

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POST-GRADO



**Inducción de germinación, crecimiento de plántula y cultivo
in vitro de pitahaya *Hylocereus undatus* (Haworth)**

Britton and Rose.

T E S I S

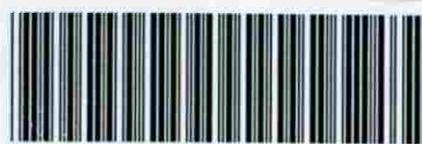
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BOTANICA**

POR:

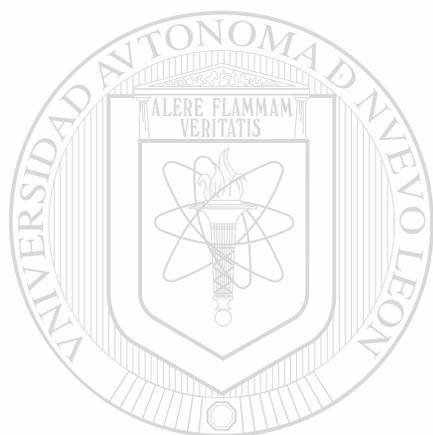
MARIA EUFEMIA MORALES RUBIO

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. MARZO 2000

TM
QK495
.C11
M6
2000
c.1



1080124407



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

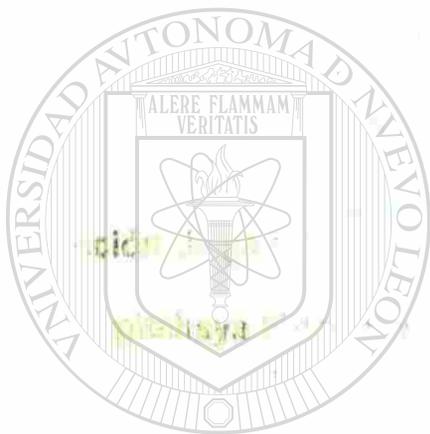


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



UANL

TESIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PARA OPTAR AL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON

ESPECIALIDAD EN BOTÁNICA

POR

MARIA EUFEMIA MORALES RUELO

COLAS DE LOS GARZA NL

MANEJO DE



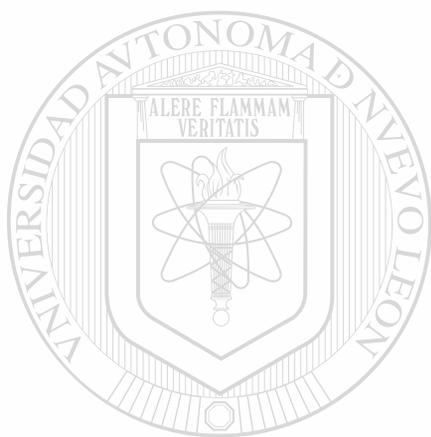
TM

QK495

.C11

M6

2000



UANL

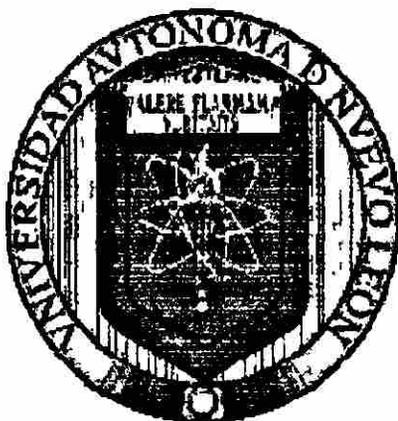
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**Inducción de germinación, crecimiento de plántula y cultivo *In vitro* de
pitahaya *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton and Rose.**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OPTAR AL GRADO DE

DIRECCIÓN MAestría EN CIENCIAS CON BIBLIOTECAS

ESPECIALIDAD EN BOTÁNICA

POR

MARIA EUFEMIA MORALES RUBIO

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA N.L.

MARZO 2000

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**Inducción de germinación, crecimiento de plántula y cultivo *in vitro* de
pitahaya *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton and Rose.**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON

ESPECIALIDAD EN BOTÁNICA

POR

MARIA EUFEMIA MORALES RUBIO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

COMISIÓN DE TESIS:

PRESIDENTE: M.C. TERESA E. TORRES CEPEDA _____

SECRETARIO: DRA. JULIA VERDE STAR _____

VOCAL: DR. ROBERTO MERCADO HERNÁNDEZ _____

DIR. EXTERNO: DRA. ELIZABETH CÁRDENAS CERDA _____

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA N.L.

MARZO 2000

DEDICATORIA

A mis padres, porque gracias a ellos, a su formación, su apoyo, consejos y cariño, estoy aquí.

A Papá, cuya presencia física no se encuentra entre nosotros le recuerdo:

Que aunque no podamos controlar el paso del tiempo, ni tampoco controlar nuestros propios destinos, ni los destinos de los que amamos, si podemos encontrar consuelo al saber que los que han vivido en nuestros corazones en realidad nunca se van, porque mientras los conservemos ahí ,siempre estarán con nosotros.

Porque el amor, que es eterno, nunca cesa de existir.

Mami: Para ti todo el amor del mundo y mucho más.

Gracias por tu comprensión, paciencia y gran amor, que siempre has sentido, tenido y demostrado para mi y mi familia, sin ti las cosas nunca se lograrían, gracias por tu entrega y apoyo incondicional.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Para mi Esposo, a quién amo: y con quien comparto todo, inclusive el gran amor a la Naturaleza, gracias por ser como eres, por tu apoyo, motivación, amor y paciencia.

A mis Hijos: Jair y Vanny a quienes adoro, gracias por su apoyo, y comprensión a mi trabajo, y gracias por ser los soles que iluminan mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A cada uno de mis asesores, por el apoyo, consejos y recomendaciones a este trabajo, gracias por su labor de revisión, asesoría y sobre todo por su espíritu positivo y de superación que siempre me brindaron.

Al Dr. Mario Morales Vallarta por permitirme trabajar y utilizar el equipo del Laboratorio de Biología Celular y Genética a su cargo.

A la M.C. Ma. Luisa Cárdenas Ávila, por su ayuda para la realización de esta investigación.

A la Dra. Azucena Oranday Cárdenas, por su constante apoyo y motivación imprescindible para la realización de todo proyecto personal y profesional.

Al Biol. Jaime Fco. Treviño Neávez por su apoyo profesional, sobre todo en la realización del trabajo fotográfico.

Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica PAICYT por haber aprobado el proyecto CN 166-99, porque gracias a dicha aportación económica se lograron varios de los objetivos de este trabajo.

ÍNDICE

	PÁGS.
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE Y UBICACIÓN TAXONÓMICA	5
GERMINACIÓN DE SEMILLAS	8
CULTIVO DE TEJIDOS	10
INDUCCIÓN DE CALLO	11
INDUCCIÓN DE BROTE	14
PROCEDIMIENTOS DE DESINFECCIÓN	16
REGULADORES DEL CRECIMIENTO	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	19
MATERIAL	20
METODOLOGÍA	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	37
APÉNDICE DE FOTOGRAFÍAS	39
LITERATURA CONSULTADA	46

RESUMEN

El fruto de la "pitahaya" *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton and Rose , es un recurso explotado en las zonas tropicales y subtropicales del país en forma semintensiva. Sin embargo existen pocos antecedentes correspondientes a la técnica de cultivo de tejidos y su capacidad de germinación bajo condiciones controladas y de estrés hídrico, por lo anterior la finalidad del presente trabajo fue obtener un conocimiento más amplio sobre estos aspectos de la especie, lo cual permitirá establecer las bases técnicas y científicas para su conservación como germoplasma, como fuente de material de micropropagación, para la obtención de alcaloides, colorantes, etc. En la etapa de germinación se usaron dos sustratos: perlita y suelo (50-50) y agar; para el cultivo *in vitro* se utilizó el medio de Murashige y Skoog, adicionándolo con dos auxinas y dos citocininas en combinaciones y concentraciones diferentes. Las auxinas empleadas fueron 2,4-D y NAA y las citocininas utilizadas fueron K (cinetina) y BAP. Se evaluó la respuesta de germinación , observándose el mejor porcentaje en aquellas germinadas bajo riego continuo. Así mismo se evaluó la respuesta morfogénica en cada tratamiento, resultando mejores las combinaciones de BAP(2 mg/l) y K (1 mg/l), BAP (3mg/l) y NAA (1 mg/l), para formación de brote y callo respectivamente Los resultados se evaluaron mediante análisis estadísticos.

SUMMARY

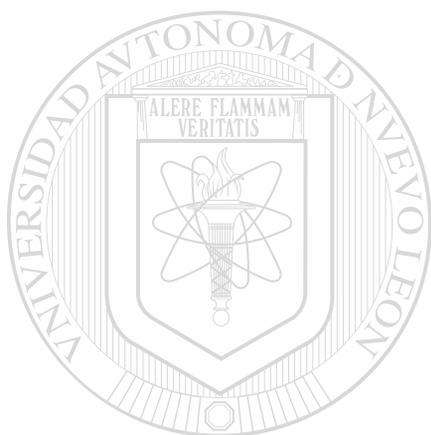
The fruit of "pitahaya" *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton and Rose, is a exploded resource in the tropical and subtropical areas of the country in more or less intensive form. The purpose of this study was to have a wider knowledge about this species, of which, few antecedents exist regarding to the tissue culture technique and its capacity germination under controlled conditions and water stress. This proyect will allow to settle down technical and scientific bases for its conservation as: germoplasm, a source of micropropagation material and alkaloids, coloring, etc. For germination, two media were used: a mixture of perlite and soil (50:50) and agar; was used for tissue culture, the of Murashige and Skoog (1962) (MS) medium, was supplemented with two auxins and two cytokinins in different combinations and concentrations, the auxins used were 2,4-D and NAA and the cytokinins used were K and BAP. It was evaluated 1) Germination response , best percentage being observed in those germinated under continuous watering, 2) Morfophogenetic response for each treatment , being best for bud formation combinations of BAP(2 mg/l) and K (1 mg/l), and for callus were BAP (3mg/l) and NAA (1 mg/l). The results were evaluated by statistical analysis.

INTRODUCCIÓN

Hablar de la importancia de las cactáceas productoras de frutos comestibles, que no sean tunas, implica referirse a varios géneros de la familia Cactaceae, que han jugado un papel importante en la cultura y alimentación del pueblo mexicano, desde el arribo de los primeros pobladores hasta nuestros días, y que no han recibido la atención que merecen. Varios de estos frutos son a la fecha desconocidos por los habitantes de muchas ciudades, pues su producción viene de colecta y por lo tanto su oferta es limitada, pero algunos tienen características valiosas que en últimos tiempos se han empezado a apreciar, tanto en el ámbito nacional como internacional; en general, se les conoce como frutas exóticas, ejemplos de estas son: pitahaya de Colombia (*Selenicereus megalanthus*), en México la pitahaya (*Stenocereus* sp), la pitahaya (*Hylocereus* sp), el garambullo (*Myrtillocactus* sp) y la jiotilla (*Escontria* sp). Las cactáceas citadas anteriormente cuentan con una serie de características anatómicas, morfológicas y fisiológicas, que les permiten desarrollarse en lugares donde la cantidad de agua y suelo son insuficientes para otros cultivos. Se considera que el mayor potencial lo tienen las especies del género *Hylocereus*, porque sus frutos no tienen espinas, son muy atractivos en sus colores interno y externos y tienen peso promedio muy similar a los deseados en los mercados, además, presentan un mayor período de vida útil después de cosechados. Asimismo, la planta tiene caracteres favorables para cultivarla bajo sistemas comerciales, es de fácil propagación y rápido crecimiento y con un rango amplio de adaptación en

regiones donde no se presentan daños por temperaturas inferiores a los 0 °C. (Cruz, 1997).

En particular la pitahaya orejona *H. undatus* produce un fruto grande, ovoide, escamoso y de color púrpuro; su pulpa es blanca con millares de semillas minúsculas y negras, su sabor es agradable y dulce La pitahaya tiene un amplio uso en las regiones tropicales y semitropicales de México y Centroamérica donde se cultiva en forma semintensiva, es apreciada en particular por su fruto grande y vistoso. (Bravo y Sánchez, 1978,a y Bravo y Scheinvar, 1995).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ANTECEDENTES

CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE Y POSICIÓN TAXONÓMICA

El reconocimiento taxonómico de las cactáceas sigue ciertos criterios fundamentales, Buxbaum (1953) presentó una propuesta filogenética de las Cactáceas columnares como es el caso del género *Hylocereus*, dicha propuesta ha sido aceptada por Bravo y Sánchez, (1978). y Sánchez, (1984). Gibson y Horak citados por Granado, (1997), publicaron sus estudios anatómicos sobre cactáceas columnares mexicanas y los unen con los morfológicos y químicos, y dan una nueva propuesta filogenética

Orden : Cactales

FAMILIA: Cactaceae

SUBFAMILIA: Cactoideae

TRIBU: Hylocereeae

SUBTRIBU : Hylocereinae

GENERO: *Hylocereus*

ESPECIE: *undatus*

Nombre vulgar: pitahaya

Bravo y Sánchez, (1978).

La pitahaya es una planta semiepipfita que suele crecer sobre otros árboles (Figura 1) pero siempre mantiene su conexión con el sustrato del que toma agua y nutrientes (Riha y Subik, 1981).

Morfológicamente la planta presenta tallos largos segmentados y ramificados, su color es verde intenso, desarrollando numerosas raíces aéreas con las que se fijan a los muros y árboles por los que trepan. Alcanzan una altura de hasta 5 metros y un diámetro de hasta 6 cm. Cada segmento puede tener una longitud de 50 cm; está conformado por tres costillas muy pronunciadas. Presenta de una a tres areolas cortas y gruesas y las espinas en número de 1 a 3. Con flores grandes, hasta 30 cm de longitud de color blanco en el interior y amarillo verdosas en el exterior con tintes purpúreos. Florecen desde agosto hasta septiembre, y crecen en suelo compuesto, añadido de un 25% de mantillo de hojas o turba enriquecida Bravo y Sánchez, (1978). Por otro lado en algunos lugares del trópico seco se cultiva pitahaya orejona en huertos familiares, debiéndoles facilitar humedad suplementaria. (Granado et al. 1999).

Debe tener una temperatura por encima de los 8°C, aunque puede soportarlas más bajas. Es semiepipfita se desarrolla bien en lugares sombreados o semisombreados, con riego generoso de primavera a otoño. Y con multiplicación por esqueje o semilla (Ballester, 1978).

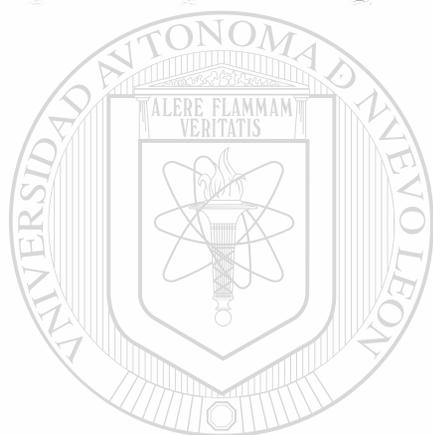
Los frutos desarrollan escamas gracias a la proliferación de las areolas del pericarpio después de la fecundación. (Mercado y Granado, 1999).

El tamaño del fruto varía entre 10 a 12 cm de diámetro, con pulpa blanca y numerosas semillas pequeñas y negras. (Martínez, 1959).

A nivel de nutrimentos el fruto de la pitahaya contiene niveles altos de sodio y potasio , su contenido de proteínas, grasas y carbohidratos es similar al de la manzana, plátano, naranja o piña. (Castillo y Cáliz , 1997).

De la época prehispánica se tienen reportes del uso del fruto y sus semillas dentro de la farmacopea de ese tiempo, reportándose para dolores de cabeza y "clorosis" (Valverde y Pérez, 1988).

H. undatus esta reportada que contiene alcaloides no específicos, (<http://www.lycaenum.org/~iamklaus/hylocere.htm>).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Uno de los problemas que frecuentemente se tiene es la obtención y desinfección de explantes, ya que en ocasiones no se dispone del material vegetativo, o bien este puede tener un alto grado de contaminación en el medio natural donde se encuentra, por lo que las semillas son una muy buena alternativa para obtener explantes en condiciones asépticas, al inducir su germinación *in vitro*. El cultivo *in vitro* puede ser una alternativa para la germinación de semillas de cactáceas y de las pequeñas plántulas obtenidas utilizar sus tejidos como explantes para la formación de callo (Comparán y Luna 1994).

Padilla, et al. (1995), usaron plántulas germinadas *in vitro* como explantes para micropropagar *Echinocereus pectinatus*., en medio MS adicionado con NAA y BAP por separado, funcionando mejor el BAP a concentraciones de 0.03 y 0.08 mg/l.

Infante (1992), obtuvo brotación y callos embriogénicos a partir de plántulas provenientes de semillas germinadas en medio MS con sales minerales, para la brotación utilizó BA y NAA, mientras que el callo lo obtuvo al agregar NAA.

Se estableció un método para germinar semillas de cactáceas : se usaron frascos de 14 cm de alto y de boca ancha (6 cm de diámetro), con tapa de plástico. Se colocaron 3 cm (de profundidad) de sustrato (4 partes de arena volcánica y 1 parte de tierra de hoja tamizada y en avanzado estado de descomposición) en el frasco, 15 ml de agua (hervida y de preferencia de lluvia pues el pH es menor que el de la llave y esto favorece la germinación) se tapó el frasco, no bien cerrado y se esterilizó en un horno de microondas por 5 minutos. Las semillas fueron colocadas por 6 horas en una solución de fungicida (Benlate ½ a 1 gr/l), luego con

unas pinzas flameadas se transfirieron 20 semillas por frasco, se cierra bien y no se abre hasta el momento de trasplantarlas cuando tengan 1 cm de altura y espinas (Rivas 1993).

Otros medios como el BDS (medio modificado de Gambor B5) suplementado con 2,4-D y K se han empleado para propagar especies de cactus ornamentales (Havel y Kolar 1983).

Semillas de *Leuchtenbergia principis* fueron germinadas en medio MS, sin reguladores de crecimiento, obteniendo desarrollo de plántulas a las seis semanas, después de este tiempo cortó sus extremos apicales para colocarlos en medio MS con 3% de sacarosa y varios rangos de reguladores del crecimiento , desarrollando callo al usar altas concentraciones de citocininas y auxinas (10 mg/l de BA y NAA) y al usar 10 mg/l de BA y 0.1 mg/l de NAA logró una gran proliferación de brote en seis meses (Starling 1985).

Cárdenas, et al. (1993), recomendaron utilizar epicotilos de plántulas germinadas en forma aséptica, después de dos meses de crecimiento.

Para la germinación de semillas de *Astrophytum miriostigma*, se recomienda su colocación sobre papel filtro húmedo en caja petri a 25° C y con un fotoperíodo natural de 12.5 horas, obteniéndose casi el 100% de germinación a los 6 días (Arredondo y Camacho 1995).

CULTIVO DE TEJIDOS

Dentro de la nueva era biotecnológica, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han alcanzado un grado de desarrollo, insospechado hace 20 años. En la actualidad estas técnicas tienen grandes aplicaciones en la agricultura, industria farmacéutica, alimentaria etc. Ya que mediante éstas es posible realizar una propagación clonal de especies vegetales de importancia económica, o en vías de extinción, así como también la obtención de plantas resistentes a patógenos, y metabolitos secundarios aplicables a las industrias mencionadas, etc. (Kantha, 1981).

Pierik (1990), define el cultivo *in vitro* de plantas como: el cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles, de semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos de plantas, se caracteriza porque: ocurre a microescala, es decir sobre una superficie relativamente pequeña, porque optimiza las condiciones ambientales (nutritivas, hormonales, de luz y temperatura), porque es aséptico, es decir libre de patógenos, porque puede inducir un patrón anormal de desarrollo lográndose así la inducción de callo, embriogénesis somática, etc; y porque permite la manipulación genética al trabajar con células individuales y protoplastos.

Como una alternativa para propagar diversas especies de cactáceas que comúnmente tienen un lento crecimiento se ha recomendado la técnica de micropropagación (Phillips, *et al.* 1993).

Cozza, *et al.* (1997), mencionaron que la composición del medio tiene una influencia decisiva en los componentes químicos de las estructuras formadas.

Aunque se han encontrado pocas referencias sobre el cultivo *in vitro* de *H. undatus*, (Yassen 1994, y Tovar y López 1998), existen estudios relacionados con diversas especies de cactáceas.

Mantell y Smith, (1983), reconocieron la utilidad del sistema de cultivo de tejidos vegetales al servir como fuente de nuevas plantas y metabolitos de importancia económica para el hombre.

INDUCCIÓN DE CALLO

Generalmente el callo se define como un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales luego son llevados a una diferenciación celular, estas células presentan proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada que dan lugar a una masa amorfa de tejido, algunos callos son masas celulares compactas mientras que otros son esponjosos. La inducción de callo a partir de una porción de vegetal sucede cuando el inóculo ya estéril se pone en contacto con un medio de cultivo que induzca y mantenga un crecimiento y una división celular continua (Hurtado y Merino 1988).

Los explantes de casi cualquier parte de la planta o de la semilla pueden formar callo, previa desinfección y colocación en el medio apropiado. Las auxinas en una concentración de moderada a alta son las sustancias primarias de crecimiento para inducir el callo. Como el IAA, el NAA, y el 2,4-D; también deben de suministrarse en cantidades menores las citocininas como la K, y la BA. (Hartman, *et al.* 1997).

Torres, et al. (1989), hicieron mención de que el 2,4-D es un regulador usado muy ampliamente en la inducción de callo, pero es necesario transferir en corto tiempo a un medio con citocininas para así mantener el potencial de regeneración del vástago.

Aparecida, et al. (1996), recomendaron utilizar para el mantenimiento de tejidos de callo de *Cereus peruvianus* el uso de medio MS adicionado con 1% a 3% de glucosa.

Villegas, et al. (1989), consignaron la formación de callo al colocar explantes de cladodio de nopal en medio MS adicionado con una combinación de picloram 1.5 mg/l y BAP 0.2 mg/l. Así mismo, **Ault y Blackmon (1985)**, utilizaron explantes de brotes de plantas germinadas *in vitro* de *Echinocactus uncinatus*, *Echinocereus pectinatus*, variedad *neomexicanus*, *Mammillaria gummifera* variedad *meicantha*, *Ferocactus covillei* y *F. Wislizenii* y los colocaron en el medio de cultivo de Murashige y Skoog adicionado con 30g de sacarosa, 9g de agar, 150mg de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 100mg de inositol, 30mg de adenina, 1.0 mg de ácido nicotínico, 1.0 mg de piridoxina·HCl, 1.0mg de tiamina·HCl, auxina y citocinina. La proliferación de callo se presentó en todas las especies con los reguladores de crecimiento aplicados.

Bustamante y Tovar (1990), cultivaron *in vitro* varias especies de cactáceas con citocininas y auxinas. Los explantes que se obtuvieron fueron brotes y algunos segmentos de callos. Los explantes iniciales fueron tomados de cultivos procedentes de semillas germinadas *in vitro* de *Pelecypora pseudopectinata*, *Neolloydia lophophoroides*, entre otras. Los explantes se pusieron en el medio

Murashige y Skoog con cinetina (K) o benciladenina (BA) en concentraciones de 0, 0.2, 0.4, 0.8 y 1.6; y 3.2 mg/l de ácido indolacético (IAA).

Coryphantha macromeris una especie de cactácea fue cultivada en un medio Murashige y Skoog, adicionado con 0.4mg/l de tiamina·HCl, 100mg/l de inositol, 20gr/l de sacarosa, 44M de N-(fenilmetil)-1H-purina-6-amino(BA), 0.5 M de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) con un pH de 5.7, lograndose satisfactoriamente la formación de callo. (Smith, *et al.* 1991).

Silos y Meléndez (1995), utilizaron *Mammillaria bocasana*, empleando las areolas espiníferas como explantes en un medio Murashige y Skoog adicionado con hormonas 2,4-D y K en diferentes concentraciones. En todos los tratamientos se formó callo y solamente en uno de ellos hubo brotación, posterior a los callos formados. El promedio general de brotación fue de 7.5%.

Aparecida, *et al.* (1995), utilizaron semillas como recursos de explantes de tallo para determinar las condiciones más efectivas para inducir y mantener tejidos de callo en rápido crecimiento usando una combinación de 2,4-D en 18.1 μM con K en 18.6 μM o 27.9 μM , el callo desarrollado fue friable.

Acram, *et al.* (1996), mencionaron que los tejidos desarrollados *in vitro* frecuentemente presentan un desorden fisiológico llamado vitrificación, que puede acarrear problemas, ya que afecta la multiplicación de brotes y el vigor del cultivo e impide la posterior aclimatación de las plántulas. Esto es causado algunas veces por altas concentraciones de citocininas o por el agente solidificante usado: La apariencia externa del tejido cultivado *in vitro* se aprecia como translúcido e hiperhidratado

Hernández y Tavera (1996), reportaron la formación de callo de *Begonia x tuberhybrida* cultivada *in vitro*, la formación de estos centros meristemáticos es requisito previo para la formación de embriones somáticos o meristemas del brote. Así mismo relacionaron la acumulación de almidón con la producción de brotes. Se ha observado la formación de callos friables y compactos de *Ariocarpus retusus*, después de doce meses de cultivo, utilizando medio MS (1962) adicionado con BA (0-3 mg/l) y Acido Naftalenacético (NAA) (0-1 mg/l). (Olguín y Chávez 1994).

INDUCCIÓN DE BROTE

La producción de brotes puede llevarse a cabo directamente del explante o del callo y esto dependerá de las hormonas suministradas. (Hartman, *et al.* 1997).

Ortiz y Vargas (1995), cultivaron secciones de *Heliocereus elegantissimus* en medio MS (1962) con un pH 5.8 y adicionado con 0.5 mg/l de K y 0.5 mg/l de BAP, obteniendo una activación de la areola y un desarrollo de brotes y plántulas completas.

Johnson y Emino (1977), usaron explantes de tubérculo de *Mammillaria elongata* exponiéndolos a diferentes concentraciones y reguladores de crecimiento como 2,4-D, NAA, 6-dimetilalilamino-purina (2iP), Acido Indolbutírico (IBA), K, Bencilaminoprina (BAP) y Acido Giberélico (GA₃) en un medio Murashige Y Skoog alto en sales. De ellos el NAA y el IBA promovieron en los explantes la iniciación de raíz, resultando mucho más uniforme y óptima la respuesta de enraizamiento con NAA de 40.0 - 60.0mg/l; para la formación de brotes la mejor concentración fue con 2-iP en 40.0mg/l y para la producción de callo fue de 6.0mg/l de 2,4-D.

Johnson y Emino (1979), cultivaron 8 especies diferentes de cactáceas, entre ellas *Hylocereus calcaratus*, en medio MS con alto contenido de sales y reguladores de crecimiento, obteniendo elongación de brotes y desarrollo de raíz en esta especie

Ault y Blackmon (1987), lograron la propagación de *Ferocactus acanthodes* a partir de explantes apicales de plantas germinadas *in vitro*, con un promedio de 6 brotes por explante usando MS adicionado con 30 gr. de sacarosa, 1.0 mg/l de Cinetina y 1.0 mg/l de NAA.

Dabekaussen, et al. 1991, utilizaron explantes de *Sulcorebutia alba* y lograron la activación de areolas en medio MS con 25 mg/l de Acido etilendinitrotetraacético-férrico y sódico (NaFeEDTA), 2.5 g de azúcar y 0.25 – 1.0 mg/l de BAP con un pH de 5.5.

Cárdenas, et al. (1992), lograron la proliferación de brotes de *Astrophytum capricorne* utilizando medio MS (1962) adicionado con BAP 0.2 mg/l y K 0.1 mg/l;

Cárdenas y Torres (1991), reportaron la proliferación de la biznaga verde *Echinocactus platyacanthus* utilizando MS adicionado con BAP 3 mg/l y NAA 10 mg/l.

PROCEDIMIENTOS DE DESINFECCIÓN

Una etapa esencial para la micropropagación de cualquier especie es la obtención del cultivo aséptico, lo que se logra implementando diferentes técnicas para eliminar todo patógeno del explante. Los procedimientos varían de acuerdo al tipo de explante y especie trabajada. Los métodos de eliminación de patógenos lo podemos clasificar en: calor seco, calor húmedo, ultrafiltración y esterilización química. Para la técnica de calor húmedo se recomienda la esterilización del medio y el instrumental, en una autoclave o en una olla de presión, a 121° C, 15 libras de presión por 15 minutos, y debe de evitarse el tiempo prolongado de esterilización ya que algunos componentes del medio pueden sufrir cambios. (**Dodds y Lorin 1986**).

Cárdenas (1995), desinfectó dientes de ajo, colocándolos en gasa, para luego sumergirlos en etanol al 70% por 30 segundos, luego fueron trasladados a una solución de Hipoclorito de sodio comercial al 20% v/v y de 2 a 4 gotas de detergente no iónico Tween 20, por 125 minutos, dentro de la Campana de Flujo® laminar eliminó el agente desinfectante enjuagando el material de 3 a 5 veces con agua destilada estéril, resultando efectiva esta técnica para desinfectar y tener un riesgo mínimo de contaminación. Mientras que **Pierik (1990)**, recomendó la técnica siguiente para la desinfección de explantes: 1) lavado del material en forma intensiva en agua limpia, 2) colocar el material por unos segundos en alcohol etílico al 70%, para eliminar las burbujas de aire y de esta manera el líquido desinfectante estará en contacto con el material vegetal. 3) desinfectar los explantes en una solución, de Hipoclorito de sodio al 10% con Tween 20 u 80

para disminuir la tensión superficial y así permitir un mejor contacto con la superficie del explante, este procedimiento se puede hacer en un agitador magnético o bien bajo vacío para eficientizar la esterilización.

Villalobos (1985). Mencionó que para la desinfección de explantes herbáceos se recomienda incorporar detergente a la solución desinfectante para romper la tensión superficial y eliminar así los microorganismos, o combinar un lavado en alcohol absoluto.

Una técnica de desinfección para semillas de cactáceas, consiste en desinfectar las semillas en solución de Hipoclorito de sodio (cloralex) al 12% por 15 minutos en agitación constante, luego dentro de la Campana de flujo laminar se enjuagan con agua estéril (Peña, et al. 1995).

Margara (1988), recomendó para la desinfección de semillas y explantes sumergirlos por algunos instantes en alcohol, y luego en una solución de hipoclorito cálcico, seguido de lavados con agua estéril.

Tovar y López (1998), desinfectaron plántulas de pitaya, primero con Captan® 1% (p/v) por 15 minutos. Posteriormente aplicaron ocho tratamientos de desinfección de NaCl (1.5, 3.0, 4.5 y 6.0%) y dos tiempos de exposición (10 y 20 minutos) y para finalizar un lavado con agua estéril. Los mejores resultados de supervivencia 100% y de 0% de contaminación se obtuvieron con la combinación de 1.5% de NaCl con 10 minutos de exposición.

REGULADORES DEL CRECIMIENTO

El crecimiento y desarrollo de las plantas está regulado por ciertas sustancias químicas, que en conjunto, ejercen una compleja interacción para cubrir las necesidades de la planta. Se han establecido cinco grupos de hormonas vegetales: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico y sus derivados y etileno. Estas sustancias están ampliamente distribuidas y se encuentran en forma natural en todas las plantas superiores. Son específicas en cuanto a su acción, ejercen su actividad a muy bajas concentraciones, y regulan el crecimiento de las células, la división y la diferenciación celular, así como la organogénesis, la senescencia y el estado de latencia. El término reguladores de crecimiento se aplica a las hormonas vegetales sintéticas, y estas forman parte de la mayoría de los medios de cultivo, básicamente se utilizan dos, las auxinas y las citocininas, las primeras en un rango de 0.1 a 10 mg/l , mientras que las segundas de 0.03 a 30 mg/l. Las auxinas más ampliamente usadas en medios de cultivo son ácido indolacético (IAA o AIA), ácido Indolbutírico (IBA o AIB), ácido naftoxiacético (NAA o ANA) ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) etc, su función como en el resto de las hormonas vegetales esta dada en base a su concentración, cuando la auxina predomina tiende a formar raíces o callos; dentro de las citocininas: la cinetina (K), la bencilaminopurina (BAP), etc, las cuales funcionan como inductoras del crecimiento de brotes y represoras de la dominancia apical. Cada tipo de regulador, cada concentración y cada combinación de regulador con concentración dará respuestas de crecimiento distintas (Hurtado y Merino 1991).

HIPÓTESIS

El desarrollo de la plántula estará dado en base al tratamiento de riego implementado, mientras que los explantes tendrán una respuesta morfogénica diferente en base a la concentración y tipo de reguladores de crecimiento aplicados para el cultivo *in vitro* de *Hylocereus undatus*.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar del porcentaje de germinación de *H. undatus* bajo diferentes sistemas de germinación, y evaluar su crecimiento bajo dos sistemas de riego; así como su respuesta morfogénica al cultivo *in vitro*.

PARTICULARES

- Obtener la germinación de semillas de *H.undatus* en almácigo.
- Cuantificar el crecimiento de la plántula bajo dos tratamientos de riego.
- Establecer el protocolo de desinfección para las semillas de *H. undatus* y su germinación *in vitro*.
- Obtener los explantes a partir de plántulas germinadas *in vitro* e *in vivo*.
- Establecer el protocolo de desinfección de las plántulas germinadas en almácigo.
- Determinar el tipo y concentración óptima de reguladores del crecimiento para el crecimiento *in vitro*.

MATERIAL

En cuanto al material se refiere, se hará referencia tomando en cuenta la siguiente clasificación:

CRISTALERÍA

Cajas petri

Frascos capacidad 1 litro (para agua estéril)

Frascos Gerber ^{MR} con tapa.

Frascos gotero de 50 y 100 ml.

Pipetas, de 1,5 y 10 ml.

Probetas de 10, 100 y 500 ml

Vasos de precipitado de 250, 500, y 1000 ml.

Matraz de aforación de 500 y 1000 ml.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



INSTRUMENTOS Y EQUIPO GENERAL DE BIBLIOTECAS

Agitador magnético y térmico

Algodón

Aspersor

Balanza analítica

Balanza granataria

Bisturí

Bolsas de plástico

Campana de flujo laminar

Cinta Masking-tape_{mr}

Clima

Cubre bocas

Espátula

Etiquetas

Gasa

Horno de microondas

Kleen-pack_{mr}

Lámpara de alcohol

Olla de presión

Papel secante

Pinzas de disección

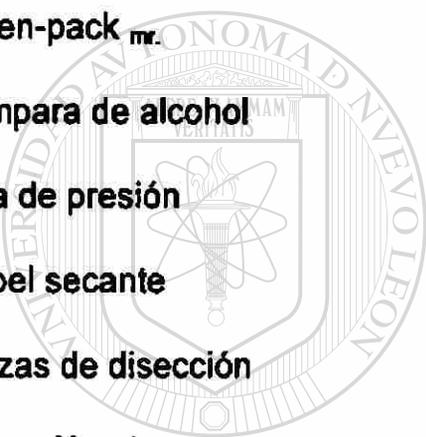
Potenciómetro

Refrigerador

Regulador de fotoperíodo (Timer)

Termómetro

Vasos de Unice1 ¼ lt. .



UANL

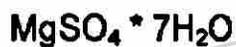
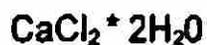
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



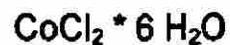
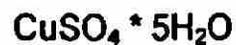
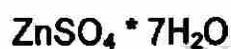
REACTIVOS PARA MEDIO DE CULTIVO

COMPONENTES INORGÁNICOS

MACROELEMENTOS:



MICROELEMENTOS:

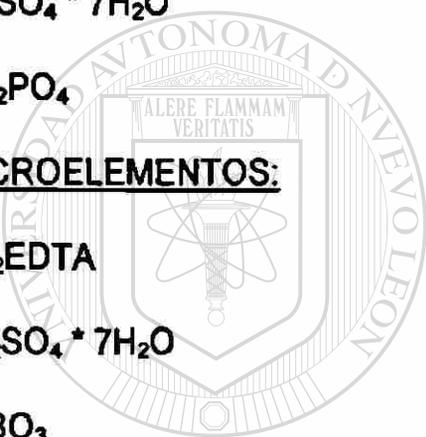


OTROS

Agua bidestilada

HCl 1N

NaOH 0.1



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

COMPONENTES ORGÁNICOS

Myo-inositol

Ac. Nicotínico

Piridoxina * HCl

Tiamina * HCl

Glicina

Hemisulfato de adenina

Sacarosa

Agar

REGULADORES DEL CRECIMIENTO

2,4-D ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

IAA ácido Indolacético

NAA ácido naftalenacético

BAP Bencilaminopurina

K Cinetina

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

METODOLOGÍA

ÁREA DE TRABAJO: El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L, en el período enero de 1998 a noviembre de 1999.

MATERIAL BIOLÓGICO: Siendo la especie con la que se trabajó, no originaria de nuestra región, los frutos fueron adquiridas en los mercados locales durante el período de junio-septiembre de 1998, que es cuando se encuentra a disponibilidad.

La metodología se dividió en cuatro etapas:

ETAPA I : OBTENCIÓN DE LA SEMILLAS

ETAPA II: GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y CRECIMIENTO DE PLÁNTULA

ETAPA III: ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *In Vitro*

ETAPA IV: VARIABLES EVALUADAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

ETAPA I: Para la obtención de semillas se utilizaron frutos de pitahaya maduros (Figura 2), adquiridos en el mercado local, los cuales fueron seccionados transversalmente (Figura 3) para extraer las semillas, las cuales se lavaron y tamizaron para eliminar todo residuo de mesocarpio, posteriormente se colocaron a secar al sol. Una vez limpias y secas (Figura 4), se procedió a inducir su germinación.

ETAPA II: Para su germinación fueron colocadas 300 semillas en un almácigo consistente de sustrato orgánico y perlita (50 - 50), con riego diario (10 ml) y fotoperíodo de 12 hs. luz y temperatura de 23°C; de este grupo se midió el porcentaje de germinación; a los 40 días las plántulas germinadas fueron transplantadas a recipientes de unicel con el mismo sustrato y condiciones, se dividieron en dos grupos de 25 plántulas cada uno, al grupo 1 (tratamiento 1) se le dio riego diario (10 ml de agua) y al grupo 2 (tratamiento 2) se le aplicó 10 ml de agua por semana. Otro grupo de semillas fueron colocadas en una gasa, lavadas en agua corriente, luego se sumergieron en etanol absoluto por 5 segundos (DIP), para luego colocarse en una solución de Hipoclorito de sodio comercial a 10% v/v, con dos gotas de detergente no iónico Tween 20, por 10 minutos, y ya dentro de la Campana de Flujo Laminar se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada, y posteriormente para la germinación se colocaron en frasco gerber con 30 ml. de agar al 0.7% previamente esterilizado. Cabe mencionar que el instrumental utilizado (pinzas y bisturí) fue flameado constantemente para asegurar las condiciones asépticas que deben prevalecer dentro de la campana, estos frascos fueron colocados bajo condiciones controladas de 12 horas luz y 23° C (Figura 5). Las semillas restantes se almacenaron en frascos de vidrio ámbar, bien tapados.

Cada cuatro semanas se tomaron datos del crecimiento del brote principal en los tratamientos 1 y 2 por un período de 5 meses. Las plántulas germinadas en agar

ETAPA II: Para su germinación fueron colocadas 300 semillas en un almácigo consistente de sustrato orgánico y perlita (50 - 50), con riego diario (10 ml) y fotoperíodo de 12 hs. luz y temperatura de 23°C; de este grupo se midió el porcentaje de germinación; a los 40 días las plántulas germinadas fueron transplantadas a recipientes de unicel con el mismo sustrato y condiciones, se dividieron en dos grupos de 25 plántulas cada uno, al grupo 1 (tratamiento 1) se le dio riego diario (10 ml de agua) y al grupo 2 (tratamiento 2) se le aplicó 10 ml de agua por semana. Otro grupo de semillas fueron colocadas en una gasa, lavadas en agua corriente, luego se sumergieron en etanol absoluto por 5 segundos (DIP), para luego colocarse en una solución de Hipoclorito de sodio comercial a 10% v/v, con dos gotas de detergente no iónico Tween 20, por 10 minutos, y ya dentro de la Campana de Flujo Laminar se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada, y posteriormente para la germinación se colocaron en frasco gerber con 30 ml. de agar al 0.7% previamente esterilizado. Cabe mencionar que el instrumental utilizado (pinzas y bisturí) fue flameado constantemente para asegurar las condiciones asépticas que deben prevalecer dentro de la campana, estos frascos fueron colocados bajo condiciones controladas de 12 horas luz y 23° C (Figura 5). Las semillas restantes se almacenaron en frascos de vidrio ámbar, bien tapados.

Cada cuatro semanas se tomaron datos del crecimiento del brote principal en los tratamientos 1 y 2 por un período de 5 meses. Las plántulas germinadas en agar

solo se emplearon como explantes para la técnica de cultivo de tejidos, así como las del tratamiento 1 previa desinfección y al alcanzar más de 3 centímetros la longitud del brote.

ETAPA III: El medio utilizado fue el **Murashige y Skoog (1962)**, los tratamientos se elaboraron en base a la adición a las sales básicas de los siguientes compuestos orgánicos: reguladores del crecimiento: 2,4-D en concentraciones de 2, 4 y 8 mg/l, con K (cinetina) en las mismas concentraciones y BAP 3 y 6 mg/l con NAA 1 y 2 mg/l para la inducción de callo; para la inducción de brote: K 1 mg/l con BAP 2 mg/l y K 5 mg/l, IAA 0.3 mg/l y Hemisulfato de adenina 80 mg/l; en todos los tratamientos se incluyó myo-inositol 100 mg/l, piridoxina. HCl 0.1 mg/l, ácido nicotínico 0.5 mg/l, tiamina.HCl 0.4 mg/l, glicina 2.0 mg/l, sacarosa 30g/l y 7 gr/l de agar. En el cuadro 1 se pueden apreciar los componentes del medio utilizado, en el cuadro 2 la manera de elaborar las soluciones stock y substock en virtud de que muchos componentes se aplican en cantidades muy pequeñas, y en el cuadro 3, la cantidad de cada solución, que se le debe de agregar a un litro de medio MS (1962) . El solvente utilizado fue agua bidestilada.

El pH fue ajustado a 5.7, usando NaOH 0.1 ó HCl 0.1 N. Una vez ajustado el pH se le agrega el agar y se calienta en horno de microondas hasta que este clarifica, luego el medio fue depositado en frascos gerber con tapa de plástico, la esterilización se efectuó en olla de presión con una temperatura de 121° C, 15 libras de presión por 15 minutos. Para cada tratamiento se manejaron 12 repeticiones.

CUADRO 1. SALES BÁSICAS Y COMPUESTOS ORGÁNICOS DEL MEDIO MS(1962)

SALES		mg/l
MACROELEMENTOS		
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650
KNO ₃	Nitrato de potasio	1900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	Cloruro de calcio	440
CaCl ₂	Cloruro de calcio (anhidro)	332
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Sulfato de magnesio	370
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio	170
MICROELEMENTOS		
Na ₂ EDTA	Acido etilendinitrotetraacético-disódico	37.3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	Sulfato ferroso	27.8
H ₃ BO ₃	ácido bórico	6.2
MnSO ₄ · H ₂ O	Sulfato de manganeso	16.9
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	Sulfato de zinc	8.6
KI	Yoduro de potasio	0.83
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	Molibdato de sodio	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	Sulfato de cobre	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	Cloruro de cobalto	0.025
COMPUESTOS ORGÁNICOS		
Myo-inositol		100
Tiamina		4
Ácido nicotínico		1
Piridoxina		1
Sacarosa		30g/l
Agar		7g/l
Reguladores de crecimiento		Según tratamiento

CUADRO 2. SOLUCIONES STOCK Y SUBSTOCK PARA EL MEDIO MS(1962)			
SOLUCIÓN A	CaCl ₂ · 2H ₂ O	22 g	1000 aforado a 50 ml
SOLUCIÓN B	KNO ₃	1.9 g/l	Pesar y agregar al medio directamente
	NH ₄ NO ₃	1.65 g/l	
SOLUCIÓN C * Preparar una solución con 2.5 mg/l y tomar 0.5 ml para la solución	KI	41.5 mg	1000 x aforado a 50 ml
	*CoCl ₂ · 6H ₂ O	1.25 mg	
SOLUCIÓN D ** Preparar una solución con 25 mg/l y tomar 0.2 ml para la solución	KH ₂ PO ₄	3.4 g	400 x aforado a 50 ml
	H ₃ BO ₃	0.124 g	
	**Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	5.0 mg	
SOLUCIÓN E *** Preparar una solución con 2.5 mg/l y tomar 0.2 ml para la solución	MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.4 g	400 x aforado a 50 ml
	MnSO ₄ · H ₂ O	0.338 g	
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.172 g	
	***CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.5 mg	
SOLUCIÓN F	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.557 g	200 x aforado a 100 ml
	Na ₂ EDTA	0.745 g	
SOLUCIÓN G **** Preparar una solución con 2.5 mg/l y tomar 1.0 ml para la solución	Glicina	50 mg	100 x aforado a 250 ml
	Piridoxina	12.5 mg	
	ácido Nicotínico	12.5 mg	
	****Tiamina	2.5 mg	

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CUADRO 3. PROCEDIMIENTO PARA ELABORAR 1 LITRO DE MEDIO MS(1962) CON LAS SOLUCIONES CONCENTRADAS.

COMPUESTO	CANTIDAD POR LITRO
SOLUCIÓN A	1 ml
B = PESAR	KNO ₃ 1.9 g
	NH ₄ NO ₃ 1.65 g
SOLUCIÓN C	1 ml
SOLUCIÓN D	2.5 ml
SOLUCIÓN E	2.5 ml
SOLUCIÓN F	5 ml
SOLUCIÓN G	10 ml
REGULADORES DEL CRECIMIENTO	—
MYO-INOSITOL	100 mg
SACAROSA	30 g
AJUSTAR pH a 5.7	
AFORAR A 1000 ML	
AGAR	7 g

Una vez preparados los tratamientos se procedió a sembrar, basados en el protocolo general establecido para esta técnica y repitiéndose dicho procedimiento cada vez que se efectuaron siembras: a) Encender la Campana de Flujo Laminar 20 minutos antes de iniciar el trabajo, b) Desinfectar perfectamente la Campana dando aspersiones con alcohol y luego tallando con alcohol, algunas veces que se sospechó de contaminación, se dió un lavado previo con solución de cloralex comercial, c) Se procedió a introducir todo el material necesario

dentro de la campana previa aspersion del mismo con etanol (vasos de agua destiladas estéril, vasos de precipitado estériles, cajas de petri estériles, bolsas con medio, instrumental de disección, lámpara de alcohol etc.), d) Sembrado del material biológico, (en forma directa si se obtuvo de manera aséptica o previa desinfección), se colocó un cubrebocas, es imprescindible traer las uñas cortas y quitarse anillos, pulseras, relojes etc, que pudieran ser fuente de contaminación, luego se lavaron perfectamente las manos y antebrazos con detergente antibacterial, se secaron al aire y luego se asperjaron con alcohol, la lámpara de alcohol se encendió y el instrumental de disección se flameó cada vez que se usó para mantener lo más posible las condiciones asépticas, luego los frascos ya inoculados se sellaron con Kleen-Pack^{MR} y, e) se trasladaron al cuarto de Cultivo donde se mantuvieron controladas las variables de luz y temperatura.

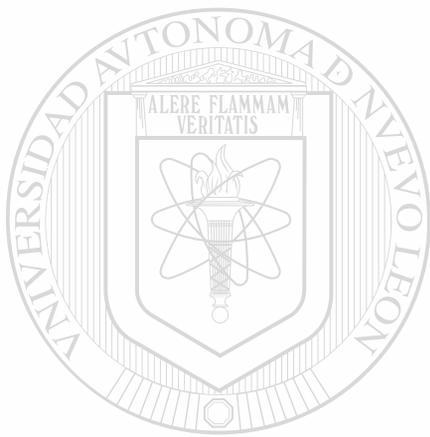
ETAPA IV: VARIABLES EVALUADAS

Las variables evaluadas fueron: semillas germinadas en los primeros 15 días, y crecimiento de las plántulas bajo los dos sistemas de riego en un lapso de 5 meses, con mediciones mensuales del aumento de la longitud del brote principal.

En cuanto al crecimiento *in vitro*, las variables que se evaluaron en la inducción de brote fueron: tipo, número y longitud de brotes desarrollados y areolas, en un lapso de cuatro meses; y desarrollo, aspecto y coloración de callos establecidos en un lapso de 10 meses.

El análisis estadístico se realizó mediante la aplicación del paquete computacional SPSS 8.0 (Statistical Package for the Social Science)

Los datos obtenidos del bioensayo de germinación, desarrollo de plántula e inducción de brotación se evaluaron mediante Análisis de Varianza (ANVA) completamente al azar y comparación múltiple de medias (Tukey). (Steel y Torrie , 1986) y Zar (1996). En cuanto al desarrollo de callo la apreciación fue cualitativa.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación y crecimiento de plántula: En cuanto a la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas bajo los tratamientos de aporte hídrico, se obtuvo lo siguiente: El inicio de la germinación se observó a los cuatro días después de la siembra; el más alto índice se obtuvo a los 14 días con un 90% de germinación (262 plántulas) (Figura 6). Las plántulas sometidas al tratamiento 1 de riego diario se observan vigorosas, turgentes, de un color verde brillante y crecimiento del brote más notorio, (Figura 7), mientras que las sometidas al tratamiento 2 de estrés hídrico se muestran de menor tamaño y vigor (Figura 8). En el Cuadro 4 se presentan los resultados del ANVA factorial donde se observa que el factor tiempo ($T = 80.45$, $P < 0.01$), los tratamientos ($F = 177.82$, $P < 0.01$) y la interacción de ambas ($F = 11.13$, $P < 0.01$) presenta alta diferencia significativa. En los cuadros 5 y 6 se presentan las estadísticas descriptivas, el ANVA y la prueba de Tukey para el factor tiempo y tratamiento respectivamente, que demuestra diferencia significativa entre los meses evaluados y los tratamientos. Esto concuerda con Ballester (1978), donde menciona que el tipo de riego debe ser generoso para un óptimo desarrollo.

FACTOR	F	P
MES	80.45	<0.01
TRATAMIENTO	177.82	<0.01
INTERACCIÓN	11.13	<0.01

Cuadro 4. - Muestra los resultados de la interacción tiempo y tratamiento.

MES	MEDIA	E.E.	F	P	TUKEY
1	2.624	0.319			A
2	6.96	0.689	34.37	<0.01	b
3	10.180	0.824			c

Cuadro 5. - Resultados del ANVA y prueba de Tukey entre los meses evaluados

TRAT.	MEDIA	E.E	F	P	TUKEY
1	9.843	0,590	80.45	<0.01	a
2	3.333	0.423			b

Cuadro 6. - Resultados del ANVA y prueba de Tukey entre los tratamientos.

Cultivo *in vitro*: En cuanto al cultivo *in vitro*, para la obtención de explante se recomienda la germinación *in vitro* de las semillas pues de esta manera se eliminan problemas con infecciones que pueden ser transmitidas por vectores a las pequeñas plántulas obtenidas por germinación en almácigo, esto concuerda con las metodologías propuestas por: Ault y Blackmon (1985), Bustamante y Tovar (1990), Aparecida, *et al.* (1995).

El procedimiento de desinfección fue a base de calor húmedo (Dodds y Lorin, 1986), la técnica empleada dio buenos resultados, teniéndose un bajo porcentaje de contaminación al trabajar con semillas, lo que concuerda con: Cárdenas (1995), Villalobos (1985) y Pierik (1990). A partir de los explantes obtenidos, se logró tanto la brotación como la inducción de callo.

Inducción de brotes: en base a la comparación de medias (Cuadro7), los resultados obtenidos indican que el mejor tratamiento fue el que contenía BAP y K (Figura 9) , lo que al revisar la literatura concuerda con lo establecido por Cárdenas, *et al.* (1992). Las citocininas son imprescindibles para romper el letargo de las yemas e inducir su crecimiento (Hurtado y Merino, 1988 y Havel y Kolar 1983). El tratamiento a base de IAA, K y Sulfato de adenina aunque resulta efectivo, sus brotes son en menor número y requieren subcultivo cada seis semanas (Figura 10).

TRATAMIENTO	VARIABLES							
	BROTE PRIMARIO	BROTE SECUNDARIO	BROTE Terciario	BROTE <5mm	BROTE <1y >5cm	BROTE >5 cm	BROTOS TOTALES	% DE AREOLAS
IAA, K y	8.5714	13.5714		21.1459	1.0000		22.149	49.0000
Sulfato de adenina	±0.6117	±5.2320		±4.7781	±0.90086		±5.0158	±10.5965
BAP y Cinetina	9.0000 ±0.759	20.287 ±5.8867	169.8600 ±207700	181.2857 ±25.4406	16.1429 ±2.4826	1.7100 ±0.4700	199.1429 ±26.6015	488.4286 ±67.2518
TOTAL	8.7857 ±0.4709	16.9286 ±9.8963		101.2143 ±25.4522	8.5714 ±2.4195		110.6429 ±27.7779	268.7149 ±69.1596

Cuadro 7. ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE LAS VARIABLES CONSIDERADAS

Número de brotes: para el número de brotes primarios en cada tratamiento, la media y errores estándar no indican una marcada diferencia, ya que solo el tratamiento de BAP y K tiene una ligera elevación, en cuanto a brotes secundarios, la media y errores estándar indican una diferencia mínima. Brotes terciarios solo se presentaron en tratamiento con BAP y K. En cuanto al tamaño de los brotes al analizar la media y errores estándar indican una marcada diferencia en el número de brotes producidos menores de 5 mm, y de 1 a 5 cm siendo mucho mayor en el tratamiento de BAP y K, los brotes mayores de 5 cm solo fueron producidos por este último tratamiento.

También el desarrollo de las areolas fue marcadamente mayor con el tratamiento de BAP y K, estos resultados indican la influencia de las citocininas en el desarrollo primeramente de las areolas y mas tarde en el de los brotes como lo obtuvieron Dabekaussen *et al.*, (1991), Ortiz M J. y Vargas F (1995).

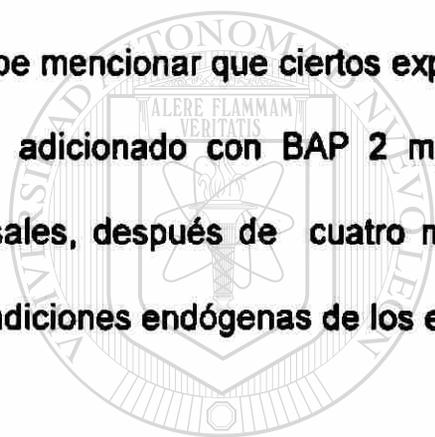
Es importante recalcar que cada especie presenta diferentes grados de dificultad para establecer su protocolo de cultivo, desde el momento de la obtención del explante, su desinfección, así como la determinación de los ingredientes esenciales del medio, incluyendo lógicamente los reguladores de crecimiento (Havel y Kolar 1983 y Cozza, *et al.* 1997).

Inducción de callo: se logró la inducción de callo en el medio MS adicionado con BAP (6 mg/l) y NAA (2 mg/l) (Johnson y Emíno 1977), donde el callo desarrollado en un principio se inicia como un pequeño crecimiento translúcido (Figura 11), con aspecto de vitrificación (Acram, *et al.* 1996), y luego prolifera a una masa celular abundante de color café (Figura 12); por otro lado en el medio MS

adicionado con 2,4-D (8 mg/l) y K (8mg/l) (Silos y Meléndez 1995, Aparecida, et al. 1995, Starling 1985.) se obtuvo desarrollo de callo, siendo este menos abundante pero de la misma coloración (Figura 13).

La formación del callo se aprecia en el tratamiento con BAP y NAA y en el de 2,4-D y K después de 1 mes de sembrado, siendo el callo de apariencia vitrificada, pero al segundo mes el color cambia y se torna café siguiendo su proliferación y al cabo de seis meses apareciendo nuevo crecimiento, no hay desarrollo de brotes.

Cabe mencionar que ciertos explantes con tres o más brotes colocados en medio MS adicionado con BAP 2 mg/l y K 1 mg/l, desarrollaron abundantes callos basales, después de cuatro meses de cultivados, probablemente debido a las condiciones endógenas de los explantes (Hurtado y Merino 1991), (Figura 14).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El óptimo crecimiento se presenta en las plántulas de riego continuo, lo cual indica que su establecimiento en las zonas áridas y semiáridas podría implementarse debido al alto porcentaje de germinación que presenta, por lo que se recomiendan futuros estudios donde se observe el desarrollo de la planta en las condiciones climáticas de la región.

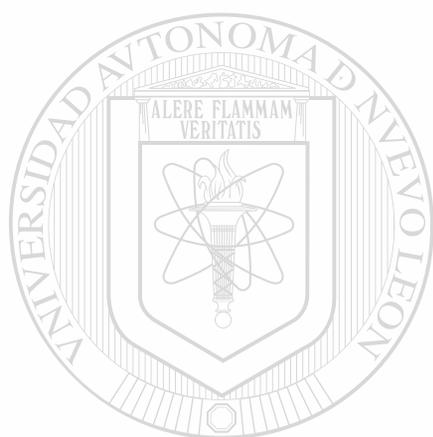
En cuanto a su cultivo *in vitro* se puede decir que *H. undatus* responde adecuadamente, para la obtención del explante se recomienda germinar las semillas en agar, y una vez que la plántula tiene unos 3 cm de longitud, manejar su brote como explante para brotación así como para el desarrollo de callo.

En cuanto al primer protocolo el mejor tratamiento fue al aplicar BAP y K⁺, y en cuanto a la inducción de callo se obtuvo mejor respuesta al adicionar al medio BAP y NAA.

En virtud de que se tiene ya establecido el protocolo para el establecimiento del cultivo *in vitro* de esta especie, se recomiendan estudios posteriores donde se analicen diversas posibilidades como son: la presencia de embriones somáticos en los callos y su posible desarrollo, análisis fitoquímicos comparativos de la planta "*in vivo*" e *in vitro*, así como del callo para detectar compuestos de importancia económica, como alcaloides, pigmentos, así como la factibilidad de su

establecimiento como cultivo en ciertas zonas rurales de nuestro estado, en virtud de la alta demanda que en la actualidad tiene a nivel internacional el fruto de esta especie.

Es importante hacer mención de que esta especie en particular por su lento crecimiento es necesario esperar varios meses para visualizar los resultados en el cultivo *in vitro*.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APÉNDICE FOTOGRAFÍAS



FIGURA 1. Planta en floración de *Hylocereus undatus*



FIGURA 2. Frutos enteros de *H. undatus*

APÉNDICE FOTOGRAFÍAS

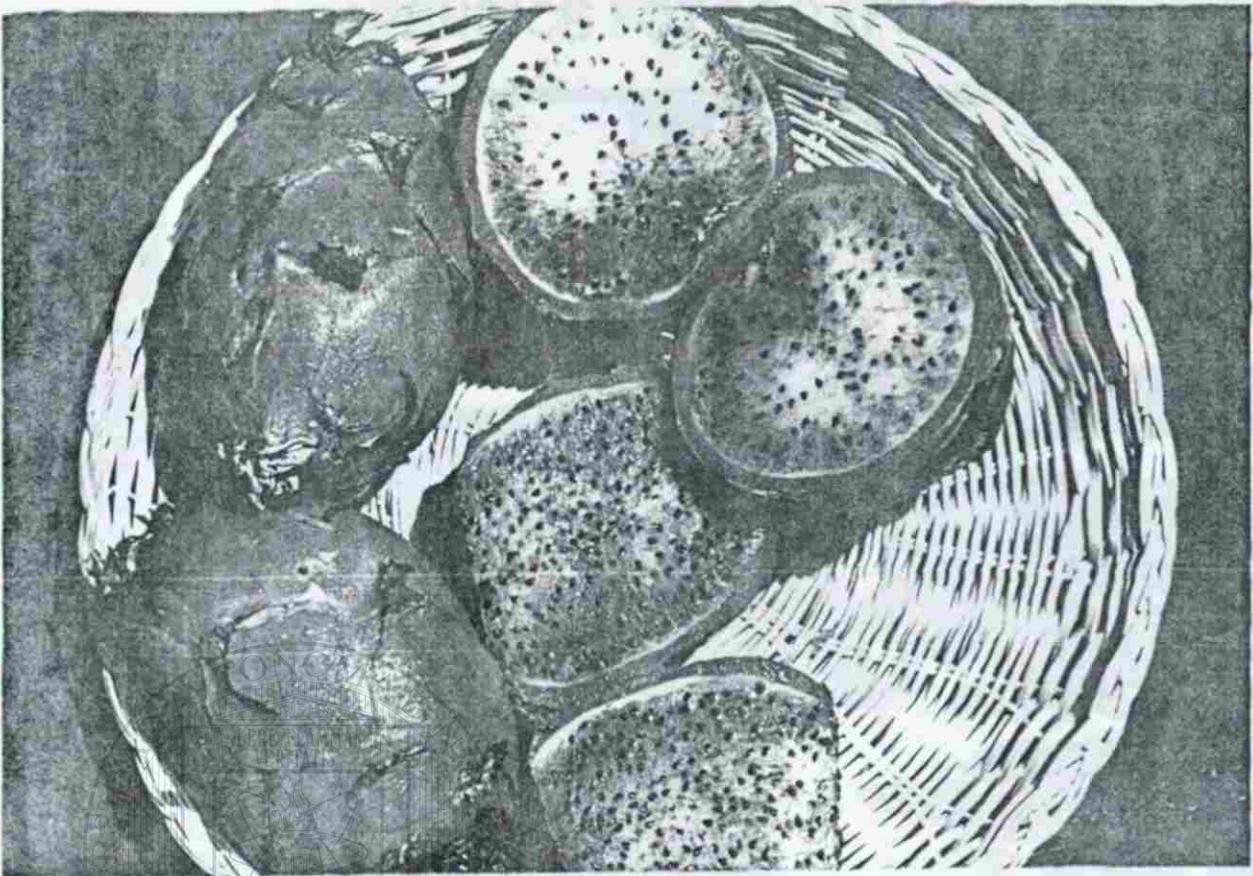


FIGURA 3. Fruto seccionado de *H. undatus*

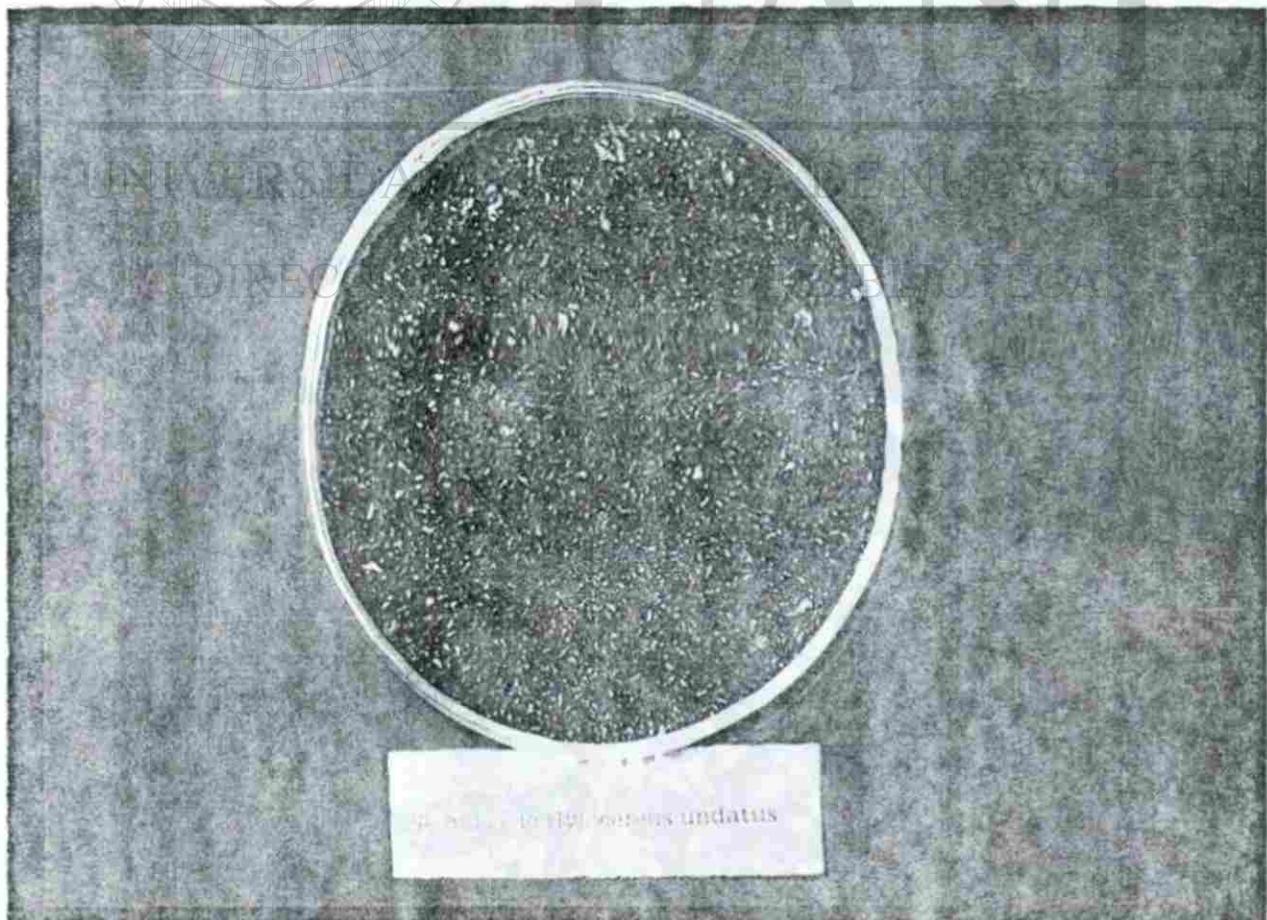


FIGURA 4. Semillas de *H. undatus*

APÉNDICE FOTOGRAFÍAS
APÉNDICE FOTOGRAFÍAS

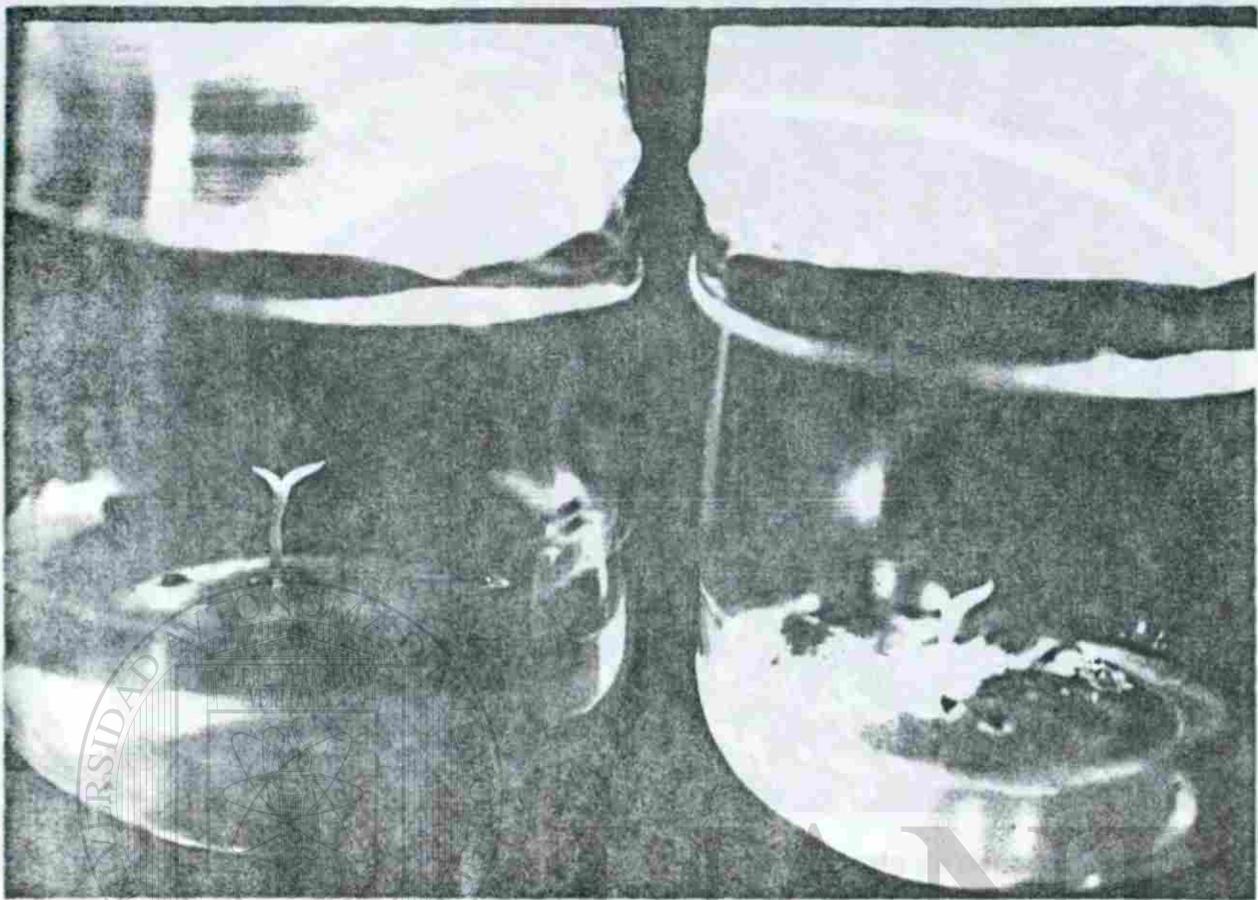


FIGURA 5. Germinación *in vitro* de *H. undatus*

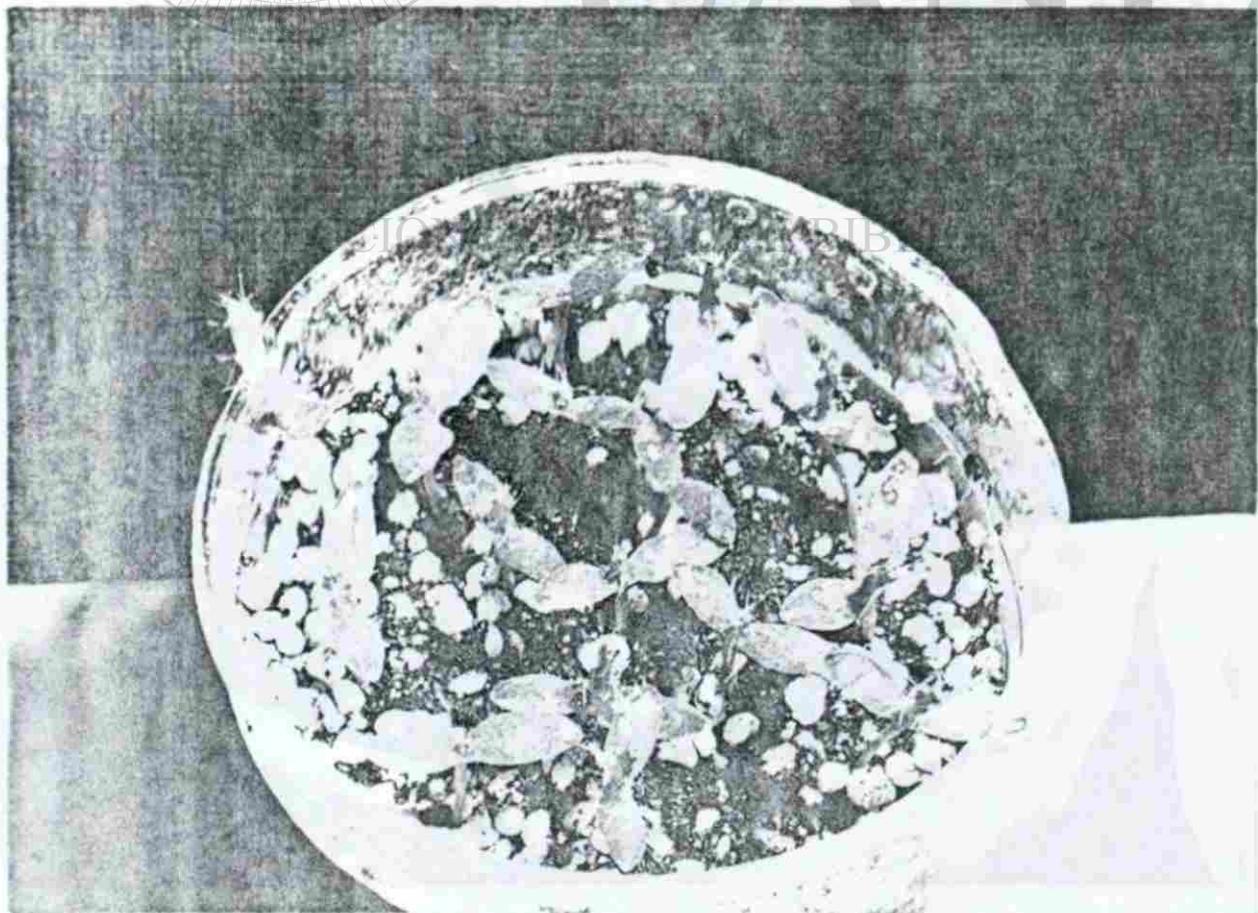


FIGURA 6. Germinación en almacigo de *H. undatus*

APÉNDICE FOTOGRAFÍAS

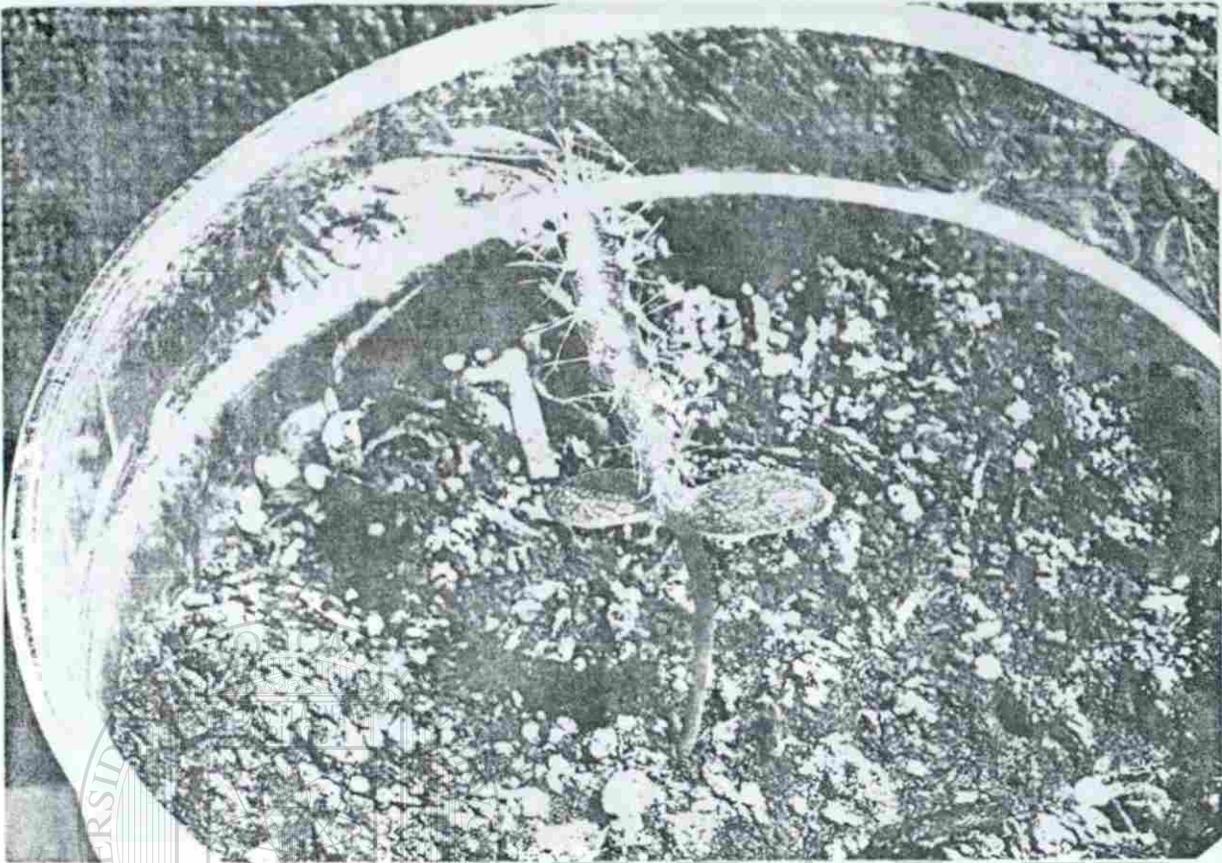


FIGURA 7. Plántula de *H. undatus* desarrollada bajo el tratamiento de riego continuo.



FIGURA 8. Plántula de *H. undatus* desarrollada bajo el tratamiento de estrés hídrico.

APÉNDICE FOTOGRAFÍAS

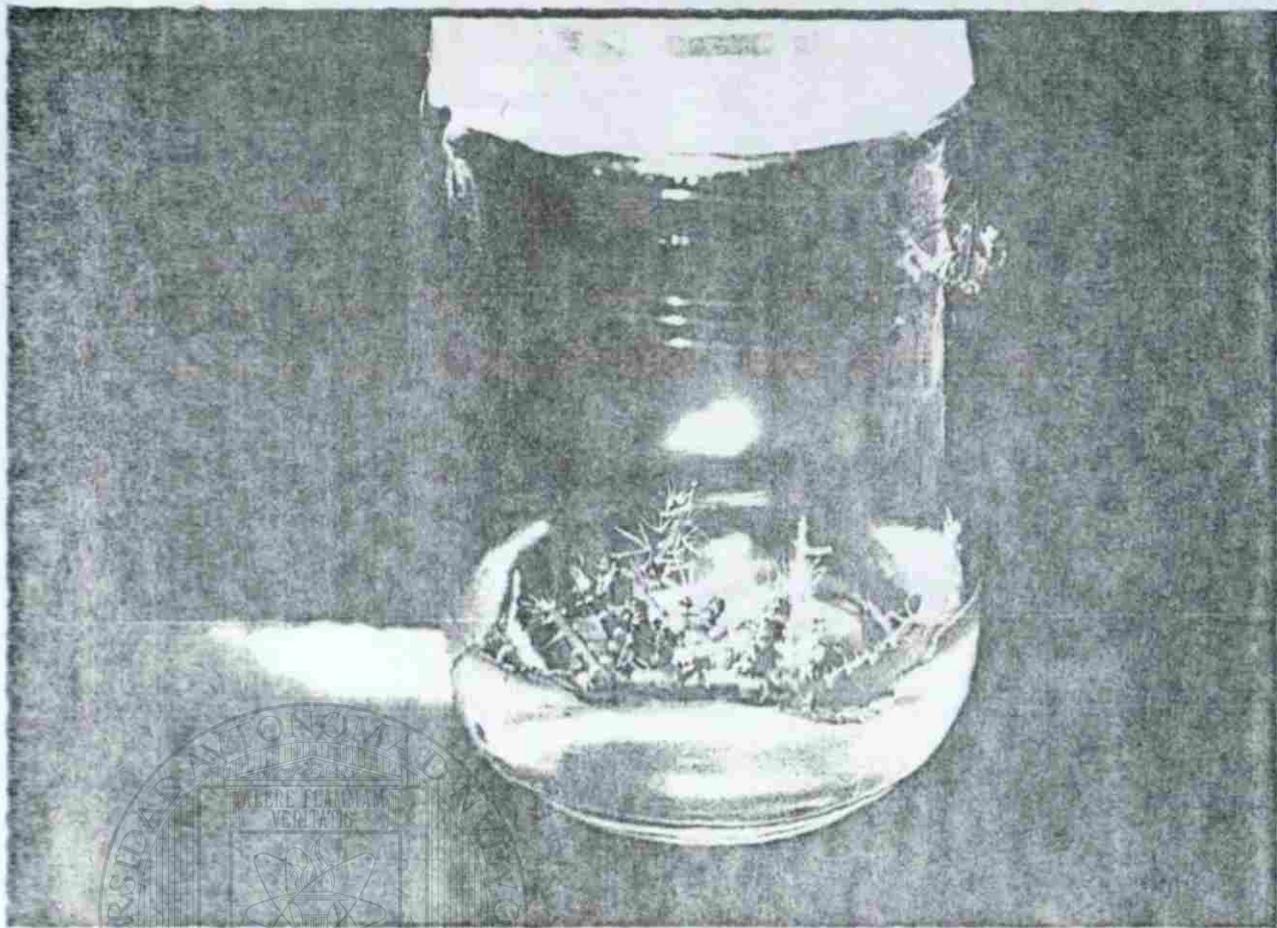


Figura 9. Desarrollo de brotes de *H. undatus* bajo el tratamiento de BAP y K.

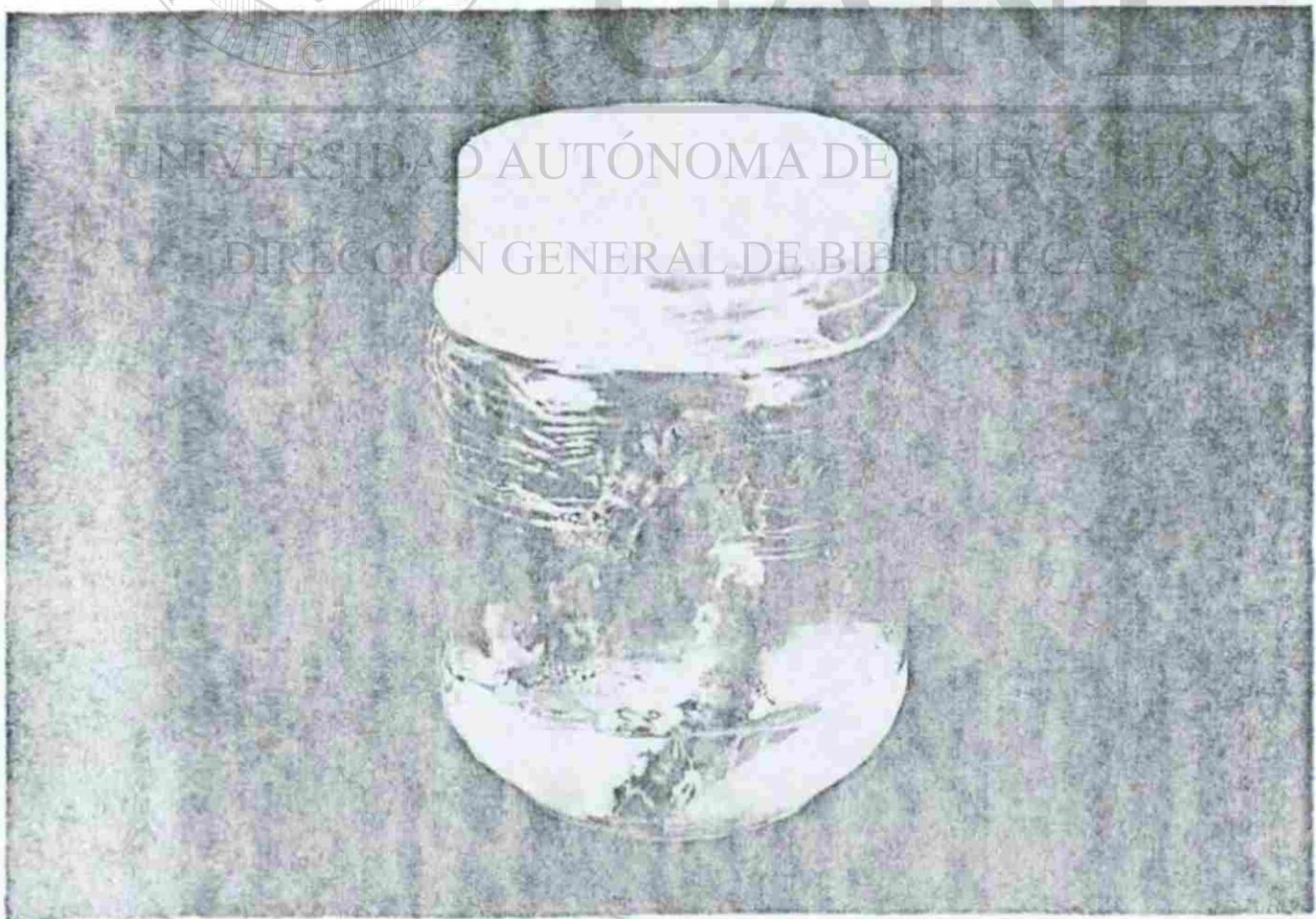


FIGURA 10. Desarrollo de brotes de *H. undatus* bajo el tratamiento de IAA, K y H. de adenina.

APÉNDICE FOTOGRAFÍAS

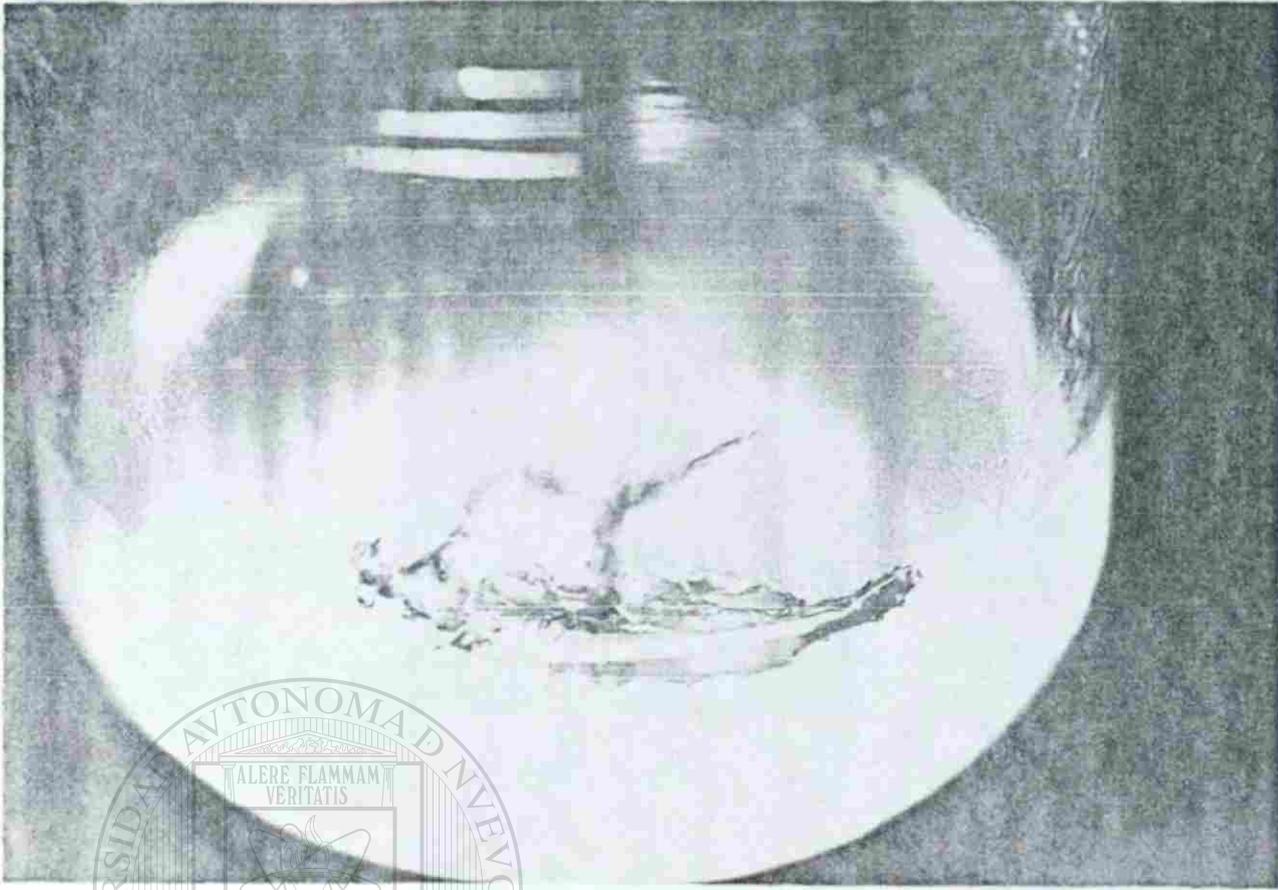


Figura 11. Inicio del desarrollo de callo (3 semanas) de *H. undatus*, tratamiento de BAP y NAA

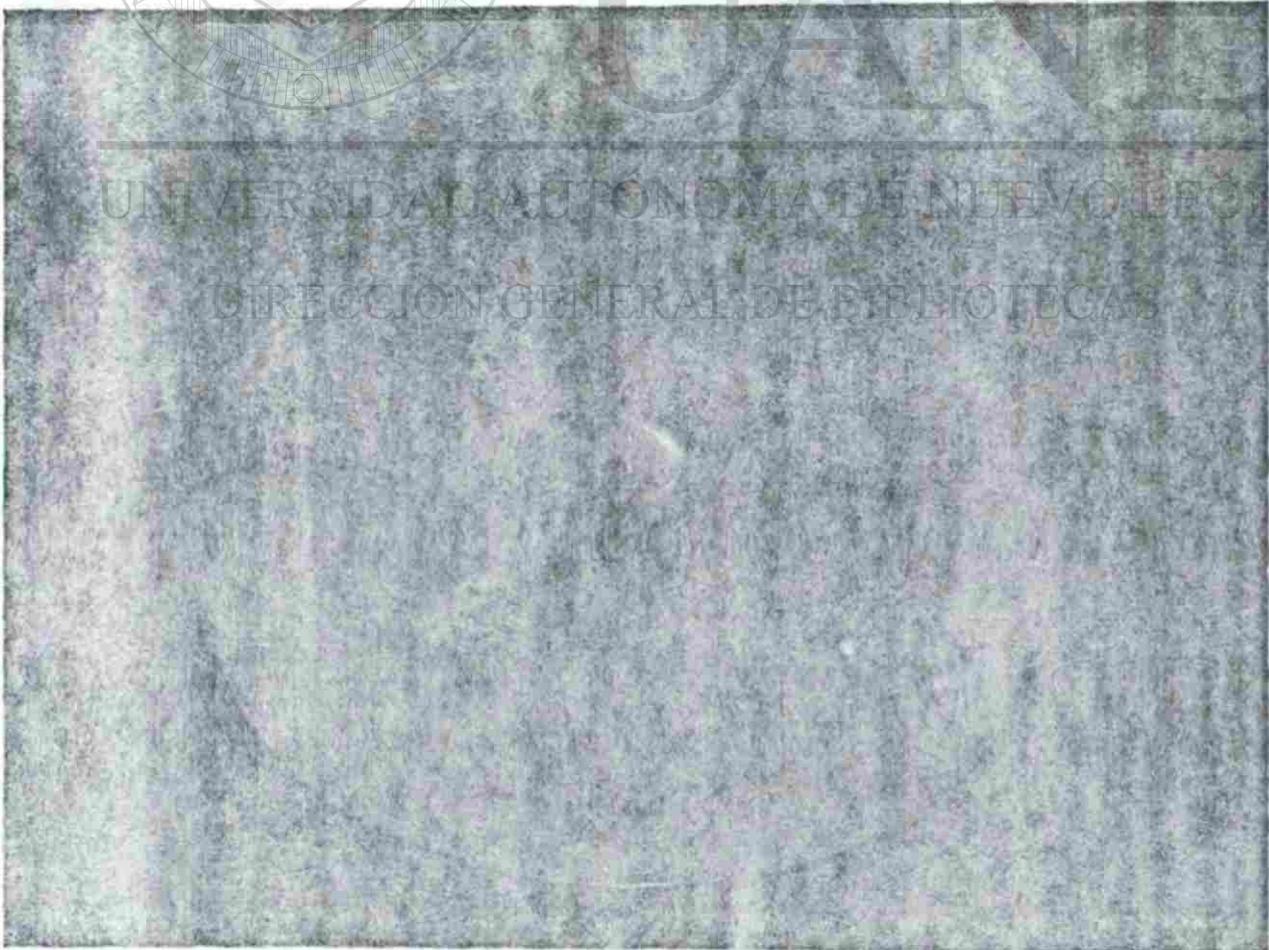


Figura 12. Callo de *H. undatus* (8 meses después), tratamiento de BAP y NAA.

APÉNDICE FOTOGRAFÍAS

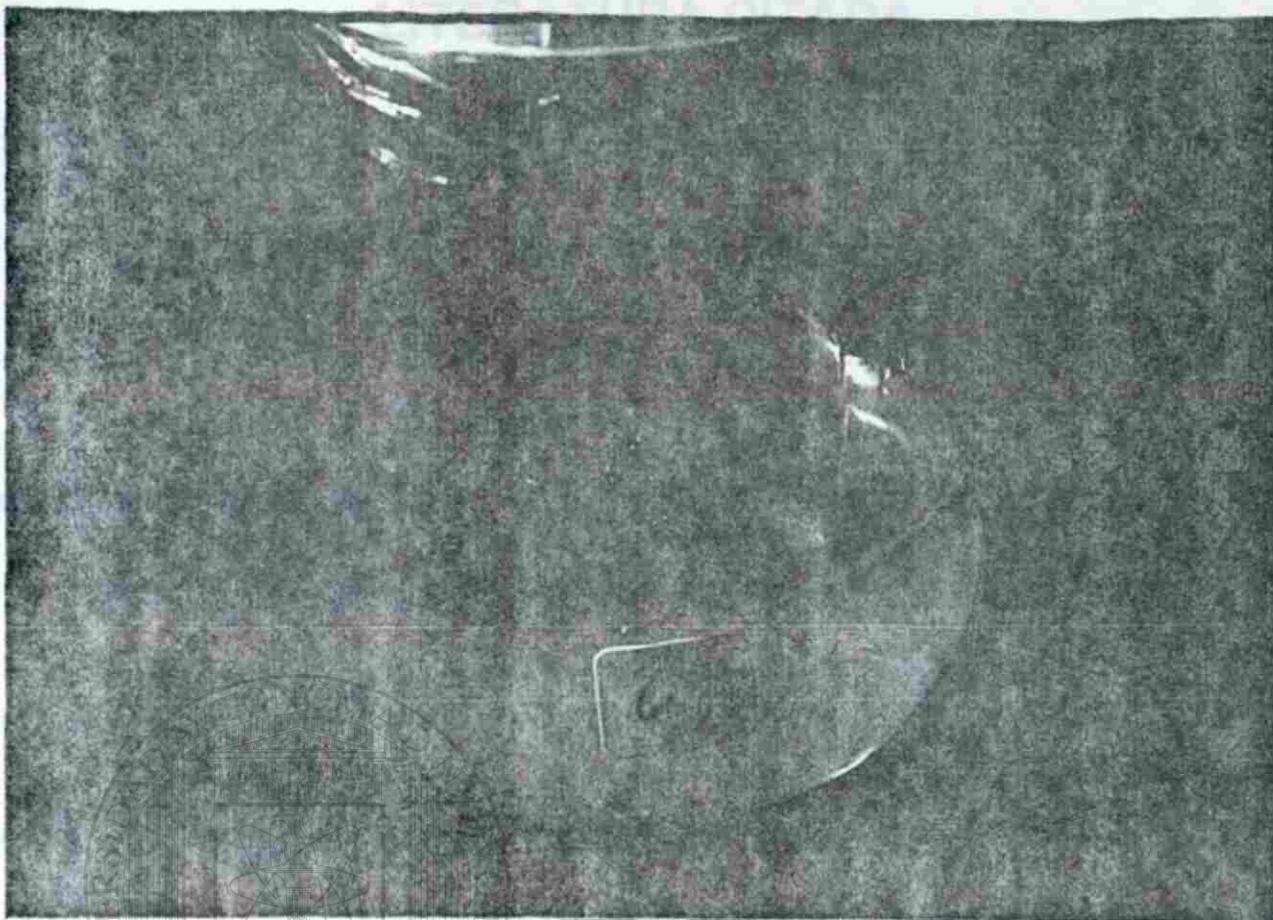


Figura 13. Desarrollo de callo de *H. undatus*, tratamiento de 2,4-D y K.



Figura 14 . Desarrollo de brotes y callo de *H. undatus*, tratamiento de BAP y K.

LITERATURA CITADA

Acram M.Taji, R.R. Williams and W.H. Sheather. 1996 Comparative Anatomy of four Australian rare plants grow *in vitro*. Botanic Gardens Micropropagation News. 2 (2).

Aparecida de Oliveira S. M F. Pires Da Silva Machado , A. J. Prioli and C. Aparecida Mangolin . 1995. In Vitro propagation of *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae). In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant. 31(1):47-50.

Aparecida de Oliveira S. M F. Pires Da Silva Machado y A. J. Prioli . 1996. Maintenance and development of *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae) callus tissues in culture. Arquivos de Biología e Tecnología. 39(3):525-536.

Arredondo Gómez A. y F. Camacho Morfín. 1995. Germinación de *Astrophytum miniostigma* (Lemaire), en relación con la procedencia de las semillas y la temperatura de incubación. Cactáceas y Suculentas de México, Sociedad Mexicana de Cactología. 40(2): 34-38.

Ault J.R. and W.J. Blackmon.1985. *In vitro* Propagation of Selected Native Cacti Species. HortScience, 20(3):541.

Ault James R. y W.J. Blackmon.1987. *In vitro*. Propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae) HortScience, 22(1): 126-127

Ballester Olmos. J.F. 1978. Los Cactus . ediciones Floraprint, España S.A. Valencia España. Págs. 5-11.

Bravo Hollis H. y M.H. Sánchez . 1978 . Las Cactáceas de México. Vol. I Universidad Autónoma de México, México D.F. Págs. 446-453.

a). Las Cactáceas de México. Vol. III
Universidad Autónoma de México, México D.F. Págs. 501-553

Bravo Hollis H. y L. Scheinvar. 1995. El interesante mundo de las Cactáceas. CONACYT y Fondo de Cultura Económica. México D.F. Págs. 127.

Bustamante M.A. and L.G. Tovar.1990. *In vitro* Shoot Formation of Cacti Species in Response Cytokinins and Auxin. Department of Agriculture. UAAAN. Buena Vista Saltillo Coah. Mex. Págs. 14.

Cárdenas Ávila M.L. 1995. Cultivo *in vitro* de brotes de ajo *Allium sativum* L. de tres variedades obtenidas en Marín, N.L. México. Tesis de Maestría, División de Posgrado de la FCBUANL. Págs. 12-13.

Cárdenas Cerda E. and E. Torres Cepeda. 1991. *In vitro* Propagation of selected native cacti species. *In vitro Cell & Develop. Biol.* 27(3) 106-A.

Cárdenas Cerda E, C. Ojeda Z, E. Olivares Sáenz and T. Torres Cepeda 1992.
Propagación *in vitro* de *Astrophytum capricorne* (Dietrich). Ciencia
Agropecuaria FAUANL. Marín N.L. 5(2) Págs. 3-6.

Cárdenas Cerda E, C. Ojeda Z, T. Torres Cepeda and E. Olivares Sáenz 1993.
Micropropagation of *Astrophytum capricorne* an endangered cactus from N.E.
México. Botanic Gardens Micropropagation News. 1 (6): 75-76.

Castillo Martínez R y H. Cáliz de Dios. 1997 Las Pitahayas del Género *Hylocereus*,
Cactáceas con gran potencial económico. Memorias de VII Congreso Nacional
y V Internacional sobre conocimiento y aprovechamiento del Nopal. Monterrey,
N.L. México Págs. 243 y 244.

Comparan Sánchez S y J. Luna Martínez. 1994. Aplicación de la Técnica de cultivo
in vitro de tejidos para la propagación de las especies *Echinocereus delaeetii* y
Pelecypora aselliformis. Primer congreso Nacional de Biotecnología
Agropecuaria y Forestal. México D.F. Pág. 65.

Cozza Radiana, D.Turco, C. Briccoli and M.Bitonti. 1997. Influence of growth
medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated
plantlets of *Olea europea*. Plant cell, Tissue and organ culture. 51: 215-223.

Cruz Hernández J.P. 1997. Otras Cactáceas de importancia económica en México, por su producción de frutos comestibles. Memorias de VII Congreso Nacional y V Internacional sobre conocimiento y aprovechamiento del Nopal. Monterrey, N.L. México Págs. 70-80.

Dabekaussen M, R. Pierik, J. Laken and S. Hock. 1991. Factors affecting aereole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. 46;3-4, 283-294.

Dodds H.J. and W.R. Lorin. 1986 Experiments in plant tissue Culture. Cambridge University Press. London England. Second Edition. Págs. 21-31, 46-47.

Granado Sánchez D. 1997. La pitahaya en México. Memorias de VII Congreso Nacional y V Internacional sobre conocimiento y aprovechamiento del Nopal. Monterrey, N.L. México Págs. 316 y 317.

Granado Sánchez D, Andrés Mercado Bafuelos y Georgina López Ríos. 1999. Las pithayas de México. Ciencia y Desarrollo. Págs. 59-67.

Hartman Hudson T, Kester Dale E, Davies Fred T Jr., and Geneve Robert L0. 1997. Plant Propagation: principles and practices. Prentice Hall Editions. Sixth Edition. 564-570.

Havel L and Z. Kolar 1983. Clonal Propagation of Cacti through axillary buds *in vitro*.
Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2(4):349-353.

Hernández P. M.V. y M.S. Tavera. 1996. Análisis histológico del callo producido por
hojas de *Begonia x turbihybrida* cultivadas *in vitro*. Revista Chapingo Serie:
Horticultura 2(2): 171-175 .

Hurtado M. Daniel. y M.E. Merino M. 1988. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial
Trillas. México D.F. Págs. 94 y 95.

Infante Rodrigo. 1992. *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embriogénesis
o yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). Plant cell tissue and
organ culture. 31(2): 155-159.

Johnson, J. L. and E. R. Emino.1977. Tissue Culture Propagation of *Mammillaria*
elongata as Influenced by Plant Growth Regulators. HortScience, 12(4): 394.

Johnson, J. L. and E. R. Emino.1979. Tissue Culture Propagation in the Cactaceae.
Cactus and Succulent Journal (US) 51: 275-277.

Kartha, K. 1981. Meristem culture and cryopreservation Methods and applications. T.A.
Thorpe, Plant Tissue Culture. Methods and applications in Agriculture. Academic
Press, Orlando Florida. Págs. 184-193.

Mantell S.H. and H. Smith . 1983 . Plant Biotechnology. Cambridge University Press.
London. Págs. 3-9.

Martínez Maximino. 1959. Plantas útiles de la Flora de México. Ediciones Botas ,
México, D.F. . Págs. 88-95

Margara Jacques. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Editorial Mundi-
Prensa, Madrid, España. Págs: 172-174.

Mercado Bañuelos A y D Granado Sánchez. 1999. La pitaya. Editada por la
Universidad Autónoma de Chapingo. México. Págs. 15-17.

Murashige T. and F.Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays
with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*. 15: 473-497.

Olguín Santos L y V. Chávez Avila. 1994. Regeneración *in vitro* de *Ariocarpus*
retusus Scheidw, cactácea amenazada de extinción. Primer congreso Nacional
de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. México D.F. Págs. 28.

Ortiz Montiel J y M Vargas Figueroa. 1995. Propagación *in vitro* de *Heliocereus*
elegantissimus (Briton and Rose) var. *elegantissimus* (cactaceae). *Cactáceas y*
Suculentas de México, Sociedad Mexicana de Cactología. 40(2):41-46.

Padilla Reyes J.L., H Silos Espino y L Valera Montero. 1995. Respuesta "in Vitro" de *Echinocereus pectinatus* a dos reguladores del crecimiento NAA y BAP. II Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. Aguascalientes Agsc. México. Pág. 55

Peña Yáñez J, M. Ramos Parra, L. Valera Montero y G Tirado Estrada. 1995. Evaluación de la germinación *in vitro* de *Equinocactus* spp y *Ferocactus* spp. Segundo congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. Aguascalientes Ags. Pág. 53.

Phillips G, T. Mabry, H. Nguyen, R. Dixon and M. Bones. 1993 . Micropropagation of rare and endangered cacti: applications in conservation and commerce. *Biotechnology for aridland-plants*. Págs. 135-152.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Pierik R.L. 1990. Cultivo "in Vitro" de Plantas Superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. Págs. 15-18, 92-95.

Riha J. y R. Subik . 1981 . The Ilustred Encyclopedia of Cacti & Other Succulents. Chartwell Books, Inc. Slovakia, Bratislava. Págs. 188-189.

Riva Gómez M (1993) . Notas sobre el cultivo de Cactáceas por semilla. *Cactáceas y Suculentas de México*, Sociedad Mexicana de Cactología. 38(4):93-95.

- Silos Espino H, A. Nava Cedillo y J. Meléndez Sánchez. 1995. Obtención de brotes *in vitro* de *Mammillaria bocasana*, con 2,4-D y Kinetina. En Memorias del II Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. ANABAF. Aguascalientes, Ags. México. Pág. 56
- Smith, R, P. Burdick, J. Anthony and A. Reilley . 1991. *In vitro* Propagation of *Coryphantha macromeris*. HortScience, 26(3):315.
- Starling R. 1985. In Vitro propagation of *Leuchtenbergia principis*. Cactus and Succulent Journal. 57(3):114-115.
- Steel R. y J. Torrie 1986. Bioestadística. Principios y Procedimientos. Editorial Mc. Graw-Hill . segunda edición. Págs. 132-142..
- Torres Fernández O, T. Fandiño García y M. Perea Dallos. 1989. Aspectos anatómicos y fisiológicos de cultivo *in vitro* de *Tropaeolum tuberosum* (Ruiz & Pavón). Acta Biológica Colombiana, Volumen 1 No. 5 Universidad Nacional de Colombia, Colombia Págs. 70-79.
- Tovar González L. y Ma. C. López Peralta 1998. Cultivo *in vitro* de pitahaya (*Hylocereus undatus*). Memorias del XVII Congreso de Fitogenética. Acapulco, Guerrero. México. Pág. 8.

Valverde J. y R.J. Pérez 1988. Drogas americanas en Fuentes de escritores franciscanos y dominicos. Universidad de Granada, España. Págs. 178-179

Villalobos Arámbula V. 1985. Fundamentos teórico prácticos de cultivo de tejidos. Editado por la FAO y el Colegio de Chapingo. México D.F. Págs. 54-61

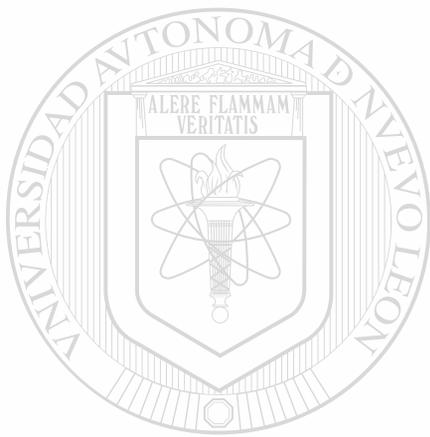
Villegas G., A. Jiménez, O. Dávila, M.A. del Villar y N. Rhode. 1989. Establecimiento de las condiciones de propagación de *Opuntia microdasys* (Cactáceae) a través de cultivo de tejidos. Memorias del III Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Fac. De Ciencias Biológicas U.A.N.L. Monterrey., N.L. México. Págs. III-14

Yassen M. 1994. Micropropagation of pithaya (*Hylocereus undatus*, Haworth Britton y Rose) . Hortscience, 29(5):559.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Zar J. 1996 Biostatistical Analysis. Third Edition. Prentice Hall Inc. EUA. Págs. 198-202, 220-222, 272-274 y 527-230.

<http://www.lycaenum.org/~iamklaus/hylocere.htm>.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



