

**ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE  
REGENERACIÓN EN PITAHAYA AMARILLA  
(*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran)**

**DIEGO GERALDO CAETANO NUNES**

**DIRECTOR  
JUAN CARLOS VACA-VACA, Ph.D**

**CO-DIRECTOR  
ROOSEVELT ESCOBAR, Candidato D. Sc.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADOS  
PALMIRA, COLOMBIA  
2012**

**ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE  
REGENERACIÓN EN PITAHAYA AMARILLA  
(*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran)**

**DIEGO GERALDO CAETANO NUNES**

**Trabajo de grado para optar al título de  
Magister en Ciencias Biológicas área Biotecnología Vegetal**

**DIRECTOR  
JUAN CARLOS VACA-VACA, Ph.D**

**CO-DIRECTOR  
ROOSEVELT ESCOBAR, Candidato D. Sc.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADOS  
PALMIRA, COLOMBIA  
2012**

## **AGRADECIMIENTOS**

A los grupos de investigación GIRFIN e IPMA – UNAL sede Palmira, VRI y a DIPAL por financiar los reactivos y parte del estudio

A la profesora Creucí Maria Caetano por el apoyo moral

Al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, técnica María Elena Guevara y coordinador profesor Hernando Ramírez

A los directores de tesis, Roosevelt Escobar y Juan Carlos Vaca Vaca

A todas las personas que contribuyeron, de alguna forma, a la realización de este trabajo:

Martha Bonilla

Karina Lopez Lopez

Diego Fernando Marmolejo

Jaime Eduardo Muñoz

Diana Rodriguez

Johannes Delgado

Hector Ramirez

Dorian Otavo

Yamileth Chagüezá Villarreal

Paula Tatiana Uribe

Jhon Fredy Betancur



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
ACTA DE JURADO DE TESIS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
LINEA DE INVESTIGACIÓN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

En Palmira a los 10 días del mes de Diciembre de 2012, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores EDDIE TABARES y HERNANDO RAMIREZ Para calificar la Tesis de Grado de:

**DIEGO GERALDO CAETANO NUNES**

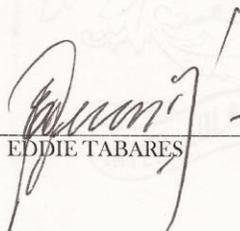
Titulada:

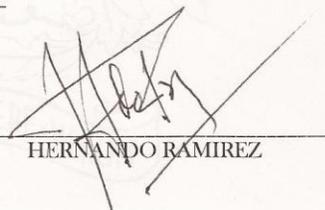
“ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE REGENERACIÓN EN PITAHAYA AMARILLA (*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. Ex Vaupel) Moran”, bajo la dirección de Juan Carlos Vaca Vaca PhD y Roosevelt Escobar MSc.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los docentes EDDIE TABARES y HERNANDO RAMIREZ, y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA

REPROBADA

  
EDDIE TABARES

  
HERNANDO RAMIREZ

La Facultad y los jurados de tesis no se harán responsables de las ideas emitidas por el autor.

Artículo 24, Resolución 04 1974.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	14
1 INTRODUCCIÓN.....	15
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
3 JUSTIFICACIÓN.....	19
4 OBJETIVOS.....	20
5 MARCO TEÓRICO.....	21
1 Descripción general de <i>Selenicereus megalanthus</i> .....	21
2 Hábitos de crecimiento y distribución geográfica de la pitahaya.....	23
3 Propagación en plantas.....	23
4 Requerimientos del cultivo y sistemas de propagación vegetativa de pitahaya amarilla.....	25
5 Cultivo de tejidos vegetales.....	27
6 Regeneración en Cactaceae. ....	33
7 Sistema de propagación por cultivo <i>in vitro</i> de la pitahaya amarilla.....	35
8 Transformación genética e Cactaceae.....	36
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
1 Localización del área de estudio.....	39
2 Material vegetal.....	39
3 Tipo de explantes.....	39
4 Metodología.....	40
5 Análisis histológico de los materiales.....	43

6	Análisis estadístico.....	43
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
	CONCLUSIÓN.....	74
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
	ANEXOS.....	83

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corte transversal del filocladodio y margen de las aristas de los cladodios de pitahaya amarilla.....	22
Figura 2. Comportamiento general de rebrote de estacas de pitahaya amarilla en dos diferentes condiciones de campo (Roldanillo y La Tebaida) e invernadero (Armenia), respectivamente a 1650, 1200 y 1450msnm (Suárez Román, 2011).....	26
Figura 3. Tipos de explantes, métodos de propagación y rutas de regeneración..	29
Figura 4. Desarrollo de plántulas de pitahaya en cultivo <i>in vitro</i> a partir de semillas. ....	35
Figura 5. Aréolas apicales y laterales en pitahaya amarilla. Las laterales fueron utilizadas como explante en el presente estudio.....	40
Figura 6. Modelo de disposición de los explantes de pitahaya amarilla (aréolas) en una repetición, en los distintos tratamientos ensayados.....	42
Figura 7. Hongos en aréolas provenientes de cladodios adultos (a) y jóvenes (b) de pitahaya amarilla.....	46
Figura 8. Meristemos de pitahaya amarilla provenientes de aréolas de filocladodios jóvenes (resultantes de estacas maduras mantenidas en invernadero) desarrollándose en medio MS suplementado con TDZ.....	49
Figura 9. Porcentaje de explantes en los 12 tratamientos bajo condiciones de luz (16/8) y oscuridad (0/24) que formaron callos y con callos regenerantes, después de 45 días posteriores a la siembra.....	51
Figura 10. Promedio de callos regenerantes formados en presencia de TDZ y TDZ suplementado con BAP, bajo condiciones de luz (16/8h) y oscuridad (0/24), en conjunto.....	53
Figura 11. Formación de callos no regenerantes en los tratamientos con 2,4-D: tratamientos 1(a), 2 (b) y 3 (c), y 2,4D combinado con BAP, tratamientos 4 (d), 5 (e) y 6 (f), sometidos a condiciones de luz.....	59
Figura 12. Formación de callos viables en los tratamientos con TDZ: tratamientos 7 (a), 8 (b) y 9 (c), y TDZ combinado con BAP, tratamientos 10 (d), 11 (e) y 12 (f), sometidos a condiciones de luz.....	60

Figura 13. Formación de callos no regenerantes en los tratamientos con 2,4-D: tratamientos 1 (a), 2 (b) y 3 (c), y 2,4D combinado con BAP, tratamientos 4 (d), 5 (e) y 6 (f), sometidos a condiciones de oscuridad.....	61
Figura 14. Formación de callos regenerantes en los tratamientos en los tratamientos con TDZ: tratamientos 8 (a) y 9 (b), y TDZ combinado con BAP, tratamientos 10 (c), 11 (d) y 12 (e), sometidos a condiciones de oscuridad.....	62
Figura 15. Tratamiento 13. En los controles de tratamiento con luz C1 (a), callo esponjoso con crecimiento de brote; C2 (b), callo esponjoso con brote y raíz; tratamientos en oscuridad C3 (c), callo esponjoso con formación de raíz y C4 (d) callo esponjoso con formación de raíz.....	63
Figura 16. Promedio de callos con brotes en pitahaya amarilla, en tres diferentes composiciones de medios, después de 30 días de siembra.....	65
Figura 17. Promedio de callos con brotes en pitahaya amarilla, en los tratamientos de TDZ, después de 30 días de siembra.....	66
Figura 18. Promedio de brotes de pitahaya amarilla por tratamiento, después de 30 días de siembra.....	67
Figura 19. Formación de brote a partir de callos, en los diferentes tratamientos. a, callo con un brote y b, con cuatro brotes, tratamiento 8; c, con tres brotes, tratamiento 9; d, cuatro brotes, tratamiento 10; e, un brote, tratamiento 11; f, dos brotes, tratamiento 12.....	68
Figura 20. Tejidos y primordios de brotes obtenidos a partir de callos regenerantes.....	71

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento para regeneración vía organogénesis indirecta.....	41
Tabla 2. Tratamientos empleados en la evaluación del tipo de fitoregulador, solo o combinado y la concentración.....	44
Tabla 3. Agentes desinfectantes utilizados en explantes de distintas especies de cactáceas, por diferentes autores.....	48
Tabla 4. Tratamientos ensayados bajo condiciones de luz (16/8) y oscuridad (0/24), porcentaje de explantes que formaron callos y callos regenerantes y eficiencia de inducción, 45 días posteriores a la siembra. ....	52
Tabla 5. Callos regenerantes formados en presencia de TDZ y TDZ suplementado con BAP, bajo condiciones de luz (16/8h) y oscuridad (0/24), en conjunto. ....	54
Tabla 6. Características de los callos de pitahaya amarilla inducidos a partir de aréolas laterales, formados bajo condiciones de luz y oscuridad.....	56
Tabla 7. Composiciones de los medios utilizados para el mantenimiento de los callos y proliferación de brotes en pitahaya amarilla, después de 30 días en MS (1962).....	64
Tabla 8. Número de callos regenerantes y de brotes producidos según el tipo de explante (aréola <i>in vitro</i> y campo), en las diferentes concentraciones de fitoreguladores.....	69

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Composición de los stocks utilizados para la preparación del medio básico MS (Murashige y Skoog, 1962).....	83
Anexo 2. Procesamiento de muestras de callos de pitahaya amarilla para estudios histológicos descrito por (Roth, 1964).....	84
Anexo 3. Análisis estadístico utilizando el programa SAS V 9.0.....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

AG o GA= Ácido giberélico

AIA= IAA ácido indolacético

AIB =ácido indolbutírico

ANA ácido naftalenacético

BA= benziladenina

2,4-D= 2,4-ácido diclorofenoxiacético

BAP o 6-BAP= benzilaminopurina

ES= embriogénesis somática

Kn= kinetina (quinetina)

MS= Murashige y Skoog

OI= organogénesis indirecta

OS= organogénesis somática

TDZ= Thidiazuron

## RESUMEN

### **Estandarización de un protocolo de regeneración en pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran)**

El cultivo de la pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*, Cactaceae) ofrece una alternativa para la inserción de las economías campesinas de los países andinos a los mercados nacionales e internacionales, por su fruto ser denominado exótico en particular, y por su sabor, apariencia, calidad y propiedades nutraceuticas. Un protocolo de regeneración *in vitro* vía organogénesis indirecta en pitahaya amarilla fue estandarizado a partir de meristemos axilares (aréolas), cultivados en medio MS (Murashige & Skoog, 1962). Se ensayaron tres concentraciones del Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (2.26, 3.26 y 4.26  $\mu\text{M}$ ) en combinación con 6-bencilaminopurina (6-BAP) 2.21  $\mu\text{M}$ , y tres concentraciones de Thidiazuron (TDZ) (200, 300 y 400  $\mu\text{M}$ ), y en combinación con 6-BAP, para un total de 12 tratamientos. Las condiciones de crecimiento evaluadas incluyeron el uso de luz (fotoperiodo de 16/8) o en oscuridad (0/24). Los fitoreguladores ensayados mostraron diferentes respuestas. El 2,4-D fue efectivo en la inducción de callo pero la eficiencia en regeneración para la especie fue nula, en las tres concentraciones utilizadas, solo o combinado con 6-BAP (tratamientos 1 a 6). A su vez el TDZ o TDZ suplementado con 6-BAP (tratamientos 7 a 12), se mostró más eficiente en la inducción de callo con capacidad de regeneración vía organogénesis indirecta. En aquellos tratamientos donde hubo regeneración fueron los mismos en que se logró un callo compacto, de color verde-morado; los reguladores de crecimiento que favorecieron esta condición son el TDZ y TDZ con BAP, bajo las condiciones de luz u oscuridad. Aunque los tratamientos 10, 9 y 11 presentaron mejor respuesta en la formación de callos regenerantes, el tratamiento 8 (TDZ a concentración de 300 $\mu\text{M}$ , 16/8) fue el que mostró más eficiencia de respuesta porque el número de brotes formados por punto de regeneración fue el más elevado. Un análisis histológico confirmó la vía de regeneración en *S. megalanthus*, evidenciando estructuras primordiales características de la formación de brotes a partir de callos. Se estandarizó el protocolo de organogénesis indirecta en pitahaya amarilla. El explante ensayado (aréola) presentó una buena respuesta a los estímulos, constituyéndose en una buena alternativa, por tratarse de una zona meristemática presente en gran cantidad en la estructura vegetativa de la planta (filocladodio).

**Palabras clave:** *Selenicereus megalanthus*, cultivo *in vitro*, callo regenerante, Thidiazuron, organogénesis indirecta.

## ABSTRACT

### **Standardization of a regeneration protocol in yellow pitahaya (*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran)**

The cultivation of yellow pitahaya (*Selenicereus megalanthus*, Cactaceae) offers an alternative to the inclusion of rural economies of the Andean countries to national and international markets for their fruit to be called exotic in particular, and for flavor, appearance, quality and nutraceutical properties. A protocol for *in vitro* regeneration in yellow pitahaya by indirect organogenesis pathway was standardized from axillary meristem grown on MS medium (Murashige & Skoog, 1962). Three concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (2.26, 3.26 and 4.26  $\mu\text{M}$ ), and 2,4-D + 6-benzylaminopurine (6-BAP) to 2.21 mM, and three Thidiazuron concentrations (TDZ) (200, 300 and 400  $\mu\text{M}$ ), and TDZ + 6-BAP were tested, in a total of 12 treatments. Growing conditions evaluated included the use of light (photoperiod of 16/8) or in darkness (0/24). The phytohormones tested showed different responses. The 2,4-D was effective in inducing calli but regeneration efficiency for the species was null in the three concentrations used, alone or in combination with BAP (treatments 1 to 6). In turn, the TDZ or TDZ + BAP (treatments 7 to 12) was more efficient in inducing calli with capacity of regeneration following indirect organogenesis. In those treatments where there were the same regeneration was achieved in compact callus, green, purple, growth regulators favored this condition are the TDZ and TDZ + BAP, under conditions of light or darkness. Although treatments 10, 9 and 11 showed better response in regenerating callus formation, treatment 8 (TDZ, 300  $\mu\text{M}$ , 16/8) showed more efficiency of response because the number of buds formed by regeneration point was the highest. Histological analysis confirmed the route of regeneration in *S. megalanthus*, showing primary structures characteristic of the formation of shoots from calli. We standardized the indirect organogenesis protocol for yellow pitahaya. The explants tested ('areola') showed a good response to stimuli. They are a good alternative, because constitute a meristematic region present in large numbers in the vegetative structure of the plant (phylocladodia).

**Keywords:** *Selenicereus megalanthus*, *in vitro* culture, regenerating calli, Thidiazuron, indirect organogenesis.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las Cactaceae son una familia constituida por alrededor de 1600 especies, distribuida en forma nativa desde Chile y Argentina hasta Canadá. Dentro del orden Caryophyllales comparte con otras familias sinamorfismos que no ocurren en ningún otro orden de las Angiospermae, uno de los cuales es la presencia de betalaínas, pigmentos nitrogenados derivados de la tirosina. Sus especies se caracterizan por el uso eficiente del agua (cinco a diez veces más que en cultivos convencionales), en relación con la ruta fotosintética CAM (Metabolismo Ácido de las Crasuláceas) (Wallace & Gibson, 2002).

A muchas especies de los géneros *Hylocereus*, *Selenicereus*, *Cereus*, *Leptocereus*, *Escontria*, *Myrtilloactus*, *Stenocereus* y *Opuntia*, se las conoce como pitahaya, pitaya, pitajaya, 'dragon fruit', flor de cáliz, entre otros. Al rededor de 35 especies tienen potencial como cultivo. Tradicionalmente la parte comestible es el fruto, aunque también se reporta el consumo de las flores y el de los brotes. Su elevado contenido de sólidos solubles (hasta 18 °Brix) le confiere gran potencial comercial y agroindustrial (Esquivel, 2004).

De todas las pitahayas se puede procesar la pulpa y extraer los colorantes y pectinas contenidos en la cáscara y, en algunos tipos, también en la pulpa. Esta es susceptible de someterse a procesos de congelamiento, concentración, deshidratación, fermentación, procesamiento térmico y preservación química, para los cuales existe tecnología disponible para las escalas casera, artesanal o industrial, previa prueba y adecuación de los procedimientos generales a las particularidades de las pitahayas (Esquivel, 2004).

*Selenicereus megalanthus* es conocida en Colombia como pitahaya amarilla debido a que su exocarpio es de ese color. A diferencia de las otras especies, tiene numerosas brácteas de las que nacen entre 10 a 15 acúleos, el endocarpio es blanco (diferencia primordial que permite distinguirla de las otras especies que se cultivan en otros países) y presenta numerosas semillas. Se encuentra distribuida geográficamente en Perú, Bolivia, Ecuador, Colombia y Venezuela (Britton & Rose, 1920; Anderson, 2001; MOBOT, 2012).

Un estudio realizado entre 2007-2010 (Caetano & Propitaya 2006) tuvo como finalidad principal seleccionar genotipos por sus características agronómicas sobresalientes (premejoramiento), que atiendan a las necesidades de los productores colombianos mediante las imposiciones del mercado, sobre todo el externo. Por lo tanto, se realizaron caracterizaciones en nivel morfológico, citogenético, físicoquímico y nutricionales, molecular y fitoquímico de muestras

colectadas en los departamentos de Bolívar, Boyacá, Cauca, Cesar, Cundinamarca, Huila, Risaralda, Santander y Valle del Cauca.

Para la caracterización morfológica se elaboró una lista de descriptores morfológicos para pitahaya amarilla y especies cercanas (Caetano & Sandoval, 2012). El análisis citogenético confirmó el número cromosómico de  $2n=4x=44$  para *S. megalanthus* y  $2n=2x=22$  para *Hylocereus* spp (Caetano, 2010).

Los datos morfológicos, físicoquímicos y nutricionales en conjunto con los moleculares mostraron una muy baja variabilidad genética en pitahaya amarilla, lo que tiene implicaciones en cuanto a la sanidad del cultivo y selección de material de siembra, ya que la especie es susceptible a diversas enfermedades, plagas y nemátodos. Los análisis fitoquímicos arrojaron la misma conclusión, al evidenciar la no existencia de quimiotipos en pitahaya amarilla en Colombia (Caetano, 2010).

Los resultados preliminares de pruebas de patogenicidad comprobaron, en condiciones *in vitro*, el ataque de *Fusarium oxysporum* (considerado el agente causal de la pudrición basal del fruto) también en el tallo. Nuevos bioensayos en laboratorio y en campo evidenciaron un complejo biótico determinando la pudrición basal del fruto, la principal enfermedad del cultivo (Parra *et al.*, en preparación). Se brindaron metodologías de manejo del cultivo, propagación de materiales y protocolos de laboratorio (Caetano, 2010; Suárez Román *et al.*, 2012).

Una vez identificados genotipos élite (con características morfoagronómicas deseables) por Caetano (2010) y con ánimo de escalar rápidamente un esquema de propagación de material de siembra, el presente trabajo plantea el desarrollo de un protocolo de propagación clonal y de regeneración *in vitro* vía organogénesis indirecta con miras a implementar un sistema de propagación a gran escala y un esquema de mejoramiento asistido vía transformación genética para futuros trabajos. Con el proceso de transformación genética se esperaría obtener genotipos tolerantes y/o resistentes a las principales limitantes bióticas de este cultivo.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para afrontar los nuevos retos del Tratado de Libre Comercio (TLC) y posicionar el país en el escenario económico como gran exportador, la producción y comercialización de productos agrícolas y recursos naturales exigen cada vez más certificaciones, aseguramiento de sanidad vegetal, resistencia a factores bióticos y abióticos, inocuidad y altos desempeños productivos, así como sistemas de gestión de las cadenas productivas que permitan sostener las demandas en el tiempo.

Por tanto, aprovechar el potencial de la biotecnología, la biodiversidad y los recursos genéticos, es la oportunidad para lograr una proyección a largo plazo generando impactos en especial para los pequeños productores, entendido esto como el incremento de sus posibilidades para acceder a una mejor calidad de vida, disfrutar del bienestar y expandir sus posibilidades de libertad en el proceso del desarrollo humano.

Entre los cultivos que ofrecen estas oportunidades, se encuentran los frutales en general y los denominados exóticos en particular, los cuales constituyen una alternativa para la inserción de las economías campesinas de los países andinos a los mercados nacionales e internacionales. A este grupo particular, pertenece la especie *Selenicereus megalanthus* (pitahaya amarilla). Su cultivo presenta una importante demanda principalmente por su sabor, apariencia, calidad y propiedades nutracéuticos (Wichienchot *et al.*, 2010).

Las diferentes especies de pitahaya tienen una amplia distribución geográfica, que indica su gran capacidad de adaptación a distintas condiciones ambientales, desde las regiones húmedas y cálidas, prácticamente desde el nivel del mar hasta las zonas altas y frías. En general, prosperan de 0 a 1850 msnm, con precipitaciones de 650 a 1500 mm anuales. Aunque se desarrollan mejor en los climas cálidos subhúmedos, también se adaptan a los climas secos; pero no soportan las bajas temperaturas. La pitahaya amarilla de Colombia se encuentra entre 1180 y 1932 msnm, a temperaturas de 18 a 24 °C con precipitaciones de 1300 a 2200 mm anuales (Caetano, 2010).

Sin embargo, sus incipientes plantaciones enfrentan varios problemas, entre otros la susceptibilidad a diversos estreses bióticos (plagas, nemátodos y patógenos que atacan en distintas etapas de la producción, cosecha y postcosecha) resultante de la baja variabilidad genética y la escasa proporción de frutos desarrollados respecto al total de flores producidas por algunos genotipos, lo que

puede estar asociado a la calidad y/u origen del material de siembra, a la falta de un paquete tecnológico, y la condición silvestre de la especie.

Enfermedades como la pudrición basal del fruto y la pudrición de tallo generan pérdidas de la fruta exportable superiores al 80 % en el Valle y Cundinamarca, sin embargo los agentes causales no han sido reportados oficialmente. El análisis de riesgos de plagas realizado por APHIS (Animal and Plant Health Inspection Service) en 2002 reportó para Colombia entre patógenos y plagas a 24 hongos, una bacteria, 52 artrópodos, tres moluscos y 17 nemátodos. Enfermedades como la pudrición basal del fruto y la pudrición de tallo generan pérdidas de fruta exportable superiores al 80 % e incrementan en 50 % los costos por manejo.

Entre las plagas se destaca la mosca del botón floral (*Dasiops* sp.), que conlleva a la pérdida completa de la producción, por no llegar al estadio de fruto. En algunos departamentos, como Cundinamarca y Valle del Cauca, cultivos completos han sido erradicados en los últimos años por problemas de fitosanidad (Caetano, 2010), lo que aumenta de gravedad cuando se considera la inversión de tiempo y los costos de implantación hasta la etapa de producción.

Tradicionalmente, se recomienda establecer cultivos comerciales a partir de métodos de propagación asexual, tal como estacas, lo cual conlleva a estos problemas fitosanitarios por contaminación con esporas de hongos y bacterias. En la propagación por semillas sexuales se ha observado lento desarrollo y disminución de la productividad (Suárez Román, 2011).

Finalmente, aunque no exista una amplia variabilidad genética que justifique el lanzamiento de variedades comerciales, es necesario crear un sistema que asegure la calidad sanitaria y en cantidad suficiente en tiempo y espacio para proveer a los productores y nuevos emprendedores del cultivo de pitahaya. Por lo tanto, es altamente factible el desarrollo de un protocolo de propagación clonal y de regeneración vía organogénesis indirecta con miras a implementar un sistema de difusión de material y un esquema de mejoramiento asistido vía transformación genética en un futuro.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La pitahaya, nombre que significa fruta escamosa, es el fruto de una planta xerofítica de la familia de las Cactáceas. En los mercados internacionales, actualmente se comercializan la pitahaya amarilla y la roja (Corporación Colombia Internacional CCI, 1998). Colombia se destaca como el país con mayor área sembrada, y uno de los grandes exportadores, junto con Israel.

Al 2006, según la Unión Temporal Propitaya, situación que persiste en su casi totalidad, el cultivo de pitahaya presentaba deficiencias para su mejor desarrollo puesto que no hay (1) genotipos elite para siembra, (2) prácticas de manejo establecidas, (3) un sistema de comercialización organizado y ágil capaz de colocar el volumen producido de fruta en el mercado nacional e internacional) y (4) subsidios y asistencia técnica, además de la existencia de (5) problemas a solucionar en la postcosecha y agregación de valor.

Así, el cultivo se constituye en una opción viable y altamente rentable para la diversificación agrícola en Colombia, desde que exista un plan de negocio y producción en cuanto a materiales de siembra, técnicas de manejo y operaciones de mercado muy bien establecidas.

Los efectos adversos (enfermedades y plagas) podrán ser contrarrestados a través de la obtención de genotipos capaces de responder al menos parcialmente a las limitantes fitosanitarias del cultivo, presentando en conjunto características morfoagronómicas deseables. Estos genotipos fueron seleccionados en una etapa previa (premejoramiento), por sus sobresalientes características morfológicas, físicoquímicas y nutricionales. Estos corresponden a genotipos que hacen parte de la colección de trabajo de germoplasma de pitahaya, ubicada en el Lote de Cultivos de la Nacional de Colombia sede Palmira, los cuales están siendo evaluados por sus condiciones fitosanitarias (datos de Gómez *et al.*, en preparación).

La regeneración por cultivo de tejidos vegetales, empleando diferentes técnicas como micropropagación a partir de tejidos de tallo y yemas permitirá la propagación masiva y homogénea de material con buenas condiciones fitosanitarias para ampliar las áreas de cultivo, y cumplir así con las disposiciones de la norma colombiana NTC-3554. Esta norma establece los requisitos que debe cumplir la pitahaya amarilla, destinada para el consumo en fresco o como materia prima para el procesamiento. Contiene definiciones, clasificación y calibre, empaque y rotulado (ICONTEC, 1996).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

- Establecer un sistema de regeneración *in vitro* vía organogénesis indirecta en pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*).

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar el efecto de tipo y la concentración de reguladores de crecimiento que favorecen la organogénesis en pitahaya.
- Definir el tipo de explante óptimo para la organogénesis en pitahaya.
- Establecer un sistema de propagación clonal de materiales de pitahaya conservados en la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DE *SELENICEREUS MEGALANTHUS*

Según Caetano & Sandoval (2012) la pitahaya amarilla presenta cladodios conformados por tres costillas que forman un triángulo en corte transversal (Figura 1a), aunque en algunas accesiones se observa que la base de los cladodios tiene entre cuatro a siete costillas y termina con tres. El margen de los cladodios varía desde cóncavo, levemente cóncavo a liso (Figura 1b).

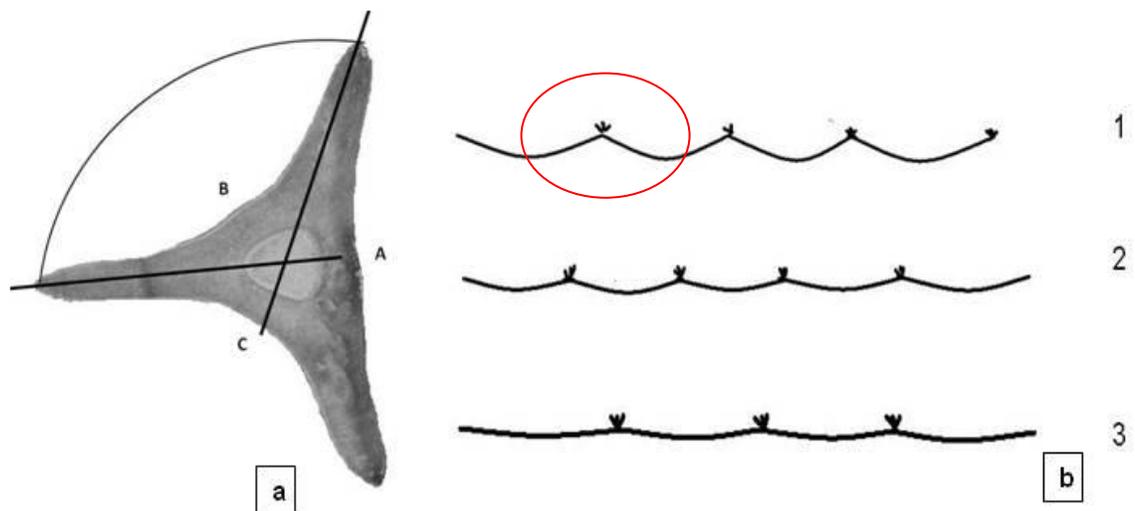
El número de aristas varía dependiendo de la planta (13 - 47), entre más aristas más largo es el cladodio. Es frecuente ver que los cultivadores de pitahaya corten el ápice de los cladodios para que se produzcan flores y evitar que la planta crezca; esto fisiológicamente lo que induce es una redistribución de reguladores de crecimiento (Ácido giberélico, AG) y fotosintatos para favorecer la floración. Cada arista presenta entre dos a tres acúleos grandes, de 3 - 5mm aproximadamente, sobre las areolas y dos muy delgados que en muchas ocasiones se pierden debido a su fragilidad. La distancia entre las aristas varía (3,78 - 6,70 cm) así como la altura de las concavidades entre areolas (0,24 - 0,41cm) (Caetano & Sandoval, 2012). De las areolas, pequeñas almohadillas homólogas de las yemas, con dos puntos de desarrollo meristemático, se originan espinas, brotes y flores (Hofflann, 1989).

La flor es de gran tamaño (25 cm de largo aproximadamente), hermafrodita, completa, simétrica, de ovario ínfero, con numerosos estambres y pétalos de color blanco. Presenta brácteas y acúleos en la parte basal. La planta produce muchas flores que nacen en cada arista. Cada flor se abre al inicio de la noche y tiene corta duración, cerrándose al amanecer (Caetano & Sandoval, 2012).

Los frutos maduran entre dos a cuatro meses, siendo éste el tiempo ideal para la cosecha. Son de tipo baya, de color amarillo intenso, con pulpa blanca, succulentos y dulces, de forma ovalada a alargada, desde 6 - 12cm de longitud. Presentan entre 30 - 50 brácteas, cada una con 9 - 20 acúleos, su tamaño varía desde 0,8 - 1,12cm. El peso del fruto varía desde 50 - 400 g aunque algunos pueden ser más grandes. Tiene numerosas semillas muy pequeñas (0.32 - 0.47cm x 0.22 - 0,29 cm) de color oscuro, brillantes, oblongas y lisas. Su número varía de 41 - 800 semillas. Todas las características anteriormente nombradas varían en pequeña escala dependiendo de la población estudiada y del manejo agronómico (Caetano & Sandoval, 2012).

Su principal forma de propagación es vegetativa, a partir de los tallos o esquejes: de manera natural a través de la separación de los tallos y, en el caso de plantas cultivadas, mediante trasplante directo en el terreno definitivo o su colocación en bolsas con sustrato hasta la formación de nuevas plantas. Para atender esta necesidad, se han desarrollado numerosos sistemas de siembra tutorados como espaldera (normal o en T), emparrado y tutores vivos (Caetano, 2010).

**Figura 1. Corte transversal del filocladodio y margen de las aristas de los cladodios de pitahaya amarilla.**



a. Corte transversal del filocladodio de pitahaya amarilla. b. Margen de las aristas de los cladodios de pitahaya 1. Cóncavo, 2. Levemente cóncavo, y 3. Liso. En la pitahaya roja las aristas son convexas (Fuente Caetano & Sandoval, 2012). En 1 (círculo rojo) se representa una aréola, explante utilizado en el presente trabajo.

Las pitahayas también se reproducen por medio de semillas, que de modo natural son diseminadas por aves y otros animales que se alimentan de los frutos. No obstante, para fines de cultivo la propagación sexual no es recomendable, pues las plantas requieren demasiados cuidados en tanto se trasplantan y tardan de cuatro a seis años en llegar a su etapa reproductiva (Suárez Román, 2011).

## 5.2 HÁBITOS DE CRECIMIENTO Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA PITAHAYA

Las pitahayas son plantas perennes que requieren de soporte, pues su arquitectura les impide sostenerse a sí mismas. Así, tienen varios hábitos de crecimiento y pueden ser trepadoras, rupícolas, hemiepífitas y epífitas. Las plantas cultivadas, empero, son terrestres trepadoras, independientemente de que parte de sus raíces adventicias aéreas se dirijan al suelo.

Su principal forma de propagación es vegetativa, a partir de los tallos o esquejes: de manera natural a través de la separación de los tallos y, en el caso de plantas cultivadas, mediante trasplante directo en el terreno definitivo o su colocación en bolsas con sustrato hasta la formación de nuevas plantas. Para atender esta necesidad, se han desarrollado numerosos sistemas de siembra tutorados como espaldera (normal o en T), emparrado y tutores vivos como *Erythrina* sp., *Glyricidia*, *Leucaena*, *Trichantera*, entre otras especies (Cáliz de Dios y Castillo, 2004).

Las pitahayas también se reproducen por medio de semillas, que de modo natural son diseminadas por aves y otros animales que se alimentan de los frutos. No obstante, para fines de cultivo la propagación sexual no es recomendable, pues las plantas requieren demasiados cuidados en tanto se trasplantan y tardan de cuatro a seis años en llegar a su etapa reproductiva (Suárez Román, 2011).

La amplia distribución geográfica que tienen las diferentes especies de pitahaya indica su gran capacidad de adaptación a distintas condiciones ambientales, desde las regiones húmedas y cálidas, prácticamente desde el nivel del mar hasta las zonas altas y frías. En general, prosperan de 0 a 1850msnm, con temperaturas entre los 18 y 27°C y precipitaciones de 650 a 1500mm anuales.

Aunque se desarrollan mejor en los climas cálidos sub-húmedos, también se adaptan a los climas secos; no soportan, empero, las bajas temperaturas. La pitahaya amarilla de Colombia es disímil, pues se encuentra entre 1000 y 1850msnm, temperaturas de 18 a 25°C y precipitaciones de 1300 a 2200mm anuales (Caetano, 2010).

## 5.3 PROPAGACIÓN EN PLANTAS

La propagación de las plantas es una ocupación básica de la humanidad. La civilización está en gran parte cimentada sobre la habilidad del hombre para propagar y cultivar clases específicas de plantas que puedan ser usadas como

alimento y proporcionar protección, vestido, recreo y satisfacciones estéticas (Hartman y Kester, 1972).

La mayoría de plantas cultivadas son formas mejoradas que deben la continuidad de su existencia al hecho que han sido propagadas en condiciones cuidadosamente controladas. La mayoría de ellas desaparecerían o regresarían a formas menos deseables si se las dejara reproducir naturalmente sin ningún control. Sin los esfuerzos de los propagadores comerciales tales como el viverista, y el productor de bulbos o el productor de semillas, los esfuerzos de los fitotécnicos o mejoradores de las plantas para producir formas mejoradas, se verían reducidos a la producción de unos cuantos individuos y no se dispondría de plantas tales como las que se tienen en la actualidad (Hartman y Kester, 1972).

Las plantas pueden propagarse de dos maneras: por vía sexual o directa, o por vía asexual o indirecta. Se entiende por multiplicación directa aquella que se hace utilizando la semilla (frijol, maíz, arroz). En cambio, se denomina multiplicación asexual o indirecta cuando se hace utilizando partes de la planta, provistas de yemas y capaces de desarrollar raíces para dar lugar a una nueva planta (como ejemplo la yuca, caña, plátano), o cuando al insertar dichas yemas a otra planta que tenga afinidad con aquella de que provienen, sea capaces de soldarse a sus tejidos y continuar su desarrollo normal, tal como se presenta en los injertos (Llano Gómez, 1952).

La multiplicación directa puede ser natural, es decir, sin que el hombre intervenga y en ese caso se llama diseminación (bosques, praderas). La semilla puede ser transportada por el viento, por las aguas, por las aves y otros animales, y por las corrientes de los océanos. Cuando la multiplicación es artificial porque interviene el hombre, se le llama siembra (cultivos) y son estos los que merecen el mayor interés (Llano Gomes, 1952).

La propagación de plantas puede lograrse de diversas técnicas. Hartman y Kester (1972) describen algunas:

#### I Sexual

- A. Propagación por semillas

#### II Asexual (vegetativa)

- A. Propagación por embriones apomícticos
- B. Propagación por estolones
- C. Propagación por hijuelos (retoños)
- D. Acodo
- E. Separación
- F. División
- G. Propagación por estacas
- H. Injerto
- I. Injerto de yema

## 5.4 REQUERIMIENTOS DEL CULTIVO Y SISTEMAS DE PROPAGACIÓN VEGETATIVA DE PITAHAYA AMARILLA

Los suelos para el cultivo de pitahaya deben tener excelente drenaje, pues la planta no tolera los terrenos inundables. De igual manera debe ser rico en materia orgánica pues sus raíces son superficiales. No obstante, requiere de programas de nutrición acordes a su desarrollo fenológico y a sus requerimientos productivos. Para la producción comercial es preciso disponer de sistemas de riego para proveerle de humedad en épocas críticas del año. La producción se inicia a uno o dos años, si la forma de propagación es a través de estacas, con una vida productiva de más de diez años (Caetano, 2010).

En trabajos de inducción de deficiencias nutrimentales se encontró en orden de importancia que N, P, K y Ca, son los que más limitan el desarrollo de las plantas, precisamente los que aparecen en mayor medida como componentes de los tallos y frutos de la pitahaya (Suárez Román, 2011).

Las respuestas fisiológicas a condiciones de déficit hídrico e intensidades lumínicas variables son descritas por Raveh *et al.* (1998), quienes evaluaron la respuesta al sombrero en *S. megalanthus* e *H. polyrhizus* introducidas a Israel. Así mismo, Nobel *et al.* (2002) y Nerd *et al.* (2002) determinaron el papel de la temperatura en el establecimiento de pitahaya en las condiciones de California y de Israel respectivamente.

Las tasas fotosintéticas que corresponden a las del metabolismo ácido de las Crasuláceas, la relación con el contenido de nitrógeno y el movimiento de agua en condiciones de sequía han sido estudiadas en varias especies de *Hylocereus* (Ortiz *et al.*, 1999; Nobel y Barrera, 2002, 2004; Nerd y Neumann, 2004; Graham y Nobel, 2005; Nobel, 2006).

Pimienta *et al.* (2004) examinaron la variación estacional en carbohidratos almacenados y su relación con el desarrollo vegetativo, reproductivo y con las condiciones climáticas, concluyendo que el almacenamiento de carbohidratos en el tallo es esencial para el desarrollo y productividad en ambientes semiáridos.

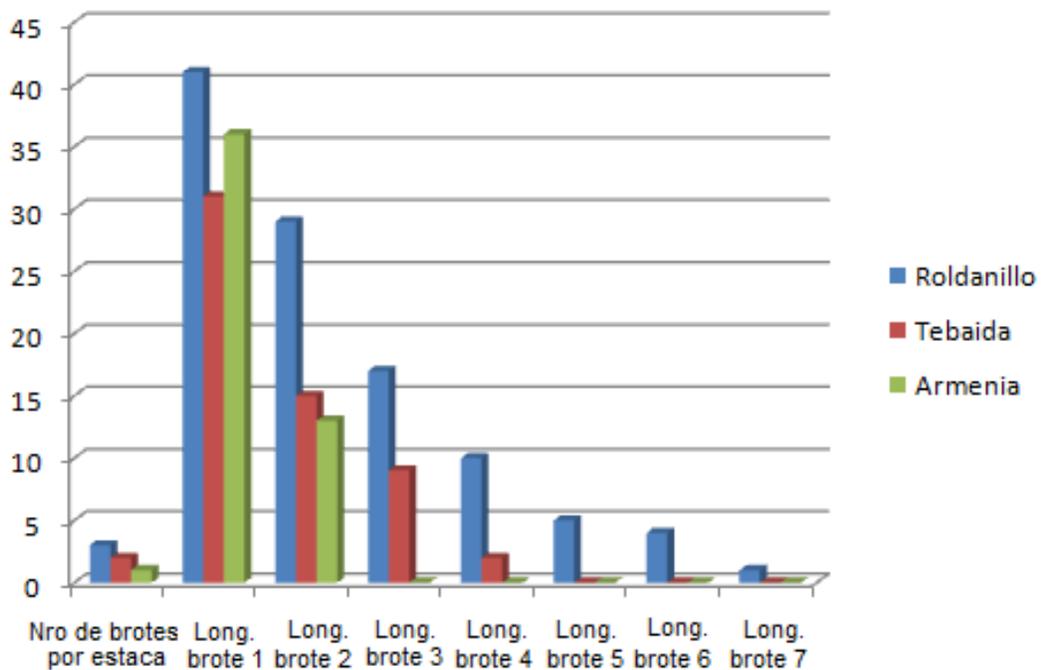
### 5.4.1 Propagación por estacas

Para validar los conocimientos de los agricultores, Suárez Román (2011) evaluó en condiciones de campo la propagación por estacas de pitahaya amarilla en dos fincas ubicadas en el departamento de Quindío, municipio de La Tebaida (finca en vereda La Popa a 1200 m de altitud), y el departamento del Valle del Cauca, municipio de Roldanillo (finca en vereda La Armenia a 1650 m de altitud), con base en los siguientes tratamientos: longitud de la estaca (50 y 100 cm), haces vasculares expuestos y sin exponer a nivel basal, y presencia/ausencia del ápice.

En condiciones de invernadero, se evaluó el comportamiento de estacas plantadas en bolsas de almácigo, en el municipio de Armenia, Quindío, a 1450 m de altitud.

Como variables de respuesta, se consideraron el número de brotes y la longitud promedio de los mismos, concluyendo que pueden presentarse hasta siete brotes por estaca, reportándose el mayor porcentaje de brotes en el municipio de Roldanillo. En condiciones de invernadero, se produjo un brote en promedio con una longitud de 36 cm, pero con un diámetro de tan sólo 4-5 cm (Figura 2). No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

**Figura 2. Comportamiento general de rebrote de estacas de pitahaya amarilla en dos diferentes condiciones de campo (Roldanillo y La Tebaida) e invernadero (Armenia), respectivamente a 1650, 1200 y 1450msnm (Suárez Román, 2011).**



### 5.4.2 Propagación por semilla sexual

Suárez Román (2011) realizó ensayos para evaluar la germinación de semillas de pitahaya amarilla y roja recién extraídas del fruto, y de la amarilla con seis meses de almacenamiento.

El porcentaje de germinación en las semillas de pitahaya amarilla fue cercano al 100% y no se presentó latencia. Después de seis meses de almacenamiento de las semillas a temperatura ambiente, estas presentaron una viabilidad mayor al 90%. Estos resultados abren perspectivas para nuevos estudios en semillas de pitahaya amarilla, determinando su categoría en cuanto a conservación de su comportamiento germinativo. En la pitahaya roja, Martínez-Cárdenas (2003) y Andrade *et al.* (2005) evaluaron tiempos y temperaturas de almacenamiento sobre el porcentaje de germinación de semillas, reportando viabilidad entre uno y tres meses.

Se logró comprobar que las semillas que flotan en la superficie de un recipiente con agua luego de la extracción del mucílago no tienen capacidad germinativa, tampoco aquellas semillas con coloración rojiza y estructura aplanada. Se reportó una frecuencia aproximada de 3:1 plántulas con dos y tres hojas cotiledonares respectivamente (Suárez Román, 2011).

## 5.5 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Roca y Mroginski (1991) describen que la técnica de cultivo de tejidos consiste en aislar una porción de planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación.

Los objetivos que se persiguen con la utilización del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son numerosos y diferentes. Mroginski y Roca (1993) y Pérez *et al.* (1998) proponen los siguientes:

- a) Estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines
- b) Bioconversión y producción de compuestos útiles
- c) Incremento de la variabilidad genética
- d) Obtención de plantas libres de patógenos
- e) Propagación de plantas

#### f) Conservación e intercambio de germoplasma

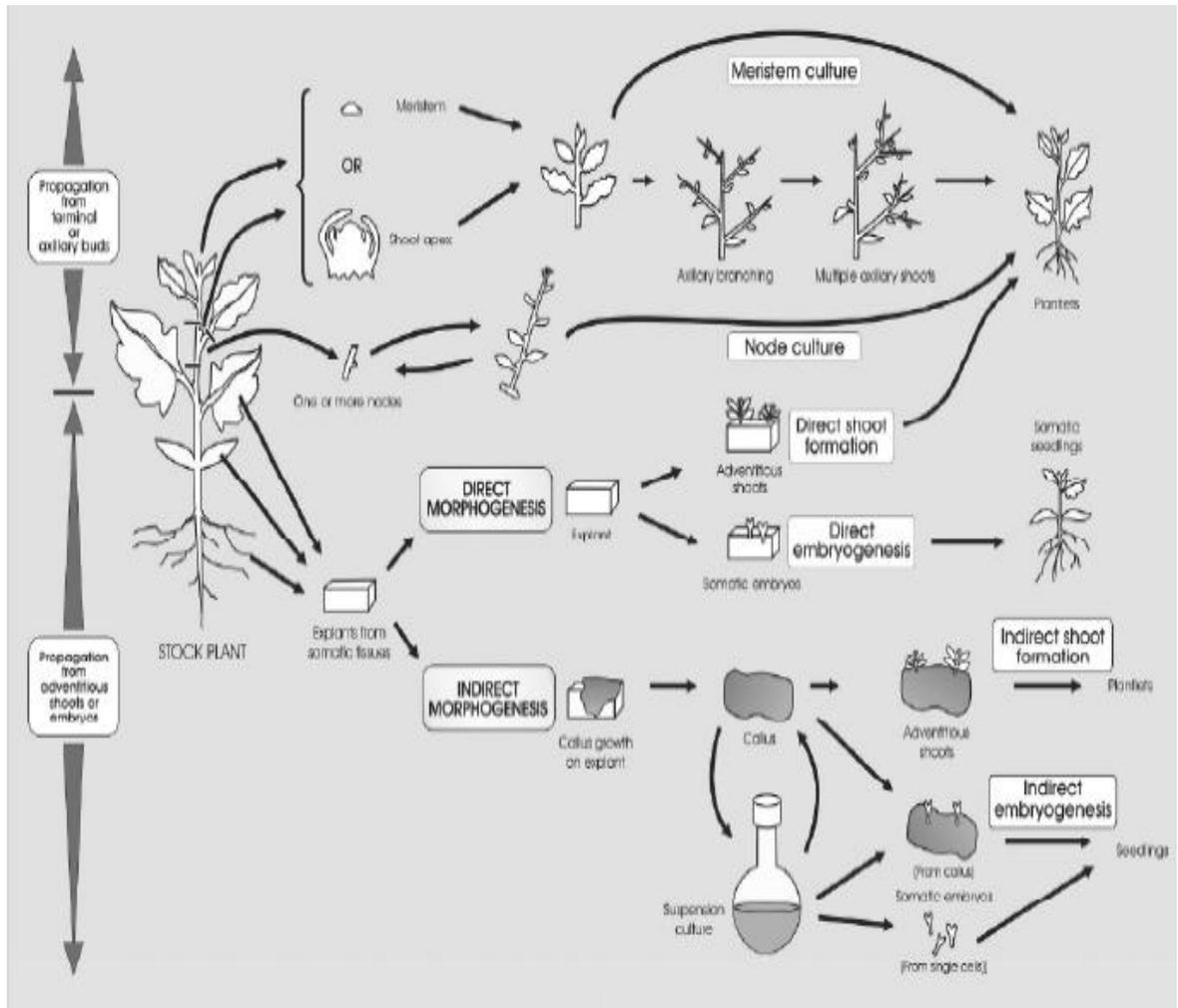
Roca y Mroginski (1991) definen la micropropagación como un procedimiento aséptico que comprenda la manipulación, en las plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente. La propagación clonal implica que cada una de las plántulas que se produzca pueda crecer y ser fenotípica y genotípicamente idéntica a la planta original de la que se deriva.

Según George *et al.* (2008) son cuatro las etapas para la producción de cultivo de tejidos: etapa I – establecimiento de un cultivo aséptico; etapa II – producción de propágulos adecuada; etapa III – preparación para el crecimiento en el medio natural medio ambiente, y etapa IV – transferencia al medio ambiente natural.

Entre los métodos de cultivo de tejidos George *et al.* (2008) señalan algunos tipos de explantes como: de brotes, brotes de flores, meristemos, múltiples brotes, de semillas, cultivo de meristemos, cultivo de nudos. Los mismos autores también atribuyen las vías de regeneración directa e indirecta a través de vías morfogénicas: organogénesis y de la embriogénesis somática (Figura 3).

Según Roca y Mroginski (1991) organogénesis directa es la formación del brote adventicio o raíz a partir del explante de un órgano, o de alguna parte escindida de la planta. Organogénesis indirecta es la formación del brote adventicio o de la raíz en un callo (siendo obvio que el callo se deriva previamente de un órgano, tejido o parte escindida de la planta). En la embriogénesis somática, los embriones pueden formarse directamente en el explante primario o indirectamente a partir de un callo de las células cultivadas en suspensión o en un medio semisólido.

**Figura 3. Tipos de explantes, métodos de propagación y rutas de regeneración.**



Fuente: George *et al.* 2008.

### 5.5.1 Reguladores de crecimiento

Un promotor de crecimiento es un compuesto orgánico que se sintetiza en alguna parte de una planta y que se transloca a otra parte, en donde en concentraciones muy bajas causan una respuesta fisiológica (George *et al.*, 2008).

Se reconocen varios grupos de reguladores de crecimiento entre los cuales se pueden citar las auxinas, giberelinas, citocininas, el ácido abscísico y el etileno, entre otros.

El término auxina (del griego *auxein*, incrementar) fue utilizado por primera vez por Fritz Went, en 1926 (Salisbury & Ross, 1994). Uno de los más importantes papeles de ese regulador en plantas superiores es la regulación del crecimiento y elongación de los tallos jóvenes y coleoptilos (Taiz & Zeiger, 2002). La forma natural más común de la auxina es el ácido indol-3-acético (IAA). Otras formas de amplio uso en el cultivo de tejidos son el ácido indol-3-butírico (IBA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; un herbicida con efecto de auxina), el ácido 2,4,5-diclorofenoxiacético (2,4,5-T) y el ácido 1-naftalenoacético (NAA) (Salisbury y Ross, 1994).

Las giberelinas fueron descubiertas en Japón en la década de 1930 por T. Yabuta & Hayashi, quienes aislaron un compuesto activo de un hongo (*Gibberella fujikuroi*), al cual denominaron 'giberelina' (Salisbury y Ross, 1994; Ramírez *et al.*, 2012). Giberelinas corresponden a una familia de compuestos definidos por su estructura, que en la actualidad suman más de 125, siendo el más común el ácido giberélico. Inducen la elongación de los entrenudos en ciertos tipos de plantas. Otros efectos fisiológicos incluyen cambios en la juvenilidad por rompimiento de letargo y la inducción de la floración, la promoción de la fructificación, crecimiento del fruto y la germinación de semillas (Taiz y Zeiger, 2002).

En 1913, Gottlieb Haberlandt en Austria, descubrió que un compuesto presente en los tejidos vasculares de diversas plantas estimulaba la división celular que causa la formación del cambium del corcho y la cicatrización de heridas en tubérculos cortados de papa. Ese descubrimiento fue la demostración de que las plantas contienen sustancias en la actualidad conocidas como citocininas (Salisbury y Ross, 1992).

Las citocininas son reguladores de crecimiento vegetal que inducen la división y la diferenciación celular (Ramírez *et al.*, 2012) y participan en la regulación de muchos otros procesos de la planta, incluyendo la morfogénesis de brotes y raíces, la maduración del cloroplasto, elongación celular y senescencia (Taiz y Zeiger, 2002). La zeatina es la citocinina natural más conocida, de la cual se derivan muchas otras citocininas activas como la ribofuranosilzeatina, la glucopiranosida de zeatina, entre otras. Entre las sintéticas se destacan la 6-benciladenina (BA) furfurilaminopurina o Kinetina (Kn) y Thidiazuron (TDZ) (Salisbury y Ross, 1994).

El ácido abscísico (ABA) fue descubierto entre 1961-1965 por dos grupos de investigación; uno de la Universidad de Davis y el otro del Colegio de Walles en Aberystwyth, quienes encontraron un regulador de crecimiento involucrado en la abscisión de las hojas y la dormancia en los brotes. El ABA es un regulador de crecimiento vegetal que favorece el reposo de las yemas y lo mantiene en las semillas, interviene en el gravitropismo de las raíces y provoca el cierre de los estomas, entre otros efectos (Ramírez *et al.* 2012).

En 1910, en un informe anual del Jamaican Agricultural Department, H. H. Cousins mencionó que no se debía almacenar naranjas junto a plátanos en los barcos, porque cierta emanación de las primeras hacía que los plátanos maduraran prematuramente. Al parecer este informe fue a primera sugerencia de que los frutos liberan un gas que estimula la maduración (Salisbury y Ross, 1992). El etileno es una hormona gaseosa liberada por tejidos maduros de la mayoría de los órganos de las plantas superiores. Regula la maduración del fruto y otros procesos asociados con la senescencia y caída de hojas, flores y frutos, el desarrollo de los pelos absorbentes de la raíz, el crecimiento de las plántulas, entre otras (Taiz y Zeiger, 2002).

### 5.5.2 Cultivo de tejidos en Cactaceae

En los años 50 se iniciaron los estudios sobre el cultivo *in vitro* de cactus, enfocados a la formación de callo, a la proliferación de brotes, y a la evaluación de los efectos de auxinas, citocininas y giberelinas a partir de yemas axilares (Ordoñez, 2003; Villalobos *et al.*, 1993; Estrada-Luna *et al.*, 2008). Así se desarrollaron sistemas de micropropagación para diferentes especies de cactus, con una eficiencia en el establecimiento y en el enraizamiento del 80 al 100 % (Ordoñez, 2003).

Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) desarrollaron sistemas de micropropagación de 21 especies cactáceas de los géneros *Astrophytum*, *Cephaloreceus*, *Coryphanta*, *Echinocactus*, *Echiaocereus*, *Echinofossulocactus*, *Ferocactus*, *Mammillaria*, *Nyctocereus* y *Stenocactus* utilizando explantes de plántulas germinadas *in vitro* o de los segmentos de brotes provenientes de plantas desarrolladas en invernadero. La formación de múltiples brotes a partir de aréolas se logró en medio MS suplementado con BA, o con BA más NAA. Los requisitos de los reguladores de crecimiento para lograr la proliferación de brotes, mejorar la velocidad de la respuesta, y el número de brotes producidos por explantes presentan diferentes niveles entre los géneros y las especies estudiadas. El enraizamiento de los brotes generados *in vitro* se logró en medio MS suplementado con IAA o IBA. El 70-95 % de las plantas con raíces que fueron transferidas a macetas mostraron supervivencia a condiciones *ex vitro*.

Según Malda *et al.* (1999), quienes estudiaron dos cactus en peligro de extinción, *Obregonia denegrii* y *Coryphantha minima*, estos presentaron limitaciones en la capacidad reproductiva y las tasas de crecimiento muy lentas, dificultad que pudo superarse con el uso de cultivo *in vitro*. La producción masiva *in vitro* de propágulos nuevos dieron lugar a plantas regeneradas, y el crecimiento del cactus fue acelerado.

Giusti *et al.* (2002) ensayaron 25 medios de cultivo MS para la propagación de tres especies también vulnerables, *Escobaria minima*, *Mammillaria pectinifera* y *Pelecyphora aselliformis*, utilizando diferentes combinaciones de NAA, BA y TDZ. El TDZ indujo buena tasa de proliferación, aunque asociada con formación de callo abundante e hiperhidricidad de las yemas axilares. Se observó alta tasa de multiplicación combinada con buena proliferación y calidad de brotes, y poco o nada de inducción de callo en los medios con BA para *E. minima* y *M. pectinifera* y en el medio con Kn para *P. aselliformis*.

Un procedimiento para la micropropagación de pitahaya roja con TDZ y NAA en medio MS fue desarrollado por Uasseen Mohamed-Yasseen (2002). Los explantes fueron aislados de las ramificaciones jóvenes de plantas maduras. Los brotes producidos fueron cortados para originar a explantes secundarios, ya sea por decapitación o por división longitudinal en tres partes. Los explantes decapitados produjeron más brotes con mayor frecuencia que los longitudinales. Para ambos tipos de explantes secundarios, la mayoría de los brotes se desarrolló a partir de las partes distales. Los brotes produjeron sus raíces en MS y luego se trasladaron a suelo, generando plantas normales.

El desarrollo de sistemas eficientes de propagación *in vitro* de *Pelecyphora aselliformis* y *P. strobiliformis*, otros dos cactus mexicanos en peligro de extinción fue descrito por Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa (2002). La formación de múltiples brotes desde aréolas de plántulas germinadas *in vitro* se logró en dos tipos de explantes (apical y transversal) cultivados en un medio MS basal suplementado con sacarosa, agar y varios tratamientos con citocininas. La proliferación después de uno (60 días) y tres (180 días) ciclos de cultivo en *P. aselliformis* mostró 13,7 brotes por explante apical después del primer ciclo en medio con BA y sacarosa. En *P. strobiliformis* la mayor tasa de proliferación fue 12,4 brotes a partir de areolas obtenidas de explante transversal. Después del tercer ciclo de proliferación se obtuvo 128,1 y 136,3 brotes en *P. aselliformis* y *P. strobiliformis*, respectivamente. Los brotes se elongaron en medio basal MS suplementado con carbón activado y se enraizaron en el medio MS basal suplementado con IAA o IBA. En promedio el enraizamiento fue del 89% en *P. aselliformis* y el 87 % en *P. strobiliformis*. La frecuencia de supervivencia fue en promedio del 88 %, una vez que las plantas fueron transferidas al suelo.

Un sistema de propagación *in vitro* mediante la activación de la aréola se desarrolló para *Turbinicarpus laui*, *T. lophophoroides*, *T. pseudopectinatus*, *T. schmidickeanus* subsp. *flaviflorus*, *T. schmidickeanus* subsp. *klinkerianus*, *T. schmidickeanus* subsp. *schmidickeanus*, *T. subterraneus* y *T. valdezianus*, usando plántulas originadas de semillas germinadas *in vitro* como fuente primaria de explantes apicales, laterales y transversos, cultivados en medio MS suplementado con 3 % de sacarosa, 10 g/L de agar y varios tratamientos con citocininas. Se logró 7,8 brotes por explante en *T. valdezianus* hasta 19,7 en *T.*

*pseudopectinatus*. Cuatro de las especies estudiadas respondieron mejor al BAP, y dos al 2-iP. Los mejores resultados se obtuvieron con cortes transversos de cinco especies, y con apicales en una. El enraizamiento de los brotes generados *in vitro* varió de 54,2 a 94,2 %. La supervivencia de las plantas una vez transferidas a suelo fue 91,6% en promedio (Davilla-Figueroa *et al.*, 2005).

En el protocolo establecido por Medeiros *et al.* (2006) para el cultivo *in vitro* y regeneración de plantas de *Notocactus magnificus*, la mejor esterilización de la superficie de los explantes se logró con la inmersión durante 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio, ya sea para semillas (0,25 % v/v) o segmentos de las costillas (1 % v/v). La formación de callos se observó cuando los explantes se cultivaron en MS (1962) suplementado con sacarosa al 2 % (v/v), 2,4D, BAP, tiamina - HCl y m-inositol. La regeneración se dio en MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP o NAA o Kn con IAA. El mayor número de brotes se produjo en MS (1962) suplementado con BAP, sacarosa 3 % (v/v) y agar 0,6 % (v/v). El enraizamiento de los brotes se observó después de ocho meses en cultivo en MS (1962). Estos brotes se convirtieron en plantas normales bajo condiciones de invernadero.

## 5.6 REGENERACIÓN EN CACTACEAE

Bhau (1999) obtuvo regeneración en *Coryphantha elephantidens* (Lem.) a partir de explantes de raíces, siendo inducidos a callo, obtenidos a partir de 10 mm de largo. Cuando se cultivó en un medio suplementado con 9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, 4,6  $\mu\text{M}$  de Kn y 7% de sacarosa, esta combinación indujo máxima diferenciación de brotes. Los regenerantes lograron un crecimiento de sus raíces en el medio MS (1962) basal sin regulador; posteriormente se aclimató en un invernadero.

Llamoca-Zárate *et al.* (1999) reportó cultivos de callo a partir de cotiledones y hipocótilos de *Opuntia ficus-indica*. Los explantes de cotiledones produjeron significativamente más callos que los de hipocótilos. El crecimiento óptimo de callos se observó en el medio MS suplementado con 0,9  $\mu\text{M}$  de Kn, 2,3  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, 1,0  $\mu\text{M}$  de Piroclam, 400  $\text{mg/L}^{-1}$  de hidrolizado de caseína y 3% de sacarosa. El mismo medio sin agar se utilizó para el establecimiento de suspensiones celulares.

Según Rubluo *et al.* (2002), en *Mammillaria san-angelensis*, una cactácea amenazada, la auxina fue el único fitoregulador que pudo inducir la potencialidad morfogenética. La mejor regeneración se observó en la presencia de IAA a concentración de 34,25  $\mu\text{M}$ . El análisis histológico reveló dos procesos que conducen a la regeneración: la producción 'de novo' de los brotes y la activación de los meristemos axilares. De las dos vías propuestas por estos

autores, la producción 'de novo' de brotes se observó tanto en los controles como en los explantes de crecimiento en presencia de IAA, mientras que la activación de meristemas axilares sólo en medio suplementado con IAA.

En un estudio con pitahaya amarilla (*S. megalanthus*), Pelah *et al.* (2002) utilizó segmentos de la parte distal y proximal de los cotiledones, hipocótilos y epicótilos cultivados en medio MS (1962) basal suplementado con TDZ. La parte proximal de los cotiledones se mostró como el tejido más sensible. La regeneración máxima de los brotes se logró en la presencia de 200 $\mu$ M de TDZ. Sin embargo, el TDZ no modificó el patrón de competencia de regeneración, que siguió restringido a la parte proximal de los cotiledones. El mejor medio para la elongación de los brotes fue el MS sin reguladores de crecimiento. El enraizamiento fue inducido en el medio MS suplementado con 5,3  $\mu$ M de NAA. Las plántulas enraizadas fueron transferidas a suelo y aclimatadas con éxito en invernadero.

Moedbius-Goldammer *et al.* (2003) indujeron la formación de brotes por organogénesis y embriogénesis somática a partir de tubérculos de plantas de *Ariocarpus kotschoubeyanus* originadas de semillas germinadas *in vitro*. La formación de brotes se obtuvo cuando los explantes fueron cultivados en medio MS suplementado con BAP y NAA. Para la inducción de brotes se utilizó MS (1962) con adición de carbón activado. El establecimiento de las plantas en el suelo se dio sin problemas.

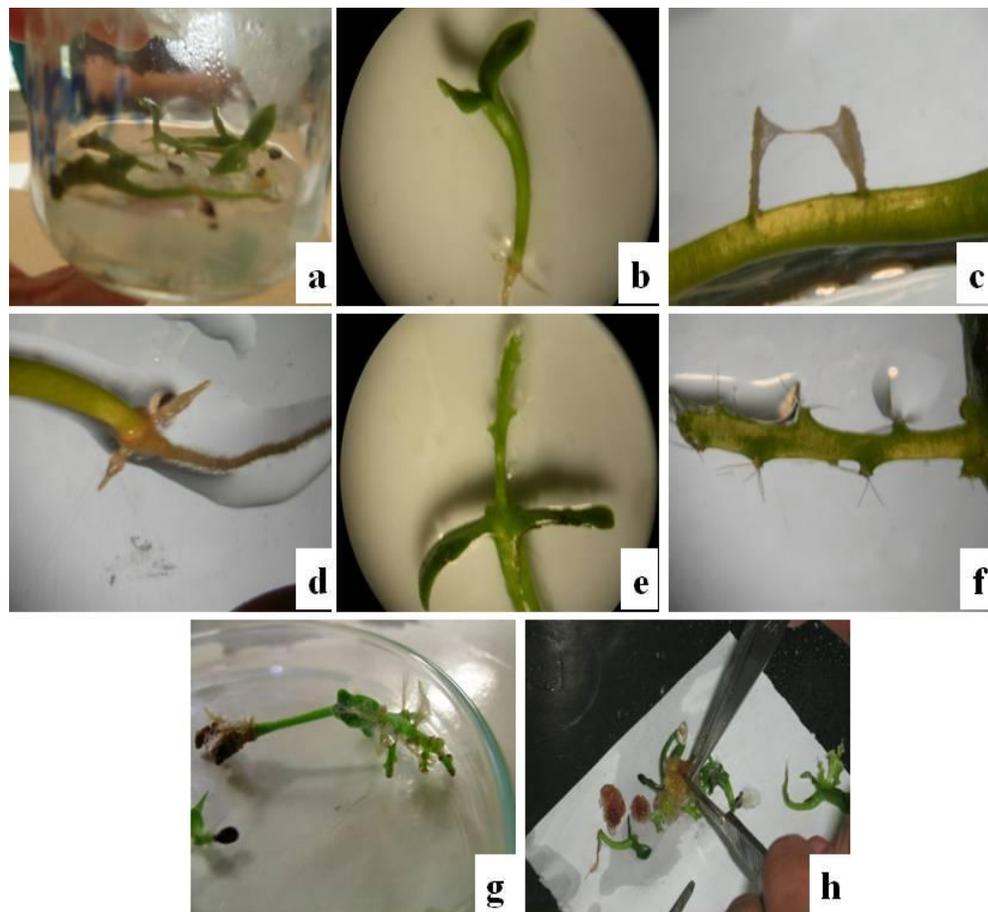
Un método para la regeneración de *Opuntia ficus-indica* fue presentado por Gomes *et al.* (2006). A través de la embriogénesis somática (ES) se indujo mediante el cultivo de brotes de ápices en medio basal MS (1962) semisólido, suplementado con Picloram a 4 mg L<sup>-1</sup>. La embriogénesis somática fue influenciada por el tipo, edad, etapa de desarrollo y fisiológica de los explantes, y también por las condiciones de luz, tipos de cortes, y la concentración de sacarosa en el medio de inducción. Un análisis histológico reveló la presencia de un sistema cerrado vascular en los embriones en desarrollo y la ausencia de una conexión vascular entre los embriones somáticos y el explante.

Angulo-Bejarano y Paredes-López (2011) obtuvieron un protocolo de regeneración por organogénesis indirecta de *Opuntia ficus-indica* var. "Blanco sin Espinas", utilizando cladodios en medio MS (1962) basal suplementado con 20 diferentes combinaciones de 2,4-D y BA. La mejor respuesta de inducción a callo y regeneración se observó cuando 2.26 $\mu$ M de 2,4-D y 2.21 $\mu$ M de BA combinadas fue aplicada en los explantes. Callos regenerantes fueron capaces de formar brotes cuando se transfirieron a un medio MS basal suplementado con 0.5 $\mu$ M BA (medio de proliferación). La elongación de brotes y enraizamiento se logró en medio MS sin reguladores de crecimiento. La aclimatación fue excelente para todas las plántulas transferidas a invernadero. No se observaron diferencias morfológicas entre las plantas madres y las regeneradas.

## 5.7 SISTEMA DE PROPAGACIÓN POR CULTIVO *IN VITRO* DE LA PITAHAYA AMARILLA

Suárez Román (2011) evaluó la germinación de semilla sexual y por explantes en condiciones *in vitro* empleando medio MS con y sin suplemento de regulador de crecimiento. Las plántulas *in vitro* obtenidas a partir de semillas presentaron emisión de radícula en un lapso de cinco a ocho días, seguido de emergencia de plúmula y hojas cotiledonares. Con un mes de edad, las plántulas presentaron desarrollo de raíces adventicias, desarrollo del cladodio y proyecciones epidérmicas tipo acúleos o agujones también se evidenció la formación de callo (Figura 4).

**Figura 4. Desarrollo de plántulas de pitahaya en cultivo *in vitro* a partir de semillas.**



a y b. Emisión de radícula, emergencia de plúmula y hojas cotiledonares. c y d. Desarrollo de raíces adventicias. e. Desarrollo del cladodio. f. Proyecciones epidérmicas tipo agujones. g y h. y formación de callo y las características del mismo a partir de explantes de pitahaya (Fuente: Suárez Román 2011).

Este autor evaluó cinco medios reportados por la literatura para establecimiento y tres para micropropagación. Como explantes se emplearon hojas cotiledonares y fragmentos del filocladodio apical, basal e intermedio. Se obtuvo la composición del medio de cultivo óptimo para la micropropagación a partir de hojas cotiledonares y fragmentos de filocladodio. Los explantes forman raíces *in vitro* y hasta siete brotes por explante. Las plántulas germinadas *in vitro* registran un crecimiento muy lento. Sin embargo, esta metodología es útil para la conservación de germoplasma y otros estudios.

El proceso de aclimatación de vitroplantas de pitahaya amarilla tuvo un 100% de efectividad. Las plántulas se sembraron con 1,5 meses de germinadas en un sustrato suelo:arena:turba en proporción 1:1:1 en vasos desechables sobre los cuales se colocó otro vaso (sellado con papel Vitaflex), con tres pequeños agujeros para generar una atmósfera húmeda. Al término de 20 días se retiró el vaso superior. Este mismo sustrato suelo:arena:turba 1:1:1 está siendo utilizado para enraizamiento de pencas recién-colectadas, para propagación, con alta eficacia, por lo cual se lo recomienda para llenado de bolsas, para semilleros o para agregar en los sitios finales de siembra directa.

En cuanto a los sistemas de propagación incluyendo herramientas biotecnológicas, López-Gómez *et al.* (2000) evaluaron procedimientos de propagación vegetativa en pitahaya *Stenocereus griseus*, tunillo *S. stellatus* y jiotilla *Escontria chiotilla*. Alka (2003) reportó los métodos de propagación y cosecha y rendimiento de varias especies, entre ellas *H. undatus*. Bárcenas (1994), Vargas *et al.* (2003) y Zhao *et al.* (2005) evaluaron el efecto de sustratos y concentraciones de agentes (IBA) sobre la propagación vegetativa, crecimiento y desarrollo de pitahayas rojas y amarillas. Infante (1992) obtuvo callos embriogénicos a partir de cotiledones y raíces de *S. setaceus*. Huang (2002), Mohamed-Yasseen (2002), Pelah *et al.* (2002), Drew & Azimi (2002) y Chen *et al.* (2003) determinaron la composición del medio de cultivo para inducir el crecimiento de yemas axilares, la regeneración y enraizamiento en *H. undatus*.

## 5.8 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN CACTACEAE

En Cactaceae, la transformación génica ha sido poco desarrollada. Se destacan los trabajos de Llamoca-Zárate *et al.* (1999) en *Opuntia ficus-indica*, Al-Ramamneh *et al.* (2006) en *Rhipsalidopsis gaertneri*, Silos-Espino *et al.* (2006) en *Opuntia ficus-indica* y Seol *et al.* (2008) en *Notocactus scopa* cv. Soonjung.

Llamoca-Zárate *et al.* (1999) trabajaron con cultivos friables de callos que se iniciaron a partir de cotiledones y hipocótilos de *Opuntia ficus-indica*. La propagación y crecimiento de callos se observaron en medio MS suplementado

con 2,4-D, Picloram y caseína. Para la transformación de la célula se hizo el bombardeo de partículas con el vector pPARGUSH, que contiene el gen *nptII* bajo el control del promotor *nos*, el gen *uidA* bajo control del promotor *par* (Landsmann *et al.*, 1988), y el gen *tet* bajo el control de un promotor bacteriano. La resistencia a la kanamicina, la expresión de *GUS* y el análisis por PCR indicaron éxito de la integración del ADN extraño.

Al-Ramamneh *et al.* (2006) desarrollaron un protocolo de transformación genética de *Rhipsalidopsis* cv. CB5 mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, cepa LBA4404 con el plásmido ayudador pBBRIMCS, con el vector plásmido pBI121, con los genes *nptII* y *uidA* (sin intrones). Además, la cepa AGL0 con el plásmido pBEO210 (Bovy *et al.* 1999), que contiene el gen *etr1-1* bajo el control del promotor de flores específicas *fbp1* (Angenent *et al.* 1992; Angenent *et al.* 1993) y el gen *nptII* bajo el control del virus del mosaico 35S (CaMV). Se obtuvo callos a partir de explantes de filocladodio y sub-cultivo en medio fresco para inducción. Los callos en un período de 9-12 meses fueron co-cultivados con *A. tumefaciens*. Los callos transformados de *Rhipsalidopsis* con un fenotipo de crecimiento vigoroso fueron obtenidos en los medios que contenían 600 mg l<sup>-1</sup> kanamicina. Después de nueve meses de una presión de selección rigurosa, la eliminación de la kanamicina del medio final junto con el cultivo de los callos transformados bajo estrés nutricional llevó la formación de varios brotes adventicios transgénicos. La transformación fue confirmada por tinción *GUS* (para el gen *uidA*), el análisis de ELISA y la hibridación de Southern blot (para el gen *nptII*). Con este enfoque, la eficiencia de transformación fue del 22.7 %.

Para la transformación de *Opuntia ficus-indica*, Silos-Espino *et al.* (2006) utilizaron *A. tumefaciens* cepa C58C1RifR (pGV2260), con el vector binario pBI-121 (Jefferson 1987) que posee el gen *nptII* como marcador de selección dirigido por el promotor *NOS* y el terminador *NOS*, así como el *uidA* (*GUS*) impulsado por el promotor 35S (CaMV) y el terminador *NOS*. A partir de infección bacteriana directa, mediante el uso de una jeringa con aguja hipodérmica al tejido meristemático (aréolas), las plantas transgénicas fueron obtenidas por la selección con 100 mg l<sup>-1</sup> kanamicina. La expresión transitoria y estable de *GUS* fue monitoreada en brotes resistentes a la kanamicina y plantas regeneradas, respectivamente. La transformación genética de plantas regeneradas bajo selección se demostró por PCR y análisis de Southern blot. El número de copias del transgén en el genoma de las plantas transgénicas varió desde dos hasta seis, mientras que la frecuencia de transformación obtenida por este sistema fue del 3.2 %.

Seol *et al.* (2008) sometieron *Notocactus scopae* cv. Soonjung a la transformación por *A. tumefaciens* cepa LBA4404, con el vector binario pBI-121 (Jefferson 1987) donde en la región T-DNA posee el gen reportero *uidA* para confirmar la expresión transgénica impulsado por el promotor (CaMV)35S, y el gen *nptII* como marcador de selección dirigido por el promotor *NOS* y el terminador *NOS*. El vector

plasmídico se introdujo en las células de la cepa de *Agrobacterium* a través de la transformación de choque térmico mediada por la infiltración de vacío, alfiler-pinchazo, y una combinación de los dos métodos. La eficiencia de transformación fue del 67-100%, y la expresión de los genes *nptII* y *uidA* fue detectada en cactus transformado. Esa técnica genera un cactus transgénico con mayor eficiencia de transformación, proceso de selección abreviada, y la expresión génica estable a través de la reproducción asexual. Todos los resultados mostraron que el método de transformación en *N. scopula* resultó un procedimiento eficiente en cuanto al ahorro de tiempo para la inserción de genes al genoma de cactus. Además, la técnica se puede aplicar a otras especies de reproducción asexual de plantas suculentas.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 LOCALIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO**

El trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, invernadero y colección de trabajo de pitahaya amarilla de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, a una altitud de 930 m.s.n.m., con una precipitación promedio anual de 1000 mm y una temperatura promedio de 24°C.

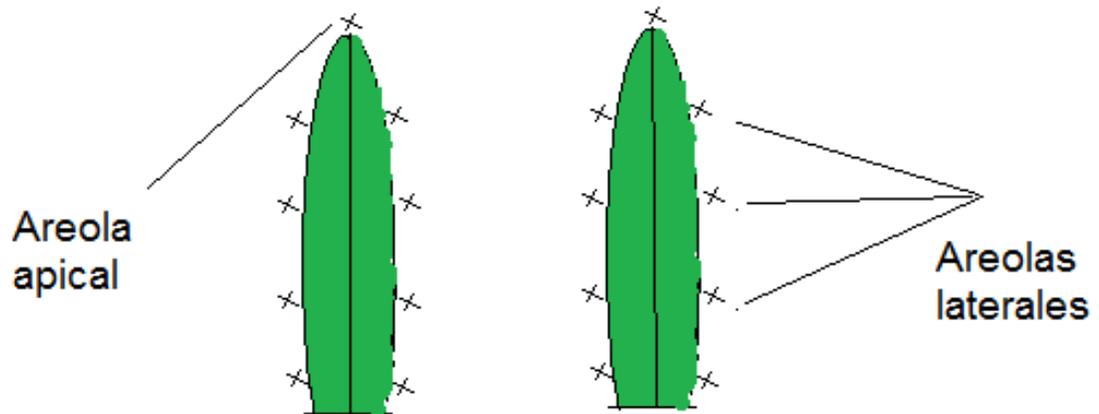
### **6.2 MATERIAL VEGETAL**

El material genético utilizado pertenece a la colección de trabajo de germoplasma de pitahaya de la Universidad Nacional de Colombia, localizada en el Lote de Cultivos de la sede Palmira, Valle del Cauca. Consiste de un genotipo de pitahaya amarilla con características morfoagronómicas sobresalientes, entre ellas peso de fruto, relación pulpa-cáscara, sólidos solubles (°Brix), carbohidratos, extracto etéreo, energía y pH.

### **6.3 TIPO DE EXPLANTES**

Los explantes ensayados corresponden a zonas de tejido meristemático (aréolas) laterales obtenidas de plántulas cultivadas *in vitro* originadas de semillas germinadas en caja de Petri (en papel filtro estéril húmedo), y de plantas adultas desinfectadas (ver Figuras 1 y 5). Las aréolas, encontradas en gran número en las costillas de los filocladodios de la planta de pitahaya, son responsables por la formación de estructuras vegetativas y reproductivas.

**Figura 5. Aréolas apicales y laterales en pitahaya amarilla. Las laterales fueron utilizadas como explante en el presente estudio.**



Las aréolas corresponden a tejido meristemático, del cual se originan yemas que resultan en estructuras vegetativas (brotes, los cuales se desarrollan en filocladodios) o en estructuras reproductivas (flor y luego el fruto).

## **6.4 METODOLOGÍA**

### **6.4.1 Desinfección de material vegetal**

El procedimiento de desinfección desarrollado en el presente estudio se hizo en el material proveniente de plantas de pitahaya amarilla adultas mantenidas en campo. Los filocladodios fueron cortados (cortes en V) en esquejes de 60 cm de largo y lavados con detergente Tween 20 al 1% mas agua destilada estéril, por 10 minutos. Luego se aplicó con un atomizador un fungicida (Captan en la concentración de  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ). En seguida los esquejes fueron llevados al invernadero con temperatura promedio de  $30^{\circ}\text{C}$ , en materas plásticas conteniendo un sustrato de turba y arena en proporción 2:1, las cuales fueron previamente autoclavadas por 20 minutos, a  $121^{\circ}\text{C}$  y 103 kPa. El riego (agua, sin adición de fertilizantes) a las materas se hizo con intervalo de tres días. Estas permanecieron en invernadero hasta el desarrollo de nuevos brotes, para obtención de los explantes (aréolas laterales).

## 6.4.2 Inducción de organogénesis indirecta

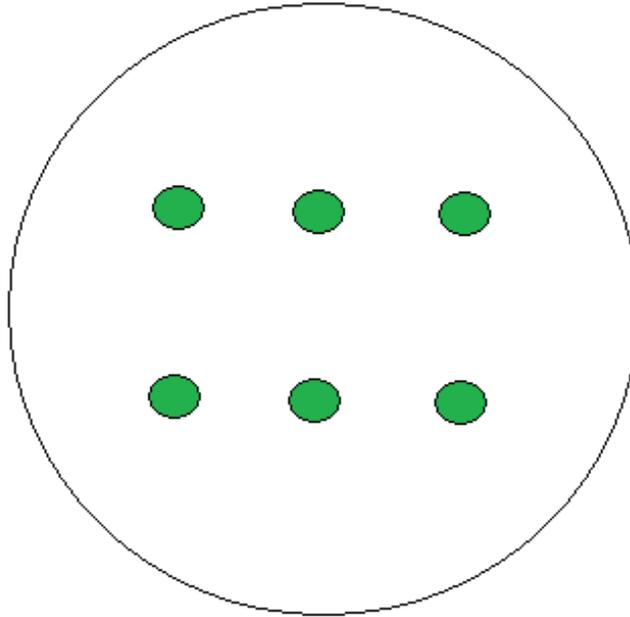
De los brotes crecidos *in vitro* se utilizaron sus aréolas como explantes para obtención de callos, con las cuales se ensayaron diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento para la regeneración vía organogénesis indirecta (Tabla 1). Los reguladores probados fueron una auxina (2,4-D) y dos citocininas (6-BAP y TDZ), en medio MS (1962), para un total de 12 tratamientos (Tabla 1). El medio se esterilizó en frascos tapados con capacidad de 500ml, en autoclave a 121°C y 103 kPa, por 20 minutos, y posteriormente se distribuyó en cajas de Petri. A cada caja de Petri debidamente esterilizada se adicionó un volumen de 25ml de medio, y se procedió a la siembra de seis explantes (Figura 6). Los tratamientos con cinco repeticiones se sometieron a condiciones de luz (fotoperiodo 16/8h) y oscuridad (0/24) por 21 días a partir de la siembra. Completados los 21 días, estos fueron expuestos al mismo fotoperiodo (16/8h).

**Tabla 1. Combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento para regeneración vía organogénesis indirecta.**

Referencia	Fitoregulador	Concentración $\mu\text{M}$			
		C1	C2	C3	C4
Pelah (2002)	TDZ	100	200	400	-
Angulo-Bejarano & Paredes-López (2011)	2,4D	0.9	2.26	4.52	-
	BAP	0.44	0.88	2.21	4.43
	2,4D	2.26	3.26	4.26	-
Caetano (2012)	BAP		2.21		-
	TDZ	200	300	400	-

Las concentraciones utilizadas en 2,4D son las reportadas por Angulo-Bejarano & Paredes-López (2011), y para TDZ en Pelah *et al.* (2002).

**Figura 6. Modelo de disposición de los explantes de pitahaya amarilla (aréolas) en una repetición, en los distintos tratamientos ensayados.**



El círculo grande representa la caja de Petri con el medio de cultivo, mientras los pequeños (verde) los explantes (aréolas) y su disposición.

### **6.4.3 Mantenimiento de callos y proliferación de brotes**

Para lograr mantener los callos y realizar la proliferación de brotes se utilizó apenas aquellos callos obtenidos del tratamiento de inducción en oscuridad (0/24). Para liberar la presión ejercida por los fitoreguladores que indujeron a callo, los explantes fueron sembrados en medio MS (1962) por 30 días, luego se ensayó la siembra de esas estructuras en tres composiciones de medios por más 30 días (Anexo 1). El medio MS1 está compuesto por MS (1962) básico y BAP a  $0.5 \mu\text{M}$  (Angulo-Bejarano & Paredes-López 2011), el MS2 por  $\frac{1}{2}$  MS (1962) suplementado con  $0.05 \text{ mg/l}$  de GA y  $0.04 \text{ mg/l}$  de BAP (Roca, 1984), y el MS3 correspondió a MS (1962) (Pelah *et al.*, 2002).

#### **6.4.4 Enraizamiento de los brotes**

En el enraizamiento de los brotes se utilizó el medio MS (1962) conteniendo 5.3  $\mu$ M de NAA, tal como lo describe Pelah (2002).

#### **6.5 ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LOS MATERIALES**

Para el análisis histológico, las muestras de callos donde se evidenciaron el desarrollo de brotes fueron fijadas en FAA, y luego almacenadas en alcohol etílico al 75%. Posteriormente las muestras fueron deshidratadas en una serie gradual de alcoholes, aclaradas en alcohol butílico e incluidas en parafina (Paraplast). Los cortes se realizaron en un micrótopo y se llevaron a un secado. Finalmente se hizo la tinción con safranina y Fast Green (Roth, 1964). El proceso completo se describe en el Anexo 2.

#### **6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La evaluación estadística de los datos se hizo mediante un análisis de varianza para un diseño experimental completamente aleatorizado con cinco repeticiones por tratamiento (Tabla 2). Cada repetición contó con seis explantes (Figura 5), en un arreglo factorial con tres factores controlados:

- Reguladores: tres diferentes reguladores, 2,4-D, TDZ y BAP (los dos primeros solo o combinados con BAP)
- Concentraciones: tres concentraciones distintas de 2,4-D y TDZ solo, o combinados con BAP (véase Tabla 1)
- Origen del material vegetal: dos orígenes, *in vitro* y en campo

Se realizó una prueba de Duncan al 5% y una correlación lineal simple. Para los análisis estadísticos se empleó el programa SAS versión 9.0.

**Tabla 2. Tratamientos empleados en la evaluación del tipo de fitoregulador: solo o combinado y la concentración.**

Tratamiento	Fitoregulador	[ ] $\mu\text{M}$	Fitoregulador	[ ] $\mu\text{M}$
1	2,4D	2.26	-	
2	2,4D	3.26	-	
3	2,4D	4.26	-	
4	2,4D	2.26	BAP	2.21
5	2,4D	3.26	BAP	2.21
6	2,4D	4.26	BAP	2.21
7	TDZ	200	-	
8	TDZ	300	-	
9	TDZ	400	-	
10	TDZ	200	BAP	2.21
11	TDZ	300	BAP	2.21
12	TDZ	400	BAP	2.21
13	-	-	-	-

Cada tratamiento con cinco repeticiones.

Las variables de respuesta a tener en cuenta fueron:

- % Supervivencia: cantidad de explantes de los diferentes tratamientos, produciendo callos.
- % Formación de callo: cantidad de callos formados por explante en cada tratamiento, en porcentaje.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

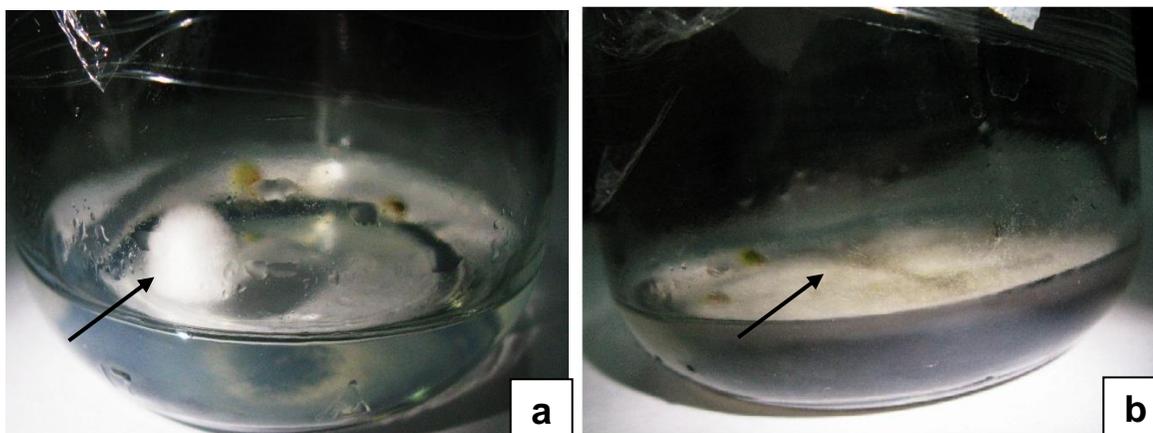
### 7.1 DESINFECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL

Varios estudios han sido desarrollados para el proceso de desinfección de cactáceas y el ingreso de los materiales a condiciones *in vitro*. Pero órganos adultos de la planta como raíces y cladodio son más dispendiosos por presentar más agentes en la superficie, haciendo que los investigadores adopten diferentes medidas para limpieza de los explantes.

Una alternativa que se observa en los trabajos en cactáceas es la utilización de semillas como explante primario, luego de un proceso de desinfección, aunque tienden a presentar naturalmente una cantidad menor de contaminantes. Esas semillas germinan formando la radícula, hipocótilo y hojas cotiledonares; esas estructuras son nuevamente desinfectadas y sembradas en medios de cultivo. Al igual que las demás cactáceas, la pitahaya amarilla también comparte esa característica, siendo más fácil trabajar con semillas como fuente de explantes primarios que con tejidos adultos.

Suárez Román (2011) reportó algunos agentes desinfectantes y concentraciones para desinfección de materiales de pitahaya amarilla y roja, como el detergente comercial Tween 20 a 0.01, 0.1 y 1.0%; alcohol etílico al 70, 80 y 90%, e hipoclorito de sodio al 3, 5 y 6%. Estos mismos desinfectantes fueron ensayados en cada una de las tres concentraciones, en el presente estudio, pero ninguna combinación se mostró efectiva para la eliminación de los patógenos en aréolas de cladodios adultos de pitahaya amarilla (Figura 7a), colectadas en campo de cultivo. Igualmente, con aréolas de cladodios jóvenes (Figura 7b), originados de estacas manejadas en invernadero. Aunque algunos explantes inicialmente no demostraban contaminación (Figura 7), cuando se transferían a nuevo medio se observó el desarrollo de hongos, conllevando a una pérdida del 100% bajo los protocolos sugeridos por Suárez Román (2011).

**Figura 7. Hongos en aréolas provenientes de cladodios adultos (a) y jóvenes (b) de pitahaya amarilla.**



Hongos en aréolas de cladodios adultos (a) y jóvenes (b) de pitahaya amarilla (flechas) desinfectados según los protocolos descritos en Suárez Román (2011). Medio MS (1962). Aunque no todos los explantes muestren contaminación, esta se manifestó cuando estos fueron transferidos a nuevo medio.

Los investigadores han buscado estandarizar protocolos que permitan hacer una desinfección efectiva en los explantes de las cactáceas (Tabla 3). La Tabla 3 muestra los productos utilizados por diferentes autores para la limpieza de explantes de diferentes especies de esa familia. Como se mencionó anteriormente, hay una preferencia por trabajar con las semillas y sus explantes para la desinfección. El uso de fungicidas es observado en algunos métodos, estando solos o combinados. El alcohol al 70% es empleado con tiempos variables. De igual manera, diferentes combinaciones de concentraciones de hipoclorito solo o con otros agentes, y sus variaciones de tiempo de exposición. Otros compuestos especiales también han sido empleados (Tabla 3).

En el presente trabajo se ensayó el uso de una mezcla de dos fungicidas, por 30 minutos, para desinfección de los explantes de pitahaya amarilla, Captan y Derosal, en la concentración descrita por Angulo-Bejarano & Paredes-López (2011), de  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  y  $0,06 \text{ ml L}^{-1}$ , respectivamente (Tabla 3). Se siguió un lavado en agua destilada. Luego, se aplicó una secuencia de lavados, sumergiendo los cladodios jóvenes de pitahaya amarilla, provenientes de las estacas mantenidas en invernadero, alternadamente en detergente Tween 20 al 1 % (10 minutos), agua destilada (1 minuto), alcohol etílico al 70 % (1 minuto), agua destilada (1 minuto), hipoclorito de sodio al 3 % (10 minutos), y finalmente en agua destilada (1 minuto). Sin embargo, se observó el desarrollo de hongos (posiblemente sistémicos) cuando fueron sembrados en el medio de cultivo. La no desinfección de los materiales de pitahaya amarilla según el protocolo de Angulo-Bejarano y

Paredes-López (2011) pudo darse por diferencias en el tiempo de exposición a los agentes utilizados, y por ser una especie distinta. Se considera que cada especie puede tener una respuesta diferenciada a un mismo tratamiento de desinfección.

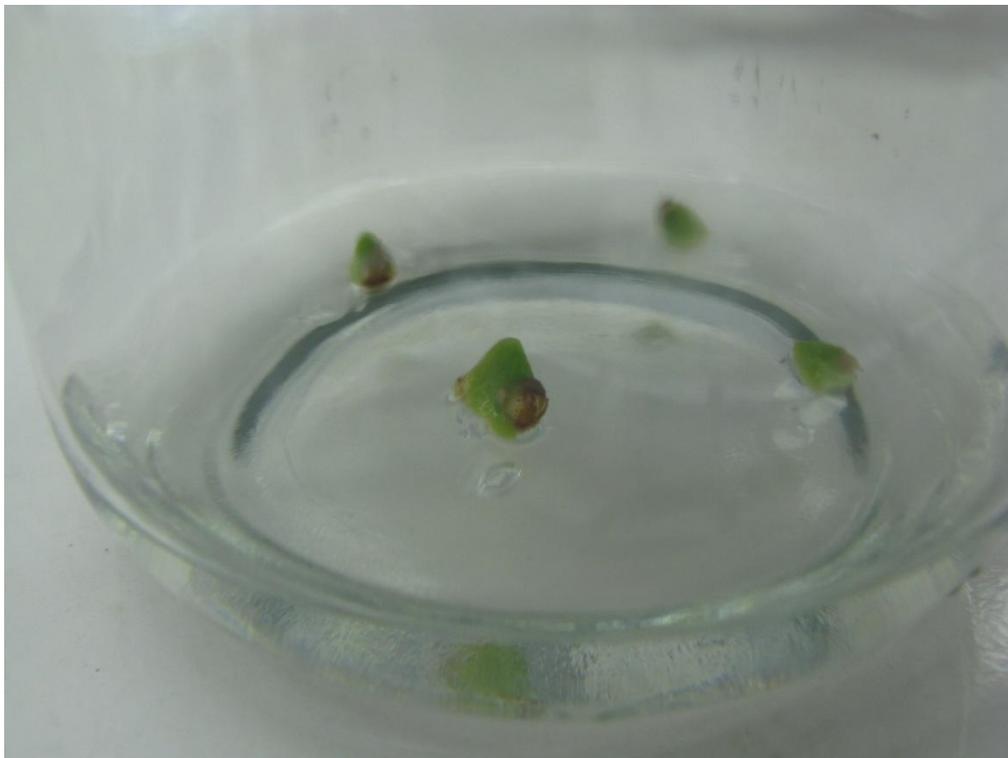
**Tabla 3. Agentes desinfectantes (y combinaciones) utilizados en varios tipos de explantes de distintas especies de cactáceas, por diferentes autores.**

Explante	Fungicida	Alcohol etílico	Tiempo	Hipoclorito	Tiempo	Otro	Especie	Referencia
<b>Tubérculos (raíces)</b>		70%	45 s			Cloruro de mercurio 0,2% por 3 minutos	<i>Coryphantha elephantides</i>	Bhau (1999)
<b>Semilla Plántulas</b>		70%	1 m	1,5%	10 m		<i>Opuntia ficus-indica</i>	Llamoca-Zárata <i>et al.</i> (1999)
<b>Semilla</b>		70%	1 m	2%	25 m	Extran 0,1%	<i>Pelecypora aselliformis</i> y <i>P. strobiliformis</i>	Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa (2002)
<b>Semilla</b>		70%	1 m	1,5% con pocas gotas de Tween 20	10 m		<i>Selenicereus megalanthus</i>	Pelah <i>et al.</i> (2002)
<b>Filocladio</b>				1,5% con 0,02 de Tween 20	15 m		<i>Shlumbergera</i> y <i>Rhipsalidopsis</i>	Sriskandarajah y Serek (2004)
<b>Ápices</b>	Previcur N Derosal 500D Buzan BM30	70%	1 m	20% (V/V) con 0,1 % Tween 20 (V/V)	20 m	Desinfectante de verduras 20% (Microdyn; 0,048 coloide de plata)	Diez especies del género <i>Mammillaria</i>	Ramírez-Malagon <i>et al.</i> (2007)
<b>Filocladio</b>	Captan 0.5 g L <sup>-1</sup> , Benlate 0.5 g L <sup>-1</sup> , Derosal 500DC 0,06ml L <sup>-1</sup> Previcur 0.1 ml L <sup>-1</sup> , Agrimicin 500EC 0.015 g L <sup>-1</sup> , por 2 h			Solución de cloro 40% con 6% hipoclorito, y 0.1% Tween 20	20 m		<i>Opuntia ficus-indica</i>	Angulo-Bejarano y Paredes-López (2011)

Otro método ensayado fue la adición al medio de cultivo MS (1962) del fungicida Vitavax en una concentración de 7,4  $\mu\text{M}$ . Para la desinfección previa de los explantes, se utilizó la secuencia de lavados descritas anteriormente (Tween 20 al 1% por 10 minutos, agua destilada por 1 minuto, alcohol etílico al 70 % por 1 minuto, agua destilada por 1 minuto, hipoclorito de sodio al 3% por 10 minutos, agua destilada por 1 minuto).

El ensayo contó con 10 repeticiones, cada una con tres explantes. En este caso, ninguna de las 10 repeticiones presentó contaminación por hongos. Sin embargo, apenas en una repetición los explantes pudieron sobrevivir a la concentración utilizada, representando un 10% del total. Así, la dosis del fungicida parece actuar como un factor selectivo. Los explantes que sobrevivieron estuvieron tres semanas en el medio con el Vitavax, después fueron sembrados en medio MS (1962) por un periodo de un mes (para desintoxicación) y posteriormente transferidos a MS suplementado con 400  $\mu\text{M}$  de TDZ para inducir a la formación de callo (Figura 8).

**Figura 8. Meristemas de pitahaya amarilla provenientes de aréolas de filocladodios jóvenes (resultantes de estacas maduras mantenidas en invernadero) desarrollándose en medio MS suplementado con TDZ.**



## 7.2 ORGANOGÉNESIS INDIRECTA EN PITAHAYA AMARILLA

### 7.2.1 Inducción de formación de callo

Para inducción de callo había se utilizaro dos fuentes de explantes: (1) *in vitro* a partir de semillas germinadas y (2) explantes adultos, meristemas axilares de cladodios. Debido a la dificultad en la desinfección de los materiales adultos, para la organogénesis indirecta se utilizaron solamente explantes tipo aréola provenientes de materiales a partir de semillas de semillas.

Con los meristemas axilares (aréolas) se llevaron a cabo los 12 tratamientos propuestos (véase Tabla 2), bajo dos condiciones: (1) con fotoperiodo 16/8h durante 25 días y (2) bajo condiciones de oscuridad (0/24) durante 20 días. El objetivo de dichas comparaciones era determinar el efecto del fotoperiodo sobre la inducción del callo en los explantes tratados. Los explantes en el total se mantuvieron durante 45 días bajo esas concentraciones de fitoreguladores.

En la Figura 9 se presenta los 12 tratamientos bajo los diferentes fotoperiodos y reguladores de crecimiento. Los datos observados permiten determinar (tratamientos 1 a 3), bajo condiciones de luz, hubo respuesta del explante con formación de callo del 93 - 100 %. Para esos mismos tratamientos bajo condiciones de oscuridad la respuesta del explante fue menor, oscilando entre 70 - 90 %.

Para los tratamientos de 2,4-D (tratamientos 4 a 6) se logró una formación de callo del 100 %, en condiciones de luz. Para la condición de oscuridad, se observó el 100 % de formación de callos en los tratamientos 4 y 5, mientras el tratamiento 6 fue de 96 %.

Sin embargo, en los tratamientos del 1 al 6, en los cuales el medio estuvo suplementado con 2,4-D (tratamientos 1 al 3) y 2,4-D con BAP (tratamientos 4 al 6), a pesar del porcentaje de callos formados, no se observaron callos regenerantes (con formación de brotes).

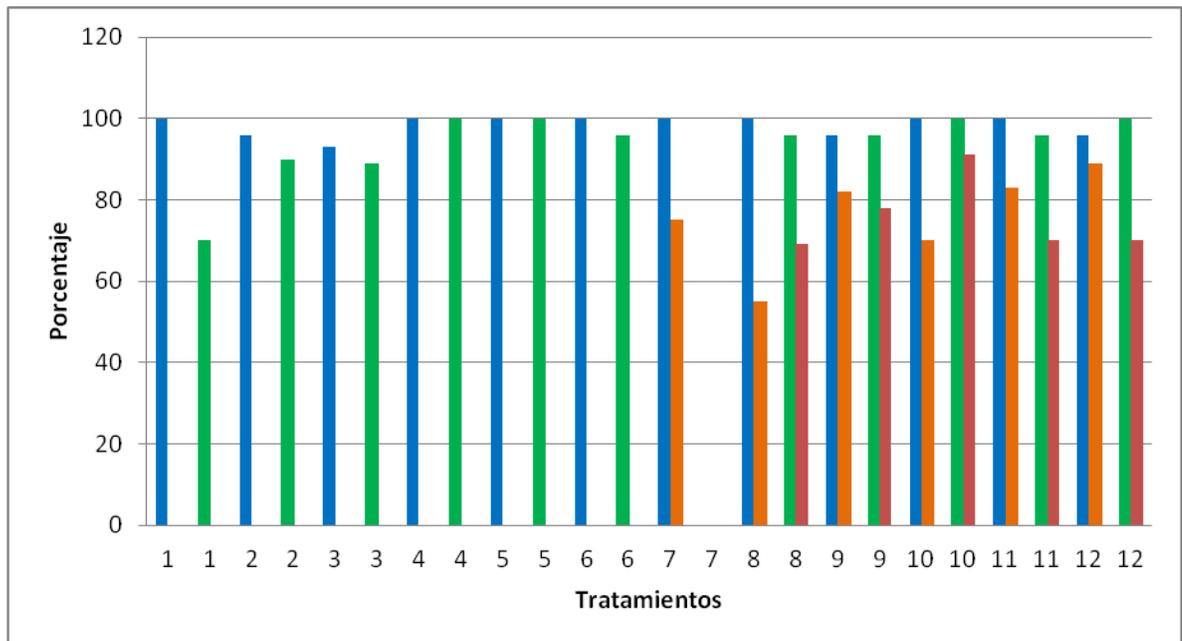
De los tratamientos 7 al 12, donde del 7 al 9 corresponden a medio suplementado con TDZ, y del 10 al 12 TDZ y BAP, se observó formación de callos y de callos regenerantes tanto en presencia de luz como en oscuridad, en diferentes porcentajes, excepto para el tratamiento 7 en oscuridad, el cual se perdió por efecto de contaminación.

En el caso de los tratamientos 7 al 9 (TDZ), bajo efecto de luz se observó respuesta del explante con formación de callos, del 96-100 % (tratamientos 9 y 7 - 8, respectivamente), mientras la formación de callos regenerantes osciló de 55 - 82 % (tratamientos 8 y 9, respectivamente). Los tratamientos 8 y 9 bajo

condiciones de oscuridad presentaron el mismo porcentaje de callos formados (96%), mientras la formación de callos regenerantes (con formación de brotes) fue de 69 - 78%, respectivamente. Esto indica que el factor luz no es crucial para la formación de callos en pitahaya amarilla, y si se puede deber más al tipo de regulador de crecimiento y a su concentración.

Para los tratamientos 10 al 12 (TDZ + BAP) bajo condiciones de luz, se observó del 96 % (tratamiento 12) al 100 % (tratamientos 10 y 11) de formación de callos. Para los mismos, la formación de callos regenerantes estuvo entre el 70 % (tratamiento 10) al 89 (12). Bajo condición de oscuridad, se observó de 96 % (tratamiento 11) a 100% (tratamientos 10 y 12) de callos formados. A su vez, los callos regenerantes estuvieron entre el 70 % (tratamientos 11 y 12) y el 91% (tratamiento 10) (Figura 9). Estas observaciones confirman lo anteriormente expuesto, en relación a los factores luminosidad, regulador de crecimiento y su concentración.

**Figura 9. Porcentaje de explantes en los 12 tratamientos bajo condiciones de luz (16/8) y oscuridad (0/24) que formaron callos y con callos regenerantes, después de 45 días posteriores a la siembra.**



Convenciones: azul, callos formados bajo condiciones de luz; azul claro, callos regenerantes; verde, callos formados bajo condiciones de oscuridad; verde claro, callos regenerantes. Tratamientos 1 al 3, 2,4-D en diferentes concentraciones; tratamientos 4 al 6 2,4-D + BAP; tratamientos 7 al 9, TDZ; tratamientos 10 al 12, TDZ + BAP. El tratamiento 7 en oscuridad se perdió por efecto de contaminación.

En la Tabla 4 se observa en los 12 tratamientos bajo condiciones de luz (16/8) y oscuridad (0/24), el porcentaje de explantes (36 explantes por tratamiento) que formaron callos y callos regenerantes, y la eficiencia de inducción 45 días posteriores a la siembra.

**Tabla 4. Tratamientos ensayados bajo condiciones de luz (16/8) y oscuridad (0/24), porcentaje de explantes que formaron callos y callos regenerantes y eficiencia de inducción, 45 días posteriores a la siembra.**

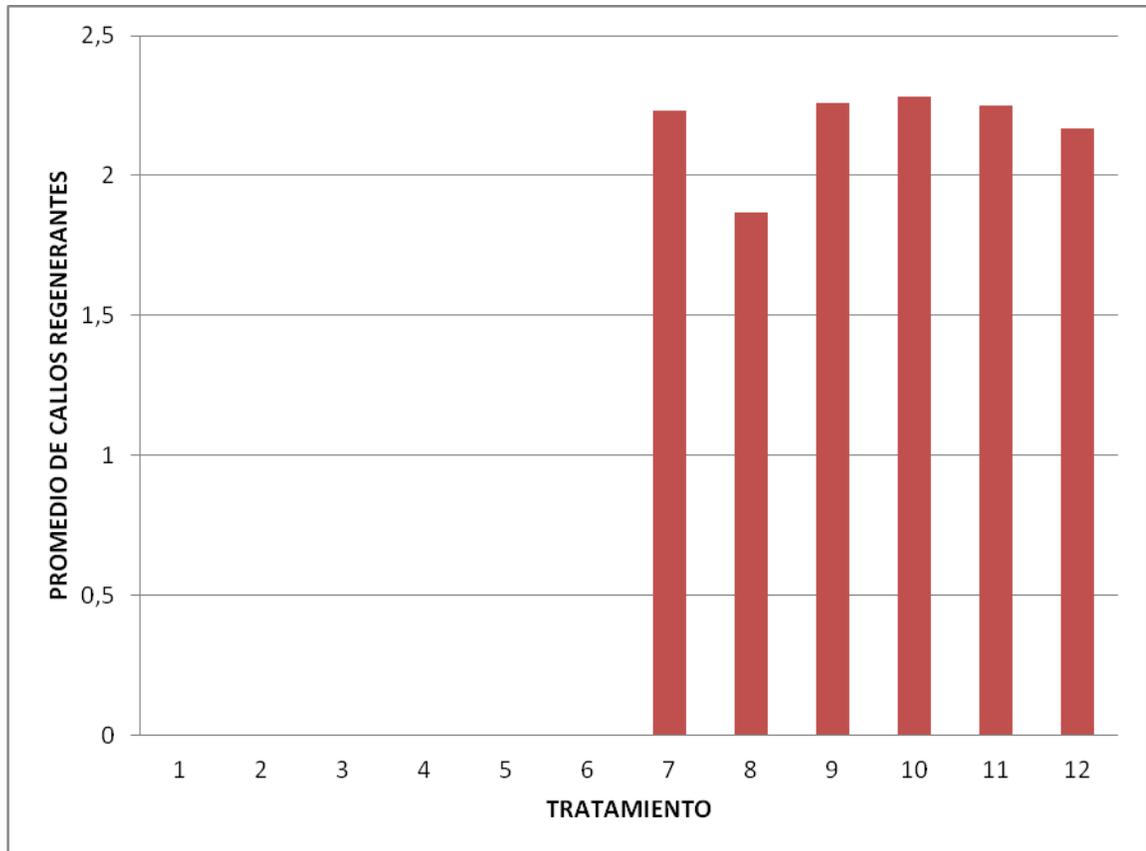
Treat.	Luz	Oscuridad	% Callos producidos	% Callos regenerantes	Eficiencia de inducción de callo
1	X		100	0	0
		X	70	0	0
2	X		96	0	0
		X	90	0	0
3	X		93	0	0
		X	89	0	0
4	X		100	0	0
		X	100	0	0
5	X		100	0	0
		X	100	0	0
6	X		100	0	0
		X	96	0	0
7	X		100	75	75
		X	0	0	0
8	X		100	55	55
		X	96	66.6	66.6
9	X		96	80	80
		X	96	75	75
10	X		100	70	70
		X	100	91	91
11	X		100	83	83
		X	96	66.6	66.6
12	X		96	86	86
		X	100	70	70

El presente trabajo si puede considerar el primer reporte de inducción de organogénesis indirecta en pitahaya amarilla (*S. megalanthus*) utilizando como explantes las aréolas laterales de filocládodos, bajo el efecto del regulador de crecimiento tipo TDZ o en combinación con el BAP, en condiciones de luz y oscuridad. La eficiencia de la regeneración en promedio fue de 1,3 para los tratamientos sometidos a luz, mientras en oscuridad fue de 1,4.

Cuando se consideran los datos agrupados de luz y oscuridad, se observa que el mejor comportamiento en la regeneración lo presentó el tratamiento 10, seguido de los tratamientos 9 y 11 (Figura 10), aunque con poca diferencia entre ellos. Además, muestra que las condiciones de luz/oscuridad no influyen en la

regeneración, y de igual manera, la combinación de dos citocininas, ya que el TDZ solo presentó resultados similares a TDZ con BAP.

**Figura 10. Promedio de callos regenerantes formados en presencia de TDZ y TDZ suplementado con BAP, bajo condiciones de luz (16/8h) y oscuridad (0/24), en conjunto.**



La Tabla 5 exhibe los tratamientos de 7 a 12 bajo condiciones de luz y oscuridad donde se discriminan el número de explantes para cada tratamiento, el número de callos producidos y la eficiencia de inducción.

**Tabla 5. Callos regenerantes formados en presencia de TDZ y TDZ suplementado con BAP, bajo condiciones de luz (16/8h) y oscuridad (0/24), en conjunto.**

Trat.	Fitoregulador	[ ] $\mu\text{M}$	No. explantes/trat.		No. callos producidos		Eficiencia de inducción de callo en %	
			Luz	Oscur.	Luz	Oscur.		
7	TDZ	100	12	0	9	0	75	0
8	TDZ	200	18	24	10	16	55	66.6
9	TDZ	300	30	24	24	17	80	70.8
10	TDZ/BAP	100/2.21	30	24	21	22	70	91
11	TDZ/BAP	200/2.21	30	24	25	18	83.3	66.6
12	TDZ/BAP	300/2.21	30	24	26	16	86.6	70

### 7.3 FITOREGULADORES

Los fitoreguladores ensayados en el presente trabajo tuvieron respuestas diversas, como se puede constatar en la Figura 9. No mucho es conocido sobre cultivo *in vitro* en pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*). El trabajo más destacado es de Pelah *et al.* (2002). Esos reguladores son descritos en otras especies de cactáceas.

El 2,4-D es un herbicida también conocido por su actuación como auxina y por favorecer la formación de callos en los tejidos. Es reportado su uso en algunas especies de cactáceas, con distintas concentraciones o combinado con otros fitoreguladores, actuando en diferentes explantes o tejidos (Bhau, 1999; Llamoca-Zárte *et al.*, 1999; Medeiros *et al.*, 2006; Angulo-Bejarano y Paredes-López, 2011). Estos autores comparten con Zhao *et al.* (2005) que la formación de callos se produce cuando el mismo nivel de auxina y citocinina se añade al medio. Por lo tanto, la relación entre estos dos reguladores de crecimiento constituye el factor crítico que desencadena los acontecimientos de desarrollo *in vitro*.

Sin embargo, en el presente trabajo, en la pitahaya amarilla no se pudo obtener una respuesta favorable utilizando el 2,4-D, o la combinación 2,4-D con BAP, por no desarrollar callos con capacidad de regeneración, tanto por efecto del fotoperiodo como de las diferentes concentraciones de estos reguladores. Los callos formados, todos no regenerantes, presentaron características variables en cuanto a color y textura (Tabla 4). Es posible que el 2,4-D, aunque actúe de forma similar a una auxina, no tiene la propiedad de inducir regeneración en pitahaya amarilla, por algún factor intrínseco de la especie.

En *S. megalanthus*, en el presente estudio, el BAP se mostró eficiente para la regeneración en combinación con el TDZ, pero no con el 2,4-D, sea en

condiciones de luz u oscuridad. Aunque sea una citocinina conocida por promover la formación de brotes en diversas cactáceas (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002; Dávila-Figueroa *et al.*, 2005) no demostró efecto cuando combinada con el 2,4-D, para pitahaya amarilla. Además, cuando se compara los tratamientos de TDZ y TDZ con BAP, el mayor porcentaje de brotes se observó en el tratamiento 8 (TDZ solo), por tanto no se evidenció una respuesta potenciada por el uso de esos dos reguladores, o un efecto de sinergia pronunciado.

El TDZ es un fitoregulador que en los últimos años ha tenido un amplio uso, por los resultados logrados con diversas especies. Exhibe la propiedad única de imitar tanto la auxina como la citocinina en sus efectos sobre el crecimiento y la diferenciación de los explantes cultivados, aunque estructuralmente es diferente de las dos. Según estudios *in vitro* el TDZ exhibe un alto nivel de actividad a concentraciones tan bajas como 10pM (Preece *et al.*, 1991; Murthy *et al.*, 1998). La exposición del tejido vegetal a TDZ por un relativamente corto tiempo es suficiente para estimular la regeneración (Visser *et al.* 1992; Hutchinson y Saxena, 1996; Murthy *et al.*, 1998).

En este trabajo se pudo observar que el TDZ es el fitoregulador de mejor comportamiento en lo que respeta la formación de callos de pitahaya amarilla capaces de inducir la regeneración a partir de los explantes utilizados, solo o en combinación con BAP, en presencia de luz o en oscuridad. Se observó que las tres diferentes concentraciones utilizadas (200, 300 y 400 $\mu$ M) favorecen la regeneración de brotes sobre los callos inducidos, lo que evidencia que esta especie es sensible al TDZ, en especial en su acción sobre la diferenciación organogénica. En contraste, los callos formados en medios suplementados con el 2,4-D, estos se presentaron compactos, de color verde y morado (Tabla 4).

## **7.4 CARACTERÍSTICAS DE LOS CALLOS**

Los callos obtenidos bajo condiciones de luz y oscuridad presentaron similitud en su apariencia. Sin embargo, los callos que estuvieron sometidos a luz con TDZ y TDZ suplementado con BAP, además de presentar callos regenerantes, presentaron porción no regenerante, posiblemente por efecto de la luz. Sumase a eso las diferentes respuestas en el tejido ensayado, según el fitoregulador (Tabla 6).

**Tabla 6. Características de los callos de pitahaya amarilla inducidos a partir de aréolas laterales, formados bajo condiciones de luz y oscuridad.**

Trat.	Condición	% Callo	% Callo regenerante	Característica del callo
1	Luz	100	0	esponjoso verde y verde claro
	Oscuridad	70	0	esponjoso verde claro y morado
2	Luz	96	0	parte compacta verde claro y morado y parte esponjosa verde claro
	Oscuridad	90	0	esponjoso verde claro y morado
3	Luz	93	0	parte compacta verde y morado, y parte esponjosa verde claro
	Oscuridad	89	0	esponjoso verde claro a blanco
4	Luz	100	0	esponjoso verde claro
	Oscuridad	100	0	esponjoso verde claro a blanco y morado
5	Luz	100	0	esponjoso verde claro y blanco
	Oscuridad	100	0	esponjoso morado y blanco
6	Luz	100	0	esponjoso verde y blanco
	Oscuridad	96	0	esponjoso verde claro a blanco
7*	Luz	100	75	compacto verde y morado
	Oscuridad	0	0	---
8	Luz	100	55	compacto verde y morado
	Oscuridad	96	69	compacto verde
9	Luz	96	82	compacto verde y morado
	Oscuridad	96	78	compacto verde
10	Luz	100	70	compacto verde y morado, y parte verde esponjosa
	Oscuridad	100	91	compacto verde
11	Luz	100	83	compacto verde y morado, o verde
	Oscuridad	96	70	compacto verde

12	<b>Luz</b>	96	89	compacto verde y morado, o verde
	<b>Oscuridad</b>	100	70	compacto verde
13	<b>Luz</b>	-	-	esponjoso y brotes a partir de la areola
	<b>Oscuridad</b>	-	-	esponjoso y raíces a partir de la areola

\*Tratamiento 7 en oscuridad se perdió por efecto de contaminación

Los tratamientos 1 a 3, en los cuales se utilizó el 2,4-D como estimulador en tres diferentes concentraciones, evidenció la formación de callos. Sin embargo, estos no fueron capaces de formar brotes (callos no regenerantes): se manifestaron de un color verde claro (blanquecino) esponjoso en luz (Figuras 11a-c) y bajo condiciones de oscuridad un color blanco, como se observa en la Figura 13a-c, y con una textura esponjosa.

Angulo Bejarano y Paredes-López (2011) comentan que callos verde claros a amarillos muestran una visible reducción en la producción de clorofila, mientras que los que presentan zonas marrones, en la práctica pueden ser asociados con oxidación fenólica.

De igual manera, en los tratamientos 4 a 6 con el 2,4-D en sus diferentes concentraciones suplementadas con BAP en su única concentración, se observó la formación de callos, pero perdieron la capacidad regenerante. De apariencia verde claro a blanco, callo tipo esponjoso, en el caso de los sometidos a la luz (Figuras 11d-f) y blancos esponjosos para los obtenidos bajo condiciones de oscuridad (Figura 13d-f).

Los tratamientos 7 a 9 correspondientes al TDZ como fitoregulador, mostraron en sus diferentes combinaciones formación de callos regenerantes, pero como se comentó anteriormente, los sometidos a la luz presentarían parte regenerante verde morada compacta viable y parte no viable con un aspecto blanco esponjoso (Figura 12a-c); los de oscuridad tenían color verde morado con capacidad regenerante (Figura 14a-b). El tratamiento 7 se perdió por efecto de contaminación.

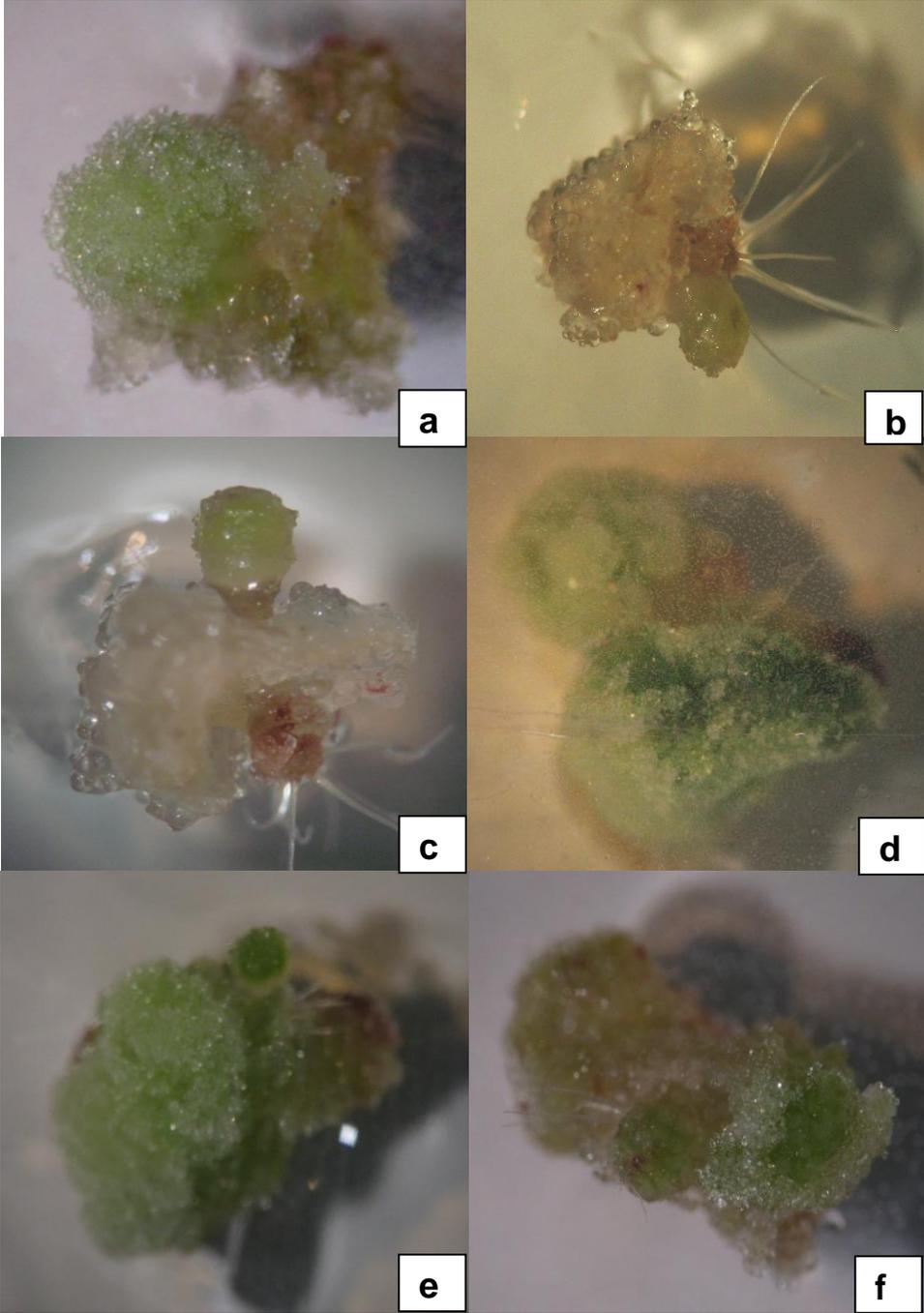
Los tratamientos 10 a 12, suplementados por TDZ en sus diferentes concentraciones con adición de BAP en única concentración, también mostraron ser viables. Los callos logrados bajo efecto de la luz presentaron parte regenerante verde morada compacta viable y la parte no viable blanca esponjosa (Figura 12d-f). Los callos obtenidos bajo condiciones de oscuridad mostraron capacidad regenerante, de color verde, y una textura compacta (Figura 14c-e). Por tanto, en aquellos tratamientos donde hubo regeneración fueron los mismos en que se logró un callo compacto, de color verde-morado;

los reguladores de crecimiento que favorecen esta condición son el TDZ y TDZ suplementado con BAP, bajo las condiciones de luz u oscuridad.

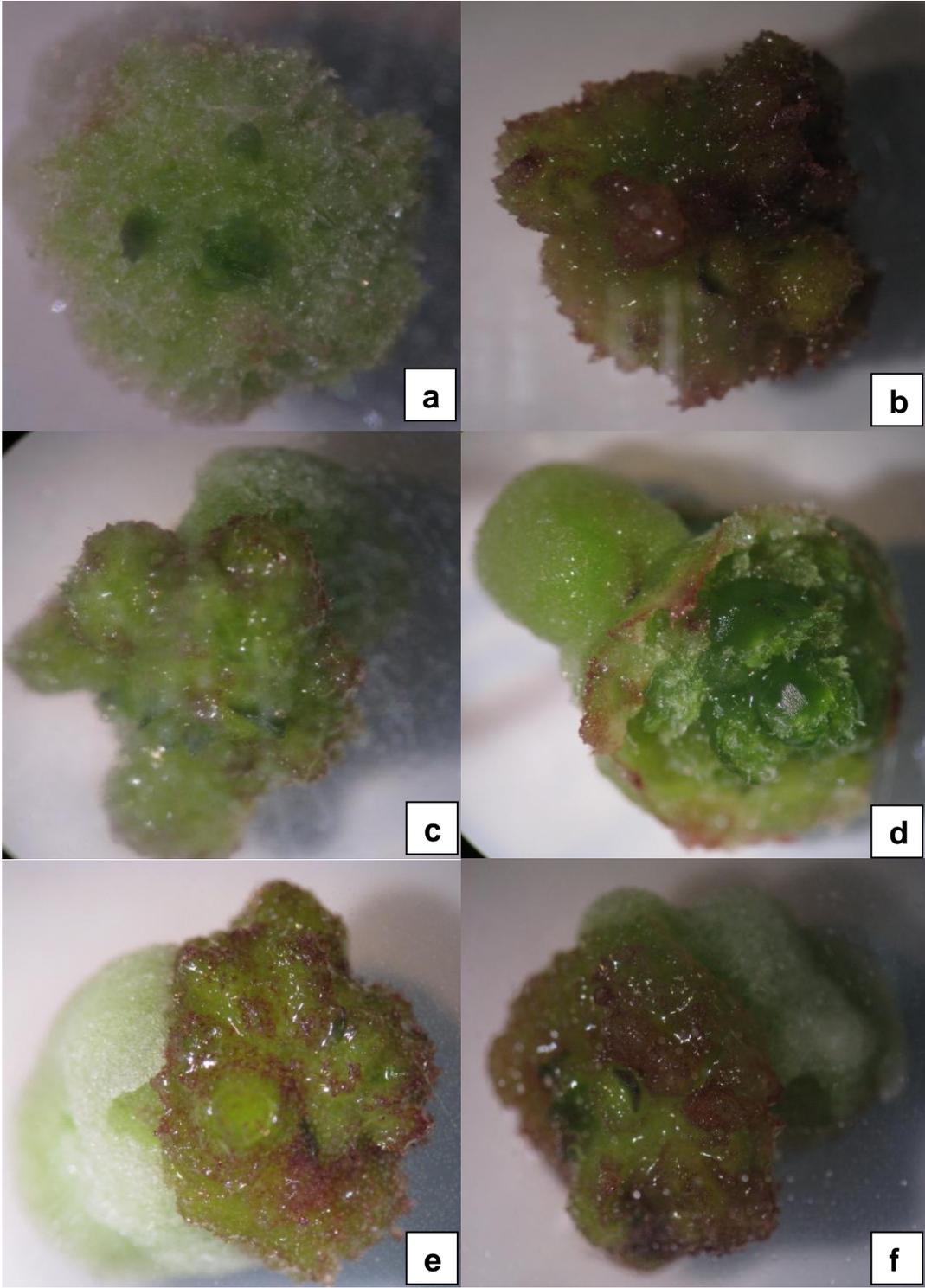
Con relación a los controles en el tratamiento 13 (Figura 15), en presencia de luz, control 1 (C1), se observó la formación de brote y un callo no organogénico blanco, mientras el control 2 (C2), se formó un brote, un callo no organogénico y una raíz. En el tratamiento en oscuridad, control 3 (C3), formó un callo no organogénico y una raíz. En el control (C4) también se evidenció un callo no organogénico y una raíz. Esto es un indicativo de que para favorecer la regeneración se debe suplementar el medio con un regulador de crecimiento, pues no solo es la presencia de callo sino que este sea competente (que el tejido pueda dar origen a órganos) y determinado (para saber que ruta morfogénica se debe tomar).

Según Murch y Saxena (2000) y Murthy *et al.* (1998) bajas concentraciones de TDZ en general tienden a promover la formación de callo nodular compacto de color verde. Pelah (2002) trabajando con hojas cotiledonares y hipocótilo de pitahaya amarilla, con las concentraciones de 100, 200 y 440 mM, pudo observar formación de callo verde amarillento organogénico en la base proximal de los cotiledones. En el presente trabajo, utilizando explantes diferentes a los de Pelah *et al.* (2002), aréolas laterales de brotes provenientes de filocladodios maduros de la misma pitahaya amarilla, también se observó organogénesis indirecta. Los callos verdes y verdes morados de consistencia compacta obtenidos a partir de TDZ y TDZ con adición de BAP presentaron regeneración (Tabla 6). Estos dos estudios de organogénesis en *S. megalanthus* son los únicos reportados hasta el momento.

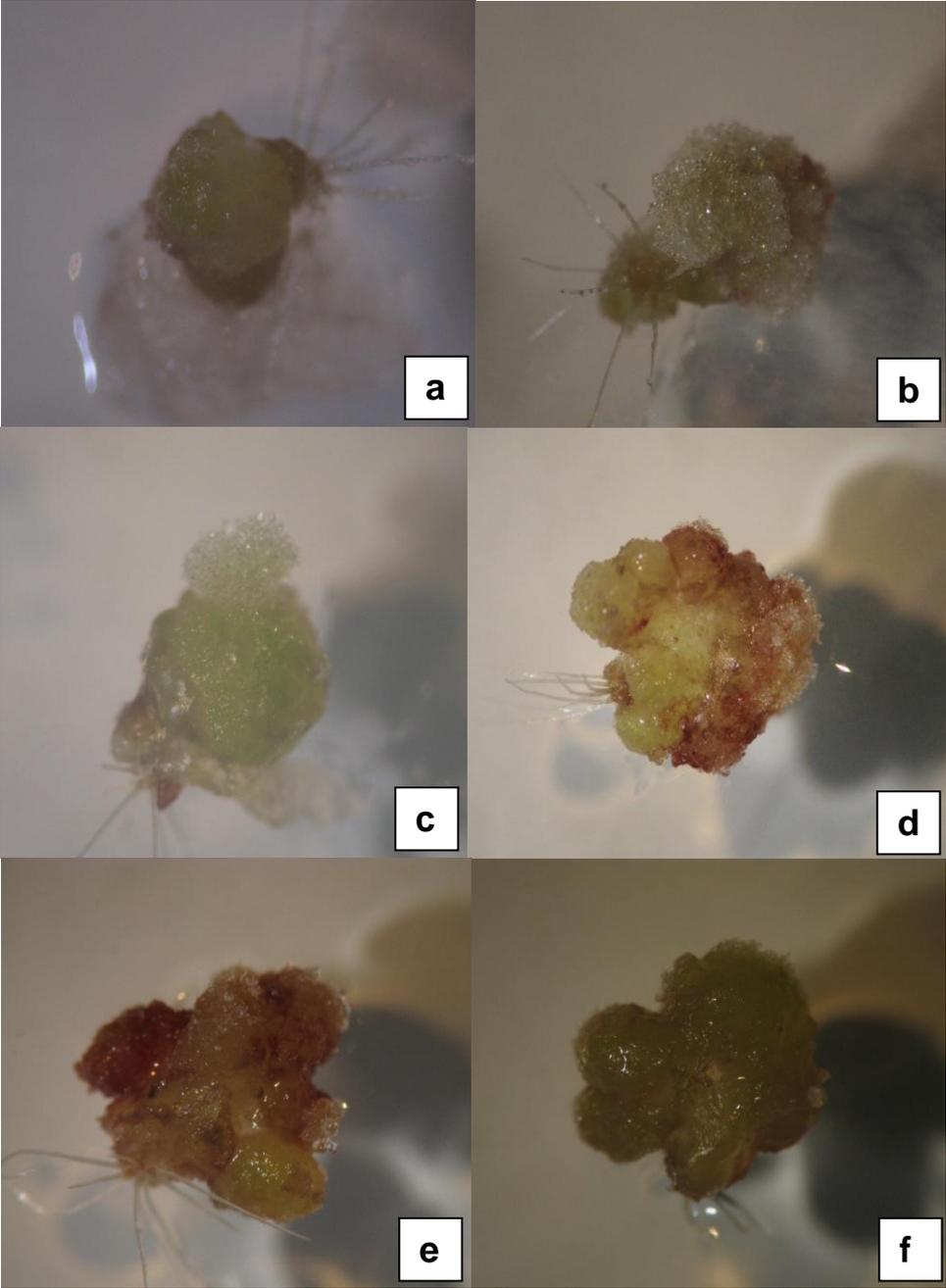
**Figura 11. Formación de callos no regenerantes en los tratamientos con 2,4-D: tratamientos 1(a), 2 (b) y 3 (c), y 2,4D combinado con BAP, tratamientos 4 (d), 5 (e) y 6 (f), sometidos a condiciones de luz.**



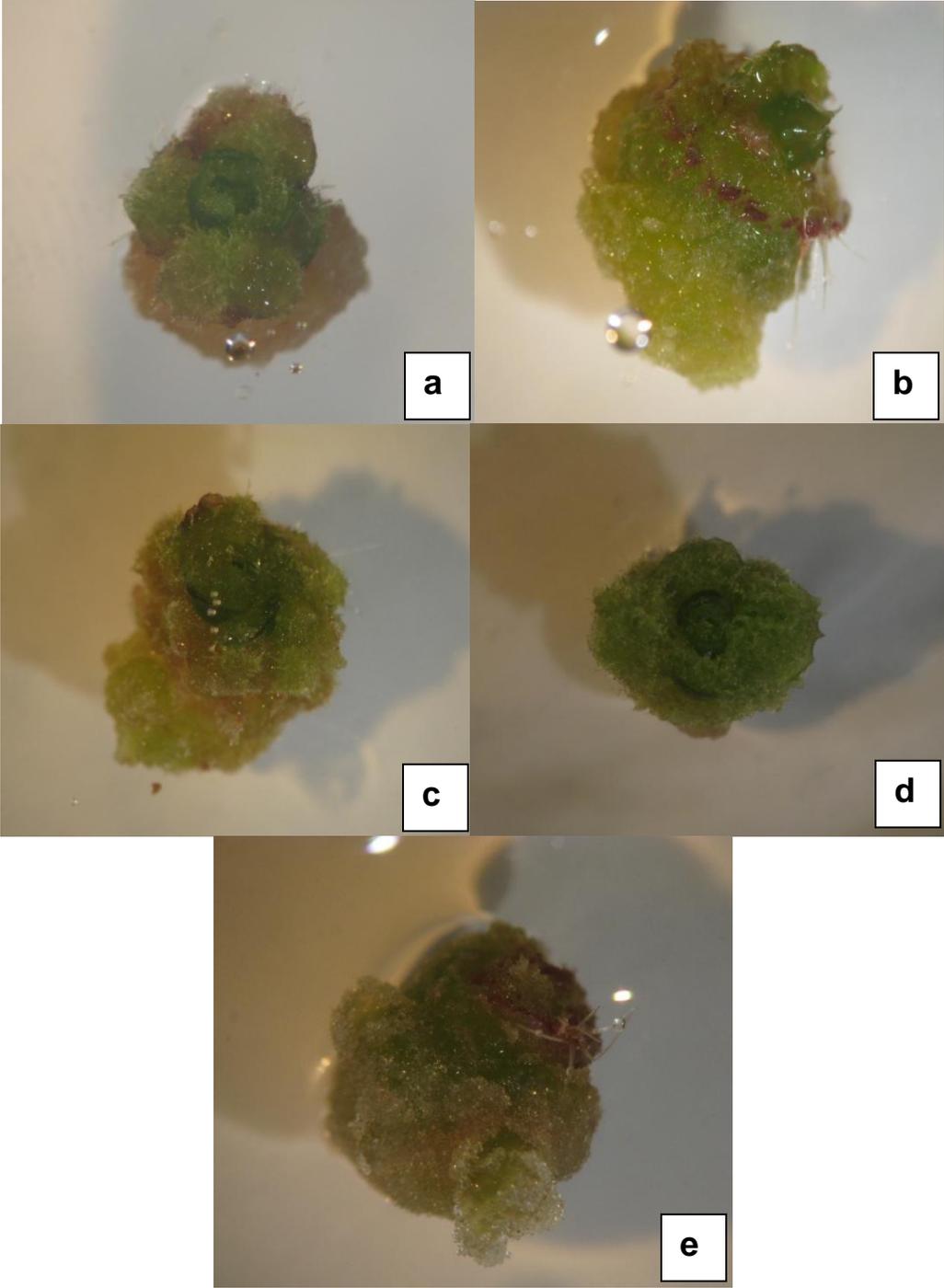
**Figura 12. Formación de callos viables en los tratamientos con TDZ: tratamientos 7 (a), 8 (b) y 9 (c), y TDZ combinado con BAP, tratamientos 10 (d), 11 (e) y 12 (f), sometidos a condiciones de luz.**



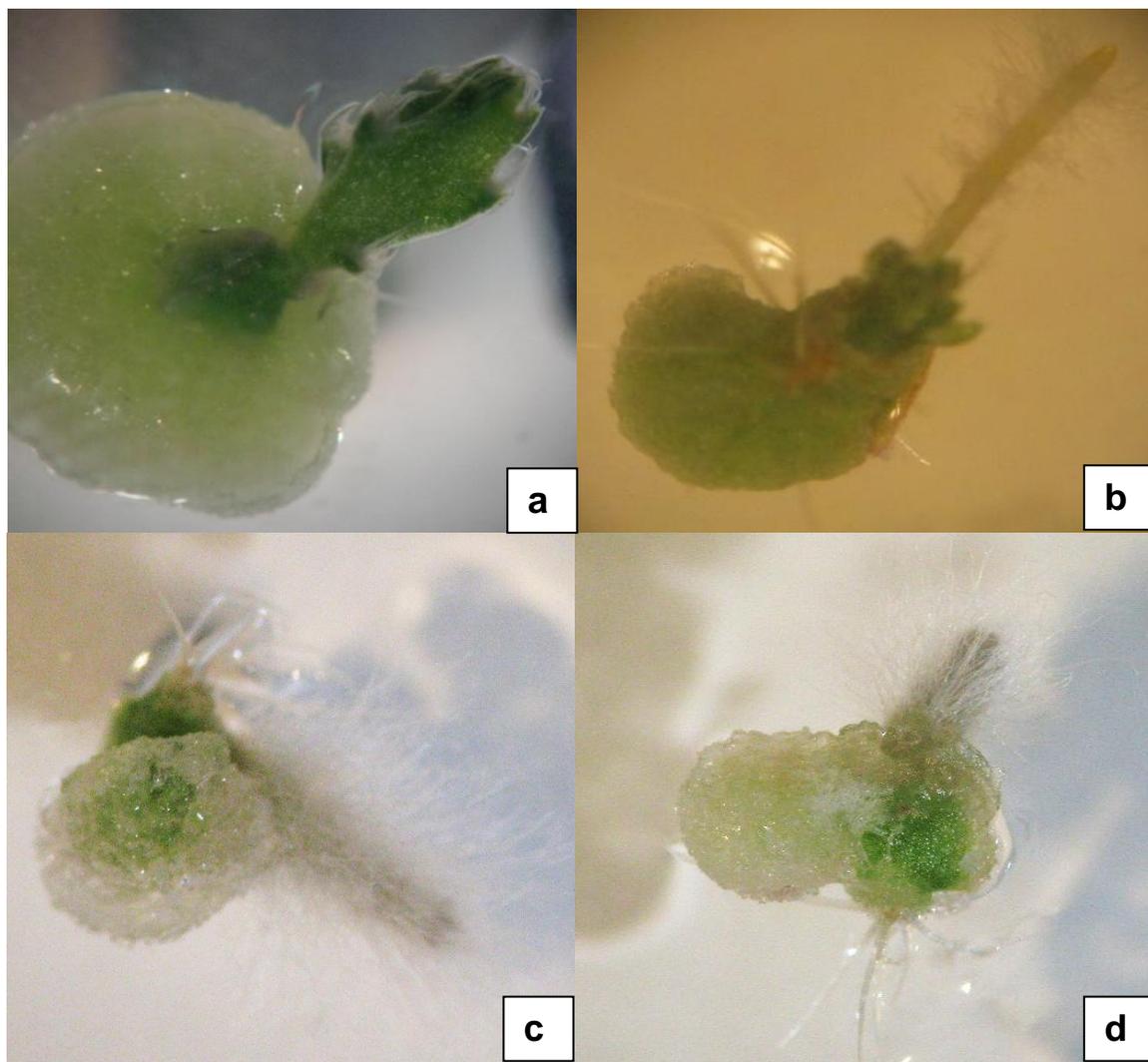
**Figura 13. Formación de callos no regenerantes en los tratamientos con 2,4-D: tratamientos 1 (a), 2 (b) y 3 (c), y 2,4D combinado con BAP, tratamientos 4 (d), 5 (e) y 6 (f), sometidos a condiciones de oscuridad.**



**Figura 14. Formación de callos regenerantes en los tratamientos en los tratamientos con TDZ: tratamientos 8 (a) y 9 (b), y TDZ combinado con BAP, tratamientos 10 (c), 11 (d) y 12 (e), sometidos a condiciones de oscuridad.**



**Figura 15. Tratamiento 13. En los controles de tratamiento con luz C1 (a), callo esponjoso con crecimiento de brote; C2 (b), callo esponjoso con brote y raíz; tratamientos en oscuridad C3 (c), callo esponjoso con formación de raíz y C4 (d) callo esponjoso con formación de raíz.**



Los callos formados en el control resultaron del tipo no organogénicos.

## 7.5 MANTENIMIENTO DE LOS CALLOS Y PROLIFERACIÓN DE BROTES

Los callos originados de los tratamientos 8 al 12, bajo condiciones de oscuridad, fueron utilizados para el mantenimiento y proliferación. El medio utilizado fue el MS (1962) sin fitoregulador por los 30 días iniciales. Luego, los callos se transfirieron por mas 30 días a medios con composiciones diferentes (MS1 a MS3), como se observa en la Tabla 7.

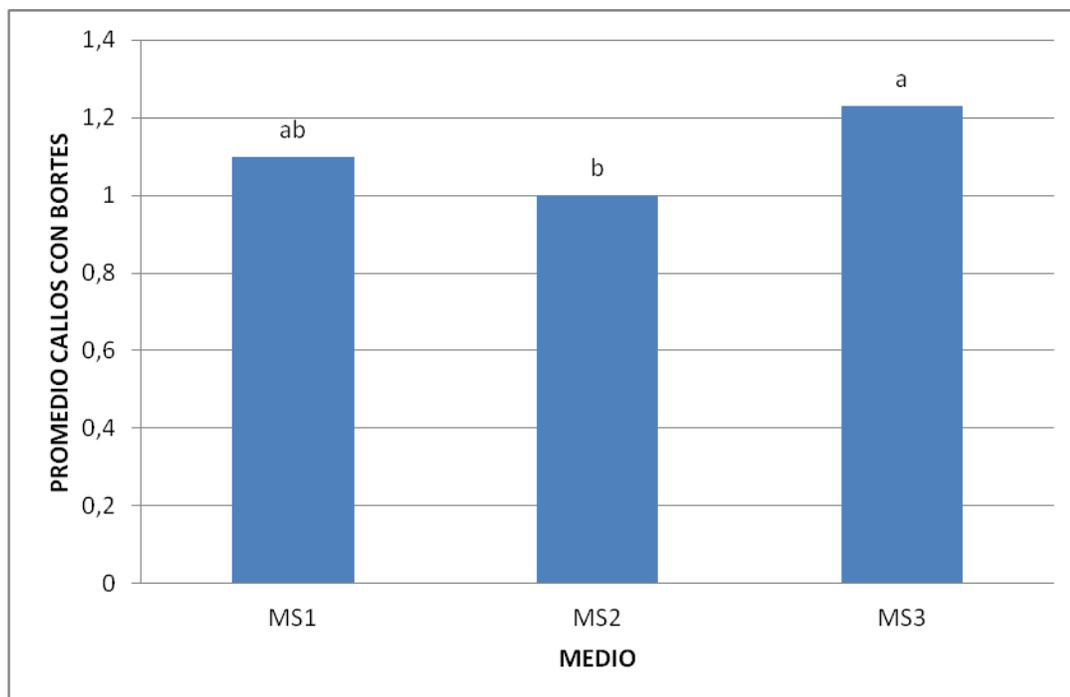
**Tabla 7. Composiciones de los medios utilizados para el mantenimiento de los callos y proliferación de brotes en pitahaya amarilla, después de 30 días en MS (1962).**

Identificación	Medio	Regulador crecimiento	Referencia
MS1	MS	BAP 0.5 $\mu$ M	Ángulo-Bejarano y Paredes-López, 2011
MS2	½ MS	0.05 mg/l de GA + 0.04 mg/l de BAP	Roca, 1984
MS3	MS	---	Pelah <i>et al.</i> , 2002

El medio MS3, al cual no se le adicionó ninguno tipo de fitoregulador, fue el que presentó mayor frecuencia de callos con formación de brotes. Esto es posible porque viene de una fase previa en medio con una alta concentración de regulador de crecimiento, y es parte de un proceso de habituación y expresión tardía del efecto del tratamiento previo. En algunos casos esto se usa para que se induzca los brotes y por efecto del cambio de nivel de reguladores de crecimiento se obtiene dicha respuesta en el explante. No se observó diferencia significativa entre MS1 y MS2, ni entre MS1 y MS3. Sin embargo, MS2 y MS3 presentaron diferencia significativa, como se observa en la Figura 16.

Resultados similares fueron obtenidos por Pelah *et al.* (2002), quien reportó también en *S. megalanthus*, que la mejor producción de brotes y elongación se obtuvo en medio MS (1962) sin fitoreguladores, comparado con MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP o GA. En el presente caso, se comparó MS sin fitoreguladores con el trabajo de Pelah *et al.* (2002) y hubo una respuesta similar encontrada por ese autor. A su vez, en *Opuntia ficus-indica*, Angulo-Bejarano y Paredes-López (2011) reportaron con el medio MS1 una media de dos nuevos brotes por explantes.

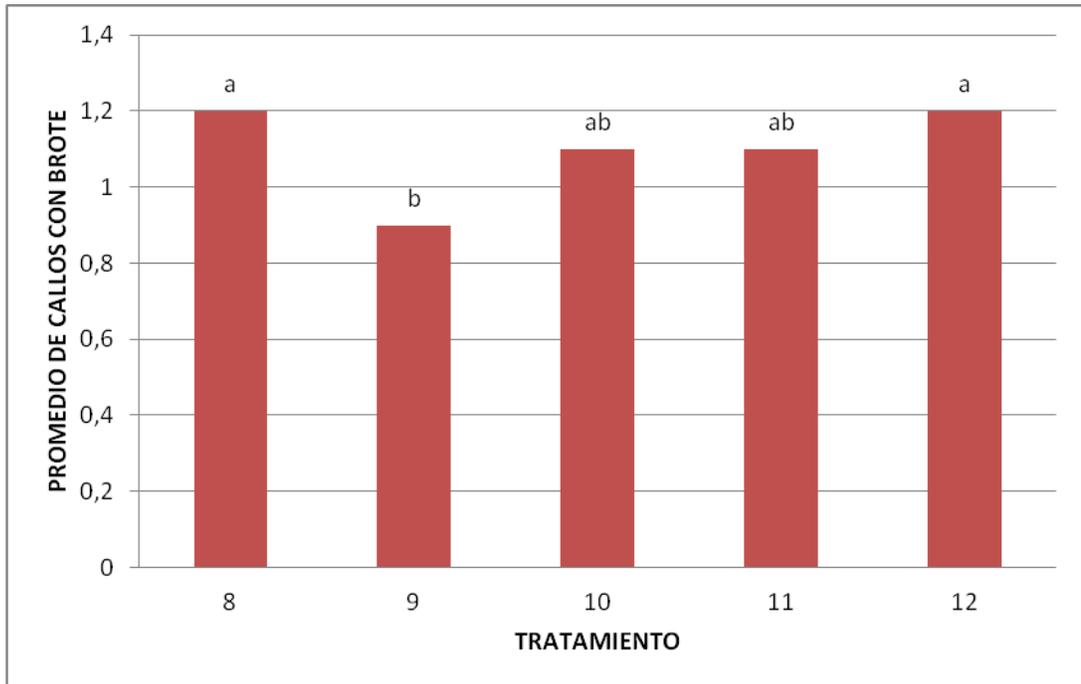
**Figura 16. Promedio de callos con brotes en pitahaya amarilla, en tres diferentes composiciones de medios, después de 30 días de siembra.**



La Figura17 muestra el promedio de callos con brotes por tratamientos. El tratamiento 12 (con 1.124) y el tratamiento 8 (1.123) presentaron los mayores promedios, seguidos del tratamiento 11 (1.099) y 10 (1.097). El tratamiento 9 (0.862) fue el de más bajo promedio. El tratamiento 8 suplementado con 300  $\mu\text{M}$ , mientras el 12, 400  $\mu\text{M}$  + 2,21  $\mu\text{M}$ .

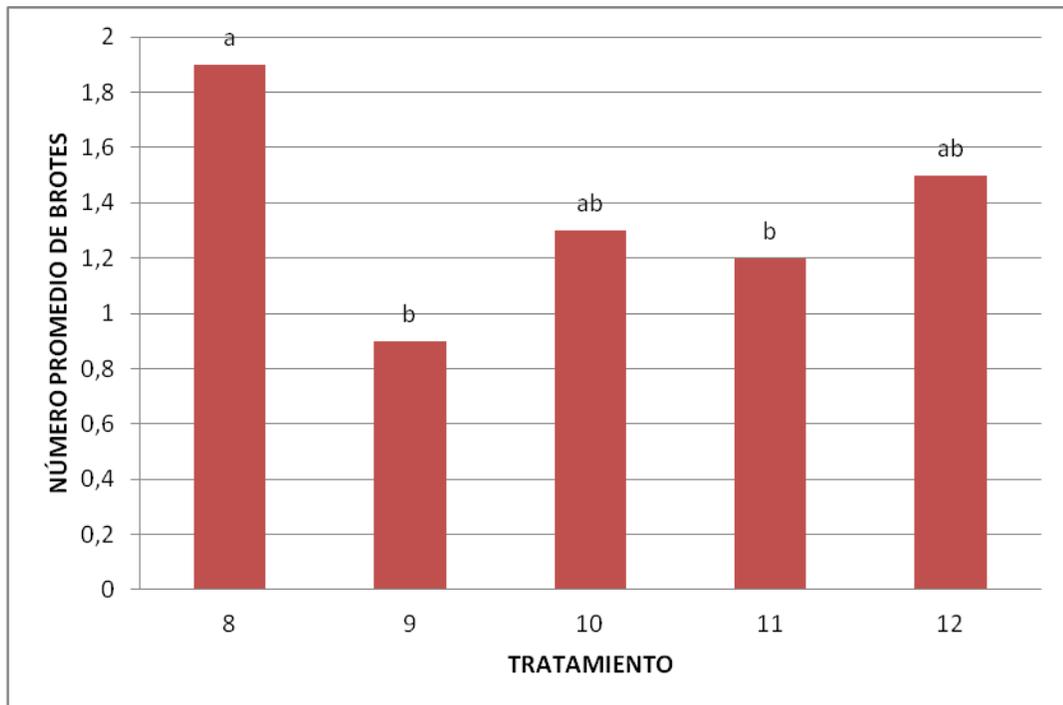
Pelah *et al.* (2002) afirma que en *S. megalanthus* el mayor número de explantes que lleven al menos a un brote y el mayor número de brotes se obtuvieron cuando la parte proximal de los cotiledones se cultiva con TDZ 200  $\mu\text{M}$  en una respuesta del 80 % de explantes con brotes. En el presente trabajo se pudo constatar que las aréolas tratadas en medios con TDZ en concentraciones de 300  $\mu\text{M}$  presentaron un promedio de 1.123 brotes/aréola.

**Figura 17. Promedio de callos con brotes en pitahaya amarilla, en los tratamientos de TDZ, después de 30 días de siembra.**



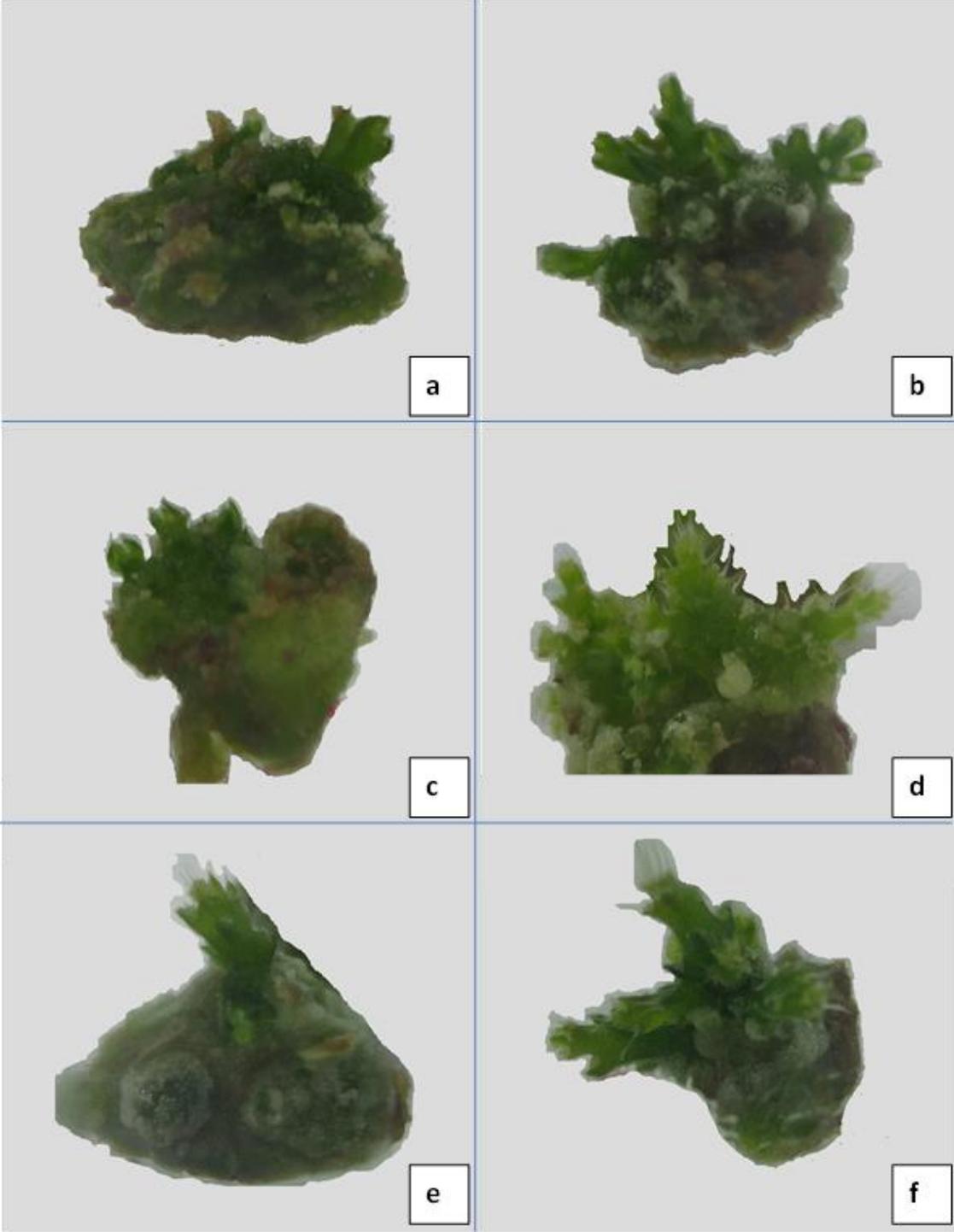
Para el número promedio de brotes, el tratamiento 8 (con 1.876) lo presentó más elevado que los demás, y le siguieron el tratamiento 12 (1.549) y el tratamiento 10 (1.336) (Figura 18). Estos se separaron en un grupo, mientras el tratamiento 11 (con 1.2398) y el tratamiento 9 (0.934) formaron otro grupo. Bhau (1999) en *Coryphantha elephantidens* obtuvo la formación de 1.7 brotes por callo por medio de 2,4-D a 2.2 mM y Kn a 4.6 mM, después de 4 semanas de siembra.

**Figura 18. Promedio de brotes de pitahaya amarilla por tratamiento, después de 30 días de siembra.**



En la Figura 19 se observa los callos con brotes formados en sus respectivos tratamientos. El número de brotes por callo por tratamiento varió desde uno hasta cuatro. Esta variación ocurrió dentro del mismo tratamiento, y también entre tratamientos. A ejemplo, en el tratamiento 8 (con TDZ a la concentración intermedia, 300 $\mu$ M) hubo callo que presentó un brote (Figura 19a), mientras en otro se formaron cuatro brotes (Figura 19b). Sin embargo, su promedio de brotes formados fue superior a todos los demás tratamientos. Los tratamientos 12 y 10, que le siguen (Figura 18), presentan en su composición TDZ con BAP (400  $\mu$ M + 2,21  $\mu$ M; 200  $\mu$ M + 2,21  $\mu$ M, respectivamente). La diferencia observada con respecto al número de brotes entre el tratamiento 12 y el tratamiento 10 posiblemente se deba a un efecto de concentración que de sinergia de reguladores de crecimiento. A su vez, la eficiencia de respuesta presentada por el tratamiento 8 muestra que el TDZ solo es capaz de inducir regeneración a la concentración de 200 $\mu$ M y que no siempre hay efecto sinérgico entre TDZ y BAP.

**Figura 19. Formación de brote a partir de callos, en los diferentes tratamientos. a, callo con un brote y b, con cuatro brotes, tratamiento 8; c, con tres brotes, tratamiento 9; d, cuatro brotes, tratamiento 10; e, un brote, tratamiento 11; f, dos brotes, tratamiento 12.**



## 7.6 EFECTO DEL TIPO DE EXPLANTE

Diversas estructuras vegetales han sido trabajadas como explantes en las cactáceas. Bhau (1999) obtuvo regeneración en *Coryphantha elephantidens* a partir de explantes de raíces. Llamoca-Zárate *et al.* (1999) reportó cultivos de callo a partir de cotiledones y hipocótilos de *Opuntia ficus-indica*. Pelah *et al.* (2002) utilizó hojas cotiledonares y hipocótilo de *S. megalanthus*; con la parte proximal de la hoja cotiledonar pudo obtener efectiva regeneración. Gomes *et al.* (2006) presentaron un método para la regeneración de la chumbera (*Opuntia ficus-indica*) a través de ES, induciendo el cultivo de brotes de ápices en medio basal MS. También en *Opuntia ficus-indica* var. "Blanco sin Espinas", Angulo-Bejarano y Paredes-López (2011) obtuvieron un protocolo de regeneración por organogénesis indirecta, a partir de cladodios.

El explante ensayado en este trabajo mostró ser una buena alternativa para la regeneración y propagación de *S. megalanthus* por ser una zona meristemática y presentarse en gran cantidad en la planta. Además, fue efectivo con diferentes tratamientos, donde varió el tipo de fitoregulador (TDZ, o TDZ + BAP), la concentración (tres concentraciones) y la combinación de ambos los factores. La Tabla 8 muestra el número de callos regenerantes y de brotes producidos según el tipo de explante (aréola *in vitro* y campo), en las diferentes concentraciones de fitoreguladores utilizados en el presente estudio.

**Tabla 8. Número de callos regenerantes y de brotes producidos según el tipo de explante (aréola *in vitro* y campo), en las diferentes concentraciones de fitoreguladores.**

Explante	Fitoregulador	Concentración $\mu\text{M}$	No. Callos regenerantes producidos	No. Brotes producidos
Aréola <i>in vitro</i>	2,4 D	2.26	0	0
		3.26	0	0
		4.26	0	0
	2,4 D / BAP	2.26/2.21	0	0
		3.26/2.21	0	0
		4.26/2.21	0	0

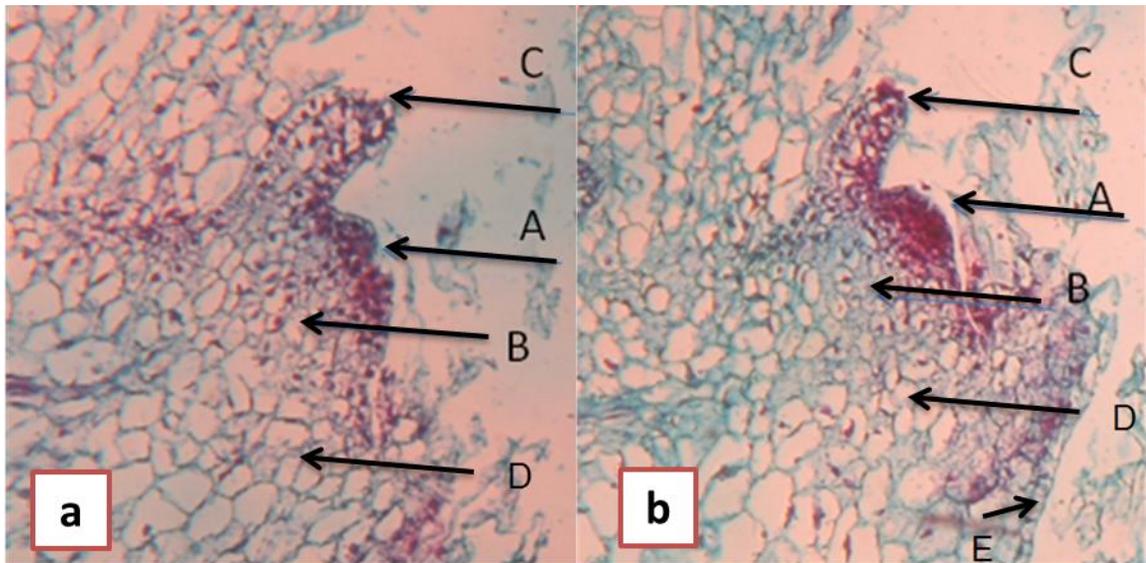
<b>vitro</b>		200	2,23	0
	TDZ	300	1,87	1,9
		400	2	0,9
		200/2.21	2	1,3
	TDZ/BAP	300/2.21	2,5	1,2
		400/2.21	2,17	1,5
<b>Aréola campo</b>	TDZ	300	2	0

## 7.7 ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LOS CALLOS REGENERANTES

El protocolo inicialmente propuesto para el análisis histológico de los callos capaces de regenerar brotes no mostró buena definición de las estructuras vegetales. Muy posiblemente esto se debió porque los procesos de fijación y deshidratación no fueron suficientes para contrarrestar el alto contenido de agua presente en los callos. Por lo tanto, se dificultó las etapas siguientes, de corte de los callos y de tinción. Al contrario, con un protocolo adaptado (ANEXO 2), desarrollado en este trabajo, se evidenciaron los tejidos de base y primordios de brotes en los callos regenerantes (Figura 19). En este protocolo la etapa clave fue un secado en horno a 60°C entre el corte al micrótopo y la tinción por Safranina y Fast Green.

En la Figura 20 se observa un callo y el origen de un meristemo primario, que se constituye primordios de un brote. Se distinguen también las células del callo, células parenquimatosas desorganizadas con grandes espacios en el interior de la célula, células de la túnica, meristemo apical, primordios de un brote y epidermis. Las células parenquimatosas son evidencia de que el tejido desorganizado en la base (callo) pudo originar a estructuras diferenciadas (brotes), confirmando la regeneración vía organogénesis indirecta.

**Figura 20. Tejidos y primordios de brotes obtenidos a partir de callos regenerantes.**



En a y b, las flechas indican las siguientes estructuras: túnica (A), meristemo apical (B), primordios de brote (C), células del parénquima (D) y epidermis (E). Tinción con Safranina y Fast Green.

## **7.8 PROTOCOLO DE REGENERACIÓN *IN VITRO* DE *Selenicereus megalanthus***

En el presente trabajo se pudo establecer un protocolo de regeneración *in vitro* en pitahaya amarilla utilizando como explante las aréolas laterales de filocladodios jóvenes, preferentemente colectados de plantas desarrolladas por germinación de semillas sexuales.

### **7.8.1 Organogénesis en pitahaya amarilla a partir meristemos de brotes obtenidos de plántulas desarrolladas de semillas sexuales**

Una vez obtenidas de frutos maduros, se separan las semillas de la pulpa y se procede de la siguiente manera:

- a. Lavado con solución de Tween 20 al 0.1% por 10 minutos, en un Baecker
- b. Lavado con H<sub>2</sub>O destilada estéril y posteriormente con alcohol al 70% por 30 segundos
- c. Lavado con H<sub>2</sub>O destilada estéril y posteriormente con hipoclorito de sodio al 2% por 10 minutos

- d. Lavado con H<sub>2</sub>O destilada estéril por 30 segundos
- e. Siembra de las semillas de pitahaya amarilla en cajas de Petri con papel filtro con H<sub>2</sub>O para germinar, en condiciones de temperatura promedio de 26°C y humedad relativa promedio de 70 - 80 %
- f. Propagación *in vitro* de hojas cotiledonares y hipocótilos para formación de brotes, como descrito por Suárez Román (2011), de los cuales serán extraídas las aréolas como explantes
- g. Transferencia de los explantes para medio de inducción a callo, compuesto por MS (1962) suplementado con TDZ en la concentración de 300  $\mu$ M, distribuido en cajas de Petri (25 ml/caja). Los explantes se mantienen 20 días bajo condiciones de oscuridad, temperatura promedio 26°C, y 25 días en luz (fotoperiodo 16/8), temperatura promedio 26°C.
- h. Siembra de los callos formados en un medio MS (1962) sin reguladores de crecimiento, distribuido en frascos (30 ml/frasco), por 60 días, para la formación de brotes, bajo condiciones de luz (fotoperiodo 16/8), temperatura promedio 26°C.
- i. Siembra de los brotes resultantes de los callos regenerantes en medio MS (1962) suplementado con NAA, como descrito por Pelah *et al.* (2002), distribuido en frascos (30 ml/frasco), bajo condiciones de luz (fotoperiodo 16/8), temperatura promedio 26°C, hasta la producción de raíces.
- j. Transferencia de las plántulas a un sustrato en materas para aclimatación.

### **7.8.2 Organogénesis en pitahaya amarilla a partir de meristemas de brotes obtenidos de plantas adultas**

Para la organogénesis a partir de tejidos adultos se requiere:

- a. Colecta en campo de filocladodios maduros de pitahaya amarilla, empleándose cortes (en V), para la obtención de esquejes de 60 cm de largo
- b. Transporte de los esquejes al invernadero
- c. Desinfección de los esquejes en solución de detergente Tween 20 al 1% en agua destilada estéril, por 10 minutos
- d. Desinfección de los esquejes con un atomizador del fungicida Captan en la concentración de 0.5 g L<sup>-1</sup>.
- e. Mantenimiento de los esquejes en invernadero con temperatura promedio de 30°C, en materas plásticas con sustrato turba y arena 2:1 (previamente autoclavadas por 20 minutos, a 121°C y a una presión de 103 kPa)
- f. Riego a las materas con intervalo de tres días. Estas permanecieron en invernadero hasta el desarrollo de nuevos brotes (uno a cuatro meses)
- g. Desinfección por sumersión de aquellos filocladodios jóvenes (brotes) de pitahaya amarilla, desarrollados de las estacas mantenidas en invernadero, a través de una secuencia de lavados alternados en

detergente Tween 20 al 1 % (10 minutos), agua destilada (1 minuto), alcohol etílico al 70 % (1 minuto), agua destilada (1 minuto), hipoclorito de sodio al 3% (10 minutos), y finalmente en agua destilada (1 minuto)

- h.** Corte en V para obtención de los explantes (aréolas laterales, que corresponden a zonas meristemáticas), en cada brote joven (desarrollado en las condiciones de invernadero)
- i.** Siembra en frascos de los explantes en 30 ml de medio MS (1962) con la adición del fungicida Vitavax diluido en agua destilada, en la concentración de 7,4  $\mu\text{M}$ . Esos explantes deben permanecer por tres semanas en el medio con el fungicida, en cuarto de crecimiento en laboratorio de cultivo *in vitro*, bajo condiciones de luz (fotoperiodo 16/8), temperatura promedio 26°C
- j.** Siembra de los mismos explantes en nuevos frascos con 30 ml de medio MS por un periodo de un mes, bajo las mismas condiciones ambientales
- k.** Transferencia de los explantes para medio de inducción a callo, compuesto por MS (1962) suplementado con TDZ en la concentración de 300  $\mu\text{M}$ . Los explantes se mantienen 20 días bajo condiciones de oscuridad (0/24), temperatura promedio 26°C, y 25 días en luz (fotoperiodo 16/8), temperatura promedio 26°C
- l.** Siembra de los callos formados en un medio MS (1962) sin reguladores de crecimiento, por 60 días, para la formación de brotes, bajo condiciones de luz (fotoperiodo 16/8), temperatura promedio 26°C
- m.** Siembra de los brotes resultantes de los callos regenerantes en medio MS (1962) suplementado con NAA, como descrito por Pelah *et al.* (2002), bajo condiciones de luz (fotoperiodo 16/8), temperatura promedio 26°C, hasta la producción de raíces
- n.** Transferencia de las plántulas a un sustrato en materas para aclimatación.

## CONCLUSIONES

Se estandarizó el protocolo de organogénesis indirecta en pitahaya amarilla. El explante ensayado (aréola) presentó una buena respuesta a los estímulos, se constituyendo en una buena alternativa, por tratarse de una zona meristemática presente en gran cantidad en la estructura vegetativa de la planta (filocladodio).

La ruta de regeneración observada en el presente trabajo es la organogénesis indirecta y abre la posibilidad a la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira de dar inicio a un trabajo de transformación genética mediada por esta respuesta, para resistencia a nematodos o a la pudrición basal del fruto en pitahaya amarilla.

A diferencia del 2,4-D, que fue efectivo en la inducción de callo pero sin capacidad de regenerarse, el TDZ fue eficiente en la regeneración vía organogénesis indirecta en pitahaya amarilla, con mejor comportamiento a una concentración de  $300\mu\text{M}$ .

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKA S. 2003. Harvesting of economically important edible exotic plant species series 20: *Asparagus officinalis*, *Hylocereus undatus*, *Persia americana* and *Stevia rebaudiana*. MFP News 13: 20-21.

AL-RAMAMNEH E. AI-D., SRISKANDARAJAH S., SEREK M. 2006. Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Schlumbergera truncate*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84: 333–342.

ANDERSON E.F. 2001. The Cactus Family. Timber Press. Portland. Oregon. 634p.

ANGULO-BEJARANO P.I., PAREDES-LÓPEZ O., 2011. Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). Scientia Horticulturae 128: 283–288.

APHIS. 2002. Importation of fresh yellow pitahaya *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vauel) Moran) into the Continental United States from Colombia. [en línea]. United States Department of Agriculture. [26 de abril del 2012].  
Disp. en:  
[https://web01.aphis.usda.gov/oxygen\\_fod/fb\\_md\\_ppq.nsf/0/4e4cb3945e96f10085256d6a0059c510/\\$FILE/CO-YellowPitayaJul8-2002.pdf](https://web01.aphis.usda.gov/oxygen_fod/fb_md_ppq.nsf/0/4e4cb3945e96f10085256d6a0059c510/$FILE/CO-YellowPitayaJul8-2002.pdf)

BARCENAS, P. 1994. Effect of three substrates on rooting and development of pitahaya (*Hylocereus undatus*). En: Proceeding of the Interamerican Society for tropical Horticulture, vol. 38, p. 120-121.

BHAU B.S. 1999. Regeneration of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. (Cactaceae) from root explants. Scientia Horticulturae 81: 337-344.

BRITTON N.L., ROSE J.N. 1920. The Cactaceae: descriptions and Illustrations of Plants of the Cactus Family. Vol II. The Carnegie Institution of Washington. 212p.

CAETANO C.M., PROPITAYA. 2006. Identificación y caracterización de recursos genéticos y fitoquímicos de pitahaya en Colombia. Convocatoria Nacional para la Cofinanciación de Programas y Proyectos de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación para el Sector Agropecuario por Cadenas Productivas. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 98p.

CAETANO C.M. 2010. Identificación y caracterización de recursos genéticos y fitoquímicos de pitahaya en Colombia. Informe final. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural & Asohfrucol. 132p.

CAETANO, C.M., SANDOVAL, C.L. 2012. Descriptores morfológicos para pitahaya amarilla y especies cercanas. En: C.M. CAETANO & CARDOZO C. C.I. (eds.), UNAL sede Palmira, Colombia. Cuadernos de Recursos Fitogenéticos Neotropicales V. I: 9-33.

CALIX DE DIOS, H. y CASTILLO-MARTINEZ, R. Soportes vivos para pitahaya en sistemas agroforestales. En: Revista Agroforestería en las Americas. 2004, no. 28.

CHEN G., XIE X., LIN Y. 2003. Tissue culture techniques for *Hylocereus undatus* fruit crop. South China Fruits 32: 31.

CISNEROS A., TEL-ZUR N. 2010. Embryo rescue and plant regeneration following interspecific crosses in the genus *Hylocereus* (Cactaceae). Euphytica 174: 73–82.

CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL. 1998. Boletín CCI Exótica No. 5. Enero - Marzo. 12p.

DÁVILA-FIGUEROA C.A., ROSA-CARRILLO M.A.L., PÉREZ-MOLPHE-BALCH E. 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *turbinicarpus* (Cactaceae). In Vitro Cell Dev Biol Plant 41: 540–545.

DREW R., AZIMI M. 2002. Micropropagation of Red Pitaya (*Hylocereus undatus*). Acta Horticulturae 575: 93-98.

EAPEN S., TIVAREKAR S., GEORGE L. 1998. Thidiazuron-induced shoot regeneration in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 53: 217–220.

ESQUIVEL P. 2004. Los frutos de las Cactáceas y su potencial como materia prima. Agronomía Mesoamericana 15: 215-219.

ESTRADA-LUNA A., MARTINEZ-HERNANDEZ, J.; TORRES-TORRES, M. y CHAMBLÉ-MORENO F. 2008 *In vitro* micropropagation of the ornamental pricklypear cactus *Opuntia lanígera* salm-Dick and effects of sprayed GA3 after transplatation to ex vitro conditions. En: Scientia Horticulturae, vol 117, no 4, p. 378-385.

FERREIRA GOMES F.L.A., HEREDIA F.F., SILVA P.B., FACO O., CAMPOS, F.A.P. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *Scientia Horticulturae* 108: 15–21.

GARCÍA-SAUCEDO P. A., VALDEZ-MORALES M.; VALVERDE M. E., CRUZ-HERNÁNDEZ A., PAREDES-LÓPEZ O. 2005. Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 80: 215–219.

GANESHAN S., CHODAPARAMBIL S. V., BAGA M., FOWLER D. B., HUCL P., ROSSNAGEL B. G., CHIBBAR R. N. 2006. In vitro regeneration of cereals based on multiple shoot induction from mature embryos in response to Thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85: 63–73.

GALLO-MEAGHER M., ENGLISH R. G., ABOUZID A. 2000. Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36:37–40.

GEORGE E. F., HALL M. A., KLERK G. J. 2008 *Plant propagation by tissue culture*. Springer. 3<sup>rd</sup> edition P.501

GIUSTI P., VITTI D., FIOCCHETTI F., COLLA G., SACCARDO F., TUCCI M. 2002. In vitro propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 95: 319–332.

GOMES F. L. A. F., HEREDIA F. F., SILVA P. B., FACÓ O., CAMPOS F. A. P. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *En Scientia Horticulturae* 108 p 15–21

GRAHAM, E. y NOBEL, P. 2005 Daily changes in stem thickness and related gas exchange patterns for the hemipiphytic cactus *Hylocereus undatus*. *En: International Journal of Plant Sciences.*, vol. 166, no. 1, p. 13-20.

GUO B., ABBASI B.H., ZEB A., XU L.L., WEI Y.H. 2011. Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology* 10: 8984-9000.

HARTMAN H., KESTER D.E. 1972. *Propagación de plantas: principios y prácticas*. Edición Revolucionaria, Instituto Cubano del Libro. 693p.

HOFFTLAN, A. *Cactaceasen la flora silvestre de Chile*. Consultado en [en línea] Ed. Fund. Claudio Gay. 1989. p. 14-69

HUANG, Q. 2002. In vitro culture of prism of *Hylocereus undatus*. *En: Fujian Journal of Agricultural Sciences*, vol. 17, no. 3, p. 186-189

HUSAIN M.K., ANIS M., SHAHZAD A. 2007. In vitro propagation of Indian Kino (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using Thidiazuron. In Vitro Cell Dev Biol Plant 43:59–64.

ICONTEC. 1996. Norma Técnica Colombiana 3554. Frutas frescas. Pitahaya amarilla. 11p.

INFANTE, R. 1992. In vitro axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitahaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). En Plant Cell, Tissue and Organ Culture, vol. 31, no 2, p. 155-159.

KHURANA-KAUL V., KACHHWAHA S., KOTHARI S.L. 2010. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to Thidiazuron and high copper contents in the medium. Biologia Plantarum 54: 369-372.

LLAMOCA-ZARATE, R. M., STUDART-GUIMARÃES C., LANDSMANN J., CAMPOS, F.A.P. 1999. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Opuntia ficus-indica*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 58: 155–157.

LLANO GOMEZ E. 1952. Propagación de plantas. Colinagro LTDA. Bogotá, Colombia. 156p.

LÓPEZ-GÓMEZ R., DÍAZ-PÉREZ J., FLORES-MARTÍNEZ G. 2000. Vegetative propagation of three species of cacti: pitaya (*Stenocereus griseus*), tunillo (*Stenocereus stellatus*) and jiotilla (*Escontria chiotilla*). Agrociencia 34: 363-367.

MALDA G., SUZÁN H., BACKHAUS R. 1999. In vitro culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. Scientia Horticulturae 81: 71–87.

MARTÍNEZ-CÁRDENAS M. L., C. A., CARMONA A., G., VARELA H. y M. C. CABRERA J. 2003. Germination studies on *Stenocereus griseus* and *Escontria chiotilla*. Acta horticulturae. p 598: 39-4

MEDEIROS L. A., RIBEIRO R. C. S., GALLO L. A., OLIVEIRA E. T., DEMATTE M. E. S. P. 2006. In vitro propagation of *Notocactus magnificus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84: 165–169.

MOBOT. 2012. *Selenicereus megalanthus*. [en línea]. Missouri Botanical Garden. New York. [10 de marzo del 2012]. Disponible en: [www.tropicos.org](http://www.tropicos.org).

MOEBIUS-GOLDAMMER K. G., MATA-ROSAS M., CHÁVEZ-AVILA, V. M. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus*

*kotschoubeyanus* (Lem) K. Schum (Cactaceae), an endemic and endangered mexican species. In Vitro Cell Dev Biol Plant 39:388–393.

MOHAMED-YASSEEN Y. 2002. Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose). In Vitro Cellular Dev Biol Plant 38: 427-429.

MURCH H. LI S. J., SAXENA P. K. 2000. Thidiazuron-induced de novo shoot organogenesis on seedlings, etiolated hypocotyls and stem segments of Huang-qin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 62: 169–173.

MURTHY B. N. S., MURCH S. J. y SAXENA P. K. 1998. Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. In Vitro Cell Dev Biol Plant 34: 267-275.

NERD, A.; SITRIT, Y.; KAUSHIK, R. y MIZRAHI, Y. High summer temperatures inhibit flowering in vine pitahaya crops (*Hylocereus* spp.). En: Scientia Horticulturae 2002, vol. 96, no. ¼, p. 343-350.

NERD, A. y NEUMANN, P. Phloem water transport maintains stem growth in a drought-stressed crop cactus (*Hylocereus* spp.). En: Journal of the American Society for Horticultural Science 2004, vol. 129, no. 4, p. 486-490.

NOBEL, P. y BARRERA, E. High temperatures and net CO<sub>2</sub> uptake, growth, and stem damage for the hemiepiphytic cactus *Hylocereus undatus*. En: Biotropica. 2002, vol. 34, no 2, p.225-23.

NOBEL, P. y BARRERA, E.; BEILMAN, D.; DOHERTY, J. y ZUTTA, B. Temperaturas limitaciones for cultivation of edible cacti in California. En: Madroño. 2002, vol. 49, no. 4, p. 228-236.

NOBEL, P. y BARRERA, E.; CO<sub>2</sub> Uptake by the cultivated hemiepiphytic cactus, *Hylocereus undatus*. En: Annals of Applied Biology. 2004, vol.144, no. 1, p. 1-8.

NOBEL, P. Parenquima-chlorenchyma water movement during drought for the hemiepiphytic cactus *Hylocereus undatus*. En: Annals of Botany. 2006, vol. 97, no. 3, p. 469-474.

ORTIZ, Y.; LIVERA, M.; COLINAS, M. y CARRILLO, J. Water stress and CO<sub>2</sub> exchange rate of pitahaya (*Hylocereus undatus*). En: Agrociencia. 1999, vol. 33, no. 4, p. 397-405.

ORDOÑEZ MEDINA, M. A. 2003. Propagación in vitro de *Mammillaria voburnensis* Scheer. (Cactaceae). Trabajo de grado Biólogo. Guatemala:

Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Biología.

PELAH D., KAUSHIK R., MIZRAHI Y., SITRIT Y. 2002. Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using Thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 71: 81-84.

PÉREZ-MOLPHE-BALCH E., DÁVILA-FIGUEROA, C. A. 2002. In vitro propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 38:73–78.

PÉREZ-MOLPHE-BALCH E., REYES M. E. P., RANGEL AMADOR E. V., RUIZ L. R. M., VIRAMONTES H.J.L. 1998. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 34:131-135.

PÉREZ-MOLPHE-BALCH E., REYES M. E. P., RANGEL AMADOR E. V., RUIZ L. R. M., VIRAMONTES H.J.L. 1998. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 34:131-135.

PIMIENTA, E.; MENA, S.; ROBLES, C. y PIMIENTA-BARRIOS, E. 2004, Relationship between storage carbohydrates, reducing sugar, growth and phenology of Queretaro pitahaya [*Stenocereus queretaroensis* (Weber) Buxbaum] En: *Revista Fitotecnia Mexicana*. Vol. 27, no. 1, p. 101-106

PRATHANTURARUG S., · SOONTHORNCHAREONNON N.,· CHUAKUL W., · PHAIDEE Y., · SARALAMP P. 2003. High-frequency shoot multiplication in *Curcuma longa* L. using Thidiazuron *Plant Cell Rep* 21: 1054–1059.

PREECE J.E., HUETTEMAN C.A., ASHABY W.C., ROTH P.L. 1991. Micro- and cutting propagation of silver maple I Results with adult and juvenile propagules. *J. Am. Soc. Hort. Sci* 116: 142-148.

RAMIREZ H. GUEVARRA M. E. ESCOBAR R. 2012 Cultivo de tejidos vegetales. Conceptos y prácticas. Universidad Nacional de Colombia p.

RAMIREZ-MALAGON, R.; AGUILAR-RAMIREZ, I.; BORODANENKO, A.; PEREZ-MORENO, L.; BARRERA-GUERRA, J. L.; NUÑEZ-PALENIUS, H. G.; OCHOA-ALEJO, N. 2007. In vitro propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactacea) *In vitro celular & Developmental Biology – Plant* December 2007, volume 43, Issue 6, p. 660-665

RAVEH, E.; NERD, A. y MIZRAHI, Y. Responses of two hemiepiphytic fruit crop cacti to different degrees of shade. En: *Scientia Horticulturae*. 1998, vol.73, no. 2-3 p. 151-164.

ROCA W. M. 1984 Cassava. In: Handbook of plant cell culture. Crop species. Pp.269-231 chapt. 10. vol. 2. Sharp W. R. Evans, D. A., Ammirato, P. V. and Yamada, Y. Eds. Macmillan, New York, USA

ROCA W., MROGINSKI L. 1991. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. En: ROCA, W. & MROGINSKI L. A. Ed. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Unidad de Investigación en Biotecnología y Unidad de Publicación, Cali, Colombia. 969p.

ROTH I. 1964. Micro técnica Vegetal. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. 87 p

RUBLUO A., MARÍN-HERNÁNDEZ T., DUVALA K., MÁRQUEZ-GUZMÁN A. J. 2002. Auxin induced morphogenetic responses in long-term *in vitro* subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). *Scientia Horticulturae* 95: 341–349.

SALISBURY F. B., ROSS C. W. 1992. Fisiología Vegetal. Grupo editorial Iberoamerica S. A. de C. V. 759 p.

SANTOS-DIÁZ M. DEL S., MÉNDEZ-ONTIVEROS R., ARREDONDO-GÓMEZ A., SANTOS-DÍAZ M. L. 2003. In vitro organogenesis of *Pelecycphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 39:480–484.

SEOL E., JUNG Y., LEE J., CHO C., KIM T., RHEE Y., LEE S. 2008. In planta transformation of *Notocactus scopa* cv. Soonjung by *Agrobacterium tumefaciens*. Genetic transformation and hybridization. En: *Plant Cell Rep.* 27:1197–1206

SILOS-ESPINO H., VALDEZ-ORTIZ A., RASCÓN-CRUZ Q., RODRÍGUEZ-SALAZAR E., PAREDES-LÓPEZ O. 2006 Genetic transformation of prickly-pear cactus (*Opuntia ficus-indica*) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 86:397–403

SUÁREZ ROMÁN R.S. 2011. Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt & Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt & Rose. Trabajo de grado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias – Fitomejoramiento. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. 250p.

SUÁREZ ROMÁN R.S., CAETANO C.M., RAMÍREZ H., MORALES J.G., PARRA SÁNCHEZ E. 2012. Protocolo para establecer ensayos de evaluación de daño por hongos en materiales de pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. Ex Vapel) Moran. En: C.M. CAETANO

& CARDOZO C. C.I. (eds.), UNAL sede Palmira, Colombia. Cuadernos de Recursos Fitogenéticos Neotropicales V. I: 34-40.

TAIZ L., ZEIGER E. 2002. Plant Physiology. Third Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 690 pp.

VARGAS-SANTIAGO G., ORTIZ-HERNÁNDEZ Y., & ALCÁNTAR-GONZÁLEZ G. 2003. Vegetative propagation of *Hylocereus undatus* and its relationship with substrate and IBA. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 48: 111-117.

WALLACE RS, GIBSON AC (2002) Evolution and systematics. In: Nobel PS (ed) *Cacti: biology and uses*. University of California Press, Berkeley, CA

WICHENCHOT S., JATUPORNPIPAT M., RASTALL R. A. 2010. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chemistry* 120: 850-857.

WYKA T.P., HAMERSKA M., WRÓBLEWSKA M. 2006. Organogenesis of vegetative shoots from in vitro cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 87:27–32.

ZHAO CHUNXIANG, ZHANG GUIZHEN , HUANG ZHAOLU , LIU MINGZHEN. 2008. Effects of media and IBA on stem cutting rooting of *Hylocereus undatus* cv. Vietnam. *Southwest China J Agric Sc* 18: 370-372.

## ANEXOS

### Anexo 4. Composición de los stocks utilizados para la preparación del medio básico MS (Murashige y Skoog, 1962)

Solución N	Compuesto	peso/100ml	Concentración final en el medio
1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	8.25 g	
	KNO <sub>3</sub>	9.5 g	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.85 g	50X
	K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.85 g	
2	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620 mg	
	MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	2.176 g	
	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	860 mg	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	25 mg	1000X
	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	25 mg	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.5 mg	
3	KI	75 mg	1000X
4	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	15 g	344.8X
5	Na <sub>2</sub> EDTA	746 mg	200X
6	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	557 mg	1mg/L
7	Inositol	800 mg	100mg/L

**Anexo 5. Procesamiento de muestras de callos de pitahaya amarilla para estudios histológicos descrito por (Roth, 1964)**

- a. Toma de muestras frescas
- b. Fijarlas en FAA (5 ml de formol al 37-40% : 90 ml de alcohol etílico al 75% : 5ml de ácido acético glacial P.A.) al menos durante 24 horas
- c. Seleccionar la muestra a procesar (callo con formación de brotes)
- d. Colocar las muestras en recipientes plásticos (casete o contenedor para deshidratación) debidamente identificados
- e. Se puede mantener en alcohol etílico al 75% por 10 o más horas hasta seguir el proceso de deshidratación que se muestra a continuación:

<b>Alcohol etílico 75% (ml)</b>	<b>Alcohol etílico 100% (ml)</b>	<b>TBA (alcohol butílico terciario (ml)</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Tiempo (hora)</b>
50		10	40 ml	1
50		20	30 ml	1
50		35	15 ml	1
50		50		1
	25	75		1
		100		1
		100		1
		100		1

- f. Incluir en Paraplast (parafina) a 57 - 60°C
- g. Hacer los cortes en el micróscopio de rotación a 10 micrómetros. Colocar los tejidos en el baño de flotación (baño María) agregándole 3 g de gelatina incolora sin sabor con agua a 60°C
- h. Después de recoger los tejidos en los portaobjetos, llevarlos al horno a 60°C para secar por el tiempo mínimo de 1 h
- i. Realizar el proceso de tinción con Safranina y Fast Green:

Xilol	2 min
Xilol	2 min
Alcohol etílico absoluto al 100%	2 min
Alcohol etílico absoluto al 100%	2 min
Alcohol etílico al 96%	2 min
Alcohol etílico al 70%	Enjuague rápido
Alcohol etílico + agua destilada	Enjuague rápido
Safranina al 1% en agua destilada	30 min
Agua destilada	Enjuague rápido
Alcohol de 70%	Enjuague rápido
Fast Green FCF al 0.5% en alcohol etílico de 75%	Enjuagues rápidos por varios segundos
Alcohol etílico al 100%	Enjuagues rápidos (observar tono de contraste)
Alcohol etílico al 100%	Enjuagues rápidos
Alcohol etílico al 100%	Enjuagues rápidos
Xilol	Enjuagues rápidos
Xilol	2 o más minutos (remover)
Xilol	2 o más minutos (remover)

- j. Montar con resina
- k. Observar en microscopio.

## Anexo 6. Análisis estadístico utilizando el programa SAS V 9.0

Análisis de varianza de callos formados a partir de aréolas laterales de plantas de pitahaya amarilla, crecidos sobre tres combinaciones diferentes de medio MS y reguladores de crecimiento.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F-VALOR</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Tratamiento</b>	4	0,15	6,04	0,0004
<b>Medio MS</b>	2	0,001	0,07	0,93
<b>Tratamiento*medio</b>	8	0,013	0,52	0,83

Análisis de varianza de callos con brotes en pitahaya amarilla, crecidos en tres combinaciones diferentes de medio MS y reguladores de crecimiento.

<b>Fuente de variación</b>	<b>de</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>de</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F-VALOR</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Tratamiento</b>		4		0,26	1,96	0,0004
<b>Medio MS</b>		2		0,27	2,06	0,93
<b>Tratamiento*medio</b>		8		0,059	0,45	0,83

Análisis de varianza de número promedio de brotes formados en callos de pitahaya amarilla, sembrados en tres combinaciones de medio MS y reguladores de crecimiento.

<b>Fuente variación</b>	<b>de</b>	<b>Grados libertad</b>	<b>de</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F-VALOR</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Tratamiento</b>		4		1,14	2,22	0.0785
<b>Medio Ms</b>		2		0,75	1,46	0.2401
<b>Tratamiento*medio</b>		8		0,24	0,48	0.8638