R. M., Pérez-Molphe, B. E. 2007. Propagación *in Vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). Biol. Soc. Bot. Méx. 81: 7-16.

Reynoso, R., García, F. A. y Gonzáles de Mejía, E. 1997. Stability of Betalain Pigments from a Cactacea Fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45(8):2884-2889.

Robbins, S. C. 2003. Comercio Espinoso: Comercio y conservación de cactus en el Desierto Chihuahuense. Fondo Mundial para la Naturaleza.

Roca, M. W., Mroginski, A. L. 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Publicación CIAT No. 151. Colombia. pp. 960.

Rodríguez, G. B. y Rubluo, A. 1992. In vitro Morphogenetic esponses of the Endangered Cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker). Cactus and Succulent Journal (U.S.). 64:116-119.

Sánchez, G. N. 2006. Extracción y caracterización de los principales pigmentos de *Opuntia joconoste* c. v. (xoconostle). Tesis (título Maestro en Tecnología Avanzada). Centro de Investigación en Ciencia Aplicada: Tecnología Aplicada. Instituto Politécnico Nacional. pp. 83.

Sánchez, M. M. R. y Pérez-Molphe, B. E. 2007. Propagación *in vitro* de *Browningia candelaris* (Cactaceae) usando meta-topolina. Bol. Soc. Latin. Carib. Cact. Suc. 4(2). pp. 17-19.

Santos, D. M. S. 2005. Micropropagación de *Ferocactus glaucescens* Britton & Rose, cactácea mexicana de valor ornamental. Boletín SLCCS. Vol. 2, No. 3. pp. 6-8.

Santos, D. M. S., Méndez, O. R., Arredondo, G. A., Santos, D. M. L. 2003. In Vitro organogenesis of *Pelecypora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant 39: 480-484.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Santos, D. M. S., Velásquez, G. Y., González, C. M. 2005. Producción de pigmentos por callos de *Mammillaria candida* Scheidweiler (Cactaceae). *Agrociencia* 39: 619-626.

Soriano, S. J., Franco, Z., Pelayo, Z. C. Armella, V. M., Yáñez, L. y Legarreta, G. 2007. Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de la "jiotilla" (*Escontria chiotilla*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. Año/vol. 6, No. 001. pp. 19-25.*

Stintzing, F. C., Schieber, A., Carle, R. 2001. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *Eur. Food Res. Technol* 212: 396-407.

Stintzing, F.C.,Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellapan, S., Akoh, C. C., Bunch, R. and Felker, P. 2005. Color, Betalain Pattern, and Antioxidant Properties of Cactus Pear (*Opuntia* spp.) Clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(2):442-451.

Tel, Z. N., Abbo, S., Bar, Z. D., Mizrahi, Y. 2004. Genetci Relationships among *Hylocereus* and *Selenicereus* Vine Cacti (Cactaceae): Evidence from Hybridization and Cytological Studies. *Annals of Botany* 94: 527-534.

Teutonico, R.Y. y Knorr, D. 1984. Plant tissue culture: Food applications and the potential reduction of nutritional stress factors. *Food Technol*. 38: 120-127.

Villalobos, A.V. 1990. Historia del cultivo de tejidos vegetales. En *Fundamentos teóricos-prácticos de cultivo de tejidos vegetales*. Editores Codmo H. Rossell y Víctor M. Villalobos. 3-7. Roma: FAO.

Viloria, M. A., Corbelli, M. D., Moreno, A. M. J. *et al.* 2002. Estabilidad de betalainas en pulpa de tuna (*Opuntia boldingii* Br. et R.) sometidas a un proceso de liofilización. *Rev. Fac. Agron.* vol.19, no.4, p.324-331.

Wyka, P. T., Hamerska, M., Wróblewska, M. 2006. Organogenesis of vegetative shorts from in Vitro cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae). *Plant Cell Tiss. Organ. Cult. Springer Science* 87: 27-32.

Yasseen, M. Y. 2002. Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose). In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant 38: 427-429.

Zhong, J. J., and T. Yoshida. 1995. High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspension for anthocyanin production: Effects of sucrose concentration and inoculum size. Enzyme Microbial Tech. 17: 1073-1079.

