

**EFFECTO DEL TDZ Y BA SOBRE LA BROTAÇÃO MÚLTIPLE
EN EXPLANTES DE PITAHAYA (*Hylocereus undatus*).**

DEDICATORIA

A Mis Padres:

Sr. Israel Narváez Cruz (Que en Paz Descanse). Quien con su vida de esfuerzo y sacrificios; cariño y bondad, supo inducirme por el camino del bien.

Que Dios lo Tenga en Su Santa Gloria!

Sra. Lucía González Díaz. En quien siempre he podido encontrar fe y esperanza para seguir adelante.

Gracias Por Tu Infinito Amor!

A mi Esposa:

Sra. Sonia de Dios Rodríguez. Por el amor y dedicación que ha derrochado en Mí; por alentarme a seguir el camino de la superación constante.

¡Siempre Te
Amaré!

A mis Hijas:

Ana Cristina y Abigail. Este esfuerzo es por y para Ustedes . Espero que puedan encontrar en Mi, todo el apoyo y amor, para que al igual que Yo, alcancen siempre las metas que se propongan.

A mis Hermanos:

Alicia, Dionisio, Francisco Trinidad, Ana Bertha, Josefina, Marco Antonio, Olivia, José Jesús, Rosa Elvira, Lucía, Patricia y Mariela; Por que de una u otra manera siempre me han brindado su amor y apoyo.

¡Siempre

Estarán en mi Corazón!

A Todos Mis Compañeros y Amigos del Incansable Equipo de Trabajo del Laboratorio de Biotecnología.
" Sólo Así, Se Construye un Nombre Digno "

!

Sinceramente Muchas Gracias.....

Constata la Presente; Mi Sincero Aprecio ;

CONTENIDO

	PAGINA
INDICE DE CUADROS -----	<i>i</i>
INDICE DE FIGURAS-----	<i>iii</i>
RESUMEN-----	<i>v</i>
I.- INTRODUCCIÓN-----	1
II.- REVISIÓN DE LITERATURA-----	3
2.1.- Aspectos Generales del Cultivo-----	3
2.1.1.- Origen y Distribución Geográfica-----	3
2.1.2.- Hábitos de Crecimiento y Descripción Botánica-----	4
2.1.3.- Importancia Económica del Cultivo-----	5
2.2.- Problemática del Cultivo en México-----	6
2.2.1.-Sistemas de Producción-----	6
2.2.2.- Sistemas de Propagación-----	7
2.2.3.- Incidencia de Patógenos-----	8
2.3.- Aspectos Generales de la Micropropagación -----	9
2.3.1.- Importancia-----	9

2.3.2.- Ventajas de la Micropropagación-----	10
2.3.3.- Desventajas de la Micropropagación-----	11
2.3.4.- Proceso de Propagación de Plantas por Cultivo de Tejidos-----	12
2.3.4.1.- Etapa 0: Preparación de la Planta Madre-----	12
2.3.4.2.- Etapa 1: Establecimiento de Cultivo Aséptico-----	12
2.3.4.3.- Etapa 2: Multiplicación de Propágulos-----	13
2.3.4.4.- Etapa 3: Preparación Para la Transferencia de Plantas al Suelo-----	14
2.3.4.5.- Etapa 4: Enraizamiento <i>in vitro</i> y Aclimatización-----	14
2.4.- Micropropagación de Cactáceas-----	15
2.4.1.- Generalidades-----	15
2.4.2.- Micropropagación de Pitahaya (<i>Hylocereus undatus</i>)-----	18
2.4.2.1.- Metodología Para el Establecimiento Aséptico-----	18
2.4.2.2.- Germinación de Semillas <i>in vitro</i> .-----	19
2.4.2.3.- Brotación Múltiple-----	19
III.- MATERIALES Y MÉTODOS-----	21
3.1.- Ubicación del Lugar-----	21
3.2.- Material Vegetativo y Medio de Cultivo-----	21
3.3.- Establecimiento del Experimento-----	22
3.4.- Variables Evaluadas-----	23
3.4.1.- Número de Brotes-----	23
3.4.2.- Longitud de Brotes-----	23
3.4.3.- Número de Raíces-----	23
3.4.4.- Longitud de Raíces-----	24
3.4.5.- Diámetro de Callos-----	24
IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	25
4.1.- Número y Longitud de Brotes-----	25
4.2.- Número y Longitud de Raíces-----	32
4.3.- Diámetro de Callos-----	35
V.- CONCLUSIONES-----	38
VI.- LITERATURA CITADA-----	39

INDICE DE CUADROS

CUADRO	NOMBRE	PAGINA
1	Concentraciones de TDZ y BA estudiados en la presente investigación.....	22
1a	Análisis de varianza correspondiente al Número de brotes a los 12 días de incubación.....	46
2	Análisis de varianza correspondiente a la Longitud de Brotes (cm) a los 12 días de incubación.....	46
3	Análisis de varianza correspondiente al Número de Brotes a los 18 días de incubación.....	46
4	Análisis de varianza correspondiente a la Longitud de Brotes a los 18 días de incubación.....	47
5	Análisis de varianza correspondiente al Número de Brotes a los 24 días de incubación.....	47
6	Análisis de varianza correspondiente a la Longitud de Brotes a los 24 días de incubación.....	47

7	Análisis de varianza correspondiente al Número de Raíces a los 6 días de incubación.....	48
8	Análisis de varianza correspondiente a la Longitud de Raíces a los 6 días de incubación.....	48
9	Análisis de varianza correspondiente al Número de Raíces a los 12 días de incubación.....	48
10	Análisis de varianza correspondiente a la Longitud de Raíces a los 12 días de incubación.....	49
11	Análisis de varianza correspondiente al Número de Raíces a los 18 días de incubación.....	49
12	Análisis de varianza correspondiente a la Longitud de Raíces a los 18 días de incubación.	49
13	Análisis de varianza correspondiente al Número de Raíces a los 24 días de incubación.....	50
14	Análisis de varianza correspondiente a la Longitud de Raíces a los 24 días de incubación.	50
15	Comparación de medias (DMS) correspondientes al efecto del TDZ y BA sobre la brotación múltiple en pitahaya a diferentes tiempos de incubación bajo luz continua.	51
16	Comparación de medias (DMS) correspondientes al efecto del TDZ y BA sobre la inducción de raíces en pitahaya a diferentes tiempos de incubación bajo luz continua.	52
17	Comparación de medias correspondientes al efecto del TDZ y BA sobre el diámetro de callos en pitahaya a diferentes tiempos de incubación bajo luz continua.	53

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	NOMBRE	PAGINA
1	Emisión de brotes y raíces en tratamiento testigo a los 12 días de incubación. La barra representa 1 cm.....	26
2	Comportamiento de explantes de pitahaya establecidos en un medio MS suplementado con diferentes concentraciones (μM) de TDZ (A) y BA (B) a los 24 días de incubación bajo luz continua.	27
3	Efecto del TDZ y el BA sobre el NUMERO DE BROTES inducidos en explantes de pitahaya durante un ciclo de incubación bajo luz continua.....	28
4	Efecto del TDZ y el BA sobre la LONGITUD DE BROTES (cm) inducidos en explantes de pitahaya durante un ciclo de incubación bajo luz continua.....	29
5	Diversidad de LONGITUD DE BROTES (cm) inducidos por 1 μM de TDZ a los 24 días de incubación bajo luz continua. La barra representa 1 cm.....	30

6	Efecto del TDZ y el BA sobre el NUMERO DE RAÍCES inducidas en explantes de pitahaya durante un ciclo de incubación bajo luz continua.....	33
7	Efecto del TDZ y el BA sobre la LONGITUD DE RAÍCES (cm) inducidas en explantes de pitahaya durante un ciclo de incubación bajo luz continua.....	34
8	Efecto del TDZ y el BA sobre el DIAMETRO DE CALLOS (cm) inducidos en explantes de pitahaya durante un ciclo de incubación bajo luz continua.....	36
9	Emisión de brotes y callos inducidos por 4 μ M de TDZ a los 18 días de incubación.	37

RESUMEN

El cultivo de la pitahaya (*Hylocereus undatus*) ha cobrado importancia económica en los últimos años, sin embargo se desconocen muchos aspectos sobre su manejo agronómico y explotación comercial. Aún existen grandes vacíos principalmente en el campo biotecnológico, a pesar de que como lo han demostrado diversos investigadores, ésta tecnología representa una poderosa herramienta para la propagación, conservación y mejoramiento genético de las especies.

Por lo anterior, el presente trabajo ha tenido como objetivo determinar el efecto del Thiadiazurón (TDZ) y Bencil Adenina (BA) sobre la brotación múltiple en explantes tomados de semillas germinadas *in vitro*.

Los resultados obtenidos han permitido concluir que la emisión de brotes y raíces no es dependiente de la adición de hormonas exógenas, sin embargo la emisión de callos sí lo es. Así mismo, pudo demostrarse que 1 μM de TDZ es capaz de estimular la brotación múltiple en la misma magnitud que 4,6,8 y 10 μM de BA, lo que corrobora la efectividad del TDZ, publicada con anterioridad por otros investigadores.

No obstante, niveles de TDZ mayores a 1 μM , estimulan la formación de callos, lo que amplía el campo de investigaciones futuras.

La aportación más relevante del presente trabajo ha sido generar un protocolo para la estimulación de la brotación múltiple en explantes de pitahaya, mismo que ha sido validado en nuestro propio laboratorio. Aunado a lo anterior, la inducción de callos representa una opción para el mejoramiento genético a través de la mutagénesis y selección *in vitro*.

I.- INTRODUCCIÓN

La pitahaya (*Hylocereus undatus*), pertenece a la familia de las cactáceas, a nivel nacional, su explotación es principalmente en huertos familiares y escasamente en plantaciones comerciales establecidas; siendo los Estados de Campeche, Oaxaca, Puebla, Yucatán y Tabasco los principales productores; debido a su rentabilidad, el establecimiento de plantaciones comerciales ha ido en aumento.

En el mercado mundial la pitahaya como fruta fresca es muy demandada, destacándose Japón, Estados Unidos, Alemania, Francia y Canadá; siendo Colombia a nivel mundial el principal país productor, con un rendimiento de 6 a 7 ton/ha y una superficie total sembrada hasta 1991, de 450 ha (Rodríguez, C. A. 1997).

En pitahaya el enraizamiento de gajos o esquejes es el método de propagación convencional; al respecto se han publicado metodologías y resultados exitosos (Rodríguez, 1993); sin embargo, otros investigadores (Cordero, 1997), ensayando técnicas de injerto, han obtenido bajo prendimiento así como una pobre brotación (inferior al 40 %) después de un año. No obstante, éstos métodos conservan el alto riesgo de diseminar enfermedades principalmente fungosas y del tipo bacteriano; por lo que, considerando el enorme potencial de aplicación de las técnicas biotecnológicas para la propagación masiva de plantas sanas, constituye una poderosa alternativa de solución.

En el estado de Tabasco, el establecimiento de plantaciones comerciales de pitahaya (*Hylocereus undatus*), ha estado aumentando existiendo una superficie potencial de 92, 160 ha para su cultivo (López, *et. al.* 1996).

Actualmente se encuentran en ejecución diversos proyectos encaminados a realizar estudios sobre el comportamiento agronómico de ésta especie, manejo de postcosecha y recientemente la etiología y manejo integral de la bacteriosis (Chi, 1998).

Dado que la aplicación de las técnicas biotecnológicas representa una poderosa herramienta que no a ha sido explotada en ésta especie, el Instituto Tecnológico Agropecuario No. 28, dentro del Programa Nuevas Opciones Tecnológicas, ejecuta con financiamiento del COSNET (**No. 928.97P**), el proyecto Micropropagación de ecotipos de pitahaya (*Hylocereus undatus*) con potencial económico para el Estado de Tabasco; al respecto, se han reportado resultados alentadores en investigaciones realizadas para la micropropagación de pitahaya (Mohamed, 1994; Cruz *et al* 1998, Sánchez, *et al* 1998 y Payró *et al* 1998).

Diversos investigadores coinciden en que el Thiadiazuron (TDZ) es la sustancia citocinica más activa para el cultivo de tejidos en plantas (Huetteman and Preece, 1993), lo que facilita la micropropagación eficiente de algunas especies recalcitrantes, así mismo se ha reportado que se solubiliza al igual que otras citocininas, pero dada su efectividad se requiere en concentraciones muy pequeñas.

Por lo anterior el presente trabajo ha tenido como objetivo, estudiar la efectividad del TDZ, comparado a concentraciones equimolares con el Bencil Adenina (BA), sobre la estimulación de la brotación múltiple en explantes asépticos de pitahaya.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1.- Aspectos Generales del Cultivo

2.1.1.- Origen y Distribución Geográfica.

Las Cactáceas son una familia muy diversa, nativa de las Américas, comprende muchas especies suculentas muy valiosas en el mercado (Phillips, 1989).

Se considera que las pitahayas son originarias de América tropical; las especies que producen frutos rojos se hayan distribuidas a lo largo de centro y sur América en regiones de clima cálido desde el nivel del mar.

De acuerdo con lo publicado por Infante (1995), probablemente el género *Hylocereus*, sea originario de las Antillas Mayores o de México; ya que actualmente pueden encontrarse en condición silvestre en los estados de Veracruz, Tabasco, Campeche, Puebla, Chiapas y Oaxaca. Así mismo es posible encontrar especies de *Hylocereus* en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Morelos, Michoacán, Guanajuato, San Luis Potosí y el estado de México.

Se estima que en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, crecen mas de 600 especies de frutas comestibles, pero menos de 25 de ellas son comercializadas, en general las frutas producidas en las zonas tropicales y subtropicales como mango, papaya, caimito, kiwi y en especial la pitahaya, se ha detectado que desde finales de los 80s, los países desarrollados como Canadá, Estados Unidos entre otros han presentado un considerable incremento en la

demanda de los mismos, lo que representa apertura de tales productos en el mercado internacional (Centurión y Sauri, 1996).

2.1.2.- Hábitos de Crecimiento y Descripción Botánica.

La planta de pitahaya (*Hylocereus undatus*), es una planta perenne, con hábito de crecimiento rastrero y ramificación libre, crece trepando sobre árboles o piedras por medio de sus raíces; comúnmente tiene raíces fibrosas abundantes y desarrolla numerosas raíces adventicias que le ayudan a fijarse a los tutores (vivos o muertos) o a las piedras para obtener humedad y nutrimentos.

Las costillas son semirectas, onduladas y aparecen cerca de la base con una longitud de 50 a 60 cm, poseen espinas cortas de color gris y la punta oscura (Britton, 1963; Innes, 1991). La planta logra alcanzar una longitud de 7 a 10 m.

La flor es tubular, hermafrodita (con órganos masculinos y femeninos en la misma flor), blanca, grande (20 a 30 cm de longitud) y abre en la noche.

El fruto es globoso o subgloboso, mide de 10 a 12 cm de diámetro y es de color rojo o amarillo, cubierto con brácteas (escamas); es de pulpa dulce y abundante, de color que varía de blanco a amarillo rojizo.

Las semillas miden 3 milímetros de diámetro y son muy numerosas, de color café oscuro o negro, se encuentran distribuidas en toda la pulpa y contienen aceite.

En condiciones naturales, la principal forma de propagación de éstas especies se lleva a cabo por las aves, quienes al alimentarse de los frutos diseminan las semillas al ser expulsadas en el excremento, ya que debido a su pequeño tamaño, pasan directamente por el tubo digestivo sin ser totalmente digeridas,

favoreciéndose además por la acción del viento así como por la humedad propia de los suelos tropicales lo que facilita su germinación.

Las vainas son estructuras triangulares que rodean al tallo leñoso. Son carnosas y su tamaño así como el color han servido para identificar las variedades.

Poseen tres caras o aristas (costillas) simétricas, una de las cuales es plana y las restantes son angulares. La epidermis de la vaina es una capa cerosa de 1mm de grosor, pero que puede aumentar dependiendo de la variedad.

Una característica importante es la estructura morfológica en la sima de las aristas en donde se ubican areolas espinosas; esta puede ser cóncava u ondular.

Esta especie posee un metabolismo ácido de las crasuláceas (plantas CAM) que le permite sintetizar ácido málico por la noche que se acumula en las vacuolas y por el día, como sus estomas están cerrados no pueden absorber CO₂ de la atmósfera, el ácido málico se rompe, produciendo otros ácidos y CO₂ que es utilizado en la fotosíntesis normal cuyo producto final son los almidones, que se acumulan en la cloroplastos (Maltez, 1994; citado por Fernández 1994).

2.1.3.- Importancia Económica del Cultivo.

De acuerdo con estudios realizados por Centurión y Sauri (1996), hasta 1987 se había reportado una superficie de 639 ha sembradas en México con una producción de 1696 ton sin embargo, a nivel internacional el principal exportador es Colombia quien exporta a los Estados Unidos con un precio de 1.4 dólar por cada fruta, lo anterior demuestra lo redituable del cultivo.

Debido a que la pitahaya posee un alto valor nutritivo, se encuentra dentro de las frutas nativas de nuestro país que en los últimos años ha llamado la

atención por la alta capacidad de exportación que representa, lo que se traduce en ingresos para las zonas productoras.

En la actualidad el objetivo principal de la explotación de la pitahaya es la comercialización de la fruta para su consumo en fresco, aguas frescas, helados y mermeladas (Castillo, 1984).

En Tabasco Agroindustrias "Carla" fabrica jalea y licor de pitahaya; en Colombia además de los usos como fruta fresca, se considera como un tónico cardiaco y también se le atribuyen propiedades laxantes para activar el estomago, además de acuerdo con Reyes (1990), ejerce un efecto benéfico sobre la curación de cálculos renales.

2.2 .- Problemática del Cultivo en México.

2.2.1.- Sistemas de Producción.

La mayoría de las plantaciones en México se encuentran en condiciones semisilvestres y su explotación es a pequeña escala (huertos familiares); se cuenta con una producción anual de 300 ton. Predominan las explotaciones comerciales de poca extensión, en el Estado de Tabasco de acuerdo a lo publicado por Reyes, (1995), las plantas de pitahaya crecen trepando a los árboles de sombra que se encuentran establecidos en plantaciones cacaoteras, lo que se ve favorecido por las condiciones agroecológicas del entorno, sin embargo, su crecimiento sobre las plantas de cacao es indeseable.

En Yucatán y Campeche, es común observarlas sobre bardas rústicas de piedra denominadas "albarradas", así como trepadas en árboles de "cochite" (*Gliricidia cepium*, *Eritrina sp*) y otras especies forestales propias de la región.

2.2.2.- Sistemas de Propagación.

En explotaciones comerciales, la pitahaya se propaga vegetativamente debido a que las plantas provenientes de semilla sexual tardan aproximadamente 5 años en iniciar su producción, mientras que vegetativamente ésta se inicia a los 18 meses.

De modo convencional se utilizan estacas que miden desde 30 a 60 cm de longitud y se ha comprobado que las más largas emiten raíces más vigorosas y en menor tiempo (Infante 1995), lo que permite una rápida recuperación de la inversión. Sin embargo, se corre el riesgo de diseminar enfermedades, por lo que se crea la necesidad de contar con una huerta madre que permita tomar de ellas mediante podas severas el material de propagación, esto repercute directamente sobre los costos de producción debido a los gastos de mantenimiento, terreno, colecta del material, entre otros.

Actualmente los intentos realizados para la optimización de los sistemas de propagación de pitahaya, se han restringido al empleo de sustratos artificiales para el enraizamiento de varetas, así como, pruebas empíricas para determinar la longitud, posición, consistencia entre otros factores, que permitan la obtención rápida de nuevas plántulas.

De acuerdo con Reyes (1995), la obtención del material vegetativo para la propagación de la pitahaya, demanda gran cantidad de personal, así como el adiestramiento del mismo y su organización en cuadrillas que permitan realizar una adecuada selección, corte y manejo de las varetas.

Existen otros métodos por los cuales es posible obtener material vegetal con menos problemas de patógenos y es la utilización de la semilla proveniente del fruto. Sin embargo ésta requiere de mayor tiempo a nivel de semillero, el

porcentaje de alogamia es relativamente alto por lo que no se conservan las características de la planta madre.

2.2.3.- Incidencia de Patógenos.

Con el objetivo de buscar resistencia a los microorganismos del suelo y adaptabilidad a nuevas regiones para su cultivo a nivel intensivo (comercial) en Colombia, Israel y muy recientemente en México (Reyes 1990), se han injertado individuos seleccionados en patrones nativos, sin embargo, se requiere implementar serios trabajos enfocados a la colecta y rescate de ecotipos nativos e introducidos que favorezcan los programas de mejoramiento genético, propagación de plantas, control fitosanitario, sistema de plantación (conducción), estudios anatómicos y fisiológicos de la iniciación y diferenciación floral, que contribuyan la realización de estudios biotecnológicos.

Así mismo, diversas instituciones del país están realizando esfuerzos por coleccionar y domesticar los ecotipos silvestres e introducidos, con el objetivo de conocer su potencial de producción, así como su resistencia a enfermedades, principalmente la antracnosis.

Recientemente Chi, (1998), determinó que *Erwinia* es el agente causal de la bacteriosis de la pitahaya y presenta la intervención de dos subespecies: (a) *carotovora* que se desarrolla a temperaturas de 34°C y produce síntomas de pudrición blanda con un halo necrótico; y (b) *atroseptica* a temperaturas de 27°C, con síntomas de pudrición sin halo necrótico. Así mismo demostró que el empleo de estacas colectadas en las comunidades de Cholul o Telchac Pueblo estado de

Yucatán, junto con un manejo combinado a base de podas y productos químicos, representan el manejo integrado de la bacteriosis en el campo.

A pesar de lo anterior, debido a lo novedoso del cultivo aún se tienen serios problemas para su manejo agronómico y desafortunadamente pocos avances en el mejoramiento genético.

2.3.- Aspectos Generales de la Micropropagación.

2.3.1.- Importancia

La micropropagación denominada también como el cultivo de tejidos vegetales es muy importante por que permite la rápida multiplicación clonal, en los últimos años estas técnicas han permitido el establecimiento de numerosos laboratorios comerciales para propagar especies de interés comercial. Sin embargo, aunque existe mucha investigación al respecto hace falta resolver algunos problemas relacionados con el establecimiento y manejo *in vivo* de las plantas producidas *in vitro* (Murashige, 1978, citado por Espada y Gil, 1996).

Algunas plantas cuando son cultivadas *in vitro*, frecuentemente sus procesos fisiológicos, bioquímicos y morfológicos son afectados por el tipo de acondicionamiento en los contenedores (fase gaseosa y sólida); como consecuencia sufren algunos desordenes que manifiestan principalmente en las hojas, donde se afectan dos grandes funciones llevadas a cabo por estos órganos: fotosíntesis e intercambio gaseoso (Debergh y Maena, 1989; Kozai, 1991, citado por Espada y Gil 1986)

Los tipos de medios mas usados para diversas especies de plantas en el cultivo de tejidos vegetales son los que continuación se enumeran:

- 1.- Medio de Gamborg *et al.*, (1968).

- 2.- Medio de Phillips y Collins (1979)
- 3.- Medio PC.
- 4.- Medio para plantas leñosas (Woody Plant Medium).
- 5.- Medio de White (1943).
- 6.- Medio Murashige y Skoog (MS).

Este ultimo es el mas usado para diversas especies de plantas, a la vez se le pueden hacer diversas modificaciones, para el cultivo de otras especies tal como lo han hecho muchos investigadores.

2.3.2. – Ventajas de la Micropropagación.

Hu y Wang (1983), Villalobos y Thorpe, citado por Enriquez y Díaz (1994) señalan algunas ventajas del cultivo de tejidos con respecto a otros sistemas de propagación:

1. Con una pequeña cantidad de tejido lo que constituye un explante o inóculo, potencialmente se puede regenerar millones de plantas, ya que el explante es un fragmento de planta que es establecido *in vitro*.
2. Esta técnica representa una opción para la multiplicación de las especies, con dificultades para ser propagadas por métodos convencionales.
3. El número de plantas derivadas por genotipo se puede incrementar rápidamente y en un tiempo más corto.
4. Los niveles de nutrimentos, luz, temperatura y otros factores pueden ser fácilmente controlados para acelerar la multiplicación vegetativa y regeneración.

5. Se puede multiplicar grandes cantidades de plantas en espacio reducidos, a bajos costos y tiempos económicamente costeados.
6. Se puede controlar la sanidad del material propagado.
7. Los materiales se pueden transportar bajo las condiciones *in vitro* a otros países con menos restricciones.
8. En la mayoría de los casos la micropropagación es independiente de las estaciones del año.
9. Las plantas *in vitro* requieren atención mínima entre subcultivos, por lo tanto, no son necesarios trabajos y materiales para riego, deshierbes, aspersiones, etc.

2.3.3.- Desventajas de la Micropropagación.

Sacawa y Kunisaki (1990), citados por Enríquez y Díaz (1994) encuentran algunas desventajas de la micropropagación con respecto a métodos convencionales de propagación:

1. La micropropagación requiere técnicas avanzadas e instalaciones y equipo especializados.
2. Los propágulos son relativamente caros debido a los métodos usados en el trabajo intensivo.
3. Deben desarrollarse métodos específicos para obtener resultados óptimos con cada especie.

4. Las plántulas inicialmente son muy pequeñas.
5. La posibilidad de producir variantes somaclonales es muy alta.

2.3.4.- Proceso de Propagación de Plantas por Cultivo de Tejidos.

Un esquema de propagación *in vitro* de plantas descrito por Murashige (1974) fue posteriormente revisado por Debergh y Maena (1981), para considerar cinco etapas de propagación, sobre la base de la experiencia obtenida en laboratorios comerciales:

2.3.4.1.- Etapa 0: Preparación de la Planta Madre.

Se ha enfatizado que hay un gran potencial para dispersión de patógenos sistémicos en plantas propagadas por métodos vegetativos tradicionales, y que la condición fisiológica de la planta madre determina la respuesta en el medio de cultivo; por lo que el objetivo de esta etapa es proporcionar material vegetativo en una condición sanitaria adecuada, que ayude a reducir la contaminación durante la etapa de establecimiento de cultivos asépticos.

Las plantas de las que se obtienen tejidos, para ser cultivadas *in vitro* deben tener un buen estado nutricional, ya que puede determinar la respuesta de los tejidos a las condiciones de cultivo.

2.3.4.2.- Etapa 1: Establecimiento de Cultivo Aséptico.

El establecimiento de cultivos asépticos es la etapa inicial en el proceso para la micropropagación de plantas; considerando que de manera natural la pitahaya (*Hylocereus undatus*), debido a su hábito de crecimiento, requerimientos de humedad y luz, es fuertemente afectada por diversos hongos y bacterias, se dificulta drásticamente el proceso de establecimiento *in vitro*, y por ende la aplicación de las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales en ésta especie.

Al establecer tejidos vegetales en el medio de cultivo se busca que este sea aséptico. En esta etapa puede ocurrir un alargamiento de brotes apicales, enraizamiento de brotes, proliferación de callo, etc., el objetivo principal es que el cultivo sea establecido libre de contaminación por microorganismos y que una adecuada proporción de los explantes sobrevivan a las condiciones de incubación.

En la esterilización química superficial que se aplica al material vegetal antes de ser establecido en el medio de cultivo se utilizan las siguientes sustancias:

- a) Etanol al 70%
- b) Hipoclorito de sodio (NaClO), 1-2% durante 5 a 30 minutos
- c) Hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, 3.5-10% durante 5 a 10 minutos.
- d) Cloruro de mercurio HgCl_2 , 0.01-0.05% durante 2 a 12 minutos.

El proceso de limpieza del material vegetal que se usa es el siguiente:

- a) Lavar con detergente y agua corriente.
- b) Inmersión en alcohol al 70%.
- c) Inmersión en hipoclorito de sodio.

d) Tres enjuagues con agua destilada esterilizada.

2.3.4.3.- Etapa 2: Multiplicación de Propágulos.

Se busca que produzca un rápido incremento de órganos y otras estructuras, las cuales posteriormente pueden dar origen a plantas. El incremento puede ser obtenido por: inducción de órganos adventicios, formación de embriones o por aumento de brotes axilares.

2.3.4.4.- Etapa 3: Preparación para la Transferencia de Plantas al Suelo

El objetivo es preparar a los propágulos para una exitosa transferencia a suelo por lo que en esta etapa se considera:

- a) El enraizamiento de los brotes (en algunas especies).
- b) Crecimiento de los brotes
- c) Endurecimiento de las plantas para proporcionar alguna tolerancia a tensión de humedad.
- d) Obtención de cierto grado de resistencia a algunos patógenos.
- e) Conversión de las plantas de un estado heterotrófico a uno autotrófico.

Los cultivos de la etapa tres deben ser frecuentemente llevados a invernadero para endurecimiento y para ayudar a reducir dificultades en la transferencia de *in vitro* a *in vivo* (Sagawa y Kunisaki, 1990, citado por Enríquez y Díaz 1994).

2.3.4.5.- Etapa 4: Enraizamiento *in vitro* y Aclimatización.

Debergh y Maena (1981) así como Torres (1989), han puesto objeciones al enraizamiento *in vitro* de plantas debido a las siguientes afirmaciones:

- a) Que el enraizamiento *in vitro* de brotes es una labor que ocupa mucha mano de obra y que esta etapa es responsable de al menos 35% del costo de las plantas producidas *in vitro*.
- b) Usualmente hay un retraso en el crecimiento de brotes enraizados *in vitro*, después de la transferencia fuera del medio de cultivo.
- c) Es difícil inducir un buen funcionamiento del sistema radical producido *in vitro* y se ha observado que dos semanas después del trasplante del medio de cultivo a suelo, las raíces formadas *in vitro* han muerto y nuevas raíces comienzan a desarrollar.
- d) Las plantas derivadas *in vitro* tienen menos cera cuticular en sus hojas en comparación con plantas que crecen en campo o invernadero, esto provoca que las plantas producidas *in vitro* pierdan agua con mas rapidez.
- e) Inicialmente las plantas producidas *in vitro* tienen un control inefectivo de apertura de estomas.
- f) Las plántulas que crecen *in vitro* en un medio que contiene carbohidratos generalmente producen solo una pequeña parte de sus requerimientos de carbohidratos a través de la fijación fotosintética de CO₂. Cuando las plantas son transferidas a condiciones *in vivo* estas deben cambiar al estado autotrófico.

2.4.- Micropropagación de Cactáceas.

2.4.1.- Generalidades

La aplicación de las técnicas biotecnológicas para la propagación de plantas, ha sido exitosa en una amplia gama de especies, tanto medicinales, ornamentales, forestales, frutales como en pastos; sin embargo, en la actualidad existen diversas especies que no han sido explotadas para su aprovechamiento a través de dicha tecnología.

Desde hace varios años, muchos estudios en los sistemas de propagación de cultivos de tejidos de cactus han reportado uniformidad y proliferación de plantas a partir de yemas axilares tomadas de la germinación *in vitro* de semillas asépticas de *Cereus peruvianus*, (Mauseth, 1979; Vyskot and Jára, 1984; Starling, 1985); ya que esto minimiza los problemas de la contaminación que esta asociada con las yemas axilares de plantas adultas *in vivo*.

En cactáceas, la micropropagación a través de brotes axilares se ha reportado con éxito para más de 50 especies, la mitad de las cuales están registradas como amenazadas o en peligro de extinción; y así mismo se han establecido bancos de germoplasma para su conservación (Phillips, 1989; Smith *et al*, 1991).

Lo anterior apoya lo publicado por Clayton *et al* (1990), quienes afirman que el cultivo de tejidos vegetales puede ser empleado para la preservación de germoplasma de especies amenazadas o en peligro de extinción por lo que a continuación, se presenta una breve relación de cactáceas que han sido propagadas a través del cultivo de tejidos:

- ❖ -*Neomammillaria prolifera*
- ❖ -*Opuntia polyacantha*
- ❖ -*Mammillaria woodsii*
- ❖ -*Mammillaria elongata*
- ❖ -*Epiphyllum chysocardium*
- ❖ -*Cephalocereus senilis*
- ❖ -*Astrophytum myriostigma* Lem
- ❖ -*Mammillaria carmenae*
- ❖ -*Trichocereus spachianus*
- ❖ -*Echinopsis turbinata*
- ❖ *Opuntia amyclaea*
- ❖ -*Opuntia tomentosa*
- ❖ -*Opuntia streptacantha*
- ❖ -*Opuntia cochenera*
- ❖ -*Opuntia tapona*
- ❖ -*Opuntia leucotricha*
- ❖ -*Opuntia ficus-indica*
- ❖ -*Mammillaria san-angelensis*

En nuestro país se ha reportado la germinación exitosa de semillas asépticas de diversas especies cactáceas en peligro de extinción (Bustamante, *et al.* 1990), así mismo la proliferación de callos, regeneración de brotes y plantas normales de *Pelecyphora aselliformis*, *Neolloydia lophophoroides*, cuyas semillas tienen un bajo porcentaje de germinación en condiciones naturales, y las plantas presentan una baja o nula producción de vástagos (Bustamante and Heras, 1990 y Bustamante and García, 1994).

Enríquez y Díaz (1994), propagaron *in vitro* *Opuntia amyclaea*, utilizando yemas axilares como inóculo tomados de viveros, sin embargo, reportan la presencia de bacterias y hongos a partir del tercer día de cultivo en explantes tomados en la temporada de lluvias; por lo que para reducir la contaminación *in vitro*, aplicaron fungicidas a las plantas en el vivero varias semanas antes de tomar material vegetativo; para el establecimiento del cultivo *in vitro* en presencia de citocininas. Limpiaron los fragmentos de tallo sumergiéndolos en alcohol al 70% (30 seg) e hipoclorito de sodio al 2.5% (15 min) seguidamente los sometieron a tres enjuagues sucesivos con agua esterilizada; obteniendo como resultado un 100% de brotación en yemas axilares.

Manchado y Prioli (1996) indujeron plantas a partir de la organogénesis indirecta, utilizando como material vegetativo brotes laterales y apicales de *Cereus peruvianus* Mill., establecieron sus explantes en un medio MS, suplementado con vitaminas de Gamborg B₅, 3% de sacarosa y 0.8% de agar; lograron resultados positivos con los brotes laterales, mientras que los brotes apicales no respondieron a la multiplicación *in vitro*.

Con el objetivo de estimular la brotación múltiple, Zapata *et al* (1998), colectaron plantas silvestres de *Mammillaria gaumeri*, una cactácea de la península de Yucatán; cuyas poblaciones silvestres han disminuido considerablemente en los últimos años, y emplearon segmentos de tallo y raíz para desinfestarlos eliminando las espinas, lavando con agua y detergente, e inmersiones en etanol al 70% (5 min); dos tratamientos con hipoclorito de sodio comercial al 30% (30 min) y al 20% (20 min), así como enjuagues posteriores con agua destilada estéril. De lo anterior reportan la obtención del 25% de asepsia en los explantes de tallo, y la obtención de callos, brotes y raíces en diversas concentraciones de BAP y ANA.

2.4.2.- Micropropagación de Pitahaya (*Hylocereus undatus*)

Son varios los trabajos que reportan la propagación de cactáceas por cultivo de tejidos, sin embargo en lo que se refiere a la propagación *in vitro* de pitahaya son muy escasos.

2.4.2.1.- Metodología Para el Establecimiento Aséptico.

Recientemente en pitahaya (*Hylocereus undatus*), Aragón *et al*; (1998), emplearon 27 tratamientos de desinfestación basados en alcohol al 70%, diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de exposición, empleando además 0.01% de gentamicina. Sus resultados demuestran que el alcohol no afecta significativamente la desinfestación del tejido; sin embargo los daña irreversiblemente.

Ensayos preliminares realizados en nuestro laboratorio indicaron que es el hipoclorito de sodio quien daña a los tejidos ocasionándoles quemaduras que avanzan desde el corte hacia el centro del explante.

Payró *et al* (1998), colectaron plantas silvestres localizadas en diferentes comunidades del área de influencia del Instituto Tecnológico Agropecuario No. 28; con éste material se establecieron macetas para su enraizamiento y brotación así mismo, se disectaron nudos que fueron sometidos a diferentes tiempos y concentraciones de cloralex y alcohol como principales agentes descontaminantes. Sus resultados demuestran que ante la dificultad de desinfectar pencas maduras provenientes directamente del campo, es posible emplear pencas jóvenes crecidas en vivero y obtener un 100% de asepsia en explantes, sin afectar la sobrevivencia de los mismos, empleando un pretratamiento a base de benlate (1gr/l) durante 3 hr seguido de una inmersión en una solución de cloralex al 2.5% (5 min).

2.4.2.2.- Germinación de Semillas *in vitro*.

Infante (1992), utilizó material vegetativo de pitahaya amarilla (*Mediocractus coccineus*), tomado de semillas germinadas en un medio MS y sales minerales con 116.6 μ M de mioinositol, 1.2 μ M thiamine-HCL, 3% sacarosa y 0.7% de agar bacteriológico y un pH de 5.7 para la inducción de la brotación múltiple.

Sánchez *et al.*, (1998), extrajeron cuidadosamente semillas de pitahaya (*Hylocereus undatus*) en buen estado físico y de forma y tamaño homogéneas para su germinación *in vitro* bajo el efecto de diferentes concentraciones de thiamine, encontrando a los 30 días de incubación bajo luz continua que las plántulas más vigorosas fueron obtenidas en la concentración 0.2 mg/l (2.14 cm), así como la mayor inducción de brotes (58.57%), mientras que la mayor longitud de éstos fue inducida por la concentración 1.50 mg/l (0.97 cm).

Respecto a la inducción de raíces y longitud de las mismas, ésta fue homogénea en todos los tratamientos, no así en 2.50 mg/l que indujo únicamente 0.68 cm por lo que concluyen que la tiamina no ejerce un efecto significativamente favorable sobre la germinación *in vitro* de semillas de pitahaya.

2.4.2.3.- Brotación Múltiple.

Hylocereus undatus no había sido estudiada, hasta que Mohamed (1994), indujo la brotación múltiple de yemas empleando 0.5 μM de TDZ en combinación con 0.5 μM de ANA, brotes que fueron individualizados, enraizados y transferidos a suelo presentando un crecimiento normal. No obstante empleó como explante segmentos de ramas obtenidas a través de la germinación *in vitro* de semillas asépticas lo que, de acuerdo con Aragón *et al* (1998), no permite conocer la carga genética del material obtenido.

Posteriormente Cruz *et al.*, (1998), al evaluar el efecto de diferentes concentraciones de TDZ en combinación con 0.5 μM de ANA sobre la morfogénesis en yemas axilares de pitahaya (*Hylocereus undatus*) provenientes de brotes *in vivo* durante varios días de incubación, observaron desde la primer semana que el total de los tratamientos indujo formación callos en la base y en los costados de los explantes; destacándose 0.2, 0.5 y 0.6 μM de TDZ con la mayor inducción (50%).

Sin embargo a los 15 días, 0.2 y 0.4 μM de TDZ lograron un total de 66.6%, 0.5 μM un 83.8% y 0.6 μM un 75%; los resultados obtenidos demostraron que durante el tiempo de cultivo, los callos no lograron crecer más de 0.5 cm de diámetro.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Ubicación del Lugar.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico Agropecuario No. 28, ubicado en la Villa de Ocuilzapotlán, Centro Tabasco.

3.2.- Material Vegetativo y Medio de Cultivo.

Del huerto fenológico del Instituto Tecnológico Agropecuario No. 28, se tomó un fruto maduro de pitahaya físicamente sano del cual, en base a lo reportado por

Sánchez, *et. al.* (1998), se extrajeron cuidadosamente con ayuda de pinzas y agujas de disección 1500 semillas sanas de forma y tamaño homogéneos.

Después de eliminarles el exceso de pulpa, fueron transferidas a una cámara de flujo laminar donde se sometieron durante 10 min a una solución de cloralex^R (100%), y cinco enjuagues sucesivos con agua destilada estéril; posteriormente se establecieron en un medio básico gelificado MS a la mitad de la concentración de los macro y micronutrientes, conteniendo 30 g/l de sacarosa y pH de 5.7.

Los contenedores fueron frascos tipo Gerber, con 25 ml de medio de cultivo y 10 semillas cada uno.

3.3.- Establecimiento del Experimento.

A los 30 días de incubación bajo luz continua; se seleccionaron plántulas asépticas y de aspecto normal para disectar pencas de 1.0 cm de longitud; cuidadosamente se establecieron 2 en cada repetición.

Los tratamientos que se relacionan en el cuadro 1, fueron diferentes concentraciones (equimolares) de TDZ así como de BA. Se emplearon 12 repeticiones por tratamiento haciendo un total de 168 repeticiones conteniendo dos explantes cada una.

Cuadro 1. Concentraciones de TDZ y BA estudiados en la presente investigación.

TRATAMIENTO	CITOCININAS	
	TDZ (μ M)	BA (μ M)
1 Testigo	0.0	0.0
2	1.0	0.0
3	2.0	0.0
4	4.0	0.0
5	6.0	0.0

6	8.0	0.0
7	10.0	0.0
8 Testigo	0.0	0.0
9	0.0	1.0
10	0.0	2.0
11	0.0	4.0
12	0.0	6.0
13	0.0	8.0
14	0.0	10.0

En ambos casos se empleó el medio de cultivo MS, con 30 g/l de sacarosa, pH de 5.7 y gelificado con phytigel.

Como puede observarse en el cuadro 1, se incluyeron dos tratamientos testigo con la finalidad de tener una referencia respecto a la consistencia de los posibles resultados.

3.4.- Variables Evaluadas.

Se realizaron en total de cuatro evaluaciones cada seis días, registrando independientemente los datos de cada variable por fecha de observación.

3.4.1.- Número de Brotes.

Se realizó mediante la apreciación visual y conteo del número de brotes nacidos en diferentes puntos del explante. Se expresa en promedio (\bar{x}) por explante.

3.4.2.- Longitud de Brotes.

Esta variable se tomó como una referencia del vigor o crecimiento de los brotes emitidos, midiendo cada uno con la ayuda de una regla milimétrica por encima del contenedor. Se expresa en centímetro promedio (**cm**) de brote.

3.4.3.- Número de Raíces.

Se realizó mediante la apreciación visual y conteo del número de raíces nacidas en diferentes puntos del explante. Se expresa en promedio (\bar{x}) por tratamiento.

3.4.4.- Longitud de Raíces.

Esta variable se tomó como una referencia del vigor o crecimiento de las raíces emitidas, midiéndolas con la ayuda de una regla milimétrica por encima del contenedor. Se expresa en centímetro promedio (**cm**).

3.4.5.- Diámetro de Callos.

Esta variable se tomó como una referencia del crecimiento de los callos emitidos, midiéndolos con la ayuda de una regla milimétrica por encima del contenedor. Se expresa en centímetro promedio (**cm**).

Los datos tomados en cada fecha de observación fueron analizados mediante un análisis de varianza del diseño completamente al azar (DCA) con igual número de repeticiones por tratamiento; y la comparación de medias se realizó mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) con un nivel de significancia de 0.05.

Se utilizó el programa estadístico propuesto por Olivares (1994), de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La información que a continuación se presenta fue validada estableciendo un segundo lote experimental cuyos resultados mostraron tendencias similares al experimento inicial lo cual demuestra la consistencia de los mismos, y puede constatarse con el comportamiento de ambos tratamientos testigo.

Se presentan los resultados discutiéndolos por variable evaluada aclarando, que las letras asignadas a los valores proporcionados corresponden a los resultados obtenidos en la prueba de medias (DMS) anteriormente referida ($NS=0.05$).

4.1.- Número y Longitud de Brotes.

Como puede observarse en la figura 1, nuestros resultados muestran que los explantes son capaces de formar brotes y raíces aún sin la adición de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal (SRCV) pero éstas sí se requieren para la formación de callos.

Este comportamiento se debe a la naturaleza misma de la especie ya que de manera silvestre ramifica con relativa facilidad y emite raíces adventicias para fijarse en la corteza de los árboles.

La figura 2 presenta un aspecto general del comportamiento de los explantes bajo el efecto del TDZ (panel A) y BA (panel B) a los 24 días de incubación.

En la figura 3, puede apreciarse que ambas citocininas ejercen un efecto estimulativo sobre la brotación a partir de los primeros seis días de incubación, sin embargo, fueron demasiado inconspicuos por lo que a los tratamientos se le asignó el valor de 0.00 decidiendo registrar las mediciones a partir del día 12.



Figura 1. Emisión de brotes y raíces en tratamiento testigo a los 12 días de incubación. La barra representa 1 cm.

Aunque de modo general todos los tratamientos mejoran marcadamente su efecto con el paso del tiempo, para TDZ se observaron $8\mu\text{M}$ (9.50 BC) y $10\mu\text{M}$ (8.75 BCD) con los mejores promedios, y para BA, $4\mu\text{M}$ (10.08 AB) y $6\mu\text{M}$ (12.16 A); sin embargo el crecimiento de los brotes fue muy incipiente pues la longitud promedio máxima registrada fue 0.41 cm.

A los 18 días de incubación se observó la misma tendencia en los tratamientos, registrándose de modo general un aumento promedio de 1 a 4 brotes inducidos por tratamiento, sin embargo, 1 μM de TDZ induce un promedio similar al de 10 μM de BA (10.58 BC y 10.83 BC respectivamente), mientras que 4 y 6 μM de BA presentan los promedios mas altos (11.66 B y 15.25 A respectivamente).



A

B

Figura 2. Comportamiento de explantes de pitahaya establecidos en un medio MS, suplementado con diferentes concentraciones (μM) de TDZ (A) y BA (B) a los 24 días de incubación bajo luz continua.

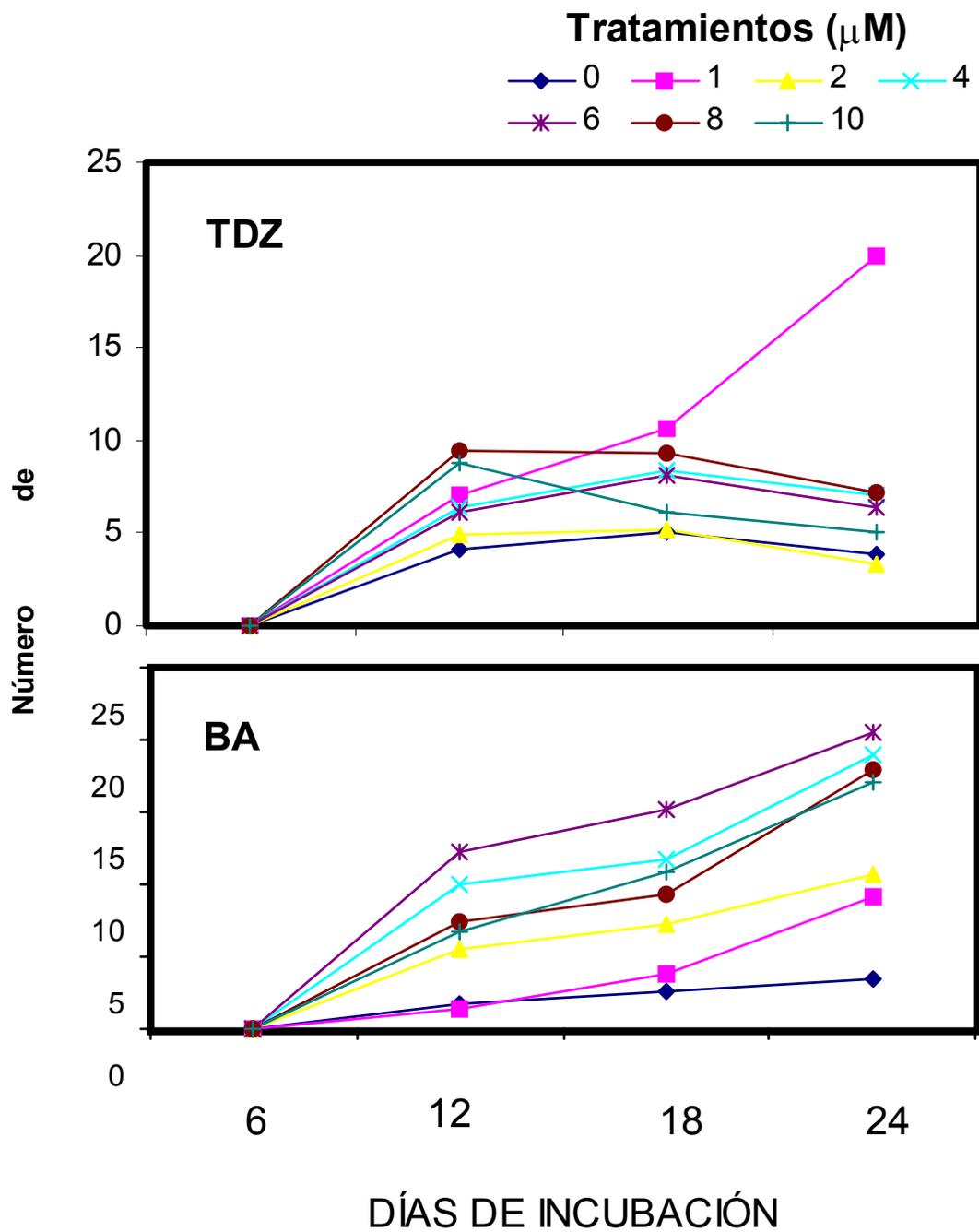


Figura 3. Efecto del TDZ y el BA sobre el NUMERO DE BROTES inducidos en explantes de pitahaya durante un ciclo de incubación bajo luz continua.

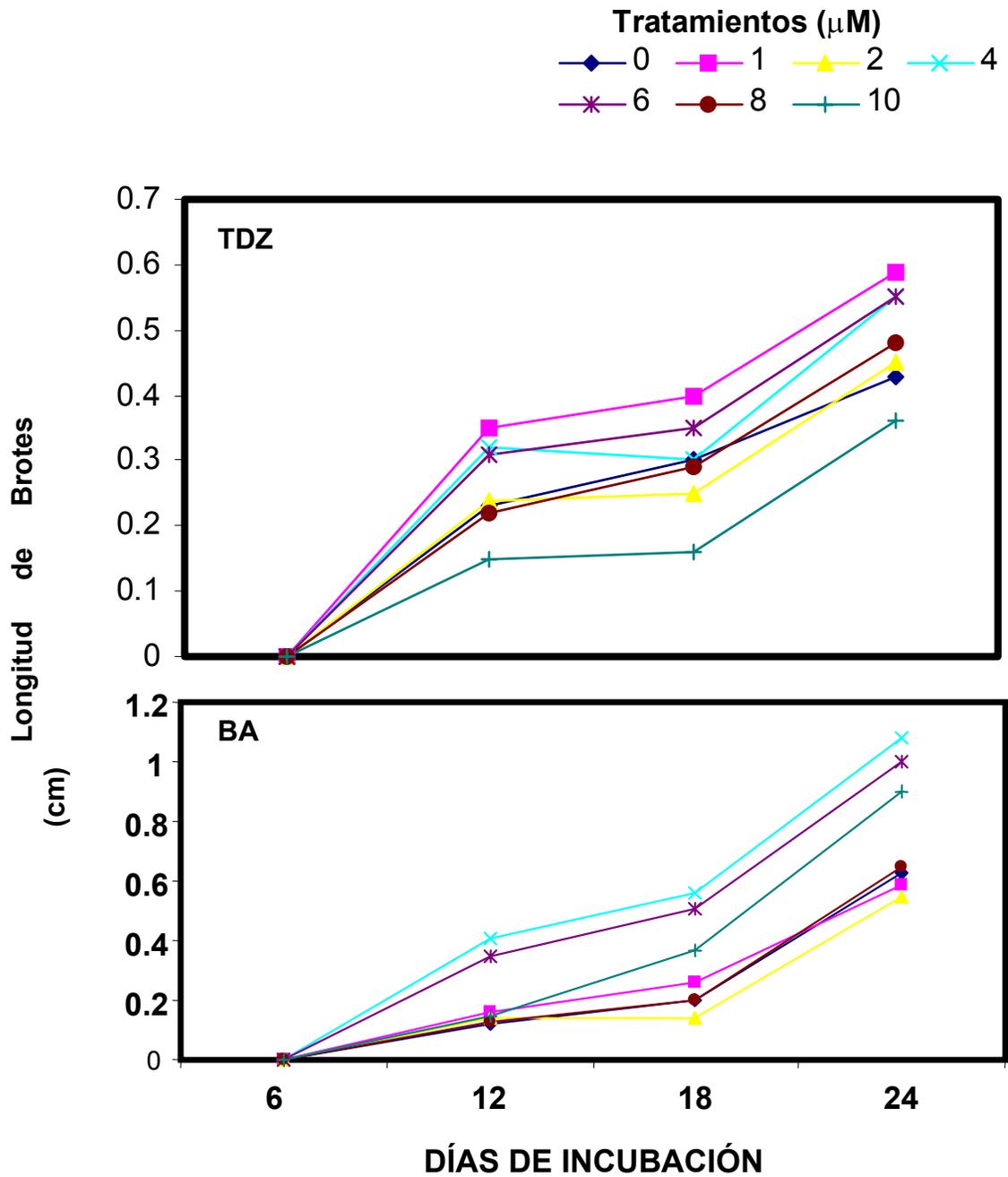


Figura 4. Efecto del TDZ y el BA sobre la LONGITUD DE BROTES (cm) inducidos en explantes de pitahaya durante un ciclo de incubación bajo luz continua.

Como puede observarse en la figura 3, a partir de esta fecha se observa una disminución en el número de brotes emitidos por las concentraciones 2 a 10 μM de TDZ esto se explica, debido a que a partir de éste tiempo diversos brotes que fueron anteriormente inducidos paulatinamente se van transformando en pequeños callos.

La figura 4, muestra que el crecimiento de los brotes sigue siendo incipiente aun que se destaca 4 μM de BA (0.56 A) con la máxima longitud promedio.

La tendencia presentada en la figura 2, se ve reflejada en las figuras 3 y 4, ya que a los 24 días de incubación 1 μM de TDZ (20.00 A) al igual que 6 μM de BA (20.58 A) inducen el mayor número de brotes, sin embargo, las medias que corresponden a los tratamientos 4, 8 y 10 μM de BA, aunque ligeramente inferiores son estadísticamente iguales (DMS, NS=0.05). Así mismo, como puede observarse en la figura 4, las concentraciones de 4, 6 y 10 μM de BA indujeron los brotes de mayor longitud (1 cm).



Figura 5. Diversidad de LONGITUD DE BROTOS (cm) inducidos por 1 μM de TDZ a los 24 días de incubación bajo luz continua. La barra representa 1 cm.

Como puede observarse en la figura 3, de lo anterior se obtiene que es posible estimular la inducción de brotes múltiples físicamente normales, con 1 μ M de TDZ en la misma magnitud que con 4, 6, 8 y 10 μ M de BA lo que ratifica su efectividad reportada por Huetteman and Preece (1993).

Sin embargo cabe destacar el reducido tamaño de brotes que emiten los tratamientos de TDZ.

Cruz *et al.*, (1998), en nudos de pencas tomadas de vivero lograron un porcentaje de inducción de brotes entre el 8 y 16% con 0.3 y 0.5 μ M de TDZ

Aunque BA induce el mejor crecimiento deberán realizarse investigaciones para mejorarlo ya que el vigor es un factor importante para la aclimatización de las vitroplantulas.

En ninguno de los tratamientos ensayados se observó la inducción de brotes mal formados, de modo general, como se observa en la figura 5, los brotes inducidos presentan un aspecto físico normal, salvo que como se explicó con anterioridad los niveles de 2 a 10 μ M de TDZ transforman sus brotes en callos después de 18 días de incubación.

En sentido estricto, lo anterior no implica que se induzcan brotes anormales, sin embargo, es importante destacar que el reducido tamaño de los brotes es un factor que pudiera ser limitante al momento de iniciar el proceso de aclimatización, por lo que ésta problemática deberá ser estudiada como objetivo principal en trabajos posteriores; haciendo énfasis sobre la posible relación existente entre el crecimiento inicial (como un indicativo de vigor), referido a la condición que posee la plántula *in vitro*, y la sobrevivencia, velocidad de crecimiento así como el crecimiento final.

4.2.- Número y Longitud de Raíces.

Como puede observarse en la figura 6, la formación de raíces, se presentó en ambos tratamientos testigo durante todo el tiempo de incubación, destacándose la incapacidad del TDZ para estimular la inducción de éste órgano, así mismo, se observó que BA a concentraciones de 4, 6, 8 y 10 μM ejerce un efecto inhibitorio.

Como puede observarse en la figura 6, el TDZ inhibe la formación de raíces más eficientemente que el BA ya que éste en concentraciones de 1 y 2 μM permiten a los 24 días de incubación 4.91B y 4.08B raíces respectivamente, sin embargo no es posible atribuirles la capacidad de inducción ya que en número, son estadísticamente iguales al efecto del tratamiento testigo e inferiores en longitud, lo cual puede observarse en la figura 7.

No obstante Cruz *et al.*, (1998), en nudos de pencas tomadas de vivero encontraron que 0.3 μM de TDZ indujo un 25.0% de raíces con una longitud de 2.5 cm mientras que 0.2 μM indujo sólo el 8.33% pero alcanzaron mayor longitud (3.5 cm) esto demuestra que concentraciones menores de 1 μM de TDZ ejercen un efecto estimulativo sobre la rizogénesis.

Cabe hacer mención que estas variables fueron reportadas para emitir información complementaria al presente trabajo.

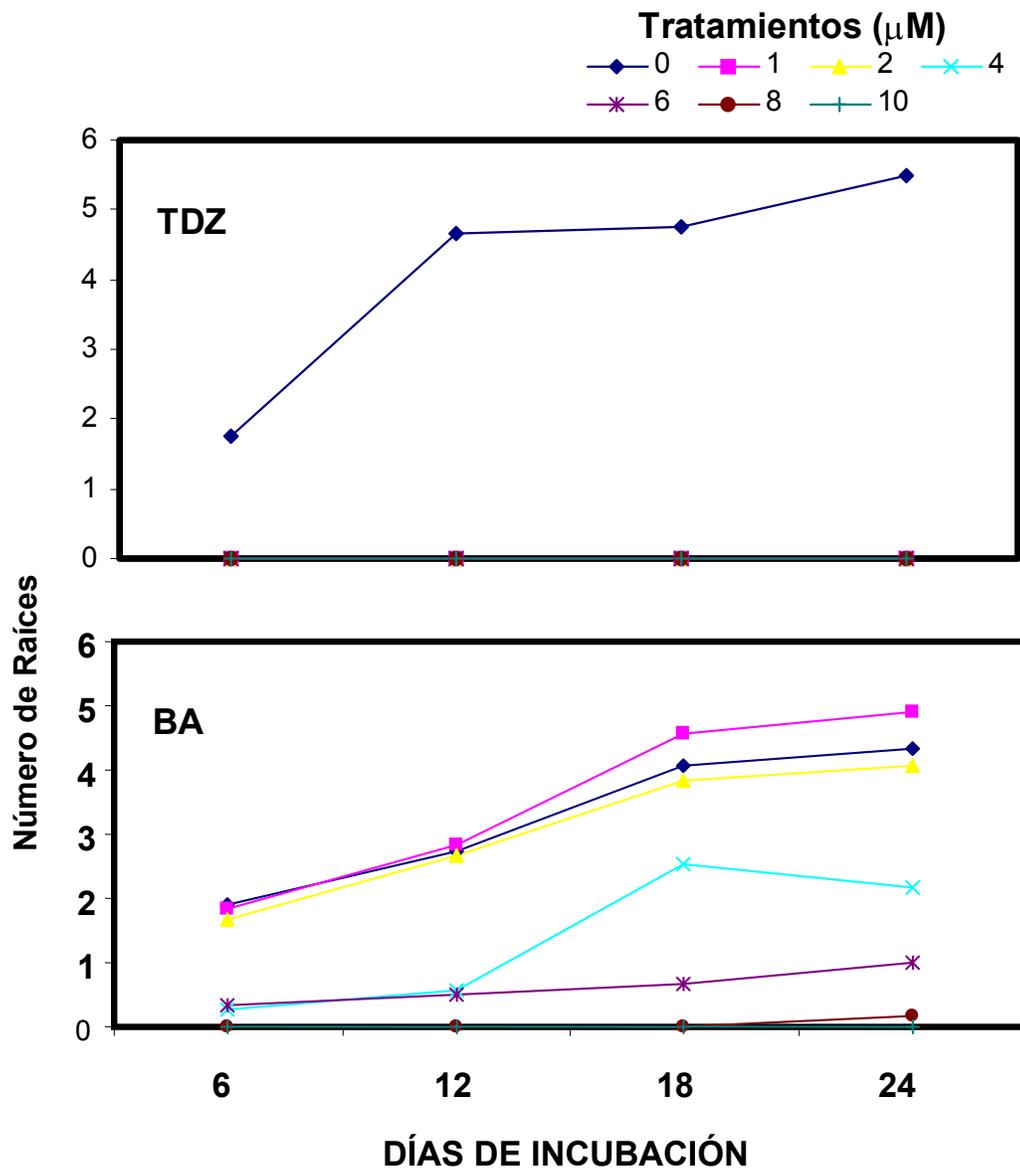


Figura 6. Efecto del TDZ y el BA sobre el NUMERO DE RAÍCES inducidas en explantes de pitahaya durante un ciclo de incubación bajo luz continua.

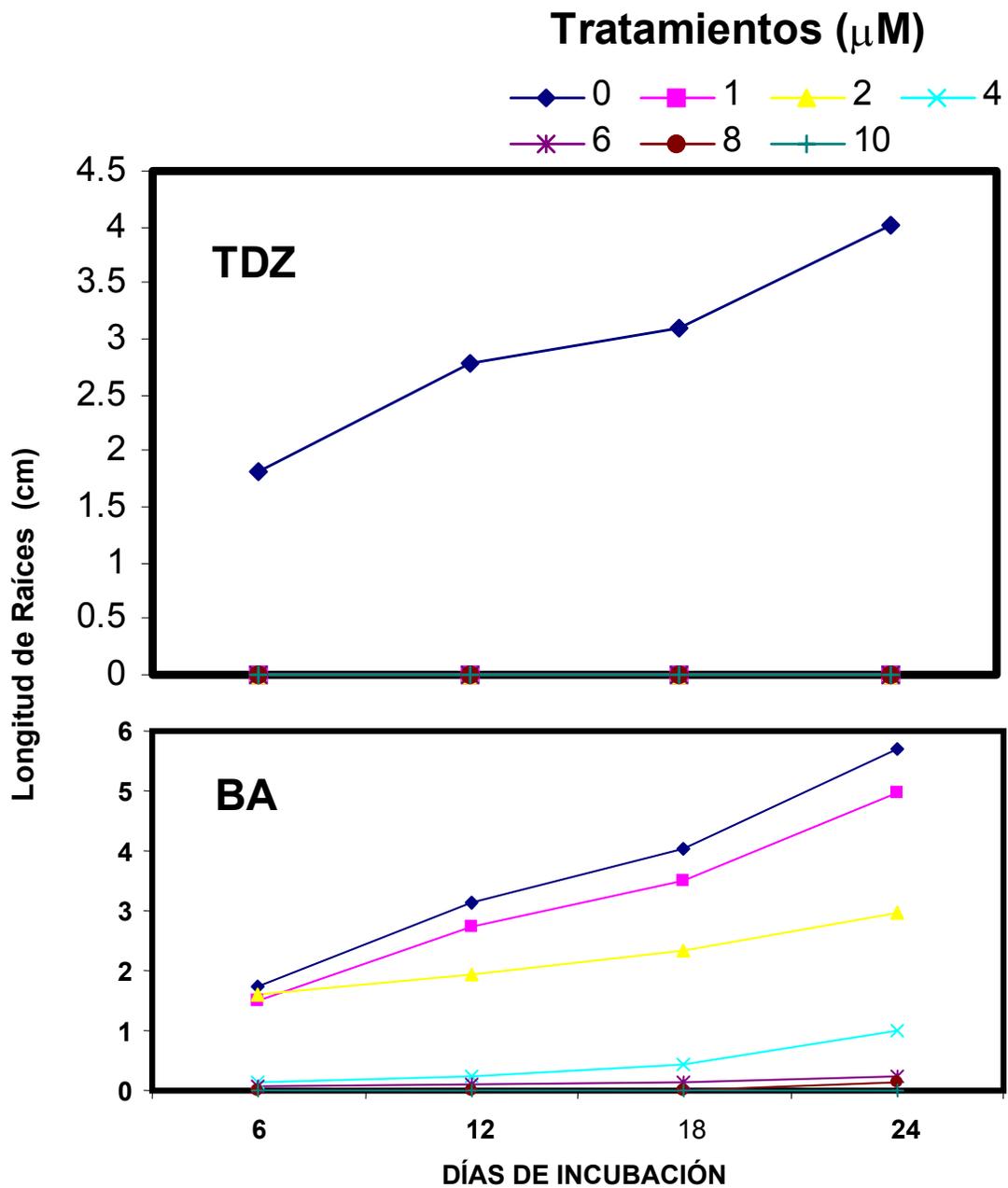


Figura 7. Efecto del TDZ y el BA sobre la LONGITUD DE RAÍCES (cm) inducidas en explantes de pitahaya durante un ciclo de incubación bajo luz continua.

4.3.- Diámetro de Callos.

Como puede observarse en la figura 8, aún en la concentración más baja el TDZ ejerce un efecto estimulativo sobre la formación de callos, sin embargo ésta variable no es de interés para los objetivos del presente trabajo.

De acuerdo a la tendencia que describe la figura 3, se observa la poca capacidad del 4 μM de TDZ para la estimulación de la brotación, sin embargo, tales brotes son muy pequeños y se transforman en callos a partir de los 18 días de incubación. Un aspecto de los mismos se presenta en la figura 9.

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por otros investigadores tales como Huetteman and Preece (1993), quienes afirman que el TDZ a concentraciones mayores de 1 μM estimula la formación de callos en plantas leñosas. Todas las concentraciones de TDZ inducen callos, destacándose las mayores a 4 μM , así mismo se observa en la figura 8, que los valores obtenidos en los tratamientos de BA son inconspicuos.

Cruz *et al.*, (1998) en pitahaya, observaron desde la primer semana de incubación que el total de los tratamientos indujo formación callos en la base y en los costados de los nudos de pencas tomadas de vivero; destacándose 0.2, 0.5 y 0.6 μM de TDZ con la mayor inducción (50 %), presentando un ligero incremento a los 15 días de cultivo, a partir del cual no hubo cambios, logrando 0.2 y 0.4 μM de TDZ un total de 66.6 %, 0.5 μM un 83.8 % y 0.6 μM un 75 %; sin embargo, éste efecto no es propio del TDZ, sino de la acción conjunta con los 0.5 μM de ANA presentes en el medio; durante 7 semanas de cultivo los callos no lograron crecer más de 0.5 cm de diámetro, una leve formación de callos en la base y en los bordes de las yemas axilares disectadas de plantas maduras y establecidas en un rango de 0.1 a 0.7 μM de TDZ en combinación con 0.5 μM de ANA.

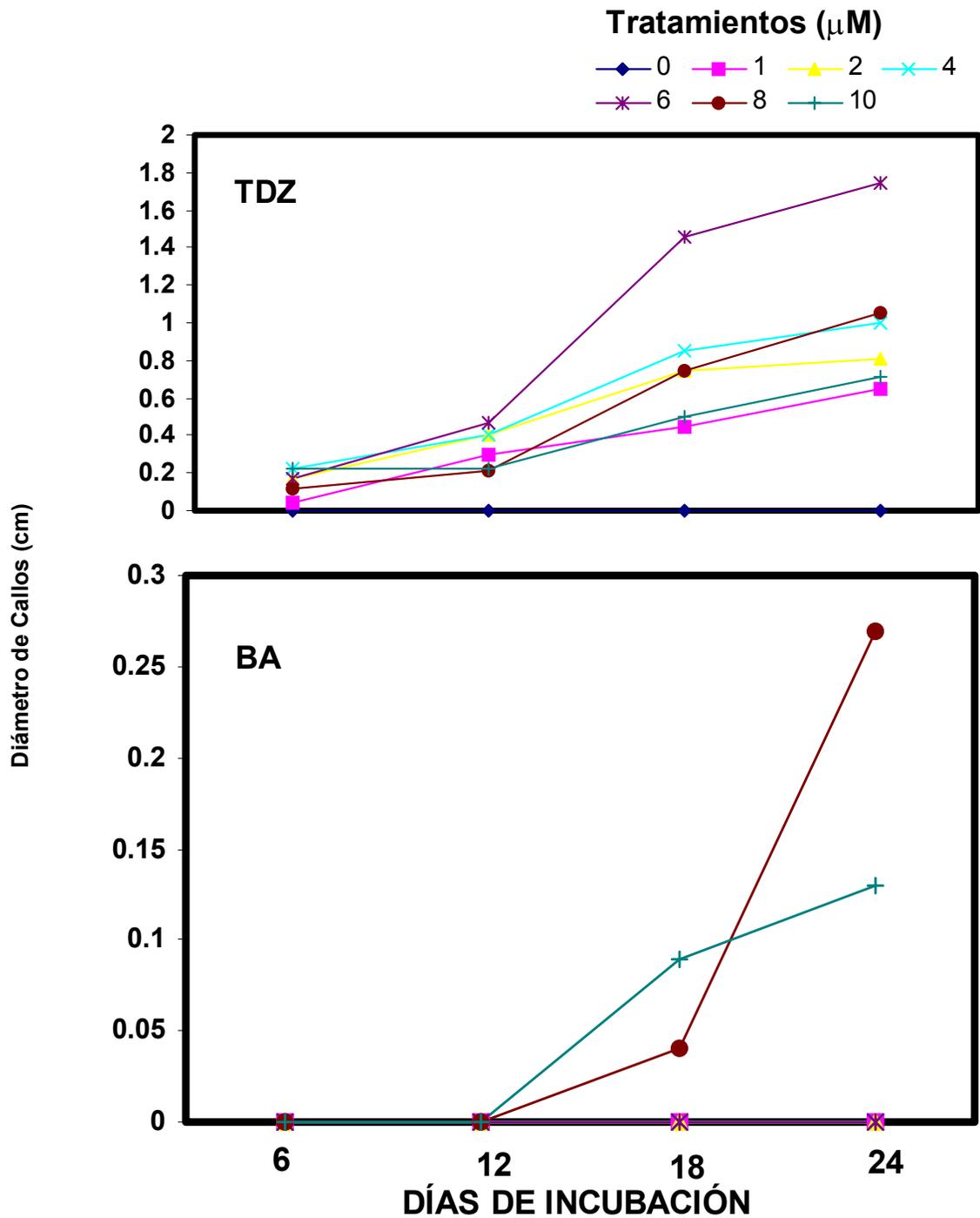


Figura 8. Efecto del TDZ y el BA sobre el DIÁMETRO DE CALLOS (cm) inducidos en explantes de pitahaya durante un ciclo de incubación bajo luz continua.

La formación de callos es una respuesta propia de las auxinas, sin embargo, aunque representa el riesgo de inducir variaciones y no lograr la fidelidad clonal deseada en la micropropagación; amplía nuestro campo de investigación ya que es una poderosa herramienta a emplear en trabajos posteriores encaminadas hacia la inducción de la embriogénesis somática así como para el mejoramiento genético por medio de la mutagénesis y selección *in vitro*, no obstante con éstos fines deberá compararse la efectividad del TDZ contra diferentes combinaciones hormonales (relación auxinas / citocininas).



Figura 9.- Emisión de Brotes y Callos inducidos por 4 μ M de TDZ a los 18 días de incubación.

V. CONCLUSIONES

- ❖ La brotación y emisión de raíces no son dependientes de la adición de Sustancias Reguladoras del Crecimiento Vegetal.
- ❖ El mejor tratamiento de TDZ para estimular la brotación es 1 μM .
- ❖ Los brotes inducidos por TDZ son muy cortos.
- ❖ Los mejores tratamientos para la inducción de brotes así como el crecimiento son 4, 6, 8 y 10 μM de BA.
- ❖ Ambas citocininas no favorecen la emisión de raíces.
- ❖ La inducción de callo es dependiente del tipo y concentración de la Sustancias Reguladoras del Crecimiento Vegetal .
- ❖ Concentraciones de TDZ mayores de 1 μM estimulan la formación de callos.

VI. LITERATURA CITADA

- ❖ Aragón, P. R., Campos A. G. y Ortiz, H. Y. (1998). Establecimiento *in vitro* de pitahaya (*Hylocereus undatus* Haworth). IX Congreso Nacional de Investigación y Desarrollo Tecnológico Agropecuario. S.E.P. Conkal, Yucatán. Pg. 84.

- ❖ Britton, N. L. and Rose, N. J. (1963). The cactaceae Dover Publications. Inc. New. York. Vol. II. PR. 187-193.

- ❖ Bustamante, M. A., Heras, M. G. y Bustamante, L. A. (1990). Germinación de semillas de especies cactáceas *in vitro*. XIII Seminario Panamericano de Semillas, Guatemala, Pg. 47.

- ❖ Bustamante, M. A. and Heras, M. G. (1990). Tissue culture of cacti species. XXIII International Horticultural Congress, Firenze, Italy. Pg. 163.

- ❖ Bustamante, M. A. and García, G. (1994). Survival of micropropagated cacti shoot after IBA and desecation treatments. XXIV International Horticultural Congress, Kyoto, Japan. Pg. 137.

- ❖ Cáliz, D. H. (1994). Aspectos taxonómicos de la pitahaya (p.35-48). Primer curso teórico práctico sobre el cultivo de la pitahaya. Compiladores: Roberta Castillo Martínez y Héctor Cáliz de Dios. Universidad de Quintana Roo. México. 123p.

❖ Castillo, H. A. (1984). Introducción de pitaya (*Stenocereus stelatus* y *S. marginatus*) al Valle del Mezquital en el estado de Hidalgo. Simposio: Aprovechamiento del pitayo. Universidad Autónoma Metropolitana. Xochimilco. pp.38-40.

❖ Chi, M. F. (1998). Etiología y Manejo Integral de la *Bacteriosis* (*Erwinia carorovora* Smith) en Pitahaya (*Hylocereus undatus* Britton & Rose). Tesis de Maestría. Centro de Investigación y Graduados Agropecuarios No. 2. Conkal, Yucatán.

❖ Centurión-Yah, A. R. y Sauri-Duch, E. (1996). Frutas tropicales y Subtropicales de interés para la península de Yucatán y México, su manejo y conservación. Revista del Centro de Graduados e Investigación. Vol. 27. Instituto Tecnológico de Mérida. pp. 23-35.

❖ Clayton P. W., Hubstenberger, J. F., Phillips G. C. and Butler-Nane S. A. (1990). Microrpropagation of members of the cactaceae subtribe cactinae. Journal American Society Hortucultural Science. 115, 2:337-343

❖ Cordero, I. F. J. (1997). Injertos de pitahaya (*Hylocereus undatus*, Haworth) sobre otras cactaceas. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Mexico. 51p.

❖ Cruz, D. H, Sánchez R. D. y Payró C. E. (1998). Efecto del thiadiazurón sobre la morfogénesis en yemas axilares de pitahaya (*Hylocereus undatus*). XI Reunión Científica Tecnológica Forestal y Agropecuaria. Villahermosa Tabasco

❖ Deberg, P. C. and Maena, L. J. (1981). A Scheme for comercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulture* 14:335-345.

❖ Enríquez, V. R. y Díaz, R. B. (1994). Experiencias sobre la propagación de plantas. CIGA. Instituto Tecnológico de Oaxaca. No. 1. México. 39 pp.

❖ Hu, G. Y. and P. J. Wang. (1983). Meristem, Shoot tip and bud culture.

❖ Huetteman, C.A. and Preece J.E. (1993). Thiadiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant cell tissue and organ culture*. 33:105-119.

❖ Infante, G. S. (1995). Curso teórico práctico sobre el cultivo de la pitahaya: Experiencia en Colombia (p.17-31). Primer curso teórico práctico sobre el cultivo de la pitahaya (123p). Compiladores: Roberta Castillo Martínez y Héctor Cáliz de Dios. Universidad de Quintana Roo. México.

❖ López, A. J. I., Rodríguez, C. M., Olivera, S., y González, L. V. W. (1996). Areas potenciales para el cultivo de maracuyá y pitahaya en Tabasco. Informe Técnico. INIFAP. Campo Experimental Huimanguillo Tabasco. 7p.

❖ Maltes, P. R. (1994). Primer encuentro nacional del cultivo de la pitahaya. San Marcos, Carazo. Nicaragua.

- ❖ Mauseth, J. D. (1979). A new method for propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cactus Succulent J.* 51: 186-187.

- ❖ Machado, M. F and Prioli, A. J. (1996). Micropropagación of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactácea) by areola activation. *In Vitro Cel. Dev. Biol. Plant.* 32:199-203.

- ❖ Mohamed, Y. Y. 1994. Micropropagation of pitahaya (*Hylocereun undatus* Britton & Rose). *Hort Science.* 29:55-59

- ❖ Murashigue, T. and Skoog, F. A. (1962). A revised medium for rapid Growth and bioassays with tabacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15:473-497.

- ❖ Murashige, T. (1974). Plant. propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25.135-166.

- ❖ Olivares, S. E. (1994). Paquete de diseños experimentales FAUANL. Versión 2.5. Facultad de Agronomía. UANL. Marín, N.L. México.

- ❖ Payró, C. E., Ruiz, C. V., Sánchez, R .D., Cruz D. H. (1998). Metodología para el establecimiento aséptico de yemas axiláres de pitahaya (*Hylocereus undatus*). Memoria de Residencia Profesional. I.T.A. No. 28. Ocuiltzapotlán, Tabasco.

- ❖ Phillips, G. C., Clayton, P. W. and Hubstenberger, J. F. (1989). Microrpropagation of thretened and endangered species of the Cactaceae. *In Vitro.* 25:32-39

❖ Reyes, R. N. P., (1995). El cultivo de las pitahayas y sus perspectivas de desarrollo en México. Ed. Secretaría de Fomento Económico. Tabasco, México. (91p).

❖ Rodríguez, C. A. (1993). El cultivo de pitahaya en Yucatán. Universidad Autónoma Chapingo, México. 53p.

❖ Rodríguez, C. A. (1997). Guía técnica para la producción de plantas de pitahaya en vivero. Universidad Autónoma Chapingo. México. 70p.

❖ Sagawa, Y. and Kunisaki, J. T. (1990). Micropropagation of Floriculture Crops.

❖ Sánchez, M. R. (1984). Origen, taxonomía y distribución de las pitayas en México. En: Aprovechamiento del pitayo. Memorias del Simposium realizado por el departamento de producción agrícola y animal, de la división de ciencias biológicas y de la salud. UAM-Xochimilco. (p.6-21.)

❖ Sánchez, R. D., Cruz D. H. y Payró, C. E. (1998). Efecto de la tiamina sobre la germinación *in vitro* de semillas de pitahaya (*Hylocereus undatus*). XI Reunión Científica Tecnológica Forestal y Agropecuaria. Villahermosa Tabasco.

❖ Starling, R. J. (1985). *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. Cactus Succulent J. 57:114-115.

❖ Villalobos, A. V. M. y Escobar, A. H. A. (1990). Micropropagación de nopal (*Opuntia spp.*). En: Rosell, C.H. y Villalobos, A.V.M.(1990). Fundamentos

teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Estudio FAO, Producción y Protección Vegetal. Roma. 111pp.

❖ Vyskot, B., and Jára, Z. (1984). Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. J. Hortic. Sci. 59:449-452.

VII.- A P P E N D I C E

Cuadro 1a.- Análisis de varianza correspondiente al Número de brotes a los 12 días de incubación.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	3	1446.	111.2	10.59	0.00
ERROR	154	1616. 91601	10.49 94		
TOTAL	157	3063. 70849			

C.V.=49.53%

Cuadro 2. Análisis de varianza correspondiente a la Longitud de Brotes (cm) a los 12 días de incubación.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	13	1.485	0.114	8.070	0.00
ERROR	154	2.180	0.014		

		8	1		
TOTAL	167	3.666			
		6			

C.V.=49.36

Cuadro 3. Análisis de varianza correspondiente al Número de Brotes a los 18 días de incubación.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMI	13	1805.	138.8	7.674	0.00
ENTOS		0302	484	4	
ERROR	154	2786.	18.09		
		2490	25		
TOTAL	167	4591.			
		2792			

C.V.=52.51%

Cuadro 4. Análisis de varianza correspondiente a la Longitud de Brotes a los 18 días de incubación.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMI	13	2.424	0.186	8.302	0.00
ENTOS		3	4	3	
ERROR	154	3.459	0.022		
		1	4		
TOTAL	167	5.883			
		5			

C.V.=48.14

Cuadro 5. Análisis de varianza correspondiente al Número de Brotes a los 24 días de incubación.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMI	13	6867.	528.2	21.71	0.00
ENTOS		1210	401	33	
ERROR	154	3746.	24.32		
		4980	79		
TOTAL	167	10613			
		.6191			

C.V.=45.33

Cuadro 6. Análisis de varianza correspondiente a la Longitud de Brotes a los 24 días de incubación.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMI	13	7.135	0.548	9.051	0.00
ENTOS		0	8	1	
ERROR	154	9.338	0.060		
		3	6		
TOTAL	167	16.47			
		33			

C.V.=38.88%

Cuadro 7. Análisis de varianza correspondiente al Número de Raíces a los 6 días de incubación.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMI	13	104.5	8.043	31.89	0.00
ENTOS		714	9	96	
ERROR	154	38.83	0.252		
		33	1		
TOTAL	167	143.4			
		047			

C.V.=89.75%

Cuadro 8. Análisis de varianza correspondiente a la Longitud de Raíces a los 6 días de incubación.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMI	13	93.98	7.229	76.32	0.00
ENTOS		52	6	31	
ERROR	154	14.58	0.094		
		75	7		
TOTAL	167	108.5			
		227			

C.V.=62.83%

Cuadro 9. Análisis de varianza correspondiente al Número de Raíces a los 12 días de incubación.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMI	13	372.8	28.67	93.63	0.00
ENTOS		333	94	90	
ERROR	154	47.16	0.306		
		66	2		
TOTAL	167	420.0			
		000			

C.V.=55.34%

Cuadro 10. Análisis de varianza correspondiente a la Longitud de Raíces a los 12 días de incubación.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMI	13	245.2	18.86	126.2	0.00
ENTOS		357	42	491	
ERROR	154	23.01	0.149		
		08	4		
TOTAL	167	268.2			
		466			

C.V.=49.31%

Cuadro 11. Análisis de varianza correspondiente al Número de Raíces a los 18 días de incubación.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMI	13	608.4	46.80	79.49	0.00
ENTOS		523	40	80	
ERROR	154	90.66	0.588		
		66	7		
TOTAL	167	699.1			
		190			

C.V.=56.05%

Cuadro 12. Análisis de varianza correspondiente a la Longitud de Raíces a los 18 días de incubación.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMI	13	367.1	28.24	164.9	0.00
ENTOS		673	36	890	
ERROR	154	26.36	0.171		
		24	1		
TOTAL	167	393.5			
		298			

C.V.=42.77%

Cuadro 13. Análisis de varianza correspondiente al Número de Raíces a los 24 días de incubación.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMI	13	370.5	28.50	102.6	0.00
ENTOS		297	22	750	
ERROR	154	42.74	0.277		
		99	5		
TOTAL	167	413.2			
		797			

C.V.=64.61%

Cuadro 14. Análisis de varianza correspondiente a la Longitud de Raíces a los 24 días de incubación.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMI	13	687.7	52.90	133.4	0.00
ENTOS		957	73	510	
ERROR	154	61.05	0.396		
		41	4		
TOTAL	167	748.8			
		499			

C.V.=46.05%

Cuadro 15. Comparación de medias (DMS) correspondientes al efecto del TDZ y BA sobre la brotación múltiple en pitahaya a diferentes tiempos de incubación bajo luz continua.

TDZ (μM)	NUMERO DE BROTES (\square)				LONGITUD DE BROTES (cm)			
	TIEMPO DE INCUBACIÓN (DÍAS)							
	6	12	18	24	6	12	18	24
0	0	4.08 FG	5.08 EFG	5.08 D	0	0.23 CDE	0.30 CDEF	0.43 DE
1	0	7.08 CDE	10.58 BC	20.00 A	0	0.35 AB	0.40 BC	0.59 BCD
2	0	4.91 EF	5.16 EFG	3.33 D	0	0.24 CDE	0.25 EFGH	0.45 CDE
4	0	6.33 DEF	8.33 BCD	7.00 BCD	0	0.32 ABC	0.30 CDEF	0.55 BCDE
6	0	6.16 DEF	8.08 CDE	6.33 CD	0	0.31 BCD	0.35 CDE	0.55 BCDE
8	0	9.50 BC	9.33 BCD	7.16 BCD	0	0.22 DEF	0.29 CDEF	0.48 BCDE
10	0	8.75 BCD	6.16 DEF	5.00 D	0	0.15 EFG	0.16 GH	0.36 E
BA (μM)								
0	0	1.81 GH	2.66 G	3.41 D	0	0.12 G	0.20 FGH	0.63 BC
1	0	1.33 H	3.83 FG	9.08 BC	0	0.16 EFG	0.26 DEFG	0.59 BCD
2	0	5.45 EF	7.16 DEF	10.75 B	0	0.14 EFG	0.14 H	0.55 BCD
4	0	10.08 AB	11.66 B	18.91 A	0	0.41 A	0.56 A	1.08 A
6	0	12.16 A	15.25 A	20.58 A	0	0.35 AB	0.51 AB	1.00 A
8	0	7.50 BCDE	9.25 BCD	18.00 A	0	0.13 FG	0.20 FGH	0.65 B
10	0	6.75 DE	10.83 BC	17.00 A	0	0.15 EFG	0.37 CD	0.90 A

*Mismas letras indican resultados estadísticamente iguales. DMS (NS=0.05)

Cuadro 16.- Comparación de medias (DMS) correspondientes al efecto del TDZ y BA sobre la inducción de raíces en pitahaya a diferentes tiempos de incubación bajo luz continua.

TDZ (μM)	NUMERO DE RAÍCES (\square)				LONGITUD DE RAÍCES (CM)			
	TIEMPO DE INCUBACIÓN (DÍAS)							
	6	12	18	24	6	12	18	24
0	1.75 A	4.66 A	4.75 A	5.50 A	1.82 A	2.78 B	3.09 A	4.01C
1	0.00 B	0.00 D	0.00 E	0.00 C	0.00 C	0.00 D	0.00 F	0.00 F
2	0.00 B	0.00 D	0.00 E	0.00 C	0.00 C	0.00 D	0.00 F	0.00 F
4	0.00 B	0.00 D	0.00 E	0.00 C	0.00 C	0.00 D	0.00 F	0.00 F
6	0.00 B	0.00 D	0.00 E	0.00 C	0.00 C	0.00 D	0.00 F	0.00 F
8	0.00 B	0.00 D	0.00 E	0.00 C	0.00 C	0.00 D	0.00 F	0.00 F
10	0.00 B	0.00 D	0.00 E	0.00 C	0.00 C	0.00 D	0.00 F	0.00 F
BA (μM)								
0	1.91 A	2.75 B	4.08 BC	4.33 B	1.73 AB	3.14 A	4.02 A	5.70 A
1	1.83 A	2.83 B	4.58 AB	4.91 B	1.50 B	2.75 B	3.50 B	4.98 B
2	1.66 A	2.66 B	3.83 C	4.08 B	1.60 AB	1.93 C	2.32 D	2.97 D
4	0.27 B	0.58 C	2.54 D	2.16 C	0.12 C	0.25 D	0.45 E	1.00 E
6	0.33 B	0.50 C	0.66 D	1.00 C	0.06 C	0.10 D	0.14 EF	0.25 F
8	0.00 B	0.00 D	0.00 E	0.16 C	0.00 C	0.00 D	0.00 F	0.12 F
10	0.00 B	0.00 D	0.00 E	0.00 C	0.00 C	0.00 D	0.00 F	0.00 F

*Mismas letras indican que son estadísticamente iguales. DMS (NS=0.05)

Cuadro 17.- Comparación de medias correspondientes al efecto del TDZ y BA sobre el diámetro de callos en pitahaya a diferentes tiempos de incubación bajo luz continua.

TDZ (μM)	DIAMETRO DE CALLOS (CM)			
	TIEMPO DE INCUBACIÓN (DIAS)			
	6	12	18	24
0	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.04	0.30	0.45	0.65
2	0.17	0.4	0.74	0.81
4	0.22	0.4	0.85	1.00
6	0.17	0.47	1.46	1.75
8	0.12	0.21	0.75	1.05
10	0.22	0.22	0.50	0.71
BA (μM)				
0	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.04	0.27
10	0.00	0.00	0.09	0.13

