

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACIÓN DE VARIACIÓN SOMACLONAL DE PLANTAS DE PITAHAYA (*HYLOCEREUS
COSTARICENSIS*) REGENERADAS *IN VITRO*

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en
Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales para optar al grado y título de Maestría Académica
Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Biotecnología

ANDRÉS HERNÁNDEZ PRIDYBAILO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2018

DEDICATORIA

A mi abuela materna Rosalia Chekan. Desde mi infancia, ella me transmitió no sólo el idioma ruso, sino que el amor por trabajar el suelo, sembrar, cosechar y compartir alimentos en su forma fresca y procesada con la comunidad. A ella debo la escogencia de mi camino para tomar parte en la actividad productiva de alimentos en Costa Rica, país del cuál ella se enamoró y dijo “(...) la mayor riqueza de este país se manifiesta en el hecho de que está en un territorio en donde se puede sembrar gran diversidad de plantas en cualquier época del año”.

Gracias *babushka*.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Guido y Galina, y a mi hermano Antonio. Siempre les estaré agradecido, porque el progresivo cumplimiento de mis metas de vida ha sido producto de un ambiente familiar enriquecedor, en todo sentido.

A Cata, quien ha estado a mi lado desde que escogí mi carrera de posgrado y, con todo su amor me ha ofrecido su apoyo, tanto en los momentos difíciles como en los apremiantes, lo cual ha sido un insumo indispensable en mi cotidianeidad.

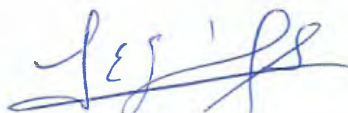
A Jairo J., Felipe M., José Daniel B., Esteban M., cuya amistad y amor fraternal se tradujo en muchas conversaciones profundas que me motivaron a continuar mi camino académico. Con ellos, el límite que diferencia a un amigo de un hermano es difuso, y espero que lo siga siendo. DMB.

A Andrea H., Dessireé Z., Ester V., Paul S., María V. y Stefany C., compañeros de trabajo y estudio con quienes compartí muchas discusiones que le dieron forma a mi trabajo, y me dieron su mano cuando la necesité.

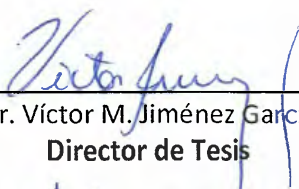
A mis mentores, el Dr. Víctor Jiménez, el Dr. Eric Guevara, y el Dr. Luis Barboza, cuyos consejos y guías fueron y siguen siendo fundamentales en mi carrera.

Al Centro para Investigaciones en Granos y Semillas y, a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el financiamiento brindado. Asimismo, al Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular por subvencionar parte de las muestras para electroforesis capilar.

“Esta tesis fue aceptada por la comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Biotecnología”



Dr. Luis Gómez Alpizar
Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado




Dr. Víctor M. Jiménez García
Director de Tesis



Dr. Federico Albertazzi Castro
Asesor

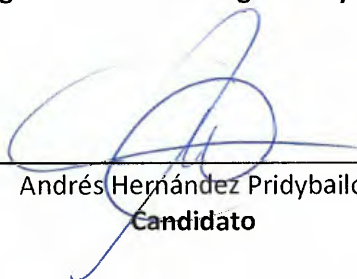


Dra. Ana Abdelnour Esquivel
Asesora



Dr. Eric Guevara Berger
Director

Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales



Andrés Hernández Pridybailo
Candidato

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	viii
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
Antecedentes	1
La pitahaya morada.....	1
Regeneración <i>in vitro</i> de la pitahaya.....	1
La variación somaclonal	2
Biología molecular de la variación somaclonal	3
Cambios genéticos en la variación somaclonal.....	3
Cambios epigenéticos en la variación somaclonal.....	3
Detección de la variación somaclonal.....	5
Detección de cambios a nivel morfológico	5
Detección de cambios a nivel citológico	6
Detección de cambios a nivel molecular.....	6
Caracterización fisiológica de la variación somaclonal	7
Efecto del tipo de regeneración <i>in vitro</i> sobre la variación somaclonal.....	7
Variación somaclonal en cactus	8
Justificación	8
OBJETIVOS.....	10
Objetivo general.....	10
Objetivos específicos.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Cultivo <i>in vitro</i> de explantes de <i>Hylocereus costaricensis</i>	11
Material vegetal	11

Condiciones generales de cultivo in vitro	12
Establecimiento in vitro de explantes (plantas madre in vitro)	12
Multiplicación por vía directa	14
Multiplicación por vía indirecta	16
Análisis histológico de callos y brotes obtenidos.....	18
Evaluación de la variación somaclonal.....	18
Análisis morfológico	18
Análisis epigenético.....	21
Análisis citológico: observación de cromosomas en puntas de raíz	25
Análisis de datos.....	26
Diseño experimental	26
Análisis morfológico	29
Análisis epigenético.....	31
RESULTADOS	33
Cultivo <i>in vitro</i> de explantes de <i>Hylocereus costaricensis</i>	33
Análisis de la variación somaclonal.....	35
Análisis morfológico	35
Multiplicación por medio de organogénesis indirecta	57
Evaluación de variaciones epigenéticas en explantes regenerados de forma directa y en callos.61	
Evaluación por medio de la amplificación sensible a metilación de inter-secuencias simples repetidas (MS-ISSR).....	61
Evaluación de cambios epigenéticos por medio de la determinación del nivel de metilación total del genoma	69
Evaluación de cambios a nivel citológico	71
DISCUSIÓN.....	72
Análisis morfológico	72
Multiplicación por vía directa	72

Multiplicación por vía indirecta	76
Análisis epigenético.....	78
CONCLUSIONES	81
Prospecciones futuras.....	82
LITERATURA CITADA.....	83
Anexos.....	91
Anexo 1. Cuantificación de la concentración y calidad del ADN utilizado en este estudio.....	91
Anexo 2. Histogramas de densidad de todas las variables morfológicas, tomando en cuenta los valores aportados por las plantas madre en invernadero, plantas madre <i>in vitro</i> y las poblaciones clonales (primera comparación) agrupando a los tres variedades (San Ignacio, Orejona y Cebra) de plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) analizadas en este estudio.....	92
Anexo 3. Eigenvalores y correlación de variables con la dimensión 1 y 2, producto del análisis de componentes principales al comparar entre plantas madre en invernadero y plantas <i>in vitro</i> (primera comparación).	95
Anexo 4. Análisis estadísticos primera comparación.....	96
Anexo 5. Eigenvalores, correlación de variables con la dimensión 1 y 2, y gráfico de valores permutados producto del análisis de componentes principales al comparar entre plantas <i>in vitro</i> (segunda comparación).....	97
Anexo 6. Eigenvalores, correlación de variables con la dimensión 1 y 2, y gráfico de valores permutados producto del análisis de componentes principales al comparar entre plantas <i>in vitro</i> (tercera comparación).	99
Anexo 7. Análisis estadísticos de la segunda comparación	101
Anexo 8. Geles electrónicos de electroforesis capilar correspondiente a las muestras de ADN amplificadas con los imprimadores UBC 824, 825 y 856.	103
Anexo 9. Análisis estadístico de comparación de medias de niveles de metilación total en muestras tratadas con 5-azacitidina.	112
Anexo 10. Imagen tomada células luego del proceso de extracción en puntas de raíz de <i>Hylocereus costaricensis</i> cultivado <i>in vitro</i>	115

RESUMEN

La pitahaya morada (*Hylocereus costaricensis*) es un cactus hemi-epífita con potencial agronómico en Costa Rica debido a sus frutos globosos. No se encontraron reportes de evaluación de variación somaclonal de pitahaya, lo cual permitiría analizar la homogeneidad de poblaciones clonales. Es por ello que se evaluó el nivel de variación somaclonal de plantas de pitahaya de las variedades "Orejona" y "Cebra" regeneradas *in vitro* por medio de vías directa e indirecta, desde el punto de vista morfológico, epigenético y citológico. Para regenerar plantas por vía directa a partir de la inducción de yemas preformadas, se tomaron explantes de plantas de pitahaya en condiciones de invernadero, de las dos variedades mencionadas y, se agregó la variedad "San Ignacio" al estudio. Dichos explantes fueron establecidos *in vitro* en un medio MS sin reguladores de crecimiento, para posteriormente tomar un segmento de cladodio de cada variedad e inducir su brotación por medio del uso de reguladores de crecimiento. De cada explante inducido, se tomó cada cladodio nuevo y se colocó en medio MS sin reguladores para favorecer su formación de biomasa y realizar las evaluaciones. En cuanto a la regeneración de plantas por vía indirecta, solamente se logró la inducción de callos (sin brotes) en las variedades "San Ignacio" y "Orejona", los cuales fueron estudiados histológica y epigenéticamente. El análisis contempló comparaciones considerando el origen del explante (invernadero, *in vitro* con y sin reguladores de crecimiento) y a cada individuo regenerado. Para detectar posibles cambios a nivel morfológico, se evaluaron 17 variables morfométricas con la ayuda de inspección visual y uso de imágenes digitales. En cuanto a la evaluación epigenética, se cuantificaron los niveles de metilación global del ADN genómico y, el método de amplificación sensible a metilación de inter-secuencias simples repetidas. Por último, para la detección de cambios a nivel citológico, se intentó observar cromosomas en puntas de raíz; sin embargo, no se tuvo éxito en la evaluación citológica. Morfológicamente, se detectaron diferencias probablemente debidas a reacciones fisiológicas normales producto del proceso de establecimiento y multiplicación *in vitro*. Los callos obtenidos mostraron regeneración de raíces, pero no de brotes. En cuanto al análisis epigenético, no existe un patrón claro que permita señalar cambios específicos en los niveles de metilación global del genoma ni en sitios CCGG de los individuos estudiados.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición de medios de cultivo para la regeneración por vías directas de <i>Hylocereus</i> spp. reportados en la literatura.....	2
Cuadro 2. Variables morfométricas evaluadas plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra, en cladodios de plantas madre en invernadero, plantas madre <i>in vitro</i> y plantas regeneradas de forma directa a partir del uso de reguladores de crecimiento, para la evaluación de la variación somaclonal.....	20
Cuadro 3. Lista de imprimadores de inter-secuencias simples repetidas (ISSR por sus siglas en inglés) utilizados en este estudio y su respectiva temperatura de anillamiento y secuencia, reportados para la caracterización de accesiones de <i>Hylocereus</i> spp. (Tao <i>et al.</i> 2014).....	23
Cuadro 4. Número de bandas reproducibles obtenidas luego de amplificar ADN de pitahaya de los genotipos San Ignacio, Orejona y Cebra, por medio de PCR con los imprimadores UBC 824, UBC 825, UBC 835 y UBC 856, para la amplificación de inter-secuencias simples repetidas (ISSR por sus siglas en inglés), y utilizados posteriormente en este estudio para la detección de polimorfismos debidos a variación epigenética por patrones de metilación.....	31
Cuadro 5. Sitios con la secuencia de reconocimiento de las enzimas <i>HpaII</i> y <i>MspI</i> (5'-C↓CGG-3'), amplificados por medio de PCR en plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) en los genotipos San Ignacio, Orejona y Cebra, utilizando los imprimadores UBC 824, 825, 835 y 856.....	32
Cuadro 6. Tipos de patrones de aparición o desaparición de bandas, luego de amplificar por medio de PCR con los imprimadores ISSR UBC 824, 825, 835 y 856, ADN digerido con las enzimas <i>Hpa II</i> y <i>Msp I</i> , con respecto a la muestra de ADN sin digerir, proveniente de plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) de los genotipos San Ignacio, Orejona y Cebra para el análisis de variación somaclonal en plantas regeneradas <i>in vitro</i>	33

Cuadro 7. Valores de R^2 ajustado de un modelo lineal generado para cada una de las variables morfológicas evaluadas para la evaluación de la variación somaclonal en plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>), tomando en cuenta el factor genotipo (San Ignacio, Orejona y Cebra), origen del explante (planta madre en invernadero, planta madre establecida <i>in vitro</i> sin reguladores, y clones luego del proceso de multiplicación con 0.1 mg L^{-1} thidiazuron y 0.1 mg L^{-1} de ácido naftalenacético adicionado al medio de cultivo), e individuo (cada una de las plantas en todas las condiciones).....	36
Cuadro 8. Correlaciones significativas entre variables morfológicas determinadas en plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) de los genotipos San Ignacio, Orejona y Cebra en las dimensiones 1 (Dim 1) y 2 (Dim 2), consideradas para la comparación entre plantas madre en invernadero, plantas madre <i>in vitro</i> , y las plantas regeneradas de forma directa por medio del uso de reguladores de crecimiento (primera comparación), luego de realizar un análisis de componentes principales.....	41
Cuadro 9. Correlaciones significativas entre variables morfológicas determinadas en plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) de los variedades San Ignacio, Orejona y Cebra en las dimensiones 1 (Dim 1) y 2 (Dim 2), consideradas para la comparación entre plantas madre <i>in vitro</i> y los clones (segunda comparación), luego de realizar un análisis de componentes principales.....	50
Cuadro 10. Correlaciones significativas entre variables morfológicas determinadas en plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra en las dimensiones 1 (Dim 1) y 2 (Dim 2), consideradas para la comparación entre las plantas regeneradas de forma directa por medio del uso de reguladores de crecimiento (tercera comparación), luego de realizar un análisis de componentes principales.....	52
Cuadro 11. Descripción de las variables morfológicas determinadas en plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra, seleccionadas luego de un análisis de componentes principales y, consideradas para la comparación entre plantas madre <i>in vitro</i> y las plantas regeneradas de forma directa por medio del uso de reguladores de crecimiento (segunda comparación).....	53

Cuadro 12. Descripción de las variables morfológicas determinadas en plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra, seleccionadas luego de un análisis de componentes principales y, consideradas para la comparación entre plantas madre <i>in vitro</i> y los clones (segunda comparación).....	54
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Condición general de cultivo de las plantas madre de pitahaya (<i>Hylocereus</i> spp.) de donde provenían las plantas utilizadas en este estudio.....	11
Figura 2. Modo en el que los segmentos de cladodio de <i>Hylocereus costaricensis</i> fueron colocados de forma vertical sobre turba humedecida contenida en cajas plásticas, para la inducción de la formación de brotes más pequeños con respecto al cladodio de origen, según lo descrito por Hua <i>et al.</i> (2015).....	13
Figura 3. Establecimiento <i>in vitro</i> de explantes de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) que posteriormente sirvieron como fuente de tejidos (plantas madre <i>in vitro</i>) para los procesos de regeneración directa e indirecta.....	14
Figura 4. Explantes proveniente de una planta de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) de la variedad Cebra, establecida <i>in vitro</i> sin reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, luego de haber sido sometido al proceso de regeneración por vía indirecta	17
Figura 5. Diseño experimental para la evaluación de la variación somaclonal en plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) regeneradas de forma directa de los genotipos San Ignacio, Orejona y Cebra, y en callos de los genotipos San Ignacio y Orejona.....	28
Figura 6. Plantas de <i>Hylocereus costaricensis</i> de los genotipos San Ignacio (S), Orejona (O) y Cebra (C) establecidos <i>in vitro</i> sin reguladores de crecimiento, de los cuales se tomaron tejidos para generar la población clonal (SMi, OMi, CMi – Mi = “madre <i>in vitro</i> ”) luego de siete meses de cultivo, y una muestra aleatoria de plantas regeneradas de forma directa por medio de la inducción de brotación.....	34
Figura 7. Histogramas de densidad realizados a partir de dos de las variables continuas, distancia entre areolas (DA) y longitud de espinas (LE), medidas en plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) en invernadero, plantas madre establecidas <i>in vitro</i> (sin reguladores de crecimiento, y clones generados de forma directa luego de la inducción con 0.1 mg L ⁻¹ thidiazuron y 0.1 mg L ⁻¹ de ácido naftalenacético adicionado al medio de cultivo.....	37
Figura 8. Análisis de componentes principales (PCA) de variables morfológicas de plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) para comparación entre plantas madre en invernadero, plantas madre <i>in vitro</i> , y los clones (primera comparación).....	40

Figura 9. Calidad de la representación de las variables morfológicas determinadas en plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) de los genotipos San Ignacio, Orejona y Cebra en las dimensiones 1 (Dim 1) y 2 (Dim 2), consideradas para la comparación entre plantas madre en invernadero, plantas madre <i>in vitro</i> , y las plantas regeneradas de forma directa por medio del uso de reguladores de crecimiento (primera comparación), luego de realizar un análisis de componentes principales.....	41
Figura 10. Correlaciones entre la longitud de espinas y el número de espinas por areola determinadas en plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>), en los genotipos San Ignacio, Orejona y Cebra, tomando en cuenta el origen del explante evaluado (M = planta madre en invernadero, Mi = planta madre <i>in vitro</i> , RD = plantas regeneradas de forma directa).....	42
Figura 11. Diagramas de “violines” y de cajas de la circularidad transversal del cladodio determinadas en plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>). a) Diagrama realizado considerando el origen del explante (M = planta madre en invernadero, Mi = planta madre <i>in vitro</i> , RD = plantas regeneradas de forma directa), en donde dos asteriscos significa que se encontraron diferencias significativas (con $p < 0.01$) con respecto a la media general, luego de realizar un análisis de la varianza (ANOVA) y una prueba T.....	43
Figura 12. Número de costillas por cladodio (NCC) determinado en plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>), de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra, considerando el origen del explante (M = planta madre en invernadero, Mi = planta madre <i>in vitro</i> , RD = plantas regeneradas de forma directa).....	45
Figura 13. Análisis de componentes principales (PCA) de variables morfológicas de plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) para la comparación entre plantas madre <i>in vitro</i> (Mi), y los clones (designados con un número).....	48
Figura 14. Calidad de la representación de las variables morfológicas determinadas en plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra en las dimensiones 1 (Dim 1) y 2 (Dim 2), consideradas para la comparación entre plantas madre <i>in vitro</i> , y los clones (segunda comparación), luego de realizar un análisis de componentes principales.....	49
Figura 15. Análisis de componentes principales (PCA) de variables morfológicas de plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) para la comparación entre las plantas regeneradas de forma directa por medio del uso de reguladores de crecimiento.....	51

Figura 16. Diagramas de “violines” y de cajas de la variable de volumen del cladodio determinado en plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) regeneradas <i>in vitro</i> de forma directa por medio del uso de reguladores de crecimiento.....	55
Figura 17. Diagramas de “violines” y de cajas de área de la ondulación del cladodio en plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) regeneradas <i>in vitro</i> de forma directa por medio del uso de reguladores de crecimiento.....	56
Figura 18. Callos de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) del variedad San Ignacio, luego de 8 meses de inducción y cultivo en un medio MS con 0.5 mg L ⁻¹ ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 0.5 mg L ⁻¹ N6-bencilaminopurina bajo luz, generados a partir de explantes de plantas madre establecidas <i>in vitro</i> en un medio MS + 5% p/v sacarosa sin reguladores de crecimiento.....	58
Figura 19. Callos de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) de la variedad Orejona luego de 8 meses de inducción y cultivo en un medio MS con 0.5 mg L ⁻¹ ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 0.5 mg L ⁻¹ N6-bencilaminopurina, bajo luz, y generados a partir de explantes de plantas madre establecidas <i>in vitro</i> en un medio MS + 5% p/v sacarosa sin reguladores de crecimiento.....	60
Figura 20. Callos de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) de la variedad a) San Ignacio y, b) Orejona, luego de 12 meses de inducción y cultivo en un medio MS con 0.5 mg L ⁻¹ ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 0.5 mg L ⁻¹ N6-bencilaminopurina bajo luz, a partir de explantes de plantas madre establecidas <i>in vitro</i> en un medio MS + 5% p/v sacarosa sin reguladores de crecimiento...	61
Figura 21. Gel electrónico generado a partir de electroforesis capilar de productos de PCR amplificados utilizando el imprimador UBC 835, con ADN de tejidos de <i>Hylocereus costaricensis</i> , de la variedad San Ignacio (5) de la planta madre (M), planta madre establecida <i>in vitro</i> sin reguladores de crecimiento (Mi), plantas regeneradas de forma directa (1,2,3 y 5) y callos (C1, C2 y C3), digeridos con las enzimas de restricción sensibles a metilación <i>HpaII</i> (H) y <i>MspI</i> (M) , sin digerir, y el respectivo control negativo (CN).....	62
Figura 22. Gel electrónico generado a partir de la corrida por medio de electroforesis capilar de productos de PCR, utilizando el imprimador UBC 835, con ADN de tejidos de <i>Hylocereus costaricensis</i> , variedad Orejona (O) de la planta madre (M), planta madre establecida <i>in vitro</i> sin reguladores de crecimiento (Mi), plantas regeneradas de forma directa (2, 5, 6, 7, 8, 11, 12 y 13) y callos (C1, C2 y C3), digeridos con las enzimas de restricción sensibles a metilación <i>Hpa II</i> (H) y <i>Msp I</i> (M) , sin digerir, y el respectivo control negativo (CN).....	63

Figura 23. Gel electrónico generado a partir de la corrida por medio de electroforesis capilar de productos de PCR, utilizando el imprimador UBC 835, con ADN de tejidos de <i>Hylocereus costaricensis</i> , variedad Cebra (C) de la planta madre (M), planta madre establecida <i>in vitro</i> sin reguladores de crecimiento (Mi), plantas regeneradas de forma directa (2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8), digeridos con las enzimas de restricción sensibles a metilación <i>HpaII</i> (H) y <i>MspI</i> (M), sin digerir, y el respectivo control negativo (CN).....	64
Figura 24. Frecuencia de tipos de patrones de bandas encontrados al realizar una PCR con ADN de plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) de la variedad San Ignacio, proveniente de la planta madre (SM), planta madre <i>in vitro</i> (SMi), cada una de las plantas provenientes luego del proceso de multiplicación utilizando reguladores de crecimiento (S1, S2, S3 y S5), y callos inducidos a partir de tejido de las plantas madre <i>in vitro</i> y también utilizando reguladores de crecimiento (SC1, SC2 y SC3), digeridos con la enzimas de restricción <i>Hpa II</i> , con <i>Msp I</i> y la muestra sin digerir, utilizando el imprimador UBC 835.....	65
Figura 25. Frecuencia de tipos de patrones de bandas encontrados al realizar una PCR con ADN de plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) de la variedad Orejona, proveniente de la planta madre (OM), planta madre <i>in vitro</i> (OMi), cada una de las plantas provenientes luego del proceso de multiplicación utilizando reguladores de crecimiento (O2, O5, O6, O7, O8, O11, O12 y O13), y callos inducidos a partir de tejido de las plantas madre <i>in vitro</i> y también utilizando reguladores de crecimiento (OC1, OC2 y OC3), digeridos con la enzimas de restricción <i>Hpa II</i> , con <i>Msp I</i> y la muestra sin digerir, utilizando el imprimador UBC 824, 835 y 856.....	66
Figura 26. Frecuencia de tipos de patrones de bandas encontrados al realizar una PCR con ADN de plantas de pitahaya (<i>Hylacereus castaricensis</i>) de la variedad Cebra, proveniente de la planta madre (CM), planta madre <i>in vitro</i> (CMi), cada una de las plantas provenientes luego del proceso de multiplicación utilizando reguladores de crecimiento (C2, C3, C4, C5, C6, C7, y C8), digeridos con la enzimas de restricción <i>Hpa II</i> , con <i>Msp I</i> y la muestra sin digerir, utilizando el imprimador UBC 835 y 856.....	68

Figura 27. Efecto de la inducción de formación de brotes de forma directa, por medio de la utilización de 0.1 mg L ⁻¹ de thidiazurón y 0.1 mg L ⁻¹ de ácido naftaleneacético en el medio de cultivo y la adición de 100 µL de una solución 100 µM de 5-azacitidina (5-azac) y un testigo sin 5-azac (T), en explantes de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) de las variedades San Ignacio (S) y Orejona (O), provenientes de plantas previamente multiplicadas con la misma combinación de reguladores, sobre los niveles de metilación total del ADN genómico.....	70
Figura 28. Metilación total del genoma (5mdC) con respecto a un control de 60 ng de ADN metilado, en muestras de ADN de plantas de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) de las variedades San Ignacio (S), Orejona (O) y Cebra (C), proveniente de la planta madre en invernadero (M), madre <i>in vitro</i> (Mi), multiplicadas por medio del uso de reguladores de crecimiento (RD) y callos inducidos a partir de tejidos de plantas madre <i>in vitro</i> y también por medio del uso de RD de las variedades San Ignacio (SC) y Orejona (OC).....	71
Figura 29. Sección transversal de un cladodio de pitahaya (<i>Hylocereus costaricensis</i>) cultivado <i>in vitro</i> observado por medio de un microscopio de luz.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

A: adenina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANA: ácido naftalenacético

ARN: ácido ribonucleico

BAP: bencilaminopurina

C: citosina

CRED-RA: digestión con enzimas de restricción acoplada a la amplificación con imprimadores aleatorios

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

G: guanina

H: enzima de restricción *HpaII*

ISSR: inter-secuencias simples repetidas

M: enzima de restricción *MspI*

MS: Medio de cultivo de Murashige y Skoog.

MSAP: detección de polimorfismos de amplificación sensible a metilación.

MS-ISRR: amplificación de inter-secuencias simples repetidas sensible a metilación

PCA: análisis de componentes principales

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RAPD: Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico

T: timina

TDZ: tiazurón

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

La pitahaya morada

Las plantas de pitahaya morada (*Hylocereus costaricensis*; $2n=2x=22$) se clasifican dentro de la familia Cactaceae, subfamilia Cactoideae, tribu Hylocereeae (Britton y Rose 1969). Los cactus pertenecientes a esta tribu son hemi-epífitos, tienen tallos trepadores y aplanados, y están distribuidos principalmente en América Central (Hernández-Hernández *et al.* 2011), y en las regiones tropicales de Norte y Sur América (Morton 1987). *H. costaricensis* produce frutos grandes y globosos, con cáscara de color rojo oscuro y pulpa color violeta (Nerd y Mizrahi 1997).

El fruto de la pitahaya posee un alto valor nutracéutico (i.e., que brinda beneficios a la salud humana) por su contenido de polifenoles con potencial antioxidante, de oligosacáridos con capacidades prebióticas (i.e., no se digieren y tienen la capacidad de estimular el crecimiento y actividad de la flora intestinal), y de pigmentos betalaínicos, como betanina, isobetanina, filocactina, isofilocactina, hilocerenina e isohilocerenina, los cuales tienen gran potencial para su uso en la industria alimentaria por el amplio rango de pH a los que son capaces de mantener el color (Esquivel y Araya-Quesada 2012).

Regeneración *in vitro* de la pitahaya

Generalmente, la pitahaya es propagada de forma asexual, debido a que ello permite la reducción del tiempo desde que se establece en campo hasta la producción de frutos, asimismo se logra mayor homogeneidad genética a la hora de establecer su cultivo en campo y, para conocer de antemano las características de los frutos que se obtendrían (Ortiz Hernández y Carrillo Salazar 2012). Uno de los métodos mayormente utilizados para la multiplicación vegetativa es la propagación por medio de segmentos de cladodios. Sin embargo esta técnica, por lo general, puede resultar en un cuello de botella para la obtención de una cantidad adecuada de material vegetal en un tiempo determinado (Le Bellec 2006). Es por lo anterior que el cultivo de tejidos resulta en una alternativa para propagar masivamente con una mayor eficiencia. En la literatura se

reportan casos de micropropagación del género *Hylocereus* por medio de vías directas (i.e., formación de brotes a partir de células competentes que existen en el explante) (Cuadro 1), lo cual permite aplicar esta alternativa en el establecimiento de plantaciones comerciales.

Cuadro 1. Composición de medios de cultivo para la regeneración por vías directas de *Hylocereus* spp. reportadas en la literatura

Medio base	Reguladores de crecimiento	Referencia	Modelo experimental
	0.5 μ M tidiazurón (TDZ) + 0.5 μ M ácido naftalenacético (ANA)	Mohamed-Yaseen (2002)	<i>Hylocereus undatus</i>
MS + 3% Sacarosa	15 μ M bencilaminopurina (BAP)	Viñas <i>et al.</i> (2012)	<i>Hylocereus costaricensis</i>
	2.0 μ M BAP + 0.5 μ M ANA	Fan <i>et al.</i> (2013)	<i>Hylocereus undatus</i>
	13.68 μ M zeatina + 2.46 μ M ácido indolbutírico	Hua <i>et al.</i> (2015)	<i>Hylocereus</i> spp.

La variación somaclonal

Las plantas regeneradas a partir de eventos de propagación clonal por medio de cultivo *in vitro* pueden presentar una serie de cambios a nivel molecular que, aunque el tejido de origen provenga de una sola planta donadora, se pueden regenerar individuos con un fenotipo distinto a la planta madre. Este fenómeno es llamado variación somaclonal (Wang y Wang 2012). La variación somaclonal es definida como un conjunto de variaciones genéticas, epigenéticas y/o fenotípicas inducidas por las condiciones propias del cultivo *in vitro* en plantas propagadas de forma clonal (Neelakandan y Wang 2012). La variación somaclonal puede ser causada por distintos factores relacionados con el proceso del cultivo de tejidos. Por ejemplo, la vía de regeneración seguida (i.e. directa o indirecta), el tejido o material vegetal empleado, el tipo y concentración de reguladores de crecimiento, la cantidad y duración de los subcultivos, la variedad y las condiciones ambientales propias del cultivo *in vitro* son factores que influyen en los cambios generados en determinada población de plantas propagadas (Bairu *et al.* 2011, Krishna *et al.* 2016).

Biología molecular de la variación somaclonal

Según Miguel y Marum (2011), la capacidad que tienen células des-diferenciadas *in vitro* para regenerar plantas enteras es una de las evidencias de su plasticidad en el reino Plantae. Esta secuencia de eventos es acompañada por cambios en la estructura de la cromatina y la reprogramación de la expresión de genes, lo que demuestra la importancia del control genético y epigenético en estos procesos y, por lo tanto, su influencia en la variación somaclonal.

Como se mencionó anteriormente, producto del cultivo de tejidos se producen cambios a nivel genético y epigenético entre las plantas regeneradas, aunque provengan de una misma planta madre (Smulders y de Klerk 2011). No obstante, al tratar de hacer distinción entre modificaciones genéticas y epigenéticas en la variación somaclonal se debe de tener cuidado, pues puede resultar en una simplificación del fenómeno de la variación somaclonal, ya que los cambios a nivel epigenético pueden llevar eventualmente a modificaciones genéticas. Sin embargo, al ser fenómenos con mecanismos distintos de regulación, se describirán por separado a continuación.

Cambios genéticos en la variación somaclonal

Según Wang y Wang (2012), la variación somaclonal, desde el punto vista genético, tiene dos causas principales: anomalías citogenéticas y cambios específicos en la secuencia de ADN. Los cambios genéticos conllevan a modificaciones estables y duraderas en el genoma, por lo que son heredables a las siguientes generaciones (Neelakandan y Wang 2012). Entre las anomalías genéticas más frecuentes se encuentran cambios de ploidía, rearrreglos cromosómicos (e.g., translocaciones, deleciones, inserciones, inversiones) y cambios en un solo par de bases (Wang y Wang 2012).

Cambios epigenéticos en la variación somaclonal

Como parte de los procesos de adaptación de las células a las condiciones ambientales del cultivo *in vitro* se pueden activar también cambios epigenéticos (Miguel y Marum, 2011). Dichos cambios regulan la expresión de genes, sin necesariamente modificar secuencias en el ADN. Estas

modificaciones pueden influenciar la transcripción de genes y, normalmente, son temporales y pueden ser revertidas a su estado inicial; sin embargo, algunas pueden mantenerse en el tiempo o bien ser heredadas de forma sexual o asexual dependiendo del tipo de modificación (Kaepler *et al.* 2000). Además, otra de las características de los cambios epigenéticos es que es posible encontrar modificaciones reproducidas de forma consistente bajo condiciones ambientales similares (Stelpflug *et al.* 2014).

Entre los mecanismos de regulación epigenética, la estructura de la cromatina (i.e., conjunto de ADN, histonas y proteínas no histónicas que constituyen los cromosomas) puede verse afectada por metilación del ADN, modificación de aminoácidos en las colas de las histonas, y por ARN de interferencia (Miguel y Marum 2011). La metilación del ADN se refiere a la adición de un grupo metilo (-CH₃) a la base citosina en los sitios CG (principalmente), CHG (a un nivel intermedio) y CHH (a un nivel bajo) en donde H se refiere a cualquier nucleótido excepto G (Neelakandan y Wang 2012). En conjunto con las modificaciones de las histonas, las metilaciones y acetilaciones regulan la transcripción de genes. La transcripción se puede reducir, por ejemplo, por medio de di o trimetilación de la histona 3; por otro lado, la acetilación (i.e., adición de grupos acetilo) de la lisina en posición 9 de la misma histona, si se encuentra en regiones promotoras, puede generar la activación de genes (Smulders y de Klerk 2011).

Además de este tipo de modificaciones epigenéticas, se producen regulaciones post-transcripcionales de la expresión de genes por medio de pequeños ARN de interferencia, como los micro ARN. Los micro ARN son ARN no-codificantes de un tamaño de 21 nucleótidos que pueden ser codificados en el genoma o bien, formados después del procesamiento de transcritos precursores que asumen conformaciones específicas no lineares. Estos actúan cortando ARN mensajero, evitando la transcripción, lo cual lleva a la degradación del transcripto meta; sin embargo, existe evidencia de que los micro ARNs y otros ARN pequeños derivados de genes de micro ARNs pueden guiar la metilación del ADN (Rodríguez-Enríquez *et al.* 2011). Otras clases de pequeños ARN, como los siARN (ARN pequeños intereferentes, por sus siglas en inglés), de 24-26 nucleótidos de largo, que son originados a partir de transposones (i.e., secuencias de ADN que poseen la capacidad de moverse a través del genoma) y de repeticiones en tándem (i.e., repeticiones de dos o más nucleótidos y que ocurren de forma adyacente), son capaces de silenciar genes a nivel transcripcional seleccionando secuencias de ADN e histonas específicas para

su metilación y heterocromatización (i.e., regiones compactas de la cromatina) por medio de metilación del ADN dependiente de ARN (Neelakandan y Wang 2012). Por último, otro tipo de ARN de interferencia son los lncARN (i.e., ARN largos no codificantes, "*long non-coding RNA*" en inglés) también poseen la capacidad de regular la expresión a nivel post-transcripcional actuando como señales moleculares, como una especie de señuelos, guías y/o soportes para factores de transcripción y otros reguladores epigenéticos (Wang y Tran 2013).

Detección de la variación somaclonal

Actualmente existen y se han adaptado diversas metodologías para comprender el fenómeno de la variación somaclonal. Dichos métodos incluyen técnicas que determinan la variabilidad desde el punto de vista morfológico, citológico, molecular y bioquímico (Sánchez-Chiang y Jiménez 2009). De este modo se puede determinar en qué punto del cultivo *in vitro* y bajo qué condiciones se produce un determinado nivel de variación somaclonal, ya sea para evitarla o bien, para la selección de clones con características nuevas.

Detección de cambios a nivel morfológico

Las características morfológicas han sido utilizadas por mucho tiempo para clasificar familias, géneros y especies. Algunos variantes pueden ser detectados basados en diferencias en cuanto a la altura de la planta (e.g., enanismo), morfología de la hoja y modificaciones en la pigmentación (e.g., variegación, pérdida de color); sin embargo, las características morfológicas de una planta puede cambiar sin que exista un cambio real en la composición genética, por lo que estas diferencias deben ser corroboradas por otros métodos. Aunado a esto, se pueden evaluar características fisiológicas para detectar variantes somaclonales basándose en respuestas a distintos estímulos ambientales, ya sea por medio del cambio en la composición del medio (e.g., variando el regulador de crecimiento) o bien, modificando condiciones ambientales (e.g., diferentes intensidades de luz permiten la separación de plantas con distintas sensibilidades a la fotoinhibición) (Bairu *et al.* 2011).

Detección de cambios a nivel citológico

A nivel citológico se pueden corroborar cambios en el nivel de ploidía de individuos regenerados, por medio de observaciones de células del meristemo del ápice de las raíces (Rivard *et al.* 1989), citometría de flujo y por observación de cromosomas en meristemas apicales y radicales (Neelakandan y Wang 2012). La citometría de flujo consiste en liberar los núcleos de las células presentes en un tejido en un buffer, teñirlos por medio de un fluoróforo que se une a los ácidos nucleicos, y hacer pasar la muestra a través de un capilar que somete la muestra a una excitación con láser y, cuya señal es detectada según su dispersión y transmisión a través de la muestra; ello permite la caracterización biofísica de las células y, por lo tanto, permite cuantificar algunos parámetros como el nivel de ploidía (Dolezel *et al.* 2007). La observación de cromosomas en meristemas apicales o radicales, permite un conteo directo su número, y para ello se requiere preparar las muestras de modo tal que se detenga la mitosis de modo tal que se obtenga la mayor cantidad de células en metafase, por ejemplo, incubando las muestras en 8-hidroxiquinolina; para la observación de los cromosomas, se pueden teñir estos con orceína, o bien, con un fluoróforo como de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Bobadilla-Landey *et al.* 2013).

Detección de cambios a nivel molecular

Las técnicas moleculares son de gran utilidad para corroborar diferencias determinadas por los métodos morfológicos y fisiológicos. Existen métodos basados en PCR (Reacción en cadena de la polimerasa –*Polymerase Chain Reaction*-). Esta técnica consiste en la síntesis de millones de copias de un fragmento de ADN comprendido entre secuencias complementarias a dos oligonucleótidos llamados imprimadores, por medio de una enzima ADN polimerasa termoestable (Sánchez-Chiang y Jiménez 2009). Basándose en la PCR, es posible evaluar el nivel de metilación del ADN entre los individuos de una población de plantas regeneradas a partir de cultivo de tejidos, para analizar variaciones a nivel epigenético. La detección de polimorfismos de amplificación sensible a metilación (MSAP – *Methylation Sensitive Amplification Polymorphism*) generalmente se basa en el uso de dos enzimas de restricción sensibles a metilación, las cuales cortan en los sitios 5'-CCGG-3' metilados, y a la vez se utiliza una enzima de restricción no-sensible

a metilación (Bobadilla-Landey *et al.* 2013). Existen variaciones al método MSAP, en donde el ADN digerido con enzimas de restricción con sensibilidad distinta a metilación, son sujetas a una PCR con imprimadores aleatorios, y se comparan los patrones de bandas resultantes en un gel de electroforesis (Cai *et al.* 1996).

Caracterización fisiológica de la variación somaclonal

Utilizando una aproximación fisiológica, aunado a diferentes métodos moleculares para la detección de variación somaclonal, se han seleccionado clones genéticamente distintos con características de interés. Por ejemplo, se seleccionaron clones de arroz (*Oryza sativa*) con mayor tolerancia al frío (Bertin y Bouharmont 1997). En trigo (*Triticum aestivum*) se seleccionaron líneas somaclonales con mayor tolerancia a la infección por *Fusarium* spp. por medio de la selección de clones con resistencia al deoxynivalenol (Yang *et al.* 1998). En girasol (*Helianthus annuus*) se seleccionaron en campo variantes somaclonales con características superiores, como menor periodo vegetativo, resistencia a *Phomopsis helianthi* y mayores rendimientos que las plantas madres de los cuales se regeneraron (Encheva *et al.* 2003). Más recientemente, en pasto San Agustín (*Stenotaphrum secundatum*), se seleccionó un clon con mayor resistencia al frío que la planta donadora del tejido (Li *et al.* 2010). También se seleccionó un clon de ciruela (*Prunus cerasifera*) que posee mayor tolerancia a condiciones de anegamiento en el suelo, para ser utilizado como portainjertos (Pistelli *et al.* 2012). Los casos anteriores indican el uso potencial que se le puede dar a la variación somaclonal como fuente de nuevas características en cultivos de interés.

Efecto del tipo de regeneración *in vitro* sobre la variación somaclonal

La micropropagación de plantas (i.e. propagación por medio de cultivo de tejidos) es posible realizarla por medio de tres vías. A saber, se pueden clonar plantas por medio de inducción y brotación de yemas laterales y, formación de brotes directamente de algún explante (vía directa), a través de la producción de brotes a partir de callo (organogénesis indirecta), y vía producción de embriones somáticos (i.e., embriones formados a partir de células asexuales)

(Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo 2012). Por la diversidad de tipos de células, tejidos u órganos utilizados en cada vía de regeneración, es probable que el método de micropropagación que se utilice represente un factor que ejerza influencia sobre el tipo de cambios genéticos, epigenéticos y/o fenotípicos en un grupo de plantas propagadas (Bairu *et al.* 2011).

Variación somaclonal en cactus

La información sobre variación somaclonal en la familia Cactaceae es limitada. En tuna (*Opuntia ficus-indica*) se determinó la estabilidad genética por medio de RAPDs (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico –*Random amplified Polymorphic DNA* en inglés–) de plantas micropropagadas (Néjia *et al.* 2012). También se analizó genética y fitoquímicamente la variación somaclonal de plantas regeneradas *in vitro* de *Pilosocereus robinii*, un cactus en peligro de extinción (Khattab *et al.* 2013). En cuanto a *Hylocereus* ssp., recientemente se ha publicado la generación de marcadores RAPDs en 16 accesiones de *H. undatus* con diferencias en cuanto a su rendimiento (Junqueira *et al.* 2010). Sin embargo, no se encontraron estudios en Cactaceae sobre cambios a nivel epigenético de plantas cultivadas *in vitro*.

Justificación

La mayor parte de la literatura encontrada concerniente a la pitahaya es referida a la especie *H. undatus* (frutos de cáscara rojiza y pulpa blanca). Recientemente ha crecido el interés por *H. costaricensis* en Costa Rica por sus propiedades nutraceuticas y de contenido de pigmentos útiles diferentes a los de *H. undatus*, por lo que se ha desarrollado investigación en cuanto a su domesticación por métodos biotecnológicos para la propagación clonal (Viñas *et al.*, 2012), inducción de callo (Gómez, 2011) y aislamiento de protoplastos (Viñas, 2011). Ampliar el conocimiento sobre *H. costaricensis* podría contribuir a desarrollar su cultivo como alternativa en las regiones secas de Costa Rica. Sin embargo, si bien existen distintas investigaciones sobre el cultivo *in vitro* de especies de *Hylocereus*, no se encontró información acerca de la variabilidad que se presenta como consecuencia del cultivo *in vitro* de ninguna especie de este género. Tampoco se encontró en la literatura estudios sobre cambios a nivel epigenético en cultivo *in vitro* de ninguna

especie de perteneciente a la familia Cactaceae. La importancia de generar conocimiento acerca de la variación somaclonal que pueden presentar plantas regeneradas a partir de cultivo *in vitro* posee dos aristas: la variación desde el punto de vista de su perjuicio en el logro de la homogeneidad genética en poblaciones de plantas regeneradas, y desde la perspectiva del mejoramiento genético de la especie *Hylocereus costaricensis* como fuente de nuevas características agronómicas. Por la línea del mejoramiento genético de esta planta, se han hecho aproximaciones por medio del cultivo de anteras (androgénesis) y de óvulos (ginogénesis) para la regeneración de plantas haploides. Si bien se logró la regeneración, aparecieron de forma frecuente aberraciones fenotípicas (e.g., albinismo) que obliga a generar más información en este campo (Reinerio-Benega *et al.* 2009a; Reinerio-Benega *et al.* 2009b). Además, en Israel se desarrollaron estudios para la formación de híbridos interespecíficos para lograr la auto-compatibilidad, puesto que en zonas fuera del centro de origen la polinización debe ser manual (Tel-Zur *et al.* 2012). Según Viñas (2011), la variación somaclonal podría resultar en un método viable para el mejoramiento de especies del género *Hylocereus* por su relativa facilidad técnica en la que no se involucran agentes mutagénicos, y requiere un menor conocimiento de secuencias en el genoma de la planta; sin embargo, resulta un método en donde se depende del azar, lo cual requiere de una caracterización precisa para la identificación de cambios.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el nivel de variación somaclonal de plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de las variedades "Orejona" y "Cebra" regeneradas *in vitro* por medio de vías directa e indirecta.

Objetivos específicos

Evaluar variaciones morfológicas en individuos de las dos variedades regenerados *in vitro* a partir de vías directa e indirecta.

Estimar el nivel de variación epigenética en individuos de las dos variedades regenerados *in vitro* a partir de vías directa e indirecta.

Evaluar variaciones citológicas en individuos de las dos variedades regenerados *in vitro* a partir de vías directa e indirecta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica (Montes de Oca, Costa Rica). Además, recibió financiamiento por parte del proyecto de investigación "Usos de la biotecnología para la caracterización de variedades y de procesos fisiológicos en pitahaya (*Hylocereus* spp.)" (VI- 734-B3-107), registrado en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y con recursos propios del Laboratorio de Biotecnología del CIGRAS.

Cultivo *in vitro* de explantes de *Hylocereus costaricensis*

Material vegetal

Se utilizaron plantas de pitahaya morada (*Hylocereus costaricensis*) de las variedades "Orejona", "Cebra" y adicionalmente se incluyó la variedad "San Ignacio". Las plantas se encontraban en condiciones de invernadero, cultivadas en potes de plástico de 20 X 18 cm con una mezcla de turba (Heveco, Canadá) y suelo a razón de 1:1 (Figura 1). Antes y durante la ejecución del proyecto, las plantas fueron regadas en la base de dos a tres veces por semana con agua de grifo, fertilizadas con una fórmula granulada Rosafert® (12-12-17-microelementos, Rosier, Bélgica) a razón de 15 g por planta por mes, y se les aplicó una mezcla de 2 g L⁻¹ de Agrymicin® (estreptomicina y terramicina; Pfizer, Toluca, México) y 2 g L⁻¹ de Cafesa Benomil 50 WP® (benomil; Cafesa, San José, Costa Rica).



Figura 1. Condición general de cultivo de las plantas madre de pitahaya (*Hylocereus* spp.) de donde provenían las plantas utilizadas en este estudio.

Condiciones generales de cultivo in vitro

Para el establecimiento *in vitro* de las plantas, y para la inducción de la formación de brotes por medio de regeneración directa, se vertieron 25 mL de cada medio de cultivo descrito en las secciones posteriores, en frascos cilíndricos de vidrio de 5 cm de diámetro y 7 cm de altura. Cuando se realizó el cultivo de los explantes y sus respectivos sub-cultivos de mantenimiento, los frascos se cerraron con tapas Magenta® y, se sellaron con dos capas de plástico para alimentos (Darnel Wrap, Ajoever, Colombia). En cuanto a los medios utilizados para la regeneración por vía indirecta, se vertieron 25 mL de cada medio de cultivo en placas de Petri de 90 mm de diámetro. Para el cultivo de los explantes y sus respectivos sub-cultivos de mantenimiento, se cerraron las placas de Petri con la tapa de vidrio correspondiente y se sellaron con dos capas del mismo plástico de alimentos utilizado en los frascos.

Las condiciones de esterilización por autoclavado de todos los medios de cultivo que se prepararon fueron de 20 minutos, a una temperatura de 121 °C y una presión de 1.05 kg cm⁻². En ningún caso se utilizaron medios de cultivo que estuviesen almacenados por un periodo mayor a 30 días. En cuanto a las condiciones ambientales de cultivo bajo luz, los explantes se colocaron bajo luz fluorescente (Optron 4100K, Sylvania), con radiación fotosintéticamente activa de 30 μmol m⁻² s⁻¹, con un fotoperiodo de 12/12 h y 24 ± 1 °C de temperatura ambiental. Los explantes que fueron cultivados en oscuridad se cultivaron con la misma temperatura ambiental mencionada anteriormente.

Establecimiento in vitro de explantes (plantas madre in vitro)

La preparación del material vegetal para el establecimiento de los cultivos *in vitro* se hizo de acuerdo con lo descrito por Hua *et al.* (2015) con algunas modificaciones. Se extrajeron segmentos de cladodio (i.e., tallos fotosintéticos) de aproximadamente 7 cm de longitud a partir de las plantas en invernadero, y se colocaron de forma vertical en una caja plástica transparente de 32 X 26 X 9 cm con turba humedecida para inducir la formación de brotes, y se colocaron en condiciones de invernadero (Figura 2). Esto permitió la inducción de formación de brotes más

delgados y pequeños que los que se podrían obtener a partir de las plantas de origen para, finalmente, facilitar la introducción de segmentos de cladodio a condiciones *in vitro*.



Figura 2. Modo en el que los segmentos de cladodio de *Hyocereus costaricensis* fueron colocados de forma vertical sobre turba humedecida contenida en cajas plásticas, para la inducción de la formación de brotes más pequeños con respecto al cladodio de origen, luego de 5 meses, según lo descrito por Hua *et al.* (2015).

Una vez formados los brotes, y elongados hasta aproximadamente 15 cm (luego de 5 meses), se seccionaron con bisturí (no. 22), se colocaron en agua corriente durante la recolección, y se inició el proceso de desinfección para su establecimiento *in vitro*. La desinfección de los explantes se llevó a cabo según lo descrito por Viñas *et al.* (2012). Se tomaron las secciones de cladodios y se cortaron en segmentos de 5 a 7 cm de largo. Se lavaron con agua corriente con Tween 20® (dos gotas por cada 100 mL), se cepillaron suavemente y, se enjuagaron con agua corriente. Posteriormente, se realizó un pre-tratamiento en una solución de 2 g L⁻¹ de Agrymicin® (estreptomicina y terramicina; Pfizer, Toluca, México) y 2 g L⁻¹ de Cafesa Benomil 50 WP® (benomil; Cafesa, San José, Costa Rica) con agua destilada en una botella de 1 L, y se colocaron en un agitador orbital a 125 rpm durante 30 minutos. Luego, se procedió a la desinfección superficial, sumergiendo y agitando (con las condiciones de agitación descritas anteriormente) en una solución de 1.0 % p/v NaOCl con Tween 20® (dos gotas por cada 100 mL de solución) durante 15 minutos. Después, en una cámara de flujo laminar, las secciones se lavaron tres veces con agua destilada estéril, y los cladodios se mantuvieron sumergidos en agua destilada estéril. Los extremos oxidados de las secciones de cladodio fueron removidos con bisturí (no. 22) y pinzas, y las secciones no oxidadas se colocaron de forma vertical sobre el medio de establecimiento (Figura

3). El medio de establecimiento sin reguladores de crecimiento, estaba compuesto por las sales minerales del medio MS (Murashige y Skoog 1962) suplementado con 0.1 mg L^{-1} tiamina HCl, 0.5 mg L^{-1} piridoxina HCl, 0.5 mg L^{-1} ácido nicotínico, 2 mg L^{-1} glicina, 100 mg L^{-1} myo-inositol y 5% p/v sacarosa, se ajustó el pH a $5.8 \pm 0,01$ con KOH y se gelificó con 0.9% p/v agar. Los explantes fueron colocados en cultivo según la sección *Condiciones generales de cultivo in vitro*, hasta la formación de brotes *in vitro*. Los brotes se formaron y elongaron en un periodo de 8 meses de cultivo. Estos brotes se utilizaron para los procedimientos de regeneración directa e inducción de callo. Para el mantenimiento de los explantes, se realizó un subcultivo cada seis semanas, el cual consistió de la remoción de los extremos oxidados del cladodio y de raíces, y su posterior transferencia a medio de cultivo fresco.

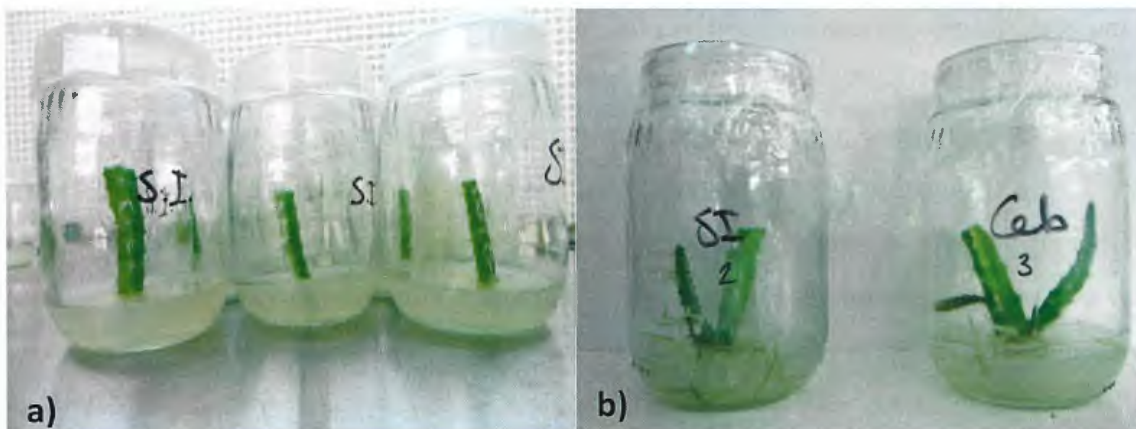


Figura 3. Establecimiento *in vitro* de explantes de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) que posteriormente sirvieron como fuente de tejidos (plantas madre *in vitro*) para los procesos de regeneración directa e indirecta. El medio base estaba compuesto por las sales minerales y vitaminas del MS (Murashige y Skoog 1962), adicionado con 5 % p/v de sacarosa y sin reguladores de crecimiento. a) Segmentos de cladodio de la variedad San Ignacio introducidos luego de haber sido sometidos al proceso de desinfección. b) Segmentos de cladodio de las variedades San Ignacio y Cebra con brotes luego de 8 meses en cultivo *in vitro*.

Multiplicación por vía directa

Para la obtención de plantas regeneradas de forma directa, se utilizaron segmentos de cladodio de las plantas establecidas *in vitro* sin reguladores de crecimiento, según lo descrito en la sección anterior. La vía de regeneración se hizo a través de la inducción de formación de cladodios nuevos a partir de yemas preformadas. Para ello, se extrajeron con bisturí y pinzas segmentos de

cladodio que contenían un máximo de dos areolas por costilla (~ 2 cm de longitud), y se colocaron de forma vertical en un medio de cultivo de multiplicación, el cual estaba compuesto por las sales minerales del medio MS suplementado con 0.1 mg L⁻¹ tiamina HCl, 0.5 mg L⁻¹ piridoxina HCl, 0.5 mg L⁻¹ ácido nicotínico, 2 mg L⁻¹ glicina, 100 mg L⁻¹ myo-inositol, 5 % p/v sacarosa y, la combinación de reguladores de crecimiento reportada por Mohamed-Yaseen (2002), que consistió en adicionar 0.1 mg L⁻¹ de thidiazuron (TDZ) y 0.1 mg L⁻¹ de ácido naftalenoético (ANA). Antes de la esterilización, se ajustó el pH del medio a 5.8 ±0.01 con KOH y se gelificó con 0.9% p/v agar. Dicho medio fue elegido tomando en cuenta la experiencia generada en el CIGRAS, pues es el que induce la formación de mayor cantidad de brotes al utilizar las variedades San Ignacio y Orejona.

Para cultivar los explantes en el medio de multiplicación descrito, se tomaron los brotes formados *in vitro* con anterioridad en el medio de establecimiento y, los explantes fueron colocados en las condiciones descritas en la sección *Condiciones generales de cultivo in vitro*. El periodo de inducción y formación de brotes comprendió un mes de cultivo. Para cada variedad, el explante que formó la mayor cantidad de brotes nuevos, fue tomado y sub-cultivado en el mismo medio base descrito en el párrafo anterior (sales y vitaminas MS adicionado con 5 % p/v de sacarosa), con la excepción de que no se adicionó ningún regulador de crecimiento para favorecer la elongación de los brotes, colocando un explante por frasco. Transcurridos seis meses de cultivo en medio sin reguladores de crecimiento, se separó cada brote nuevo elongado proveniente de un explante de cada variedad, se colocó un brote por frasco de forma vertical en el mismo medio de cultivo sin reguladores, y se asignó un código a cada brote compuesto de la inicial de la variedad (S = San Ignacio, O = Orejona, C = Cebra), seguido de un número arbitrario para su distinción. Cada brote nuevo, proveniente de un solo explante de cada variedad, con su respectivo código asignado, se mantuvo en el medio sin reguladores para facilitar la formación de raíces y nuevos cladodios para que, a la hora de las evaluaciones, sea considerado como una planta (clon). En todos los casos, se realizaron sub-cultivos de mantenimiento cada cuatro a seis semanas. En el caso de los explantes y los brotes, el sub-cultivo consistió en la remoción de tejido oxidado y cultivo en medio de cultivo fresco. En el caso de las plantas con raíces desarrolladas, el mantenimiento consistió en la remoción de cladodios necrosados y poda de raíces adventicias y basales mayores a ~ 5 cm de largo. Las condiciones de cultivo se mantuvieron por un periodo de

aproximadamente un año, hasta obtener una cantidad de biomasa que permitiera obtener las muestras necesarias para el análisis morfológico, epigenético y citológico.

Multiplicación por vía indirecta

Para la regeneración de plantas por medio de una vía indirecta (i.e., a través de la inducción de callo y, posteriormente, la inducción de formación de brotes), el procedimiento se basó en dos reportes publicados para plantas de la familia Cactaceae. Ambas metodologías fueron probadas de forma separada.

La primera metodología ejecutada fue reportada para *Notocactus magnificus* (de Medeiros *et al.* 2006), y fue probado en *Hylocereus costaricensis* por Gómez (2011). Para la fase de inducción de callo, se preparó un medio de cultivo compuesto por las sales minerales del medio MS, suplementado con 0.4 mg L⁻¹ tiamina HCl, 100 mg L⁻¹, myo-inositol, 2 % p/v sacarosa, 0.11 mg L⁻¹ ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 1 mg L⁻¹ N6-bencilaminopurina (BAP); se ajustó el pH del medio de cultivo a 5.80 ± 0.01 con KOH, se gelificó con 0.9 % p/v agar. A partir de los brotes de las tres variedades, formados *in vitro* con anterioridad en el medio de establecimiento sin reguladores de crecimiento, se extrajeron con bisturí y pinzas segmentos de tallo que contenían hasta dos areolas (~ 0.5 cm), y se colocaron diez segmentos por placa de Petri con el medio de cultivo de inducción de callo descrito anteriormente. Los explantes se cultivaron en condiciones de oscuridad por un periodo de dos meses. Transcurrido el tiempo en oscuridad, los callos fueron transferidos a un medio MS, suplementado con 0.4 mg L⁻¹ tiamina HCl, 100 mg L⁻¹, myo-inositol, 2 % p/v sacarosa y 5 mg L⁻¹ BAP, con un pH ajustado a 5.80 ± 0.01 con KOH, gelificado con 0.9% p/v agar, y se cultivaron en condiciones de luz hasta la formación y elongación de brotes.

Al probar el método de de Medeiros *et al.* (2006), se notó la formación de brotes dos semanas antes de la transferencia de los explantes en condiciones de luz. Si bien se observó que hubo formación de callo, al realizar un corte con el bisturí en la mitad del callo y el explante de origen, fue posible observar que los brotes no provenían del callo, sino de las areolas del explante de origen (Figura 4). El mismo fenómeno se observó para los explantes provenientes de las variedades San Ignacio y Orejona. Aunado a ello, los resultados reportados para esta metodología no contemplan un análisis histológico que confirme que los explantes provenían de un proceso

regeneración indirecta, por lo que se decidió probar lo reportado por Angulo-Bejarano y Paredes-López (2011) para *Opuntia ficus-indica*.

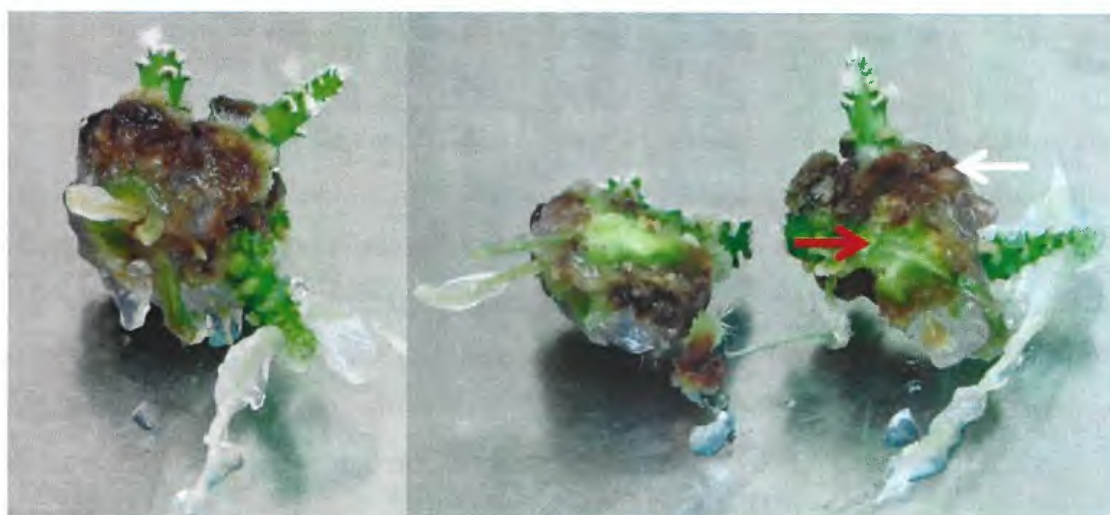


Figura 4. Explantes provenientes de una planta de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de la variedad Cebra, establecida *in vitro* sin reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, luego de haber sido sometido al proceso de regeneración por vía indirecta descrito por de Medeiros *et al.* (2006) y probado en pitahaya por Gómez (2011), a los dos meses de cultivo después de haber sido transferido a medio de brotación (MS con 5% sacarosa y 5 mg L⁻¹ N6-bencilaminopurina). El mismo explante luego de haber sido cortado a la mitad para observar que los brotes provenían de un proceso de regeneración directa a partir de las areolas presentes en el explante de origen; la flecha roja señala al explante de origen, la flecha blanca señala a lo que parece un callo alrededor de la areola.

Para probar el segundo protocolo, se preparó un medio de cultivo MS suplementado con 0.1 mg L⁻¹ tiamina HCl, 0.5 mg L⁻¹ piridoxina HCl, 0.5 mg L⁻¹ ácido nicotínico, 2 mg L⁻¹ glicina, 100 mg L⁻¹ myo-inositol, 5% p/v sacarosa y, se adicionó 0.5 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de ácido 2,4-D. El medio de cultivo se ajustó a un pH de 5.8 ±0.01 con KOH y se gelificó con 0,9% p/v agar. La extracción de los explantes se realizó del mismo modo en que se describió con anterioridad, excepto que solamente se tomaron explantes de las variedades San Ignacio y Orejona. Los segmentos de cladodio se colocaron en el medio descrito anteriormente, y se cultivaron en las condiciones de luz y temperatura ambiental descritas en la sección *Condiciones generales de cultivo in vitro*. En este último caso hubo formación de callo dos meses después de la inducción, sin embargo no formaron en ningún momento brotes. El callo de cada explante se continuó subcultivando, tomando una porción de la parte superior de estos con pinzas y colocándolos en medio de cultivo fresco. El proceso de subcultivo se realizó cada seis semanas. Los callos de ambas

variedades fueron utilizados para su observación al microscopio y para la evaluación de posibles cambios epigenéticos, tal y como se describirá en las secciones ulteriores.

Análisis histológico de callos y brotes obtenidos

Los callos (ocho meses después de su inducción) y tejidos provenientes de cultivo *in vitro* se fijaron en una solución de formaldehído-alcohol-ácido acético por al menos 3 días a temperatura ambiente, y se almacenaron a 4 °C por al menos 3 semanas. Luego, los tejidos fueron deshidratados en series de alcohol y se fijaron en parafina. Las muestras en parafina se utilizaron para realizar cortes de 8-10 µm. Las muestras fueron desparafinadas y teñidas con azul de toluidina. Las láminas fueron observadas en un microscopio de luz (Olympus CX22LED) y se tomaron fotografías con una cámara fotográfica digital (Coolpix P600, Nikon, Japón).

Evaluación de la variación somaclonal

Análisis morfológico

Para determinar posibles diferencias morfológicas, cada individuo regenerado fue evaluado según algunas de las variables morfológicas vegetativas utilizadas por Grimaldo-Juárez *et al.* (2007), Tao *et al.* (2014) y otras adicionales sin reportes en la literatura (Cuadro 2). Las evaluaciones morfológicas se realizaron, en todos los casos, entre los 19 y 21 meses después de inducida la formación de brotes que dieron origen a los clones. Considerando el tiempo que tomaron las evaluaciones, no se realizaron subcultivos de las plantas para evitar alterar su estado; además, en cada evaluación se tomaron plantas de cada variedad, para evitar en la medida de lo posible variaciones debidas al tiempo de cultivo. Las variables de altura de la costilla al vértice del ángulo de apertura de la ondulación (AC), altura de la ondulación (ALO), ángulo de apertura de la ondulación (AA), área de la ondulación (ARO), área transversal del cladodio (ART), circularidad transversal del cladodio (C), diámetro transversal del cladodio (DC), distancia entre areolas (DA), grosor de la costilla (GC) y, longitud de la espina (LE) fueron determinadas por medio de la toma de imágenes digitales. En el caso de las plantas madre en invernadero, se tomaron de fotografías

de los cladodios con una cámara fotográfica digital (Coolpix P600, Nikon, Japón). En el caso de las plantas madre *in vitro* y los clones, la toma de imágenes se realizó en cámara de flujo laminar, con la ayuda de un estereoscopio (SZ2, Olympus, Japón) y una cámara fotográfica digital acoplada al lente ocular (AM-4023X, Dino-Eye, Taiwán). El análisis de las imágenes se realizó por medio del software ImageJ Fiji (Schindelin *et al.* 2012). Por otro lado, las variables de número de areolas por costilla (NAC), longitud del cladodio (LC) y número de segmentos por cladodio (NSC), fueron determinados por medio de inspección ocular en todos los casos. Finalmente, el número de areolas por cladodio (NACI) y el volumen del cladodio (VC) fueron calculados utilizando algunas de las variables ya determinadas, según como se indica en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Variables morfométricas evaluadas plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra, en cladodios de las plantas madre en invernadero, plantas madre in vitro y plantas regeneradas de forma directa a partir del uso de reguladores de crecimiento, para la evaluación de la variación somaclonal.

Variable	Código	Unidad	Observaciones	Referencia
Altura de la costilla desde vértice del AA	AC	mm		Grimaldo-Juárez <i>et al.</i> (2007)
Altura de la ondulación	ALO	mm	Promedio de la altura de tres ondulaciones de un mismo cladodio	Grimaldo-Juárez <i>et al.</i> (2007)
Ángulo de apertura de la ondulación	AA	°		Grimaldo-Juárez <i>et al.</i> (2007)
Área de la ondulación	ARO	mm ²	Promedio del área de tres ondulaciones de un mismo cladodio	Grimaldo-Juárez <i>et al.</i> (2007)
Área transversal del cladodio	ART	mm ²	Área del corte transversal del cladodio	
Circularidad transversal del cladodio	C		Valor de 0 a 1, entre mayor sea el valor más se acerca la forma a un círculo perfecto	
Diámetro transversal del cladodio	DC	mm	Diámetro de Ferret del corte transversal de un cladodio	
Distancia entre areolas	DA	mm	Promedio de tres entrenudos de un mismo cladodio	Grimaldo-Juárez <i>et al.</i> (2007), Tao <i>et al.</i> (2014)
Grosor de la costilla	GC	mm	Promedio del grosor de tres costillas de un mismo cladodio	Tao <i>et al.</i> (2014)
Longitud de la espina	LE	mm	Promedio de tres espinas de un mismo cladodio	Grimaldo-Juárez <i>et al.</i> (2007), Tao <i>et al.</i> (2014)
Longitud del cladodio	LC	mm		Grimaldo-Juárez <i>et al.</i> (2007)
Número de areolas por cladodio	NACI		NACI = NAC*NCC	Grimaldo-Juárez <i>et al.</i> (2007), Tao <i>et al.</i> (2014)
Número de areolas por costilla	NAC		Promedio del número de espinas en tres areolas de un mismo cladodio	Grimaldo-Juárez <i>et al.</i> (2007), Tao <i>et al.</i> (2014)
Número de costillas por cladodio	NCC			Tao <i>et al.</i> (2014)
Número de espinas por areola	NEA		Promedio del número de espinas en tres areolas de un mismo cladodio	Grimaldo-Juárez <i>et al.</i> (2007), Tao <i>et al.</i> (2014)
Número de segmentos por cladodio	NSC		Número de segmentos en un mismo cladodio producto de divisiones	
Volumen del cladodio	VC	mm ³	VC = ART*DC	

Análisis epigenético

Extracción y purificación de ADN

Como un primer paso para realizar el análisis de posibles cambios a nivel epigenético, se extrajo del ADN genómico de las plantas de pitahaya de las tres variedades estudiadas de las plantas madre en invernadero, plantas madre *in vitro*, las plantas resultantes de la multiplicación por medio del uso de reguladores de crecimiento y, los callos generados a partir de tejidos de las plantas madre *in vitro* de las variedades San Ignacio y Orejona. El ADN de las plantas madre en invernadero se extrajo a partir de la epidermis del cladodio (sección de epidermis de $\sim 4 \text{ cm}^2$), puesto que los demás tejidos presentan una cantidad de mucílago considerable que compromete tanto la cantidad como la calidad del extracto de ADN. Por otro lado, el ADN de las plantas cultivadas *in vitro* (madres *in vitro* y clones), fue extraído a partir de cladodios enteros de las plantas. En el caso de los callos (tres meses luego de la inducción), se tomaron tres repeticiones de callos provenientes de placas de Petri distintas. En todos los casos, durante el muestreo, los tejidos y callos fueron colocados en nitrógeno líquido y almacenados a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Para la extracción y purificación de ADN, se utilizó el protocolo reportado por Stewart y Via (1993), y modificado por Cota-Sánchez *et al.* (2006) y otras adicionales que se detallarán a continuación

Para la extracción, entre 100 y 200 mg de peso fresco de tejido o callo fueron colocados en tubos de 2 mL que contenían dos balines de metal y una punta de espátula de polivinilpirrolidona (polivinilpirrolidona insoluble), se agregaron 500 μl de buffer de homogenización (2 % p/v CTAB, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.02 M EDTA pH 8.00, 1.42 M NaCl, 2 % p/v polivinilpirrolidona, 5 mM ácido ascórbico y, 2% v/v mercaptoetanol) previamente calentado a 65°C , se maceró en un homogeneizador de muestras (MM4000, Retsch, Alemania) por 30 segundos a una frecuencia de 30 oscilaciones por segundo, y se incubó en baño María durante 60 min a $65 \text{ }^\circ\text{C}$. Luego, a cada muestra se agregaron 600 μl de una mezcla de cloroformo e isoamilalcohol (24:1), y se agitó cada tubo hasta formar una emulsión. Después de una centrifugación (5415R, Eppendorf, Alemania) a 12000 rpm por 5 min, se tomó el sobrenadante, y se colocó en un tubo nuevo de 1.5 ml. Posteriormente, se agregó una gota de una mezcla de 10 % p/v CTAB con 1.4 M NaCl previamente calentada a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ a cada muestra, se agitó por inversión por

5 min y, se repitió la adición de 600 μl de la mezcla de cloroformo e isoamilalcohol (24:1) a cada muestra, se agitaron los tubos por inversión hasta formar emulsión, y se centrifugaron a 12000 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo. Luego, se adicionó 400 μl de isopropanol frío a cada tubo, se incubaron por al menos 12 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, se centrifugaron los tubos a 7000 rpm por 5 minutos, y se descartó el sobrenadante. Finalmente, los pellets de ácidos nucleicos se lavaron, primero, con 1 mL de 70 % v/v etanol, se centrifugó a 7000 rpm por 5 min, y luego con 1 mL de 95 % v/v etanol y se centrifugó por 7000 rpm por 5 minutos. Los pellets se dejaron secar en cámara de flujo vertical, y se disolvió el ADN en 50 μl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). La concentración ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) y calidad del ADN (relación A260/A230 y A260/A280) fue verificada por medio de un nanofotómetro (Nanophotometer Pearl, Implen, Alemania), en el Anexo 1 se encuentran los resultados de dicha verificación para cada muestra.

Detección de polimorfismos por medio de MS-ISSR

Con el fin de detectar polimorfismos debidos a posibles cambios de metilación en regiones del ADN genómico de las plantas de pitahaya, el estudio se basó en el método de digestión con enzimas de restricción acoplada a la amplificación con imprimadores aleatorios (CRED-RA por sus siglas en inglés) publicado por primera vez por Cai *et al.* (1996). El método original consiste en la digestión de ADN genómico con dos endonucleasas sensibles a metilación, y una posterior amplificación por medio de PCR con la utilización de imprimadores aleatorios (RAPDS – por sus siglas en inglés) de dichas muestras y la muestra sin digerir. El principio se basa en que, si un producto de PCR amplificado con un imprimador de secuencia aleatoria posee una región con la secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción y es cortado, dicho producto no va a ser amplificado. Al utilizar enzimas de restricción sensibles a metilación, la aparición o desaparición de la banda con el sitio de reconocimiento va a depender, principalmente, de la actividad de la enzima según el estado de metilación de dicha región. En el caso de este estudio, se utilizaron las enzimas de restricción *HpaII* y *MspI* (Thermo Scientific), las cuales cortan la misma secuencia ($5'\text{-C}\downarrow\text{CGG-3}'$), sin embargo, la actividad de *Hpa II* es bloqueada cuando la secuencia de reconocimiento posee la citosina interna metilada ($5'\text{-C}^m\text{CGG-3}'$); por otro lado, ambas enzimas son bloqueadas cuando la citosina externa se encuentra metilada ($5'\text{-}^m\text{CCGG-3}'$).

Sin embargo, en la literatura se reportan modificaciones a este método, en donde, en lugar de utilizar imprimadores aleatorios, se utilizan inter-secuencias simples repetidas (ISSRs), de los cuales se encuentran los primeros reportes de dicha modificación para evaluar cultivares de *Oryza sativa* (Wang *et al.* 2004) y de *Zea mays* (Zhao *et al.* 2006). En este estudio, se eligió trabajar con ISSRs, puesto que se reportan como imprimadores que poseen mayor reproducibilidad que los RAPDs (Godwin *et al.* 1997). Los imprimadores elegidos fueron probados previamente en *Hylocereus* sp. por Tao *et al.* (2014) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Lista de imprimadores de inter-secuencias simples repetidas (ISSR por sus siglas en inglés) utilizados en este estudio y su respectiva temperatura de anillamiento y secuencia, reportados para la caracterización de accesiones de *Hylocereus* spp. (Tao *et al.* 2014). Y = citosina(C) o timina (T).

Imprimador	Temperatura de anillamiento (°C)	Secuencia (5'-3')
UBC824	50.3	TCTCTCTCTCTCTCG
UBC825	53.5	ACACACACACACACT
UBC835	59.9	AGAGAGAGAGAGAGAYC
UBC856	55.1	ACACACACACACACAYA

Antes de la PCR con los ISSRs, se tomó cada muestra de ADN y se realizaron tres diluciones, a una concentración de 50 ng μL^{-1} cada una, en dos de las cuales se realizó la mezcla de digestión con cada enzima de restricción *Hpa* II y *Msp* I siguiendo las indicaciones del fabricante. Las condiciones de reacción fueron llevadas a cabo según lo recomendado por Gao *et al.* (2014), en donde se aplicó un exceso de enzima (10 U en total por reacción), y se incubó por un periodo mayor de tiempo, el cual en este caso fue de 24 horas a 37 °C para evitar lo más posible digestiones incompletas. Luego de las 24 horas, se realizó un paso de desnaturalización de la enzima a 80 °C por 20 min.

Para la amplificación de los ISSRs en las diluciones de ADN digeridas con *Hpa* II y *Msp* I y, en las muestras sin digerir, se realizó la PCR, cuya mezcla de reacción estuvo compuesta de 100 ng de ADN de cada muestra de cada variedad proveniente de la planta madre en invernadero, buffer Taq 1X (Thermo Scientific), 1.5 mM MgCl_2 (Thermo Scientific), 0.2 mM de mezcla de dinucleótidos trifosfato (Thermo Scientific), 1.2 μM de uno de los imprimadores presentados en el Cuadro 3 (Macrogen, Korea del Sur), 0.05 U μL^{-1} Taq Polimerasa (Thermo Scientific), y agua libre de

nucleasas, en un volumen total de 25 μ L. Las condiciones de reacción fueron generadas en un termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Alemania) y, contempló una fase de desnaturalización inicial a 95 $^{\circ}$ C por 5 min, seguido de 40 ciclos compuestos de un paso de desnaturalización a 95 $^{\circ}$ C por 45 s, un paso de anillamiento a la temperatura correspondiente a cada imprimador utilizado en este estudio (Cuadro 3) y un paso de extensión a 72 $^{\circ}$ C por 1 min y, finalmente se realizó un paso de extensión a 72 $^{\circ}$ C por 5 min. Para confirmar la amplificación de productos se realizó una electroforesis en gel de 2 % p/v de agarosa en buffer TBE (89 mM Tris-borato, 2 mM EDTA, pH 8), cargando 5 μ L del producto de PCR con 2 μ L de 6X Loading Dye (Thermo Scientific). La electroforesis consistió en correr los productos a 70 V por 8 horas. La observación de las bandas se realizó por medio de una incubación del gel 100 mL de una solución 33X de GelRed (Thermo Scientific) por 30 minutos en agitación a 25 rpm en agitador orbital, y su posterior observación en un transiluminador ultravioleta (Spectroline, Uvman, Reino Unido). Sin embargo, para el análisis del tamaño y número de bandas, los productos de PCR fueron enviados al Laboratorio de Secuenciación del Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica, para ser analizados por medio de electroforesis capilar por medio del equipo (QIAxcel Advanced, Qiagen, Alemania). El análisis del patrón de bandas se especifica en la sección *Análisis de datos*.

Cuantificación del estado de metilación global del genoma

El nivel de metilación total del genoma de plantas de pitahaya se determinó colorimétricamente por medio del kit Imprint[®] Methylated DNA Quantification (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la cantidad de ADN genómico metilado en tres repeticiones (i.e., extracciones independientes de ADN) de plantas madre en invernadero, plantas madre *in vitro* y plantas regeneradas de forma directa de las tres variedades; por otro lado, también se determinó el estado de metilación de tres repeticiones de callos inducidos a partir de tejidos provenientes de las plantas madre *in vitro* de las variedades San Ignacio y Orejona. Para el cálculo del nivel de metilación del ADN analizado, se utilizó el método basado en un porcentaje de metilación con respecto al control de 60 ng de ADN metilado, suministrado por el kit.

Con el fin de probar la sensibilidad del kit, se tomaron explantes provenientes de las plantas regeneradas de forma directa de las variedades San Ignacio y Orejona, se trataron con el agente de-metilante 5-azacitidina (Sigma-Aldrich), y se cuantificó su nivel de metilación luego de un mes de inducción de la brotación. Para ello, se extrajeron, con bisturí y pinzas, ocho secciones de cladodio de cada variedad que contenían un máximo de dos areolas por costilla (~ 2 cm de longitud), y se colocaron de forma vertical en el mismo medio de cultivo de multiplicación descrito en la sección *Multiplicación por vía directa*, con la salvedad de que se vertió el medio (10 mL) en tubos de cultivo de 2.5 X 15 cm y, luego de la esterilización, los tubos fueron inclinados ~45° durante la solidificación del agar, de modo que la superficie del medio de cultivo se mantuviera inclinada con respecto al tubo de cultivo y, se colocó un explante por tubo. Lo anterior se realizó para aplicar el tratamiento con 5-azacitidina en un sistema de doble fase (sólido líquido), y que el explante no estuviese sumergido en la solución. Inmediatamente después de colocar los explantes en el medio de cultivo, se preparó una solución 100 μ M de 5-azacitidina en una mezcla de agua y ácido acético glacial (1:1), se filtró con una malla de 0.2 μ m para su esterilización, y a cuatro tubos de cultivo de cada variedad se agregaron 100 μ L de la solución líquida de 5-azacitidina. A los otros cuatro tubos restantes con los explantes de las dos variedades, se agregaron 100 μ L de la mezcla de agua ácido acético glacial (1:1) como testigo. Los explantes fueron cultivados en las condiciones de luz descritas en la sección de *Condiciones generales de cultivo in vitro* por dos meses. Transcurrido el tiempo de inducción de la brotación, se tomaron tres explantes de cada variedad por tratamiento y del testigo, y se extrajo su ADN tal y como se describe en la sección *Extracción y purificación de ADN*. La concentración y calidad del ADN se encuentran descritas en el Anexo 1.

Análisis citológico: observación de cromosomas en puntas de raíz

Se intentó realizar observaciones de células en proceso de división en puntas de raíz, con el propósito de detectar cambios en la ploidía de los clones, según el método descrito por Bobadilla-Landey *et al.* (2013). Para ello, se tomaron puntas de raíz del material a analizar, y se colocaron en una solución 2.5 mM 8-hidroxiquinolina en oscuridad por 2 h a 4° C y 2 h a temperatura ambiente. Luego, las raíces se fijaron en una solución de Carnoy (etanol absoluto y

ácido acético glacial, 3:1) por 24 h a -20 C. El material fue posteriormente almacenado en etanol al 70 % a 4° C hasta la preparación de las respectivas láminas.

La preparación de las láminas se hizo de acuerdo con el procedimiento descrito por Herrera *et al.* (2007). Las puntas de raíz se lavaron tres veces con agua destilada, se hidrolizaron con 0.25 % v/v HCl por 10 minutos, y se lavaron con 0.01 mol L⁻¹ buffer citrato (pH 4.5). Una punta de raíz individual se colocó en el centro de un porta-objetos de vidrio, y se incubó a 37° C por 40 minutos en 25 µL de una solución enzimática compuesta de 1 % p/v macerozima, 1 % p/v pectinasa y 1% p/v celulasa en buffer citrato (pH 4.6). Posteriormente, se retiró la solución enzimática, y se agregó una gota de agua destilada a la región meristemática, y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, se removió el agua y se maceraron las raíces con solución Carnoy y pinzas de punta fina. Las láminas se secaron al aire y se guardaron a 4 °C hasta su uso. Para la observación de cromosomas, se tomaron las láminas almacenadas y se tiñeron con una gota de resina adicionada con DAPI (Fluoroshield, Sigma-Aldrich), se colocó un cubreobjetos de vidrio, y se observó en un microscopio de invertido de epifluorescencia (AX10, Carl Zeiss, Alemania) para su respectivo conteo.

Análisis de datos

Diseño experimental

Para la evaluación morfológica de la variación somaclonal en explantes regenerados de forma directa, la población clonal establecida para cada variedad provino de un solo explante al que se le indujo la formación de brotes (Figura 5). Cada individuo (clon) fue considerado como un sujeto individual perteneciente a una variedad. Asimismo, para cada variedad, la planta madre en invernadero (SM = San Ignacio madre, OM = Orejona madre, CM = Cebra madre), y la planta madre *in vitro* (SMi = San Ignacio madre *in vitro*, OMi = Orejona madre *in vitro*, CMi = Cebra madre *in vitro* -las cuales fueron en todo momento cultivadas sin reguladores de crecimiento-), fueron consideradas de forma individual. De este modo, desde el punto de vista morfológico se realizaron comparaciones entre todas las plantas de cada variedad, incluyendo a las plantas madre en invernadero, las plantas madres *in vitro* y los respectivos clones; además, se realizaron

comparaciones entre las plantas establecidas *in vitro*, incluyendo a las plantas madres *in vitro* y sus clones. Finalmente, se comparó el comportamiento de las variables morfológicas en la población clonal de cada variedad. En la sección *Análisis morfológico* se especificarán las variables evaluadas en cada caso mencionado.

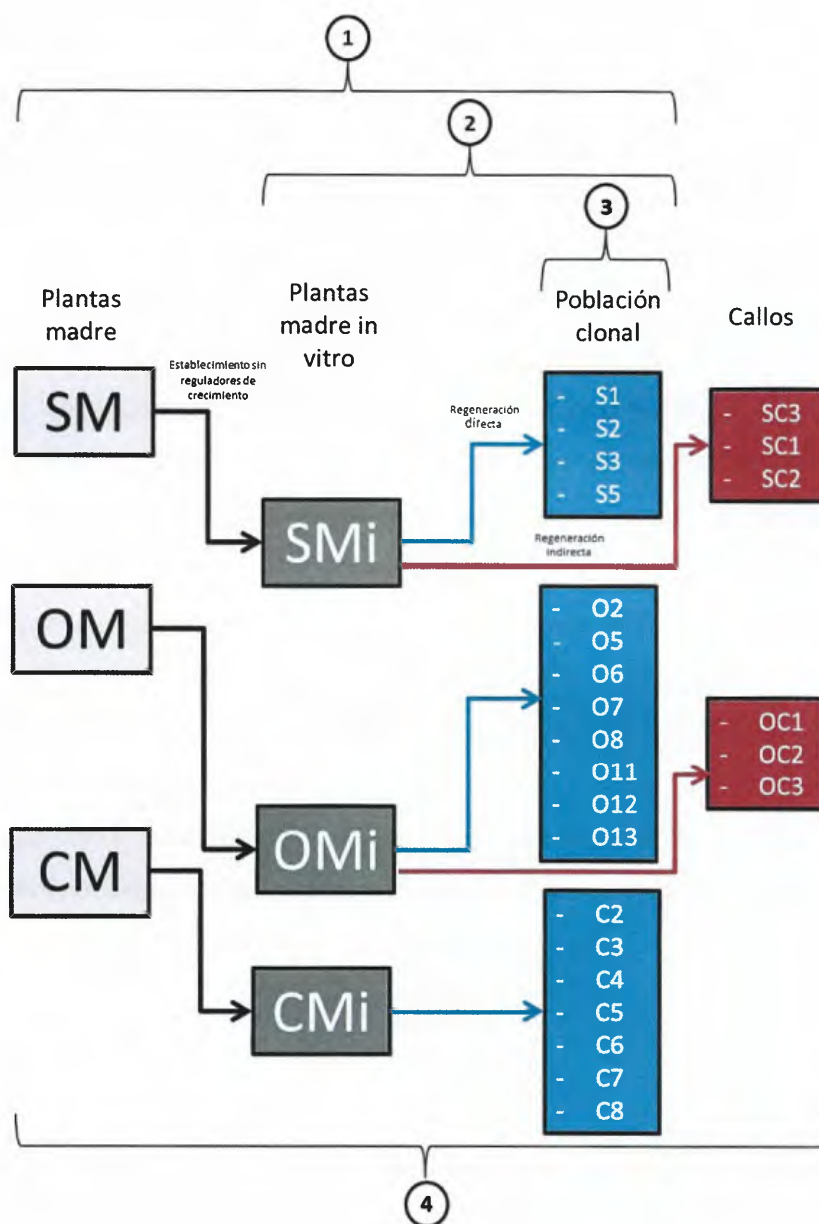


Figura 5. Diseño experimental para la evaluación de la variación somaclonal en plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) regeneradas de forma directa de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra, y en callos de las variedades San Ignacio y Orejona. Los números indican las comparaciones y tipos de análisis realizados en este estudio: 1) comparación morfológica entre plantas madre en invernadero, plantas madre establecidas *in vitro* sin reguladores de crecimiento, y la población clonal luego de la inducción de formación de brotes por medio de regeneración directa con reguladores de crecimiento; 2) comparación morfológica entre plantas madre *in vitro* y su respectiva población clonal; 3) comparación morfológica entre plantas de la población clonal de cada variedad; 4) evaluación de cambios epigenéticos entre plantas madre en invernadero, plantas madre establecidas *in vitro* sin reguladores de crecimiento, la población clonal luego de la inducción de formación de brotes por medio de regeneración directa con reguladores de crecimiento y, callos inducidos a partir de tejidos de las plantas madre *in vitro*.

En cuanto a los explantes sujetos al proceso de regeneración indirecta, al obtener solamente callos, se tomó una muestra de tres callos por cada variedad (San Ignacio y Orejona) para su descripción y análisis. La descripción morfológica se realizó por medio de cortes histológicos y su observación en un microscopio de luz, según lo descrito en la sección *Análisis histológico*. Posteriormente, las mismas tres muestras de los callos de las dos variedades mencionadas fueron sujetos al análisis de cambios epigenéticos, utilizando las metodologías descritas en la sección *Análisis epigenético*.

La evaluación de cambios epigenéticos se realizó en todos los sujetos obtenidos en el estudio, es decir, en las plantas madre, plantas madre *in vitro*, la población clonal y los callos de cada variedad. En cuanto a la metodología de digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación acoplada a la amplificación de inter-secuencias simples repetidas (*Methylation Sensitive Inter Simple Sequence Repeats*, MS-ISSR por sus siglas en inglés), se realizó en la totalidad de los individuos, mientras que en la cuantificación del estado de metilación global del genoma de cada individuo, se tomó en cuenta todos los individuos excepto que en la población clonal se tomó una muestra aleatoria de tres individuos de cada variedad (San Ignacio, plantas S1, S2 y S3; Orejona, plantas O2, O6 y O7; Cebra, C4, C5 y C7).

En el caso del análisis citológico, al no haber sido posible lograr obtener datos, ni por medio de la observación de cromosomas en puntas de raíz, ni por medio de citometría de flujo, no se pudo realizar ninguna de las comparaciones planificadas.

Análisis morfológico

Cada planta, en este caso, se analizó de forma individual, como un evento aparte. Por lo tanto, cada cladodio de cada individuo (planta madre, planta madre *in vitro* y cada clon en cada variedad) se tomó en cuenta como la unidad experimental. Todas las variables morfométricas contaron con tres repeticiones por individuo, a menos de que se indique lo contrario. Cabe destacar, además, que algunas de las variables contaban con repeticiones técnicas (Cuadro 2).

Como se indica en la sección *Diseño experimental* y como se observa en la Figura 5, desde el punto de vista morfológico, se realizó tres comparaciones distintas. Con el fin de elegir las variables a utilizar en cada una de las comparaciones, se calculó el R^2 ajustado de un modelo lineal

considerando los factores variedad, origen del explante e individuo de forma separada y se realizaron histogramas de densidad para observar la distribución de los datos. Además, para cada variedad en cada ambiente, se realizó un resumen de las estadísticas descriptivas, con el fin de ver el comportamiento de la varianza en cada comparación, lo cual incluye la prueba de homocedasticidad de Levene, como indicador de posible variación somaclonal. Para aportar al criterio de designar una variable con o sin distribución normal se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. Como parte del análisis exploratorio, una vez asignadas las variables a utilizar en cada comparación, se realizó un análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) para observar la relación entre las variables y con entre los individuos. Para el PCA, las variables fueron estandarizadas para evitar el efecto de las diferencias en magnitud entre las variables. En el caso de este estudio, la calidad de la representación se estimó por medio del valor \cos^2 , el cual se calcula como el cuadrado de la coordenada de cada variable e individuo en las dos dimensiones. Según sea el caso, las variables que presenten mayor variabilidad fueron comparadas por medio de un ANOVA ($p < 0.05$) de una vía en el caso de las variables con distribución normal, y de un ANOVA ($p < 0.05$) no paramétrico en el caso de las que no muestran una distribución normal. Finalmente, se realizó una matriz de correlación entre variables dentro de cada comparación, en donde las correlaciones significativas ($p < 0.05$) fueron tomadas en cuenta en las pruebas de hipótesis.

El manejo de las bases de datos se realizó por medio del programa informático Excel (V. 14.0.7190.5000, Microsoft Corp., Estados Unidos). Para calcular y/o graficar el R^2 ajustado, el PCA, las correlaciones y el ANOVA para comparar los estados de metilación globales del ADN se utilizó el programa estadístico R (The R foundation for Statistical Computing, v. 3.4.1), por medio de RStudio (RStudio Inc., v.1.0.153), utilizando los paquetes FactoMineR (Lê *et al.* 2008) para el PCA y corrplot (Wei y Simko 2017). Para calcular las estadísticas descriptivas se utilizó el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2016)

Análisis epigenético

Detección de polimorfismos por medio de MS-ISSR

Luego de la observación de las bandas amplificadas en las muestras de ADN digeridas con la enzima H, la enzima M y la muestra sin digerir de cada individuo, se realizó una primera discriminación y selección de bandas que se presentaron de forma reproducible en el ADN sin digerir de al menos cinco individuos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Número de bandas reproducibles obtenidas luego de amplificar ADN de pitahaya de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra, por medio de PCR con los imprimadores UBC 824, UBC 825, UBC 835 y UBC 856, para la amplificación de inter-secuencias simples repetidas (ISSR por sus siglas en inglés), y utilizados posteriormente en este estudio para la detección de polimorfismos debidos a variación epigenética por patrones de metilación. Se presenta además el número de bandas polimórficas debido a la variedad y su respectivo porcentaje con respecto al total para cada imprimador.

Imprimador	No. bandas totales	No. de bandas por variedad			No. bandas polimórficas debido a la variedad	Porcentaje de bandas polimórficas debido a la variedad
		San Ignacio	Orejona	Cebra		
UBC824	8	5	4	7	6	75,0
UBC825	9	7	8	4	6	66,7
UBC835	5	4	3	1	4	80,0
UBC856	10	6	7	8	7	70,0
Total	32	22	22	20	23	71,9

Posteriormente, se realizó una segunda discriminación, considerando los productos que presentaron polimorfismos debidos a la digestión con las enzimas *Hpa* II y *Msp* I, es decir, los posibles sitios que contienen la secuencia de reconocimiento (5'-C↓CGG-3') de ambas enzimas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Posibles sitios con la secuencia de reconocimiento de las enzimas *HpaII* y *MspI* (5'-C↓CGG-3'), amplificados por medio de PCR en plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) en las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra, utilizando los imprimadores UBC 824, 825, 835 y 856. Se presenta, además, el tamaño de la banda amplificada para cada imprimador en cada variedad.

Variedad	Posibles sitios CCGG detectados por imprimador y tamaño (pb)			
	UBC 824	UBC 825	UBC 835	UBC 856
San Ignacio			1150	
			467	
			335	
<i>Total de sitios CCGG</i>	0	0	3	0
Orejona	500		1150	1470
			962	745
			467	
<i>Total de sitios CCGG</i>	1	0	3	2
Cebra			467	1220
	<i>Total de sitios CCGG</i>	0	0	1
Total sitios CCGG distintos	1	0	4	3

Luego, se identificaron cuatro tipos de patrones de aparición y desaparición de bandas dependiendo de si el producto de PCR provenía de ADN digerido con la enzima *Hpa II* o *Msp I* (Cuadro 6). Finalmente, para cada individuo analizado, se realizó un conteo del tipo de patrón de bandas generado para cada imprimador, con el fin de determinar el comportamiento de dichos patrones dependiendo del origen de la planta, es decir, planta madre en invernadero, planta madre *in vitro*, cada uno de los individuos regenerados de forma directa y los callos en las variedades estudiados. De acuerdo con Fulnecek y Kovarik (2014), y con base en análisis de secuencias en *Arabidopsis*, los autores mencionan que existen casos de tipos de metilación en sitios CCGG más frecuentes que otros, los cuales modifican la actividad de las enzimas *Hpa II* y *Msp I*, y proponen que, a la hora de interpretar los polimorfismos debidos a la digestión de estas enzimas, se deben considerar dichas frecuencias. En este estudio se considerará cada tipo de polimorfismo obtenido con base solamente en lo que se conoce con certeza que ocurre con una alta frecuencia en genomas vegetales según Fulnecek y Kovarik (2014).

Cuadro 6. Tipos de patrones de aparición o desaparición de bandas, luego de amplificar por medio de PCR con los imprimadores ISSR UBC 824, 825, 835 y 856, ADN digerido con las enzimas *Hpa* II y *Msp* I, con respecto a la muestra de ADN sin digerir, proveniente de plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra para el análisis de variación somaclonal en plantas regeneradas *in vitro*. 1= aparición de banda, 0 = desaparición de banda.

Producto de PCR	Tipo de patrón (aparición-desaparición de bandas)			
	I	II	III	IV
Sin digerir	1	1	1	1
Digerido con <i>Hpa</i> II	1	1	0	0
Digerido con <i>Msp</i> I	1	0	1	0
	^m C ^m CGG	C ^m CGG		CCGG
Patrón de metilación según Fulnecek y Kovarik (2014)	GG ^m C ^m C	GG ^m CC	Confuso	GGCC
	Metilación total de citosinas internas y externas	Metilación total de citosinas internas		Sin metilación

RESULTADOS

Cultivo *in vitro* de explantes de *Hylocereus costaricensis*

El proceso para la obtención de los clones y la correspondiente biomasa necesaria para la evaluación morfológica y epigenética requirió de siete meses para el establecimiento, un mes para la inducción de la formación de brotes, 6 meses para la elongación de los brotes formados y su respectiva separación del explante de origen y, de 12 meses de crecimiento adicionales en medio sin reguladores de crecimiento. Cada variedad formó una cantidad distinta de clones, en donde el explante proveniente de la planta madre de la variedad San Ignacio produjo cuatro plantas, Orejona produjo ocho y Cebra produjo siete. En la Figura 6 se observa una muestra de cuatro de los clones regenerados, y su planta madre *in vitro* respectiva.

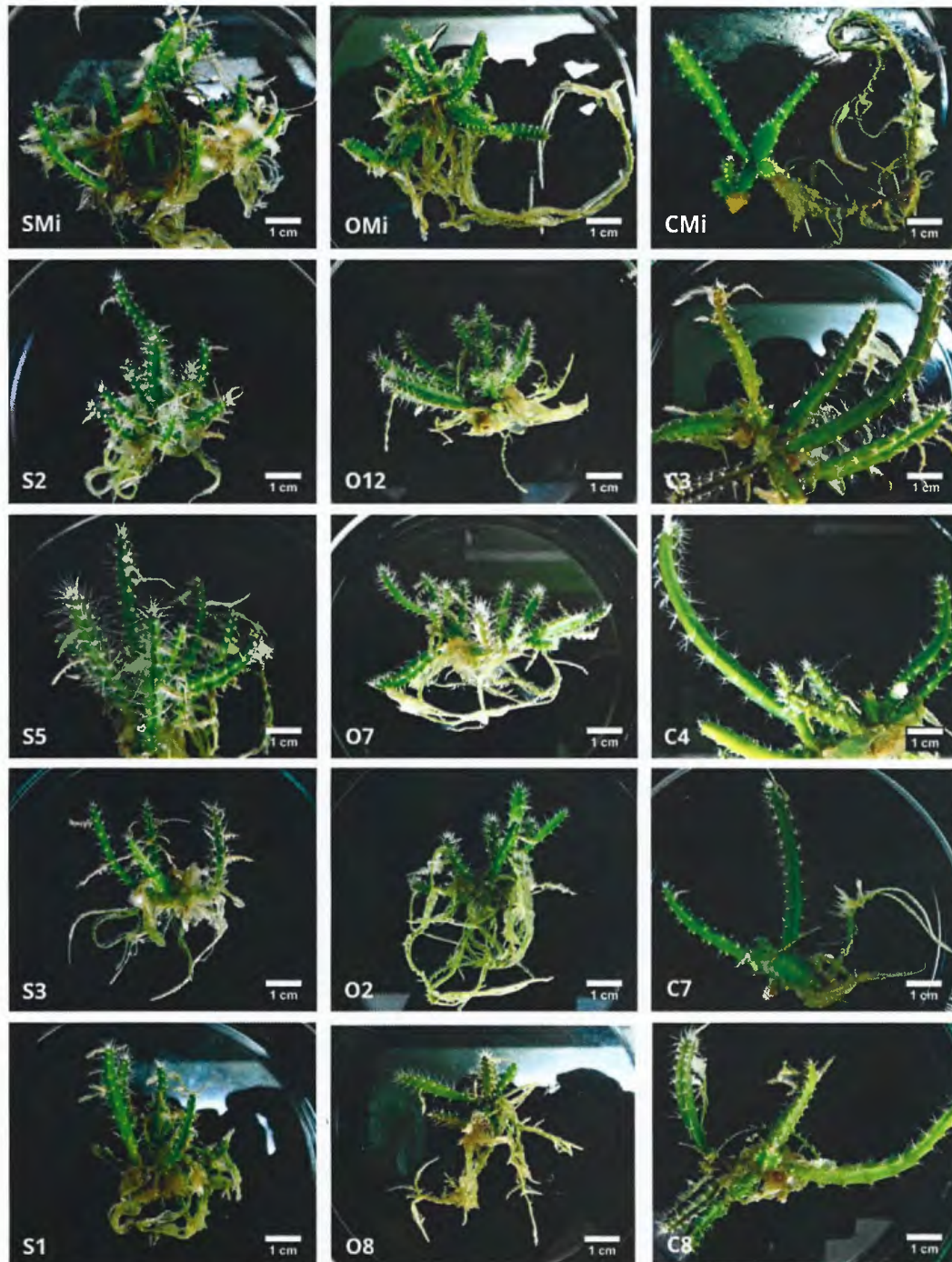


Figura 6. Plantas de *Hylocereus costaricensis* de las variedades San Ignacio (S), Orejona (O) y Cebra (C) establecidas *in vitro* sin reguladores de crecimiento, de los cuales se tomaron tejidos para generar la población clonal (SMi, OMi, CMi – Mi = "madre *in vitro*"), y una muestra aleatoria de plantas regeneradas de forma directa por medio de la inducción de brotación por un mes en un medio MS con 5 % p/v de sacarosa adicionado con 0.5 μ M tidiazurón y 0.5 μ M ácido naftaleneacético. Las fotografías fueron tomadas luego de un periodo de 12-14 meses de cultivo en medio sin reguladores de crecimiento. Barra de escala = 1 cm. Se ajustó el brillo y el contraste por medio de ImageJ.

Análisis de la variación somaclonal

Análisis morfológico

El modelo experimental del presente estudio contempló realizar tres tipos de comparaciones (Figura 5). El objetivo de realizar dichas comparaciones fue analizar el efecto del tipo de ambiente, del que provienen y al que fueron sujetos los explantes, para lograr el establecimiento y la regeneración de plantas cultivadas *in vitro*, sin el proceso de multiplicación (i.e., sin reguladores de crecimiento en el medio) y, luego del proceso de inducción de formación de brotes (i.e., por medio de la adición de 0.1 mg L^{-1} TDZ y 0.1 mg L^{-1} de ANA al medio de cultivo), sobre las variables morfológicas evaluadas en el experimento.

Primera comparación (plantas madre en invernadero y plantas in vitro): análisis exploratorio

En el caso de la primera comparación, fue necesario hacer una selección entre las variables continuas determinadas que permitiera un análisis de cambios morfológicos, para descartar aquellas sobre las cuales el efecto ambiental pudo sesgar una comparación entre individuos. Para ello, se calculó el R^2 ajustado en un modelo lineal considerando a la variedad, el origen del explante y al individuo como factor de forma separada, con el fin de observar el aporte de cada uno de estos factores a la explicación de la varianza de cada característica morfológica (Cuadro 7). Aunado a lo anterior, al observar la distribución de los valores de las variables por medio de histogramas de densidad, de forma visual fue posible observar para algunas variables la formación de un grupo considerablemente separado de valores provenientes de las plantas madre en invernadero (Figura 7 y Anexo 2). Por lo tanto, ambos criterios (i.e., R^2 ajustado y distribución de los datos) fueron tomados en cuenta para la selección de las características a utilizar en los análisis subsiguientes.

Cuadro 7. Valores de R^2 ajustado de un modelo lineal generado para cada una de las variables morfológicas evaluadas para la evaluación de la variación somaclonal en plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*), tomando en cuenta el factor variedad (San Ignacio, Orejona y Cebra), origen del explante (planta madre en invernadero, planta madre establecida *in vitro* sin reguladores, y clones luego del proceso de multiplicación con 0.1 mg L^{-1} thidiazuron y 0.1 mg L^{-1} de ácido naftalenacético adicionado al medio de cultivo), e individuo (cada una de las plantas en todas las condiciones). El cálculo se realizó tomando en cuenta la totalidad de las plantas, las plantas cultivadas *in vitro* (antes y después del proceso de multiplicación), y solamente los clones. La nomenclatura de las variables se encuentra descrita en el Cuadro 2.

Factor	n	Variables morfométricas																
		AC	ALO	AA	ARO	ART	C	DC	DA	GC	LE	LC	NACI	NAC	NCC	NEA	NSC	VC
<i>R² ajustado plantas madre y plantas in vitro</i>																		
Variedad	S= 18 O=30 C=26	-0,02	0,01	0,56	0,02	-0,02	0,11	-0,02	0,02	-0,02	0,24	-0,01	0,05	0,01	0,12	0,13	0,01	-0,02
Origen del explante	M= 9 Mi= 9 RD= 56	0,89	0,79	0,04	0,65	0,89	0,19	0,89	0,86	0,96	0,05	0,77	0,40	0,56	0,34	0,05	0,12	0,72
Individuo	3	0,94	0,88	0,75	0,83	0,90	0,47	0,95	0,93	0,95	0,75	0,74	0,56	0,70	0,56	0,46	0,07	0,66
<i>R² ajustado plantas in vitro (antes y después del proceso de multiplicación)</i>																		
Variedad	S= 15 O=27 C=23	0,12	0,17	0,62	0,30	0,00	0,12	0,03	0,28	0,02	0,05	0,39	0,09	0,04	0,31	0,17	0,07	0,19
Origen del explante	Mi= 9 RD= 56	0,03	0,06	0,00	0,02	-0,02	0,17	0,01	0,05	0,01	0,03	0,02	-0,01	-0,01	0,06	0,04	0,00	0,01
Individuo	3	0,36	0,62	0,76	0,55	0,42	0,43	0,41	0,49	0,32	0,50	0,42	0,31	0,28	0,39	0,26	0,01	0,50
<i>R² ajustado plantas in vitro (después del proceso de multiplicación)</i>																		
Variedad	S= 12 O=24 C=20	0,13	0,21	0,59	0,31	-0,01	0,13	0,03	0,33	0,00	0,28	0,49	0,24	0,20	0,41	0,17	0,19	0,22
Individuo	3	0,35	0,63	0,71	0,55	0,45	0,36	0,42	0,56	0,37	0,48	0,45	0,25	0,18	0,38	0,39	-0,11	0,52

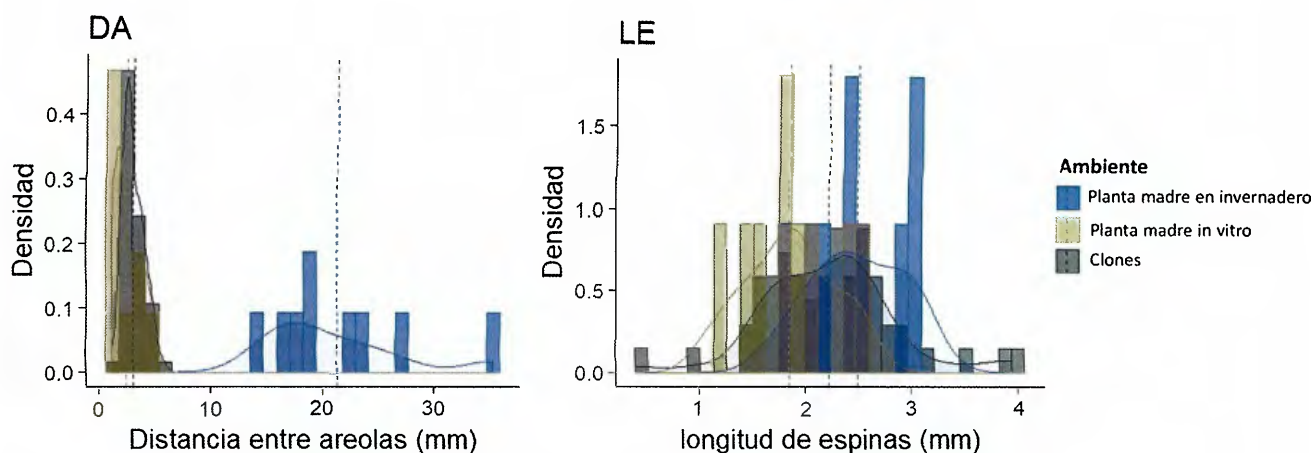


Figura 7. Histogramas de densidad realizados a partir de dos de las variables continuas, distancia entre areolas (DA) y longitud de espinas (LE), medidas en plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) en invernadero, plantas madre establecidas *in vitro* (sin reguladores de crecimiento, y clones generados de forma directa luego de la inducción con 0.1 mg L^{-1} thidiazuron y 0.1 mg L^{-1} de ácido naftalenacético adicionado al medio de cultivo). Los histogramas de las variables restantes se encuentran en el anexo 2.

Al observar los valores de R^2 ajustado calculados para la primera comparación (Cuadro 7), se observa que las variables altura de la costilla desde el vértice del ángulo de apertura de la ondulación, el área de la ondulación, el área transversal del cladodio, el diámetro del cladodio, distancia entre areolas, grosor del cladodio, longitud del cladodio y volumen del cladodio, mostraron un efecto considerablemente alto del factor origen del explante. Al revisar los histogramas de cada variable, es posible notar una separación alta de dos grupos, uno de los cuales pertenece al de las plantas madre en invernadero. Tal es el caso del histograma de densidad generado a partir de la variable distancia entre areolas (Figura 7). Es por ello que las variables mencionadas anteriormente fueron descartadas del análisis en la primera comparación, pues la magnitud de los valores generados por las plantas provenientes del invernadero sesgaría el análisis. Por otro lado, las variables de número de areolas por cladodio y número de areolas por costilla también fueron descartadas por presentar efectos similares del factor origen del explante e individuo.

Sin embargo, las variables ángulo de apertura de la ondulación, circularidad transversal, longitud de espinas, número de espinas por areola, número de costillas por cladodio y número de segmentos por cladodio, por el contrario, presentaron efectos del origen del explante considerablemente bajos con respecto al individuo como factor. Además, estas variables presentaron histogramas de densidad traslapados cuando se tomó en cuenta el factor origen del explante (ver ejemplo de la variable longitud de espinas en la Figura 7). Aunado a lo anterior, el criterio derivado de la inspección de los histogramas influyó en la selección de dichas variables

para las pruebas de hipótesis en la primera comparación. Cabe destacar que en estas variables, el valor de R^2 ajustado posee valores altos, lo que puede sugerir que estas características morfológicas pueden presentar variaciones importantes en las plantas de pitahaya, si se comparan las plantas cultivadas en los distintos ambientes. Por lo tanto, dichas variables fueron consideradas en los análisis posteriores para la primera comparación.

Primera comparación (plantas madre en invernadero y plantas in vitro): PCA

Al realizar el PCA con las variables seleccionadas para la primera comparación (Figura 8), se encontró que las primeras dos dimensiones (i.e., componentes principales) explican un 67 % de la varianza total de la base de datos (Anexo 3). En cuanto a las variables morfológicas, es posible observar que la calidad de la representación en la dimensión 1, está dada en mayor grado por las variables de número de espinas por areola y la longitud de la espina, ángulo de apertura de la ondulación y número de costillas por cladodio; por otro lado, en la dimensión 2, las variables número de segmentos por cladodio, número de costillas por cladodio y la circularidad transversal muestran una mayor representación en esta dimensión. Lo anterior, coincide con coeficientes de correlación significativos de cada variable con las respectivas dimensiones con las que representan mayor relación. La variable de circularidad transversal también parece verse afectada por el proceso de cultivo *in vitro*, pues se encuentra en lados opuestos en la dimensión 2 con respecto a las plantas madre en invernadero. Por otro lado, fue posible observar que las variables de longitud de espinas y número de espinas por areola se encuentran cercanas unas de otras y con una calidad de representación relativamente alta en la dimensión 1, por lo que probablemente existe una correlación significativa entre ambas características.

En cuanto a la distribución de los individuos en las dimensiones 1 y 2 del PCA generado en la primera comparación (Figura 8a), es posible encontrar agrupaciones que dan idea de su similitud. Por ejemplo, las plantas madre en invernadero de las tres variedades se agrupan en el lado positivo del segundo componente, lo cual coincide con la ubicación en el mismo plano de la variable de número de segmentos por cladodio. Por otro lado, las plantas cultivadas *in vitro* de la variedad San Ignacio (con y sin reguladores de crecimiento), se agrupan alrededor de la variable de número de costillas por cladodio en la segunda dimensión, excepto el clon S5, el cual se distancia considerablemente hacia la primera dimensión. Además, si se comparan los elipses de confianza (95 %) que se forman alrededor de los individuos pertenecientes a las variedades Orejona y Cebra,

el elipse formado por los individuos pertenecientes a las variedades San Ignacio presentan un diámetro considerablemente mayor (Figura 8b). Por último, la variabilidad del individuo S5 parece ser explicada por las variables de longitud de espinas y número de espinas por areola. Por lo tanto, es probable que la variable de número de costillas por cladodio posea una mayor variabilidad en las plantas de la variedad San Ignacio, cuando dichas plantas pasan por el proceso de establecimiento y multiplicación *in vitro*, que en aquellas de las demás variedades pues la respectiva planta madre en invernadero se encuentra en lados opuestos de la dimensión 2. Por último, es probable que la variable de número de espinas por areola y la longitud de las espinas, explique la variabilidad de dicho individuo con respecto a sus demás clones y su respectiva planta madre *in vitro*.

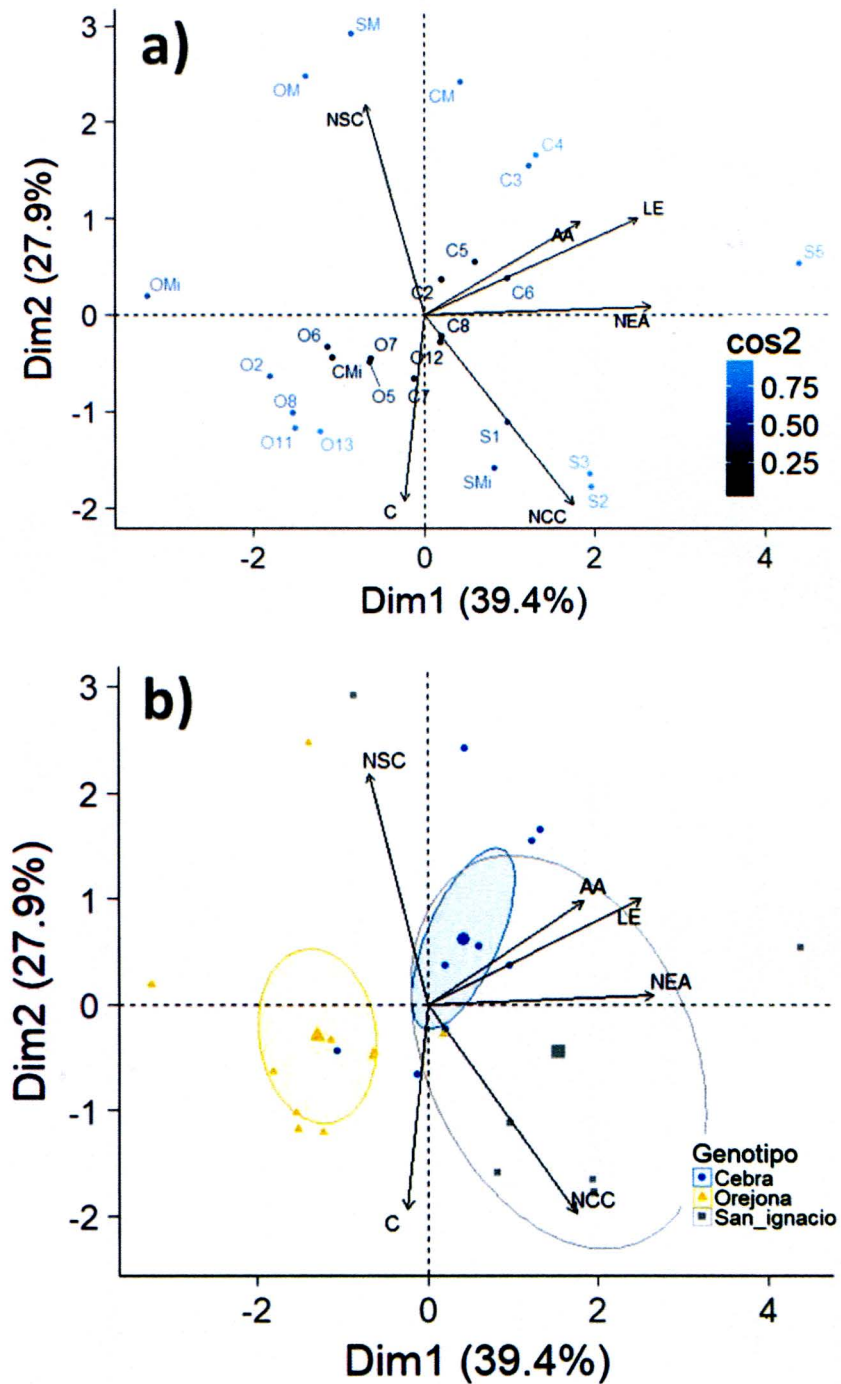


Figura 8. Análisis de componentes principales (PCA) de variables morfológicas de plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) para comparación entre plantas madre en invernadero, plantas madre *in vitro*, y los clones (primera comparación). a) Gráfico de las dimensiones 1 y 2, mostrando el nombre de cada individuo y las variables morfológicas; la calidad de la representación de los individuos en las dimensiones se encuentra representada por el valor de \cos^2 , la cual se calcula a partir del cuadrado de su coordenada. b) Gráfico de las dimensiones 1 y 2 haciendo distinción de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra, y mostrando elipses de confianza (95 %) con respecto a dichas variedades. La nomenclatura de las variables se encuentra descrita en el cuadro 2.

Para probar las distintas hipótesis, se tomará en cuenta las variables con base en su calidad de representación (Figura 9) y por su correlación significativa con las dimensiones 1 y 2 (Cuadro 8). En este caso, todas las variables presentaron una calidad de representación alta y una correlación significativa con los eigenvalores de las dos dimensiones.

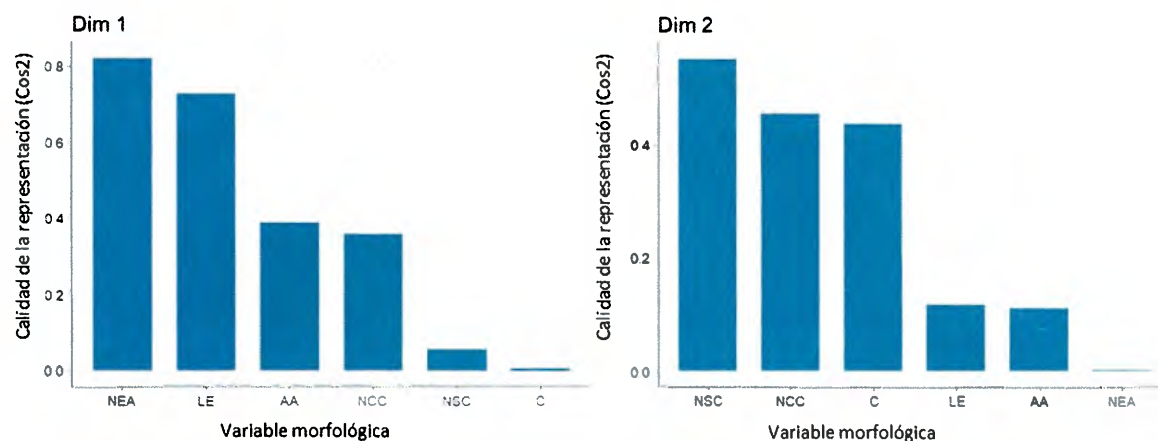


Figura 9. Calidad de la representación de las variables morfológicas determinadas en plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra en las dimensiones 1 (Dim 1) y 2 (Dim 2), consideradas para la comparación entre plantas madre en invernadero, plantas madre *in vitro*, y las plantas regeneradas de forma directa por medio del uso de reguladores de crecimiento (primera comparación), luego de realizar un análisis de componentes principales. El \cos^2 se calcula a partir del cuadrado de la coordenada de cada variable. La nomenclatura de las variables se encuentra descrita en el cuadro 2.

Cuadro 8. Correlaciones significativas ($p < 0.05$) entre variables morfológicas determinadas en plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra en las dimensiones 1 (Dim 1) y 2 (Dim 2), consideradas para la comparación entre plantas madre en invernadero, plantas madre *in vitro*, y las plantas regeneradas de forma directa por medio del uso de reguladores de crecimiento (primera comparación), luego de realizar un análisis de componentes principales. Las variables se encuentran ordenadas de manera descendente según la magnitud del coeficiente de correlación. La nomenclatura de las variables se encuentra descrita en el cuadro 2.

Clasificación	Dimensión 1		Dimensión 2	
	Variable	Correlación	Variable	Correlación
1	Número de espinas por areola	0.91	Número de segmentos por cladodio	0,74
2	Longitud de espinas	0.85	Circularidad	-0.66
3	Ángulo de apertura	0.62	Número de costillas por cladodio	-0.67
4	Número de costillas por cladodio	0.60		

Primera comparación: pruebas de hipótesis

Para someter a prueba la probabilidad de una correlación entre las variables de longitud de espinas y número de espinas por areola (Figura 8), se calculó el coeficiente de correlación (Pearson, $p < 0.05$) entre estas dos variables considerando a la variedad y al origen del cladodio en el que fueron evaluadas. En el primer caso, no se encontró una correlación significativa. Sin embargo, al considerar el origen del explante, se encontró una correlación positiva significativa en el caso de los cladodios provenientes de las plantas madre *in vitro* y, por el contrario, una correlación negativa no significativa en los cladodios de las plantas madre en invernadero (Figura 10).

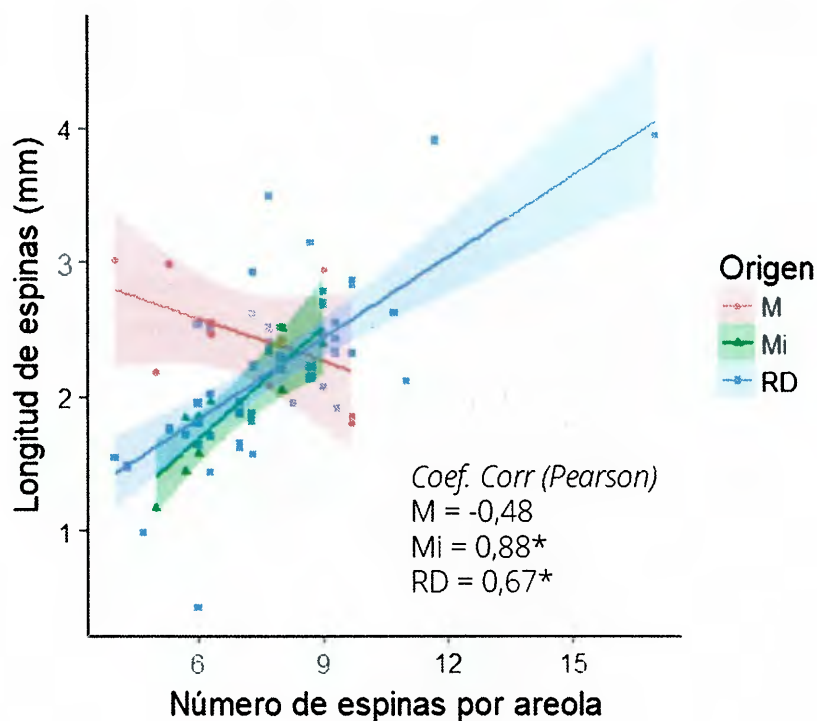


Figura 10. Correlaciones entre la longitud de espinas y el número de espinas por areola determinadas en plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*), en las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra, tomando en cuenta el origen del explante evaluado (M = planta madre en invernadero, Mi = planta madre *in vitro*, RD = plantas regeneradas de forma directa). Para cada factor se muestra la línea de tendencia y un intervalo de confianza del 95 %. Por último, se presenta el coeficiente de correlación de Pearson para cada factor, cuyo asterisco indica la presencia de una correlación significativa con $p < 0.05$.

La variable de circularidad transversal del cladodio presentó diferencias en cuanto a su media y a su variabilidad dependiendo del origen del cladodio evaluado y de la variedad, respectivamente. En el primer caso, los cladodios que provenían de las plantas madre *in vitro*

presentaron cladodios transversalmente más circulares (ANOVA, $p < 0.05$) que los que provenían de las plantas madre en invernadero, y que las plantas que pasaron por el proceso de regeneración directa (Figura 11b). Entre variedades no se encontraron diferencias significativas para la variable de circularidad; sin embargo, al comparar las varianzas se encontró que existió evidencia de varianzas heterogéneas (Levene, $p < 0.05$), en donde los extremos más notables fueron encontrados en los cladodios de la variedad Cebra.

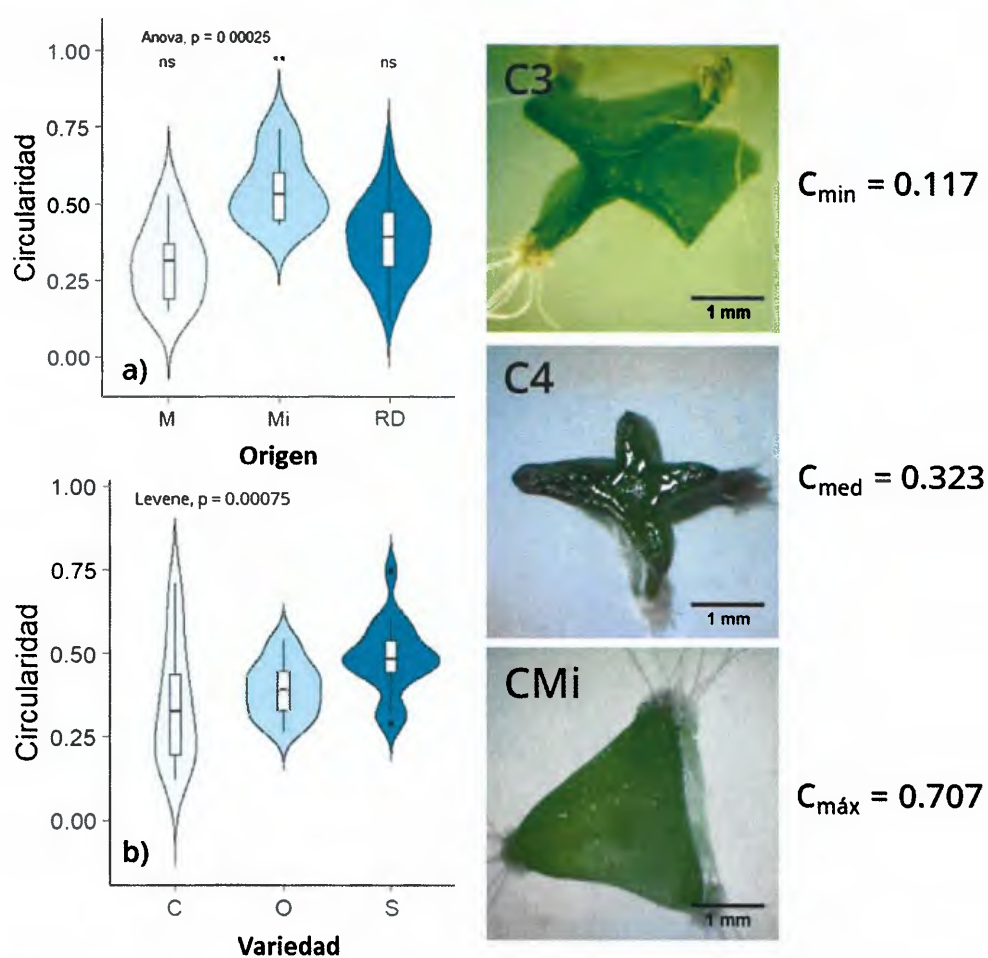


Figura 11. Diagramas de “violines” y de cajas de la circularidad transversal del cladodio determinadas en plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*). a) Diagrama realizado considerando el origen del explante (M = planta madre en invernadero, Mi = planta madre *in vitro*, RD = plantas regeneradas de forma directa), en donde dos asteriscos significa que se encontraron diferencias significativas (con $p < 0.01$) con respecto a la media general, luego de realizar un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba T. b) Diagrama en donde se considera la variedad como factor (C= Cebra, S= San Ignacio y O=Orejona), y se muestra el valor p luego de un test de Levene para determinar la homogeneidad de las varianzas. La forma del “violín” corresponde a la densidad de los datos, mostrando su distribución. Se exponen, además, cortes transversales de cladodios de la variedad Cebra en donde C3 = regenerante no. 3, C4 = regenerante no.4 y, CMi = planta madre *in vitro*, los cuales obtuvieron el valor de circularidad transversal mínima, la mediana y la máxima.

En cuanto a la variable de número de costillas por cladodio (Figura 12), se encontraron diferencias significativas al considerar el origen del explante evaluado (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$), en donde se encontró una tendencia a formar mayor número de costillas por cladodio en explantes cultivados *in vitro*, antes y después del proceso de regeneración, en comparación a sus respectivas plantas madre en invernadero. No se encontraron diferencias en las medias al comparar entre variedades, ni varianzas distintas en esta característica.

Por otro lado, en cuanto a las variables de número de segmentos por cladodio, y ángulo de apertura de la ondulación, no se encontraron diferencias significativas al comparar medias ni varianzas al tomar en cuenta los factores de origen del explante evaluado ni la variedad (Anexo 4).

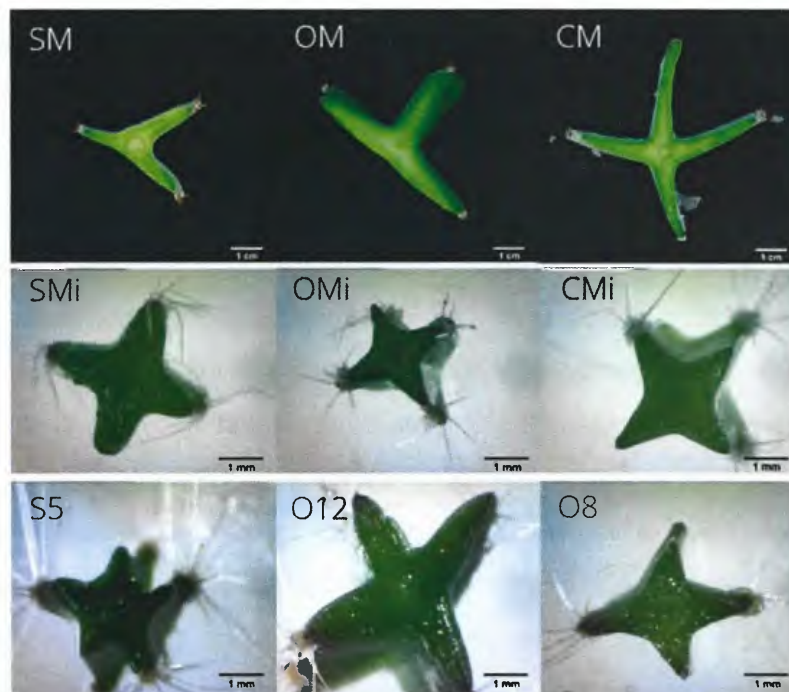
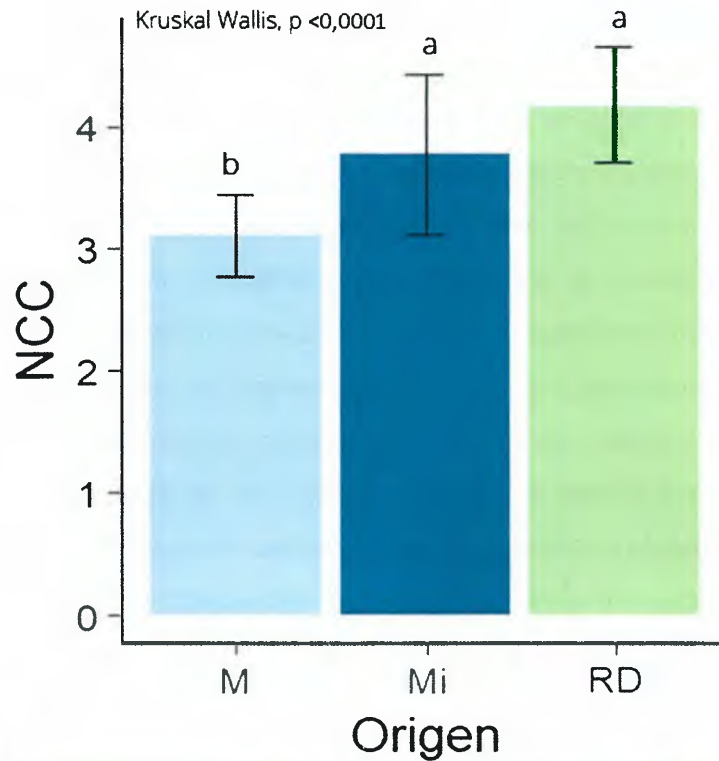


Figura 12. Número de costillas por cladodio (NCC) determinado en plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*), de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra, considerando el origen del explante (M = planta madre en invernadero, Mi = planta madre *in vitro*, RD = plantas regeneradas de forma directa). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas luego de un análisis de Kruskal Wallis con $p < 0.01$. Se exponen, además, cortes transversales de cladodios de las tres variedades, elegidos de forma aleatoria, para ilustrar el comportamiento de la variable. Las imágenes entre plantas madre se encuentran a escala (barra = 1 cm). Las imágenes entre plantas cultivadas *in vitro* se encuentran a escala (barra = 1 mm).

Segunda y tercera comparación: PCA

En los casos de la segunda comparación y la tercera, se utilizó la totalidad de las variables mostradas en el Cuadro 2, pues los valores de R^2 ajustado del modelo lineal tomando en cuenta el factor de origen del explante, no mostró valores altos, como sí ocurrió con las variables filtradas para la primera comparación. Al realizar el PCA (Figura 13), se encontró que las primeras dos dimensiones explican un 60 % de la varianza total de la base de datos (Anexo 5). En cuanto a las variables morfológicas, es posible observar que la calidad de la representación en la dimensión 1 está dada en mayor grado por las variables de volumen del cladodio, área de la ondulación, distancia entre areolas, longitud del cladodio, número de areolas por cladodio, altura de la ondulación, diámetro transversal del cladodio, altura de la costilla al vértice del ángulo de apertura de la ondulación, y el área transversal. Por otro lado, en la dimensión 2, las variables de circularidad y grosor del cladodio muestran una mayor representación en esta dimensión (Figura 14). Lo anterior, coincide con coeficientes de correlación significativas de cada variable con las respectivas dimensiones con las que representan mayor relación.

Al analizar el comportamiento de los individuos en el PCA hecho para la segunda comparación (Figura 13), es posible observar que aquellos provenientes de la variedad Orejona forman un grupo al lado izquierdo cercano a la dimensión 1. Los individuos de la variedad San Ignacio forman un grupo, probablemente, menos homogéneo, en donde se destaca el clon S5, quien se proyecta al extremo derecho de la primera dimensión. De hecho, a excepción del individuo mencionado anteriormente, los demás individuos de la variedad San Ignacio no se proyectan de forma considerable hacia ninguna de las dimensiones, lo que se confirma por medio de valores bajos de la calidad de la representación (\cos^2). Probablemente, la variabilidad en esta variedad es menor y, el individuo S5 presenta características que la distinguen de los demás individuos de San Ignacio. La variedad Cebra, en este caso, es la que presenta una mayor dispersión de sus individuos en ambas dimensiones del gráfico del PCA, lo cual probablemente haya producido una elipse de confianza (95 %) de mayor tamaño con respecto a los demás variedades. Destaca en la variedad Cebra el individuo C7, quien se proyecta hacia la primera y segunda dimensión con una calidad de representación considerablemente alta. Por lo tanto, probablemente C7 presente características extremas que permitan distinguir a dicho individuo del resto dentro de la misma variedad, al igual como ocurre con el individuo S5. Por último, cabe destacar que a diferencia de los demás variedades, en el caso de Cebra, la planta madre *in vitro* se

separa de sus respectivos clones de forma considerable, por lo que probablemente en esta variedad el proceso de regeneración posea un efecto mayor sobre su variabilidad con respecto a algunas características.

En este estudio, las pruebas de hipótesis se realizaron con las primeras diez variables que mostraron una correlación significativa con la dimensión 1, y con las primeras dos de la dimensión 2 (Cuadro 9). Dichas variables corresponden al volumen del cladodio, área de la ondulación del cladodio, distancia entre areolas, longitud del cladodio, número de areolas por cladodio, altura de la ondulación, diámetro del cladodio, altura de la costilla al vértice del ángulo de apertura de la ondulación, área transversal, número de espinas por areolas, circularidad transversal y grosor del cladodio.

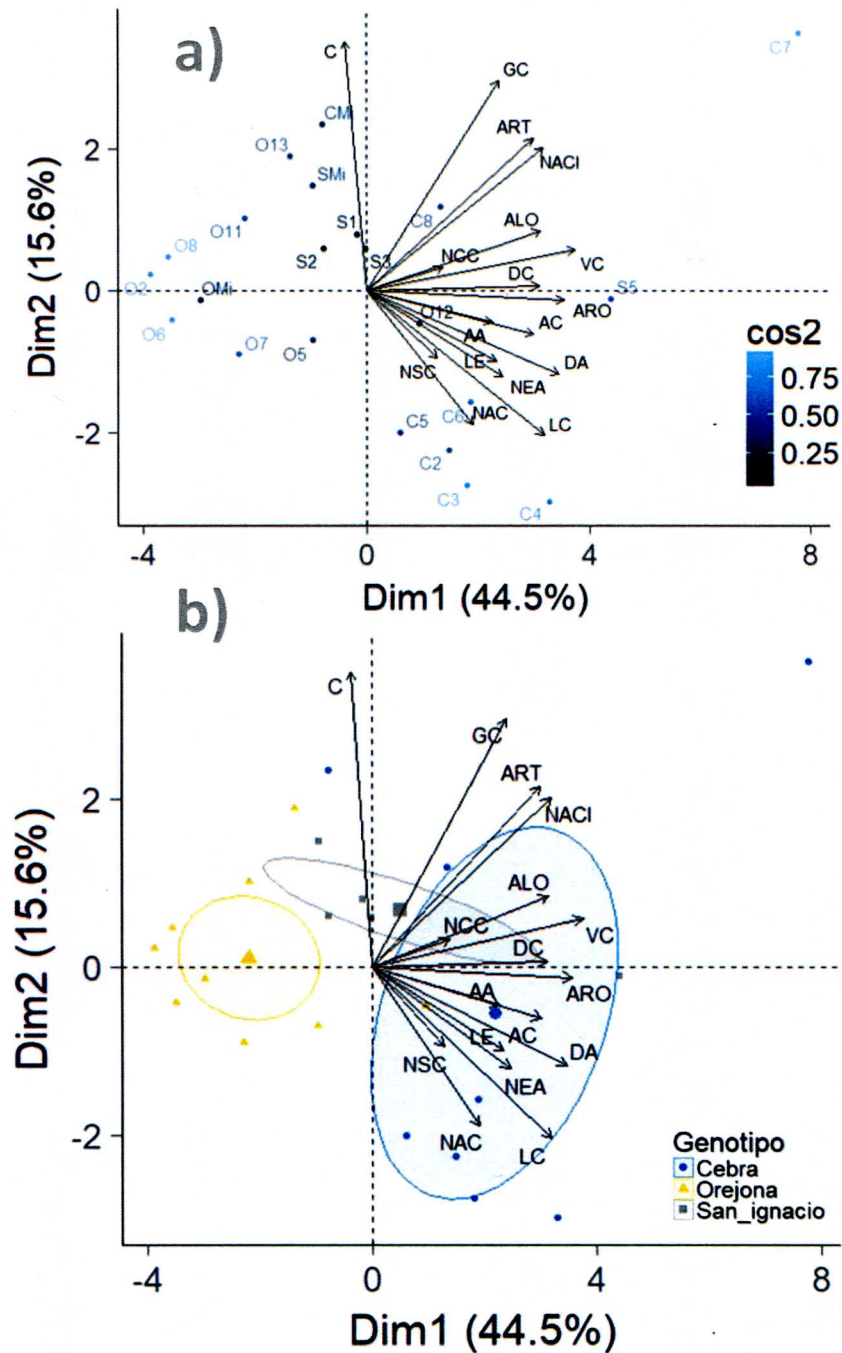


Figura 13. Análisis de componentes principales (PCA) de variables morfológicas de plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) para la comparación entre plantas madre *in vitro* (Mi), y los clones (designados con un número). a) Gráfico de las dimensiones 1 y 2 mostrando el nombre de cada individuo y las variables morfológicas; la calidad de la representación de los individuos en las dimensiones se encuentra representada por el valor de \cos^2 , la cual se calcula a partir del cuadrado de su coordenada. b) Gráfico de las dimensiones 1 y 2, haciendo distinción de las variedades San Ignacio (S), Orejona (O) y Cebra (C), y mostrando elipses de confianza (95 %) con respecto a cada variedad. La nomenclatura de las variables se encuentra descrita en el cuadro 2.

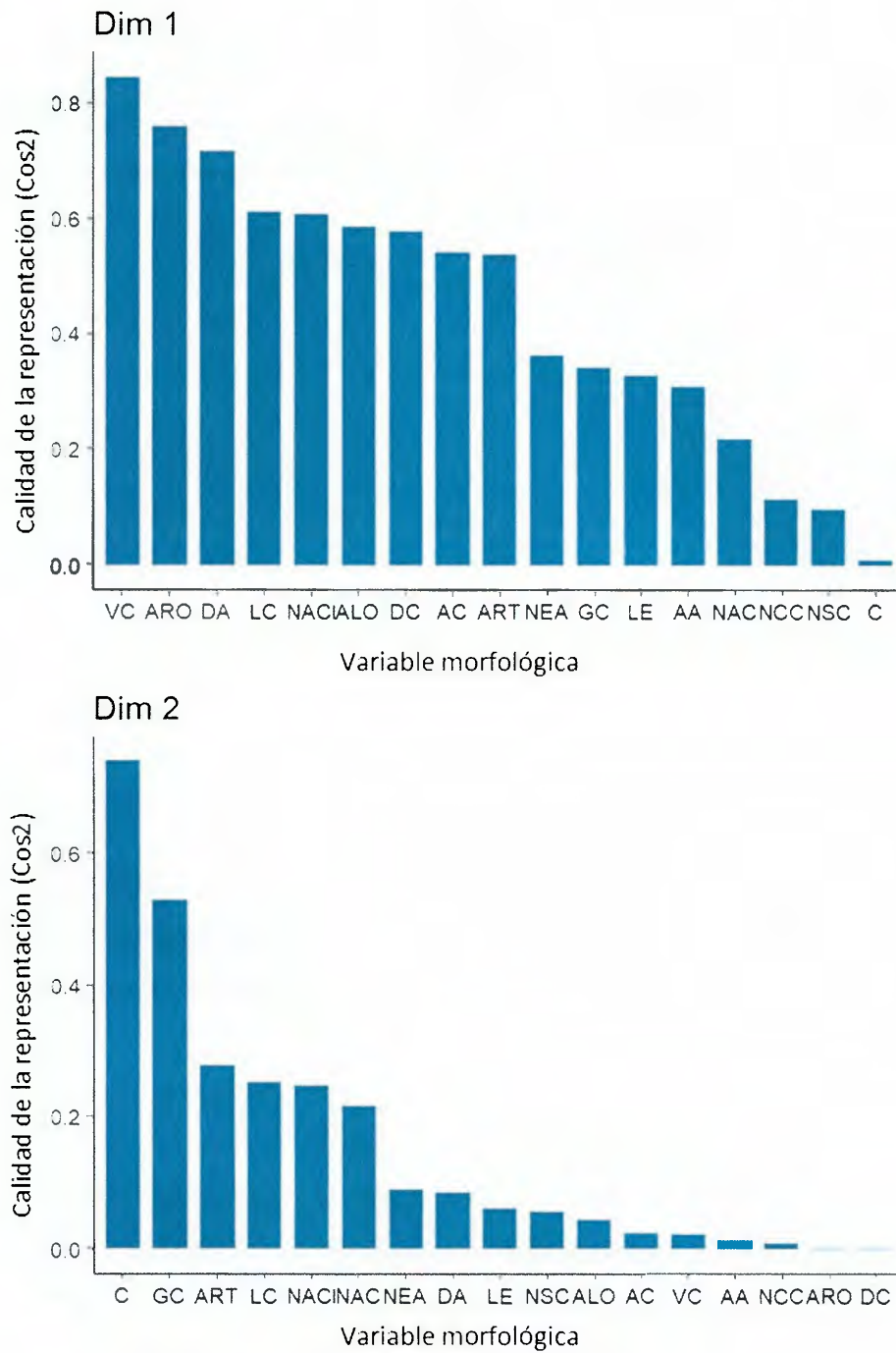


Figura 14. Calidad de la representación de las variables morfológicas determinadas en plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra en las dimensiones 1 (Dim 1) y 2 (Dim 2), consideradas para la comparación entre plantas madre *in vitro*, y los clones (segunda comparación), luego de realizar un análisis de componentes principales. El \cos^2 se calcula a partir del cuadrado de la coordenada de cada variable. La nomenclatura de las variables se encuentra descrita en el cuadro 2.

Cuadro 9. Correlaciones significativas ($p < 0.05$) entre variables morfológicas determinadas en plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra en las dimensiones 1 (Dim 1) y 2 (Dim 2), consideradas para la comparación entre plantas madre *in vitro* y los clones (segunda comparación), luego de realizar un análisis de componentes principales. Las variables se encuentran ordenadas de manera descendente según la magnitud del coeficiente de correlación. La nomenclatura de las variables se encuentra descrita en el Cuadro 2.

Clasificación	Dimensión 1		Dimensión 2	
	Variable	Correlación	Variable	Correlación
1	VC	0.92	C	0.86
2	ARO	0.87	GC	0.73
3	DA	0.85	ART	0.52
4	LC	0.78	NACI	0.50
5	NACI	0.77	NAC	-0.46
6	ALO	0.76	LC	-0.50
7	DC	0.76		
8	AC	0.74		
9	ART	0.73		
10	NEA	0.60		
11	GC	0.58		
12	LE	0.57		
13	AA	0.55		
14	NAC	0.47		

Como se describirá a continuación, el comportamiento de las variables y los individuos en la tercera comparación no presentaron variaciones mayores con respecto a la segunda, por lo que las pruebas de hipótesis se analizarán en conjunto en una misma sección.

Tercera comparación (entre clones): PCA

En la tercera comparación, el PCA (Figura 15) mostró un resultado similar a la de la segunda, con la excepción de que se incluyó una variable adicional, la de número de cladodios por explante. Esta última variable resultó estar en el lado opuesto de las demás que se relacionan a la dimensión 1. Sin embargo, su calidad de representación fue baja y no mostró correlación significativa con su respectivo eigenvalor de dicha dimensión. Para reducir el número de variables, se realizó una selección igualmente basada en la calidad de representación y la correlación de cada variable con su eigenvalor en la dimensión 1 y 2 (Cuadro 10). En este caso, se seleccionaron las variables de volumen del cladodio, longitud del cladodio, distancia entre areolas, área de la ondulación del cladodio, número de areolas por costilla, número de areolas por cladodio, diámetro del cladodio, altura de la ondulación, altura de la costilla al vértice del ángulo de

apertura de la ondulación, número de segmentos por cladodio, grosor del cladodio y área transversal del cladodio fueron consideradas en los pasos subsiguientes.

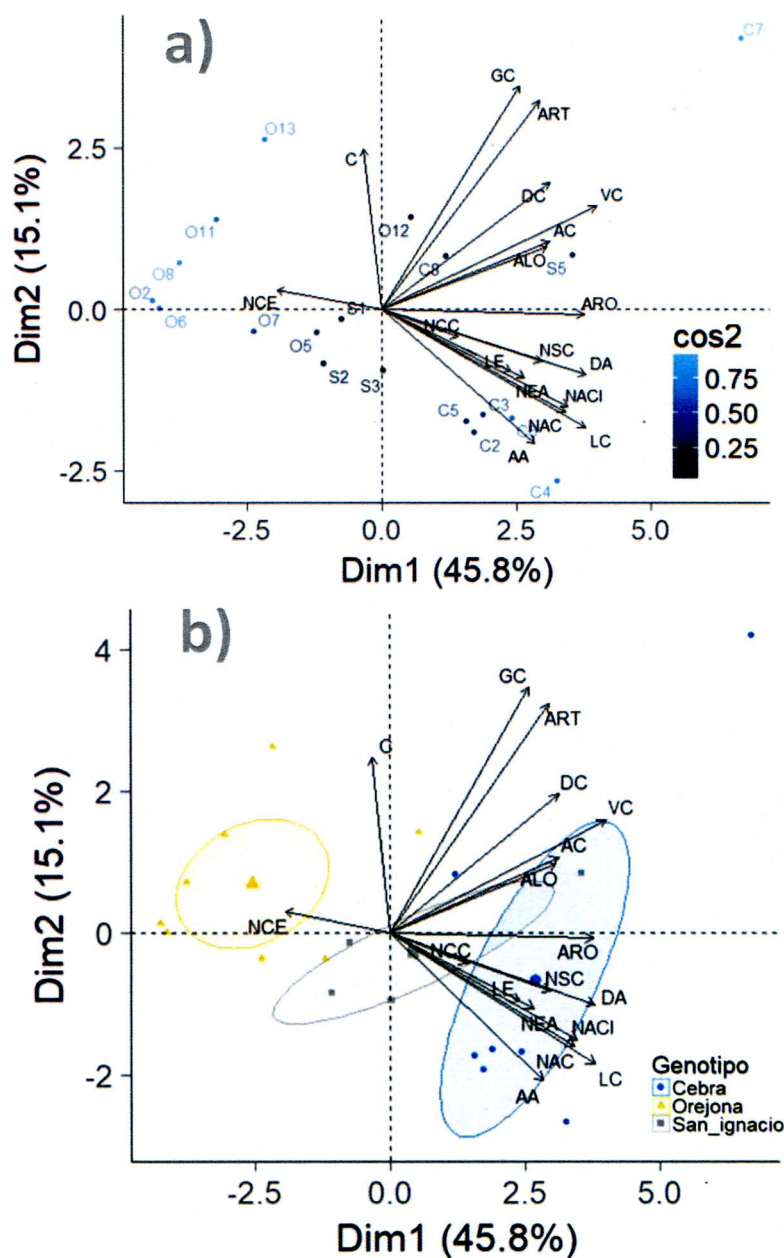


Figura 15. Análisis de componentes principales (PCA) de variables morfológicas de plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) para la comparación entre las plantas regeneradas de forma directa por medio del uso de reguladores de crecimiento. a) Gráfico de las dimensiones 1 y 2 mostrando el nombre de cada individuo y las variables morfológicas; la calidad de la representación de los individuos en las dimensiones se encuentra representada por el valor de \cos^2 , la cual se calcula a partir del cuadrado de su coordenada. b) Gráfico de las dimensiones 1 y 2, haciendo distinción de las variedades San Ignacio (S), Orejona (O) y Cebra (C), y mostrando elipses de confianza (95 %) con respecto dichos variedad. La nomenclatura de las variables se encuentra descrita en el Cuadro 2.

Cuadro 10. Correlaciones significativas ($p < 0.05$) entre variables morfológicas determinadas en plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra en las dimensiones 1 (Dim 1) y 2 (Dim 2), consideradas para la comparación entre las plantas regeneradas de forma directa por medio del uso de reguladores de crecimiento (tercera comparación), luego de realizar un análisis de componentes principales. Las variables se encuentran ordenadas de manera descendente según la magnitud del coeficiente de correlación. La nomenclatura de las variables se encuentra descrita en el Cuadro 2.

Clasificación	Dimensión 1		Dimensión 2	
	Variable	Correlación	Variable	Correlación
1	Volumen del cladodio	0,89	Grosor de cladodio	0.78
2	Longitud del cladodio	0,86	Área transversal	0.73
3	Distancia entre areolas	0,85	Circularidad	0.56
4	Área de la ondulación	0,84	Ángulo de apertura	-0.47
5	Número de areolas por costilla	0,79		
6	Número de areolas por cladodio	0,79		
7	Diámetro de costilla	0,71		
8	Área de la ondulación	0,69		
9	Altura de costilla	0,69		
10	Número de segmentos por cladodio	0,66		
11	Área transversal	0,64		
12	Ángulo de apertura	0,63		
13	Número espinas por areola	0,60		
14	Grosor del cladodio	0,56		
15	Longitud de espinas	0,54		

Segunda y tercera comparación: prueba de hipótesis

Con el fin de reducir el número de variables a analizar, se describieron las variables desde el punto de vista de su coeficiente de variación, utilizando aquellas seleccionadas luego del PCA para la segunda comparación y aquel realizado para la tercera. Lo anterior se realizó con el fin de analizar aquella que presenten niveles de variación mayores, para observar su comportamiento considerando al origen del explante evaluado (segunda comparación), a la variedad (segunda y tercera comparación) y al individuo. Como criterio, se tomaron en cuenta aquellas variables que presentaron un coeficiente de variación (CV) cercano al 50 % o mayor. En el caso de la descripción de las variables seleccionadas luego del PCA para la segunda comparación (Cuadro 11), las variables de volumen del cladodio, área de la ondulación, área transversal y longitud del cladodio presentaron los mayores niveles de variación. En el caso de la descripción realizada para las variables seleccionadas a partir del PCA de la tercera comparación (Cuadro 12), el

comportamiento fue similar, por lo que se eligieron estas cuatro variables para analizar ambas comparaciones.

Cuadro 11. Descripción de las variables morfológicas determinadas en plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra, seleccionadas luego de un análisis de componentes principales y, consideradas para la comparación entre plantas madre *in vitro* y las plantas regeneradas de forma directa por medio del uso de reguladores de crecimiento (segunda comparación). Las variables se encuentran ordenadas de manera descendente según el coeficiente de variación (CV). La nomenclatura de las variables se encuentra descrita en el Cuadro 2.

Clasificación (según CV)	Variable	n	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	DE	CV
1	VC	60	103,01	78,35	21,2	416,77	75,89	73,67
2	ARO	65	0,31	0,24	0,09	0,98	0,2	65,02
3	ART	63	3,85	3,39	0,37	15,44	2,23	57,86
4	LC	61	2,63	2,4	0,6	6,6	1,27	48,26
5	ALO	65	0,28	0,27	0,14	0,62	0,1	34,98
6	DA	65	2,94	2,7	1,1	5,58	0,99	33,74
7	C	63	0,41	0,42	0,12	0,74	0,14	32,78
8	GC	65	1,03	0,97	0,44	2,79	0,33	32,36
9	NACI	65	41,18	40	15	76	12,59	30,57
10	AC	65	1,29	1,28	0,65	2,26	0,38	29,34
11	LE	65	2,18	2,19	0,43	3,94	0,61	27,93
12	NAC	65	9,92	10	5	19	2,74	27,62
13	NEA	65	7,72	7,7	4	17	2,02	26,14
14	DC	64	3,58	3,43	2,3	6,94	0,93	26,02
15	AA	65	133,42	139,5	85,8	164,2	21,28	15,95

Al analizar la variable de volumen del cladodio, no se detectaron diferencias entre las varianzas (Levene, $p > 0.05$) ni las medias (ANOVA, post-hoc DHS Tukey, $p > 0.05$) al considerar el origen del explante evaluado. Por lo tanto, el análisis continuó con las variables considerando la tercera comparación.

Cuadro 12. Descripción de las variables morfológicas determinadas en plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra, seleccionadas luego de un análisis de componentes principales y, consideradas para la comparación entre plantas madre *in vitro* y los clones (segunda comparación). Las variables se encuentran ordenadas de manera descendente según el coeficiente de variación (CV). La nomenclatura de las variables se encuentra descrita en el Cuadro 2.

Clasificación (según CV)	Variable	n	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	DE	CV
1	Volumen del cladodio	51	107,75	80,48	21,2	416,77	80,37	74,59
2	Área de la ondulación	56	0,32	0,25	0,09	0,98	0,2	63,11
3	Área transversal	54	3,85	3,34	0,37	15,44	2,36	61,12
4	Longitud del cladodio	52	2,73	2,5	0,9	6,6	1,32	48,34
5	Área de la ondulación	56	0,3	0,27	0,16	0,62	0,1	33,76
6	Grosor del cladodio	56	1	0,95	0,44	2,79	0,33	33,37
7	Circularidad	54	0,39	0,39	0,12	0,69	0,12	32,09
8	Distancia entre areolas	56	3,03	2,71	1,43	5,58	0,93	30,8
9	Número de areol. cladodio	56	41,54	40	20	76	12,43	29,92
10	Altura de costilla	56	1,32	1,29	0,73	2,26	0,39	29,53
11	NSC	56	1,11	1	1	2	0,31	28,19
12	LE	56	2,23	2,26	0,43	3,94	0,62	27,83
13	NAC	56	9,88	10	5	19	2,66	26,9
14	DC	55	3,64	3,49	2,3	6,94	0,98	26,84
15	NEA	56	7,89	7,7	4	17	2,06	26,11
16	AA	56	133,73	139,4	92,8	162,5	19,71	14,74

Al considerar los individuos regenerados de forma directa por medio del uso de reguladores de crecimiento (tercera comparación), la variable de volumen de cladodio mostró diferencias significativas al comparar las medias (ANOVA, post-hoc DHS Tukey, $p < 0.05$) considerando como factores a la variedad y al individuo en las variedades San Ignacio y Orejona (Figura 16). La variedad Cebra mostró una tendencia a formar cladodios más voluminosos con respecto a los de Orejona; los cladodios de los clones de San Ignacio no mostraron diferencias significativas con ninguna de las plantas de los restantes dos variedades. Cuando se compararon las medias de los individuos de San Ignacio, el individuo S5 mostró cladodios con mayor volumen que los individuos S1 y S2, pero no se diferenciaron del individuo S3. En la variedad Orejona, el individuo O12 presentó cladodios con mayor volumen que los individuos O2, O6, O8 y O11, y no mostró diferencias con los individuos O13 ni O5.

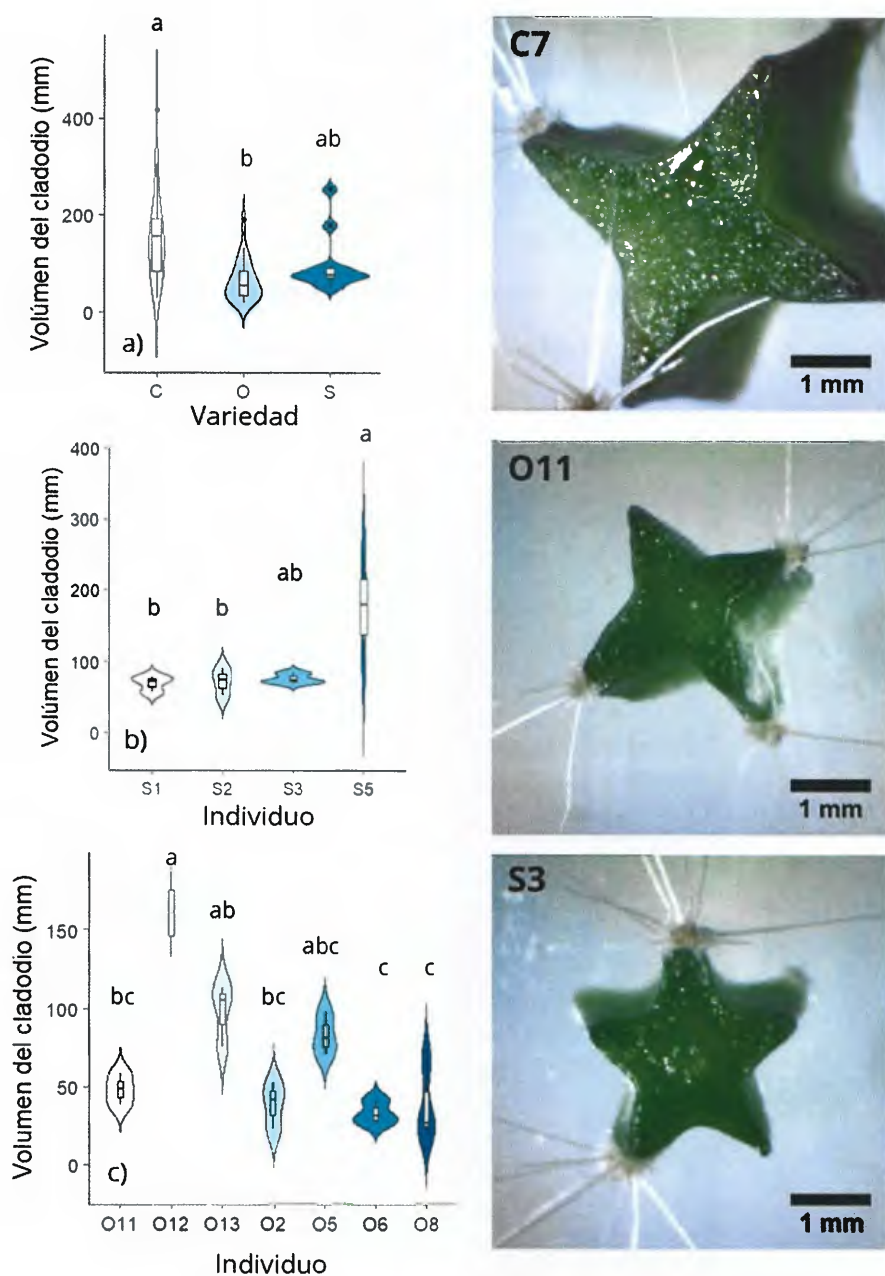


Figura 16. Diagramas de “violines” y de cajas de la variable de volumen del cladodio determinado en plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) regeneradas *in vitro* de forma directa por medio del uso de reguladores de crecimiento. La forma del “violín” corresponde a la densidad de los datos, mostrando su distribución. El volumen del cladodio fue determinado a partir de las variables de área transversal y longitud del cladodio. a) comparación de medias (DHS de Tukey, $p < 0.05$) luego de un análisis de varianza (ANOVA, $p < 0.05$) considerando a la variedad (C= Cebra, O= Orejona, S= San Ignacio) como factor. b) comparación de medias (DHS de Tukey, $p < 0.05$) luego de un análisis de varianza (ANOVA, $p < 0.05$) considerando a los individuos dentro de la variedad San Ignacio como factor. c) comparación de medias (DHS de Tukey, $p < 0.05$) luego de un análisis de varianza (ANOVA, $p < 0.05$) considerando a los individuos dentro del variedad Orejona como factor. Letras distintas indican la presencia de diferencias significativas. Se muestran además las fotografías de cortes transversales de cladodios de la variedad Cebra (individuo C7), Orejona (individuo O11) y San Ignacio (individuo S3). La variable tuvo que ser transformada por medio del logaritmo natural para cumplir con el supuesto de normalidad del ANOVA. Las fotografías se encuentran a escala.

Al analizar la variables de área de la ondulación, la variedad Cebra presentó una tendencia a formar ondulaciones más grande con respecto a la variedad Orejona, pero sin diferencias con la variedad San Ignacio. Dentro de la variedad Cebra, se encontró que el individuo C4 y C7 presentó mayor área de ondulaciones solamente con respecto al individuo C5.

No se encontraron varianzas distintas en ninguna de las variables (Levene, $p > 0.05$), por lo que las variables analizadas probablemente presentan un comportamiento homocedástico, y solamente se encontraron las variaciones con respecto a las medias descritas anteriormente.

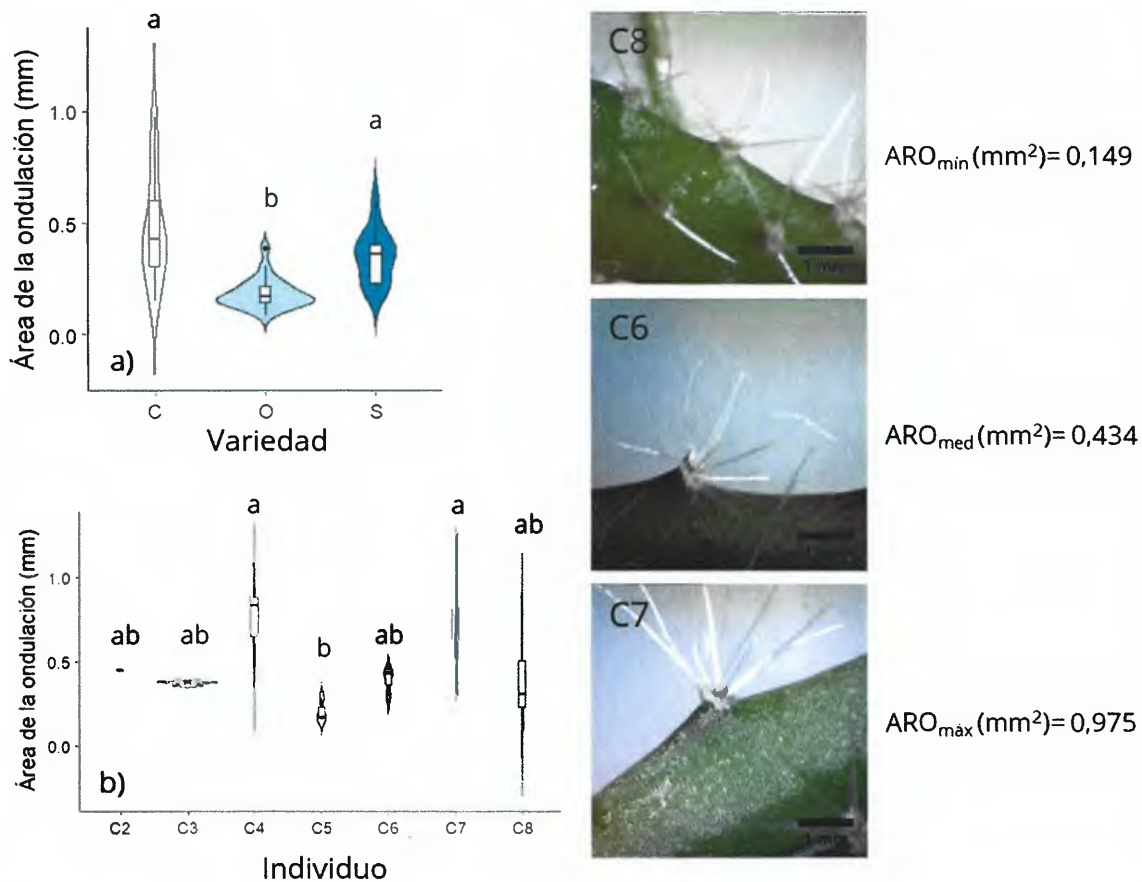


Figura 17. Diagramas de “violines” y de cajas de área de la ondulación del cladodio (ARO) en plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) regeneradas *in vitro* de forma directa por medio del uso de reguladores de crecimiento. La forma del “violín” corresponde a la densidad de los datos, mostrando su distribución. a) comparación de medias (DHS de Tukey, $p < 0.05$) luego de un análisis de varianza (ANOVA, $p < 0.05$) considerando al variedad como factor. b) comparación de medias (DHS de Tukey, $p < 0.05$) luego de un análisis de varianza (ANOVA, $p < 0.05$) considerando a los individuos dentro de la variedad Cebrá como factor. Letras distintas indican la presencia de diferencias significativas. Se muestran además las fotografías de las ondulaciones que presentaron al valor mínimo, la mediana y el valor máximo. La variable tuvo que ser transformada por medio del logaritmo para cumplir con el supuesto de normalidad del ANOVA. Las fotografías se encuentran a escala.

Multiplicación por medio de organogénesis indirecta

Luego de tres meses de proceso de inducción de callo a partir de segmentos de cladodio provenientes de las plantas madre *in vitro* de las variedades San Ignacio y Orejona, cultivando dichos segmentos en un medio MS con 0.11 mg L^{-1} 2,4-D y 1 mg L^{-1} BAP, en general, se observó que al momento de las evaluaciones los callos de San Ignacio (Figura 18) mostraron un grado de desdiferenciación menor que los callos de Orejona (Figura 19). Al observar el callo en detalle, se puede observar la formación de estructuras radicales que incluyen ápices y pelos, alrededor de los cuales se forman masas de células disgregadas (Figura 18a y b). Al realizar cortes para el análisis histológico de los callos, fue posible observar estructuras que poseen una epidermis configurada en forma de semicírculo, una zona de células nucleadas con crecimiento activo, una zona de elongación, y la formación de tejido vascular (Figura 18c). Al hacer un aumento de 400X, se puede observar que en efecto existen células con paredes celulares prolongadas en forma de cono, similares a pelos radicales (Figura 18d). No se logró la regeneración de brotes a partir de estos callos.

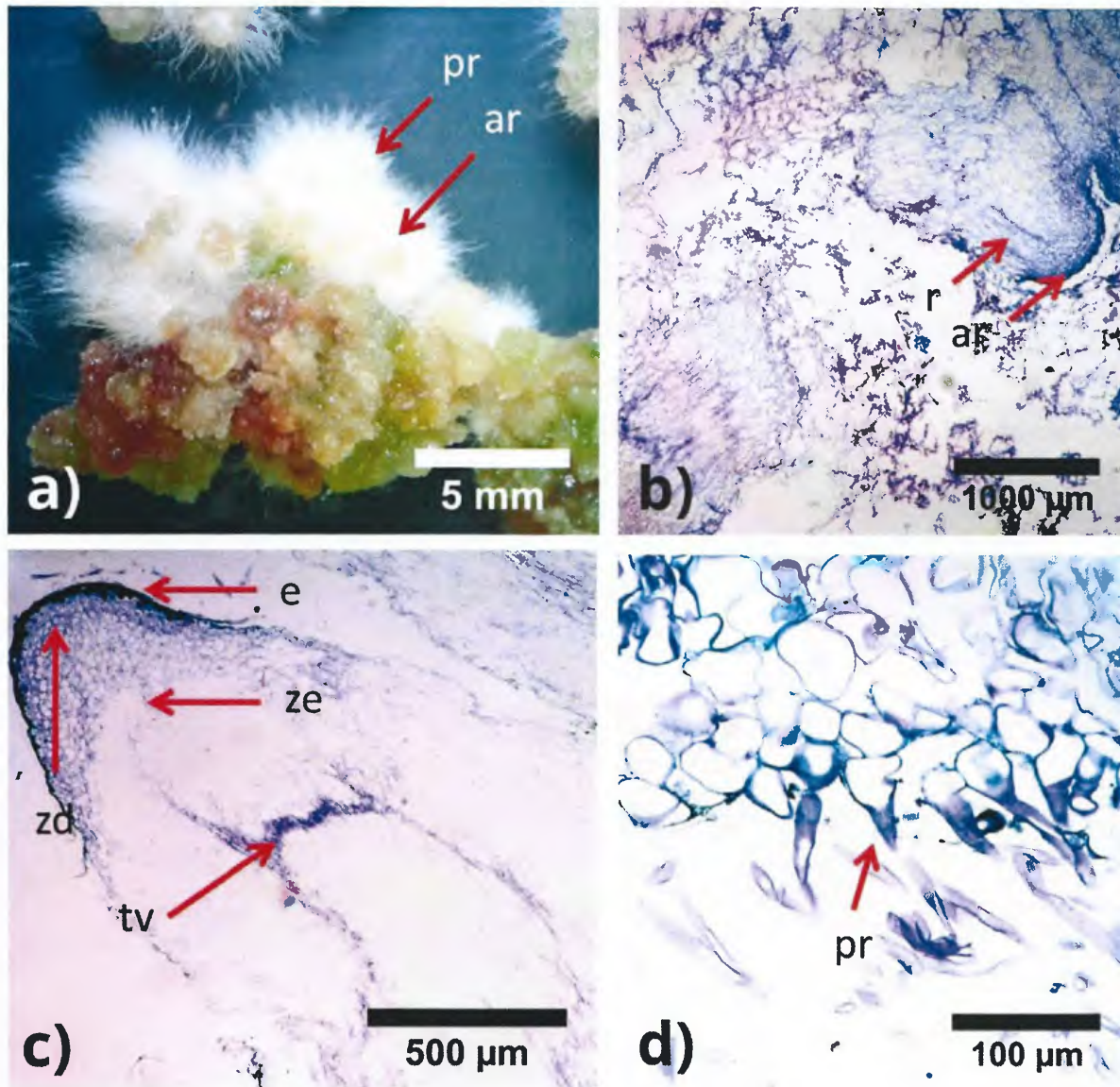


Figura 18. Callos de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de la variedad San Ignacio, luego de 8 meses de inducción y cultivo en un medio MS con 0.5 mg L^{-1} ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 0.5 mg L^{-1} N6-bencilaminopurina bajo luz, generados a partir de explantes de plantas madre establecidas *in vitro* en un medio MS + 5% p/v sacarosa sin reguladores de crecimiento. a) fotografía tomada por medio de un estereoscopio (8X) de callos. b) Corte histológico observado en microscopio de luz (40X). c) corte histológico con el detalle de una raíz formada a partir del callo (100X). d) corte histológico con el detalle de las células de los pelos radicales (400X). pr = pelos radicales, ar = ápice radical, r = raíz, e = epidermis, zd = zona de división celular, ze = zona de elongación celular, tv = tejido vascular. Los tejidos fueron teñidos con azul de toluidina. Cortes realizados por B.Sc. Miguel Benavides. Fotografía de elaboración propia. El brillo y el contraste de las fotografías fueron ajustados con el programa informático ImageJ.

Al observar los callos obtenidos a partir de secciones de cladodio provenientes de plantas madre *in vitro* de Orejona (Figura 19), al momento de la evaluación, no se observó la formación de raíces, como sí se observó en San Ignacio. Sin embargo, al estereoscopio, se observó la formación de clústeres (i.e., masas aglomeradas de células) en las regiones salientes del callo (Figura 19a). Al realizar cortes histológicos de los callos, se observó que existen masas de células con cierto grado de organización (Figura 19b). Al observar estas masas con un mayor aumento, fue evidente la formación de tejido vascular, que incluye una zona de división celular y la formación de traqueidas (Figura 19c). En otros clústeres de células nucleadas se puede observar, además de la zona de división celular, una zona con células elongadas. En este caso tampoco se observó la formación de brotes.

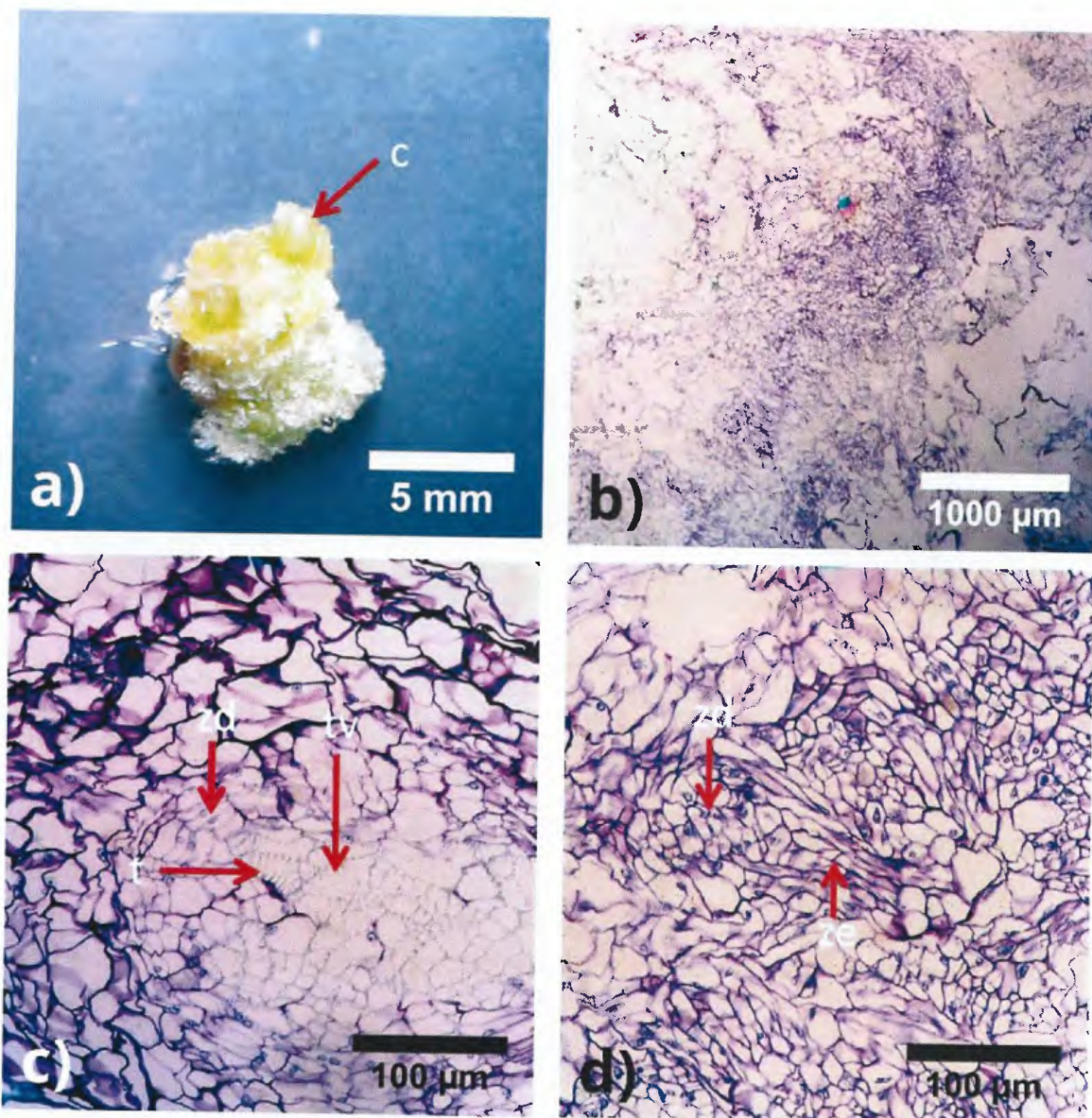


Figura 19. Callos de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de la variedad Orejona luego de 8 meses de inducción y cultivo en un medio MS con 0.5 mg L^{-1} ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 0.5 mg L^{-1} N6-bencilaminopurina, bajo luz, y generados a partir de explantes de plantas madre establecidas *in vitro* en un medio MS + 5% p/v sacarosa sin reguladores de crecimiento. a) fotografía tomada por medio de un estereoscopio (8X). b) Corte histológico observado en microscopio de luz (40X). c) corte histológico con el detalle de la formación de tejido vascular (100X). d) corte histológico con el detalle clústeres de células nucleadas y con evidencia de elongación (400X). c = clúster, zd = zona de división celular, ze = zona de elongación celular, tv = tejido vascular, t = traqueidas. Los tejidos fueron teñidos con azul de toluidina. Cortes realizados por B.Sc. Miguel Benavides. Fotografía de elaboración propia. El brillo y el contraste de las fotografías fue ajustado con el programa informático ImageJ.

Al momento de la redacción de este reporte, algunos de los callos generados a partir de la variedad San Ignacio, mostraron friabilidad, sin evidencia a simple vista de formación de

estructuras radicales (Figura 20a). En el caso de los callos de Orejona, por el contrario, al momento de este reporte, mostraron la formación de estructuras radicales (Figura 20b).

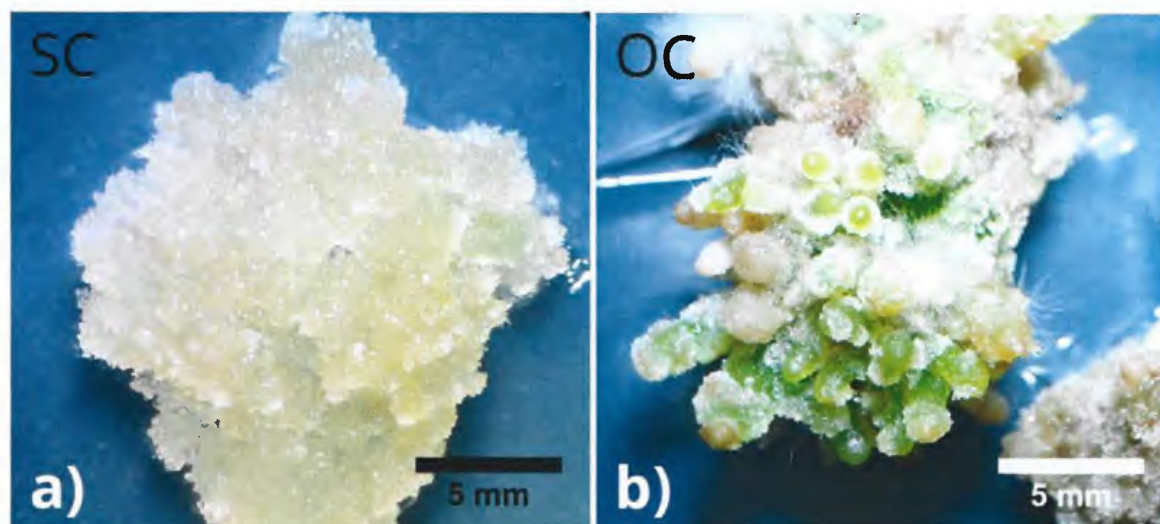


Figura 20. Callos de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de la variedad a) San Ignacio y, b) Orejona, luego de 12 meses de inducción y cultivo en un medio MS con 0.5 mg L^{-1} ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 0.5 mg L^{-1} *N*6-bencilaminopurina bajo luz, a partir de explantes de plantas madre establecidas *in vitro* en un medio MS + 5% p/v sacarosa sin reguladores de crecimiento. Aumento 8X.

Evaluación de variaciones epigenéticas en explantes regenerados de forma directa y en callos.

Evaluación por medio de la amplificación sensible a metilación de inter-secuencias simples repetidas (MS-ISSR)

Para la evaluación de posibles polimorfismos debidos a posibles cambios en los patrones de metilación a los cuales las enzimas *Hpa* II y *Msp* I son sensibles, el ADN digerido con dichas enzimas y las muestras sin digerir fueron sometidas a un PCR con los imprimadores ISSR UBC 824, 825, 835 y 856. Por medio de esta metodología se pudo detectar la presencia de posibles sitios CCGG, con base en un análisis de presencia y ausencia de bandas, luego de correr los productos en un sistema de electroforesis capilar y corroborar los patrones. Dependiendo de la variedad y del imprimador utilizado, se obtuvo diferente número de posibles sitios CCGG (Cuadro 5). En este caso el imprimador UBC 835 fue el que presentó mayor cantidad de sitios CCGG y, además, presentó dichos sitios en las tres variedades evaluadas (Figuras 21, 22 y 23). Los geles electrónicos correspondientes a la amplificación con los imprimadores UBC 824, 825 y 856 se encuentran en el

Anexo 8. Para corroborar dicha aparición o desaparición de bandas se compararon los electroferogramas de las tres muestras (i.e., digeridas con *Hpa* II y *Msp* I y sin digerir) y la del control negativo.

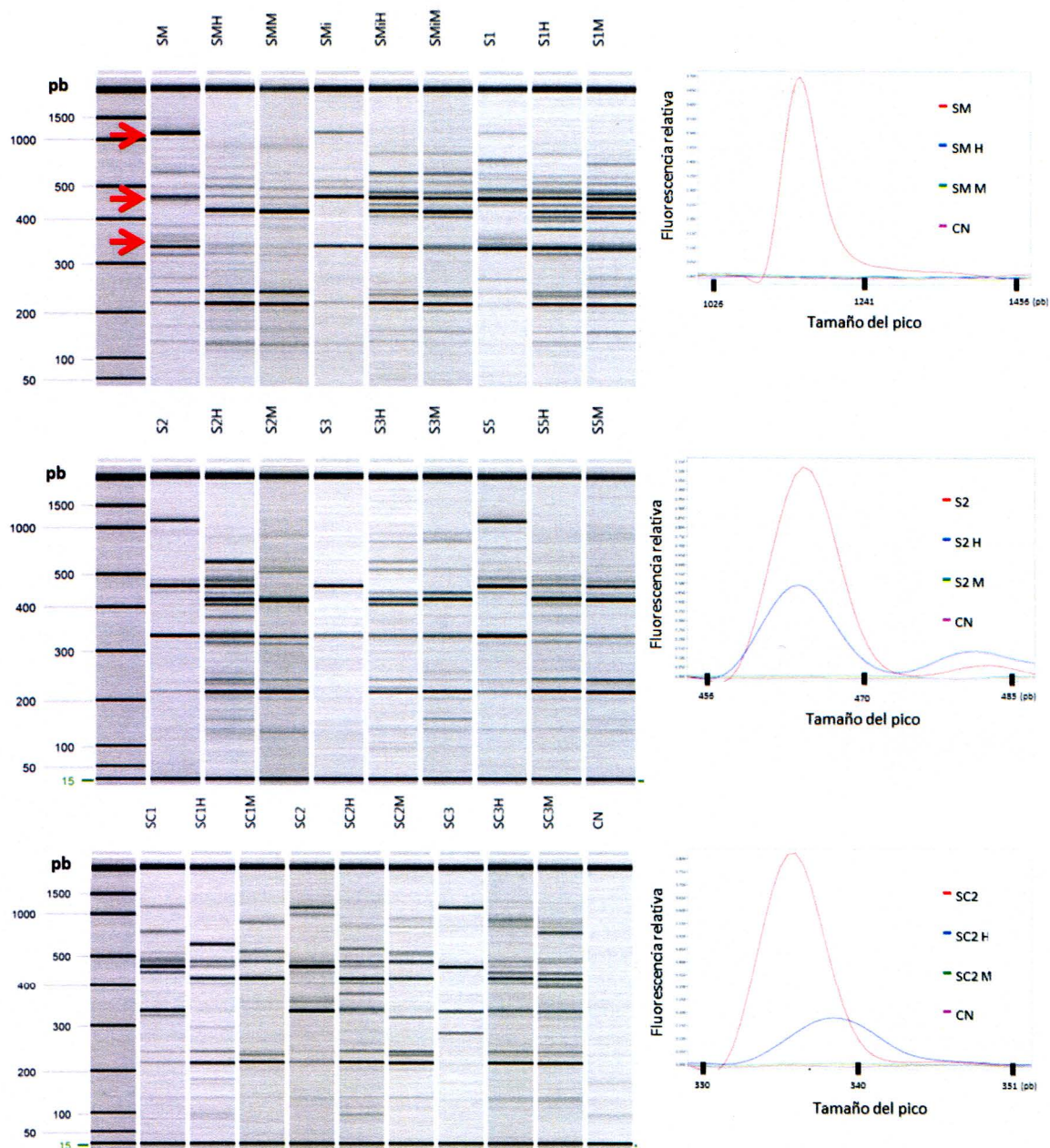


Figura 21. Gel electrónico generado a partir de electroforesis capilar de productos de PCR amplificados utilizando el imprimador UBC 835, con ADN de tejidos de *Hylocereus costaricensis*, de la variedad San Ignacio (S) de la planta madre (M), planta madre establecida *in vitro* sin reguladores de crecimiento (Mi), plantas regeneradas de forma directa (1,2,3 y 5) y callos (C1, C2 y C3), digeridos con las enzimas de restricción sensibles a metilación *Hpa*II (H) y *Msp*I (M), sin digerir, y el respectivo control negativo (CN). La primera columna de cada gel corresponde al marcador de peso molecular. Las bandas con polimorfismos debidos a la digestión con las enzimas de restricción se indican por medio de flechas rojas en el primer gel de arriba hacia abajo. Se incluyen electroferogramas de casos representativos de las bandas que resultaron polimórficas luego de la digestión con las enzimas de restricción.

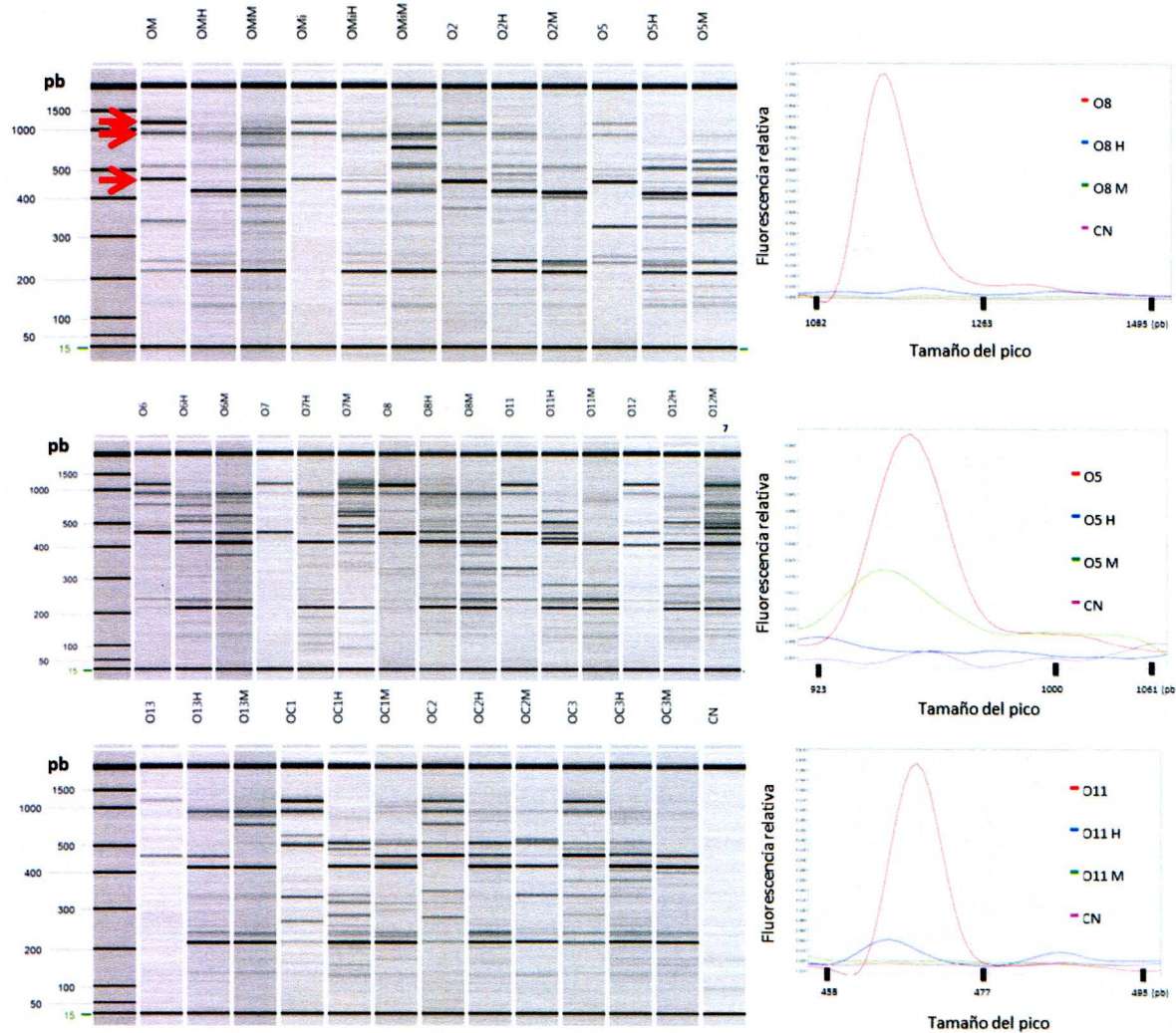


Figura 22. Gel electrónico generado a partir de la corrida por medio de electroforesis capilar de productos de PCR, utilizando el imprimador UBC 835, con ADN de tejidos de *Hylocereus costaricensis*, de la variedad Orejona (O) de la planta madre (M), planta madre establecida *in vitro* sin reguladores de crecimiento (Mi), plantas regeneradas de forma directa (2, 5, 6, 7, 8, 11, 12 y 13) y callos (C1, C2 y C3), digeridos con las enzimas de restricción sensibles a metilación Hpa II (H) y Msp I (M), sin digerir, y el respectivo control negativo (CN). La primera columna de cada gel corresponde al marcador de peso molecular. Las bandas con polimorfismos debidos a la digestión con las enzimas de restricción se indican por medio de flechas rojas en el primer gel de arriba hacia abajo. Se incluyen electroferogramas de casos representativos de las bandas que resultaron polimórficas luego de la digestión con las enzimas de restricción.

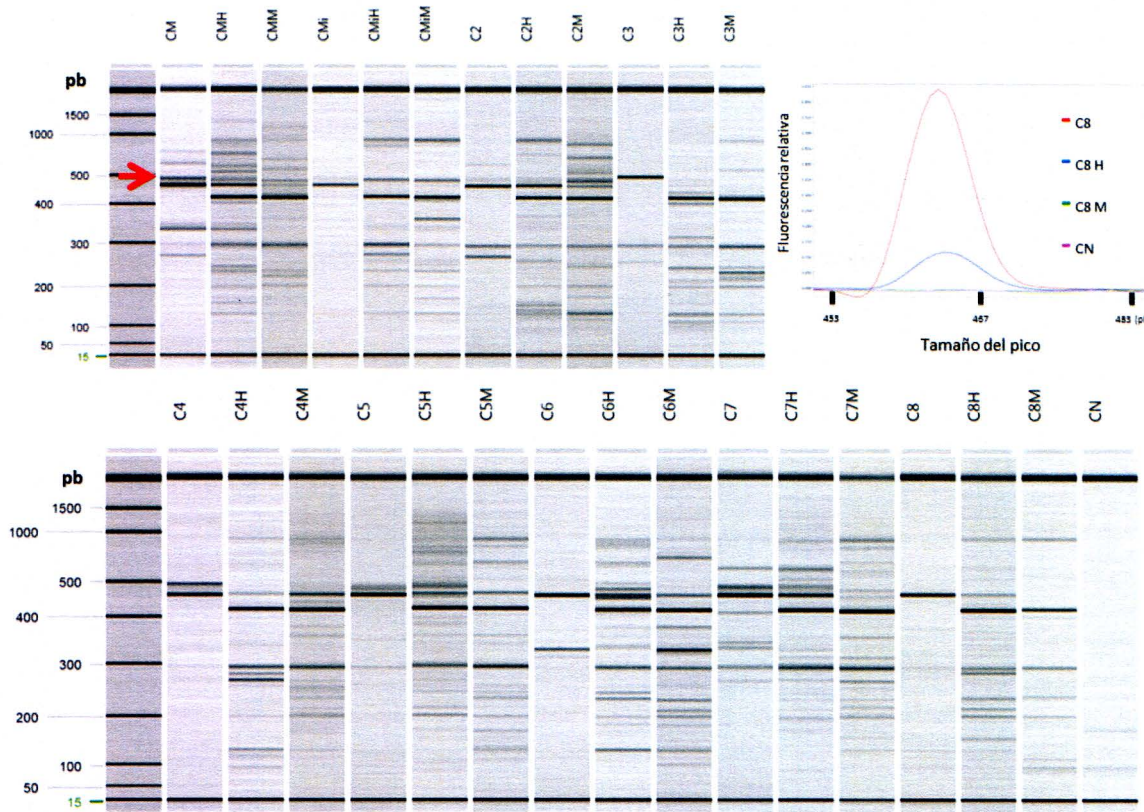


Figura 23. Gel electrónico generado a partir de la corrida por medio de electroforesis capilar de productos de PCR, utilizando el imprimador UBC 835, con ADN de tejidos de *Hylocereus costaricensis*, de la variedad Cebrá (C) de la planta madre (M), planta madre establecida *in vitro* sin reguladores de crecimiento (Mi), plantas regeneradas de forma directa (2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8), digeridos con las enzimas de restricción sensibles a metilación *HpaII* (H) y *MspI* (M), sin digerir, y el respectivo control negativo (CN). Las bandas con polimorfismos debidos a la digestión con las enzimas de restricción se indican por medio de flechas rojas en el primer gel de arriba hacia abajo. Se incluyen electroferogramas de casos representativos de las bandas que resultaron polimórficas luego de la digestión con las enzimas de restricción.

En la variedad San Ignacio, al analizar los tipos de patrones de bandas encontrados al amplificar por medio de una PCR con el imprimador UBC 835 se encontró la misma cantidad y tipos de estados de metilación de los sitios CCGG en la planta madre en invernadero, planta madre *in vitro*, en los individuos regenerado de forma directa S1 y S5, y en el callo SC3, según lo que se detectó mediante la digestión del ADN con las enzimas *Hpa II* y *Msp I* (Figura 24) Es decir, en los casos mencionados anteriormente se encontraron dos sitios CCGG probablemente metilados en las citosinas externas e internas (5'-^mC^mCGG-3', 3'-GG^mC^mC-5', tipo I), y un sitio probablemente sin metilación de citosinas (5'-CCGG-3', 3'-GGCC-5', tipo IV). Por otro lado, solamente el individuo regenerado de forma directa S2, y los callos SC1 y SC2 presentaron sitios CCGG probablemente metilados en las citosinas internas (5'-C^mCGG-3', 3'-GG^mCC-5', tipo II), en donde el callo SC2 presentó mayor cantidad de este tipo de casos. El individuo S3 y el callo SC1 presentaron mayor

frecuencia de sitios probablemente sin metilación. Al utilizar los otros imprimadores, no se encontraron más sitios CCGG en esta variedad.

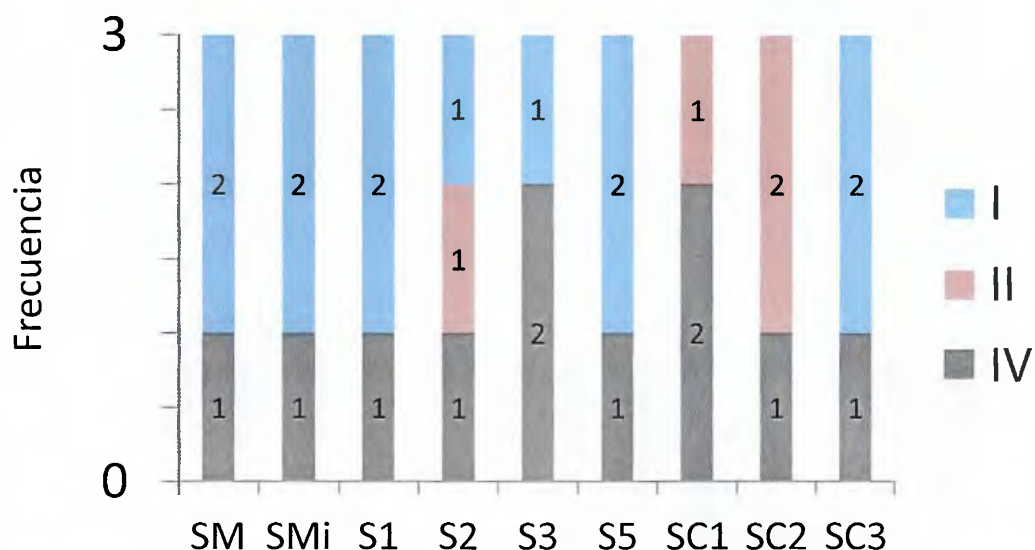


Figura 24. Frecuencia de tipos de patrones de bandas encontrados al realizar una PCR con ADN de plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de la variedad San Ignacio, proveniente de la planta madre (SM), planta madre *in vitro* (SMi), cada una de las plantas provenientes luego del proceso de multiplicación utilizando reguladores de crecimiento (S1, S2, S3 y S5), y callos inducidos a partir de tejido de las plantas madre *in vitro* y también utilizando reguladores de crecimiento (SC1, SC2 y SC3), digeridos con la enzimas de restricción *Hpa* II, con *Msp* I y la muestra sin digerir, utilizando el imprimador UBC 835. El conteo fue realizado únicamente a partir de las bandas que mostraron polimorfismos al utilizar las dos enzimas mencionadas anteriormente. Caso tipo I, presencia de la banda en las tres reacciones de PCR; caso tipo 2, ausencia de banda únicamente en la muestra digerida con *Msp* I; caso tipo IV, ausencia de banda únicamente en las muestras digeridas con ambas enzimas.

Con los imprimadores utilizados, se logró detectar más sitios probablemente CCGG en el variedad Orejona que en el ADN de las plantas de las variedades San Ignacio y Cebra (Cuadro 5 y Figura 25). En este caso, el imprimador UBC 824 permitió detectar un sitio polimórfico según la digestión con las enzimas *Hpa* II y *Msp* I, en donde hubo mayor frecuencia de probables sitios CCGG metilados en las citosinas internas, a excepción del callo OC1, el cual presentó el mismo sitio probablemente con metilación en ambas citosinas. Posteriormente, al utilizar el imprimador UBC 835, se encontró mayor diversidad de sitios CCGG con probables estados de metilación, sin un patrón definido; cabe resaltar la aparición de patrones tipo IV, de naturaleza confusa según la literatura. Por último, con el imprimador UBC 856 se logró la detección de dos sitios CCGG que, al igual que con el imprimador UBC 835, no se encontró un patrón definido tomando en cuenta el origen del explante.

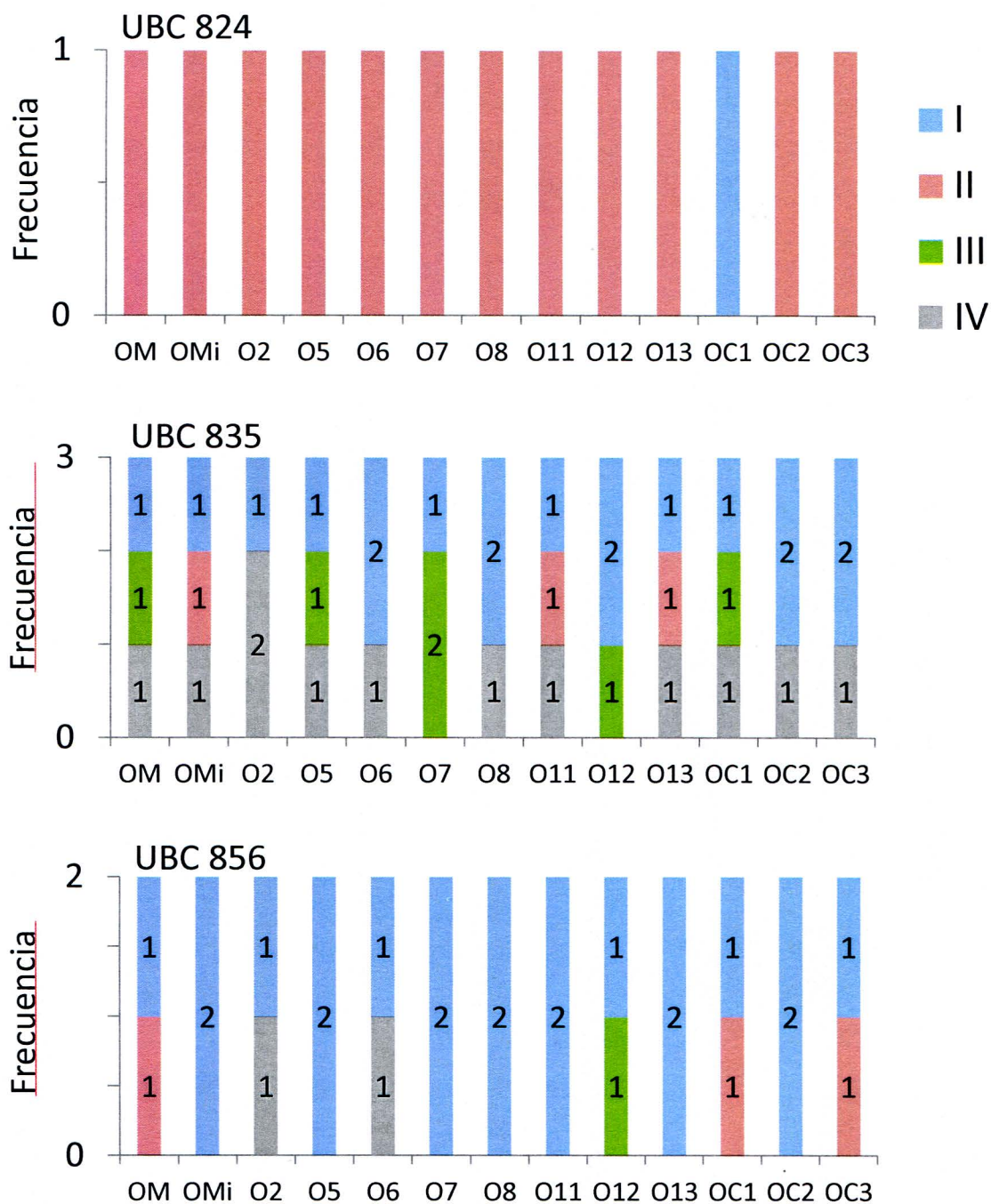


Figura 25. Frecuencia de tipos de patrones de bandas encontrados al realizar una PCR con ADN de plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de la variedad Orejona, proveniente de la planta madre (OM), planta madre *in vitro* (OMi), cada una de las plantas provenientes luego del proceso de multiplicación utilizando reguladores de crecimiento (O2, O5, O6, O7, O8, O11, O12 y O13), y callos inducidos a partir de tejido de las plantas madre *in vitro* y también utilizando reguladores de crecimiento (OC1, OC2 y OC3), digeridos con la enzimas de restricción *Hpa* II, con *Msp* I y la muestra sin digerir, utilizando el imprimador UBC 824, 835 y 856. El conteo fue realizado únicamente a partir de las bandas que mostraron polimorfismos al utilizar las dos enzimas mencionadas anteriormente. Caso tipo I, presencia de la banda en las tres reacciones de PCR; caso tipo 2, ausencia de banda únicamente en la muestra digerida con *Msp* I; caso tipo III, ausencia de banda únicamente en la muestra digerida con *Hpa* II; caso tipo IV, ausencia de banda únicamente en las muestras digeridas con ambas enzimas.

En cuanto a la variedad Cebra, no se observó ningún patrón de probable metilación del único sitio CCGG analizado. Solamente se observó que la planta madre *in vitro* y el individuo C3 presentaron probablemente una de-metilación del sitio detectado, y el individuo C8, mostró una probable metilación de la citosina interna en dicho sitio. En cuanto al sitio CCGG detectado por medio del imprimador UBC 856, solamente se encontró en un probable estado de de-metilación (Figura 26).

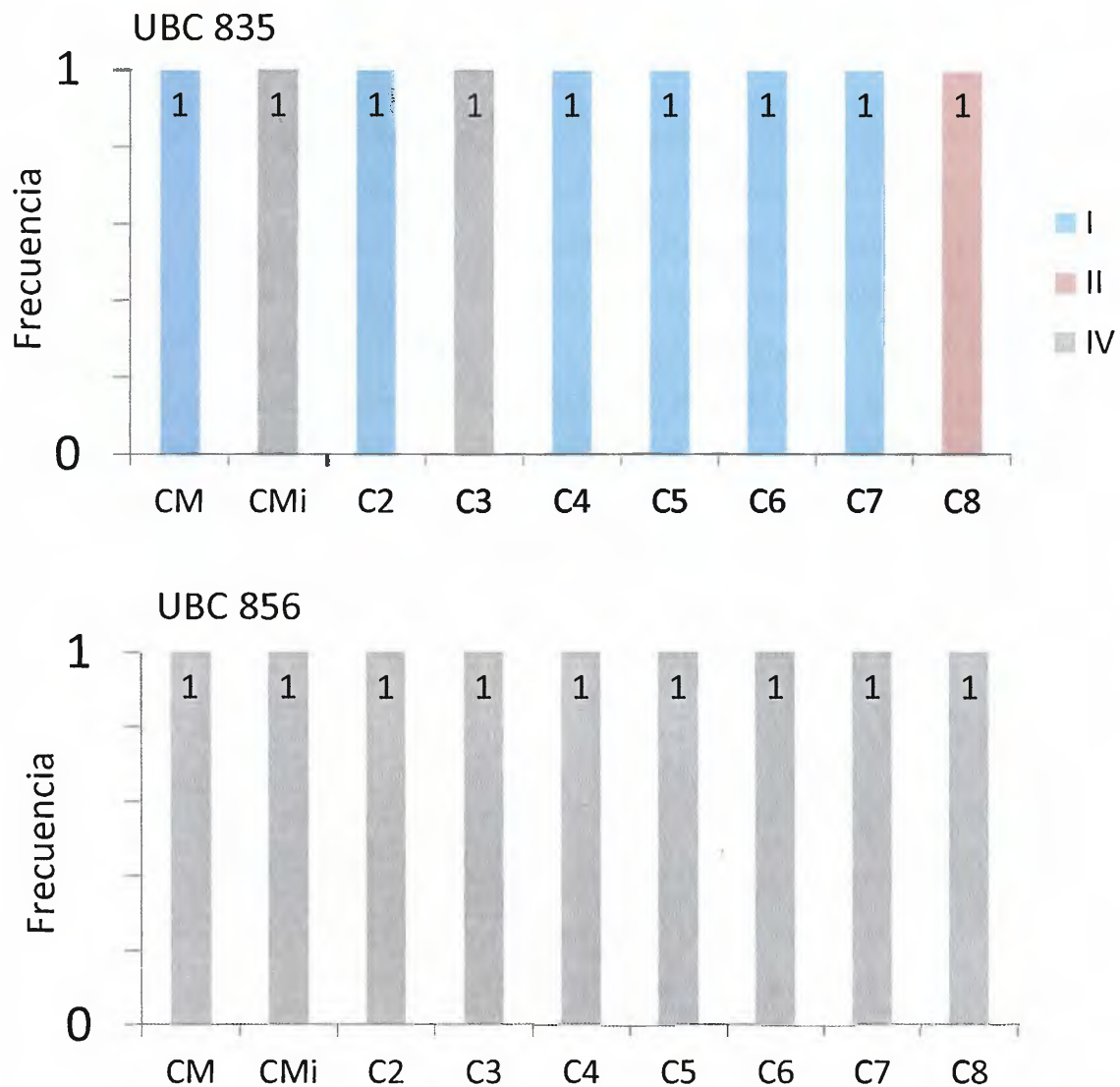


Figura 26. Frecuencia de tipos de patrones de bandas encontrados al realizar una PCR con ADN de plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de la variedad Cebra, proveniente de la planta madre (CM), planta madre *in vitro* (CMI), cada una de las plantas provenientes luego del proceso de multiplicación utilizando reguladores de crecimiento (C2, C3, C4, C5, C6, C7, y C8), digeridos con la enzimas de restricción *Hpa* II, con *Msp* I y la muestra sin digerir, utilizando el imprimador UBC 835 y 856. El conteo fue realizado únicamente a partir de las bandas que mostraron polimorfismos al utilizar las dos enzimas mencionadas anteriormente. Caso tipo I, presencia de la banda en las tres reacciones de PCR; caso tipo 2, ausencia de banda únicamente en la muestra digerida con *Msp* I; caso tipo IV, ausencia de banda únicamente en las muestras digerida con ambas enzimas.

Evaluación de cambios epigenéticos por medio de la determinación del nivel de metilación total del genoma

Los explantes de plantas de las variedades San Ignacio y Orejona, que fueron sometidos a la inducción de la formación de brotes de forma directa, por medio de la utilización de la misma combinación de reguladores de crecimiento adicionada al medio anteriormente para generar la población de clones y la adición de 5-azacitidina, mostraron una inhibición en la formación de nuevos cladodios en ambas variedades (Figura 27). Sin embargo, al cuantificar el nivel de metilación total del genoma, solamente los explantes de la variedad San Ignacio tratados con 5-azacitidina mostraron un nivel de metilación significativamente menor (ANOVA, DMS Fisher, $p < 0.05$) a su respectivo testigo. Por otro lado, los explantes de Orejona tratados con 5-azacitidina no mostraron diferencias significativas con respecto al testigo. Cabe resaltar que el nivel de metilación de los explantes de Orejona con y sin 5-azacitidina mostraron un nivel de metilación significativamente menor que los de San Ignacio (ANOVA, DMS Fisher, $p < 0.05$).

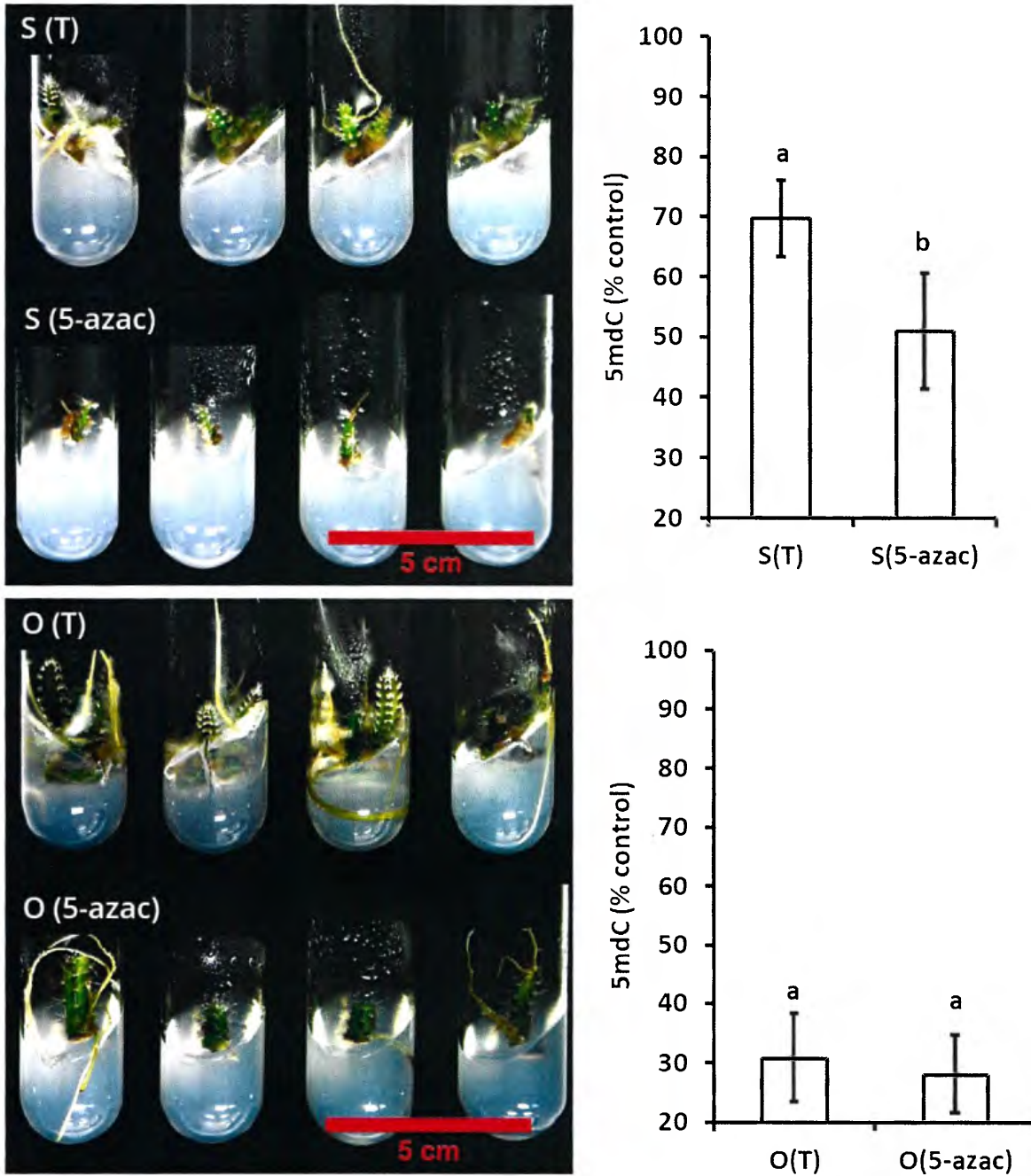


Figura 27. Efecto de la inducción de formación de brotes de forma directa, por medio de la utilización de 0.1 mg L^{-1} de thidiazurón y 0.1 mg L^{-1} de ácido naftaleneacético en el medio de cultivo y la adición de $100 \mu\text{L}$ de una solución $100 \mu\text{M}$ de 5-azacitidina (5-azac) y un testigo sin 5-azac (T), en explantes de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de las variedades San Ignacio (S) y Orejona (O), provenientes de plantas previamente multiplicadas con la misma combinación de reguladores, sobre los niveles de metilación total del ADN genómico. 5mdC = Metilación total del genoma (5mdC) con respecto a un control de 60 ng de ADN metilado. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, DMS Fisher, $p < 0.05$)

Al cuantificar el nivel de metilación general del genoma de las plantas madre en invernadero, plantas madre *in vitro*, plantas regeneradas de forma directa y los callos (Figura 28),

solamente se encontraron diferencias significativas (ANOVA, post-hoc DMS Tukey, $p < 0.05$) en la variedad San Ignacio. En esta variedad, al comparar el estado de metilación general del ADN de las plantas madre en invernadero, las plantas madre *in vitro* presentaron un mayor nivel de metilación al momento de la evaluación (27 meses después del establecimiento *in vitro*). Las plantas que fueron sometidas al proceso de multiplicación, al momento de la evaluación (20 meses después de la inducción de la brotación), presentaron un nivel de metilación menor que la respectiva planta madre *in vitro*, pero similar a la de la planta madre en invernadero. Por último, los callos evaluados, al momento de la evaluación (12 meses después de la inducción) presentaron un nivel de metilación menor que el resto de individuos analizados en esta variedad.

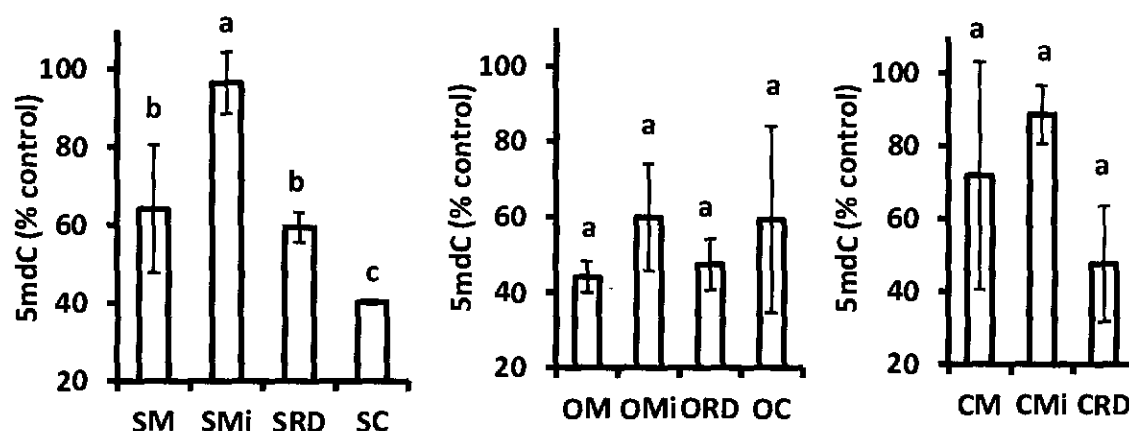


Figura 28. Metilación total del genoma (5mdC) con respecto a un control de 60 ng de ADN metilado, en muestras de ADN de plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) de las variedades San Ignacio (S), Orejona (O) y Cebra (C), proveniente de la planta madre en invernadero (M), madre *in vitro* (Mi), multiplicadas por medio del uso de reguladores de crecimiento (RD) y callos inducidos a partir de tejidos de plantas madre *in vitro* y también por medio del uso de RD de las variedades San Ignacio (SC) y Orejona (OC). Las barras verticales corresponden a la desviación estándar de la media, con $n = 3$. Letras diferentes representan diferencias significativas luego de un post-hoc DMS de Fisher, con $p < 0.05$.

Evaluación de cambios a nivel citológico

No fue posible realizar la evaluación de cambios a nivel citológico, pues no se logró optimizar una metodología eficiente para la observación de cromosomas en puntas de raíz, ni tampoco lograr observar células con los cromosomas en estado condensado, de modo tal que permita un conteo de estos (Anexo 10). Entre las razones probables por las cuales no se pudo observar correctamente las células, se encuentra el hecho de que muchas de las raíces que se utilizaron fueron aéreas, por lo que presentaban puntas oxidadas. Es por ello que se recomienda

tomar raíces jóvenes que se desarrollen en la base del explante, y que estén sumergidas en el medio de cultivo.

DISCUSIÓN

Análisis morfológico

Multiplicación por vía directa

En este estudio se realizó un análisis morfológico de cladodios de pitahaya morada de las variedades San Ignacio, Orejona y Cebra, para lo cual se determinaron 17 variables (Cuadro 2) en plantas madre en invernadero, plantas madre *in vitro* establecidas sin reguladores de crecimiento y plantas regeneradas luego de la inducción de la formación de brotes utilizando 0.1 mg L⁻¹ de TDZ y 0.1 mg L⁻¹ ANA en el medio de cultivo, y su posterior cultivo en medio sin reguladores de crecimiento. Para el análisis del comportamiento de las variables en los distintos individuos, orígenes de explante (invernadero e *in vitro*), se plantearon tres comparaciones (Figura 5). Como aproximación se utilizó el PCA para observar tendencias y generar hipótesis, que luego fueron probadas por medio de análisis estadísticos de medias y varianzas.

El uso del PCA ya ha sido reportado para analizar el comportamiento de variables morfológicas en la micropropagación de distintas plantas como *Solanum* spp. (Pratta *et al.* 2000) y *Catharanthus roseus* (Verma *et al.* 2015). En este caso, el PCA permitió la reducción del número de variables en las cuales se generaron un menor número de hipótesis, las cuales fueron luego comprobadas por análisis de la varianza para notar diferencias en las medias y, por medio de análisis de homocedasticidad para analizar el comportamiento de la variabilidad de dichas características. Aparte del PCA, se utilizó el CV como indicador de variación morfológica entre individuos (Vogt 2015), para la selección de los caracteres a comparar. En general, se determinó que la mayor parte de las variables mostraron un comportamiento similar en las tres comparaciones realizadas, a excepción de la longitud de espinas, número de espinas por areola, circularidad transversal del cladodio y número de costillas por cladodio al comparar las medidas de cladodios en plantas en invernadero y, plantas establecidas y multiplicadas *in vitro* (primera comparación); y volumen y área de la ondulación del cladodio al comparar las plantas establecidas y multiplicadas *in vitro* (segunda y tercera comparación).

En general, en la familia Cactaceae la morfología de los tallos y sus componentes es altamente variable, incluso, dentro de una misma población (Mauseth 2006). Por ejemplo, el proceso de domesticación *Stenocereus stellatus* ha causado variaciones importantes en la morfología de los frutos, cuando se compararon poblaciones silvestres y cultivadas (Casas *et al.* 1999). Por otro lado, en *Pilosocereus spp.* se determinó que el número de espinas por areola se ve afectado por el nivel de radiación solar, la longitud de las espinas se ve afectada por la cantidad de lluvia y el número de costillas se ve afectada por la latitud al comparar muestras provenientes de un herbario y las condiciones ambientales históricas del origen de la muestra (Menezes *et al.* 2015). Por lo tanto, es importante considerar que, debido a la alta variabilidad morfológica producto del ambiente en plantas de la familia Cactaceae, se hace necesaria la comprensión de esta variabilidad para evitar generar conclusiones incorrectas sobre una posible inestabilidad fenotípica, o bien, si se quiere iniciar un proceso de mejoramiento genético de un cultivo que es propagado principalmente de forma vegetativa (Bisognin 2011), como es el caso de *Hylacereus castaricensis*. Comprender la variabilidad existente en poblaciones clonales como las que se estudió en este caso, podría ayudar a discernir cambios verdaderamente distintos, por ejemplo, a la hora de inducir y seleccionar variación somaclonal.

En este estudio, el número de espinas por areola y la longitud de dichas espinas mostraron un comportamiento distinto cuando se compararon plantas en invernadero y plantas *in vitro* con y sin proceso de multiplicación con el uso de reguladores de crecimiento (Figura 10). Mientras que las plantas *in vitro* mostraron una correlación significativamente positiva entre estas dos variables, las plantas en invernadero, sin distinguir el variedad, mostraron una correlación negativa que, si bien no fue significativa (Pearson, $p > 0.05$), fue de una magnitud significativamente menor (-0.48) que la obtenida en plantas *in vitro*. Además, la circularidad transversal del cladodio también tendió a variar dependiendo del origen del cladodio medido (Figura 11). Por último, las plantas cultivadas *in vitro* (con y sin reguladores) presentaron una tendencia a formar mayor número de costillas por cladodio que las plantas madre (Figura 12). Las características relacionadas a las espinas y costillas de cladodios pueden verse modificadas por las condiciones ambientales durante el crecimiento de la planta y, pueden existir interacciones ecológicas, en donde se ha observado una mayor densidad de espinas a mayores niveles de radiación, lo cual puede ser parte de los mecanismos físicos de dispersión de radiación y temperatura en el cladodio (revisado por Menezes *et al.* 2015). Por otro lado, existe evidencia en *Opuntia spp.*, en donde la cantidad de espinas modifica la capacidad fotosintética en los cladodios (Loik 2008). En cuanto al número de costillas por cladodio,

este factor se ve afectado por el diámetro del meristema apical de cada cladodio (Mauseth 2006). Por otro lado, esta característica también tiene implicaciones en la capacidad fotosintética del cladodio, no solo desde el punto de vista de almacenaje de agua sino que, también, su disposición regula el modo en que el cladodio percibe y utiliza la luz y es por ello que pueden existir interacciones entre el ambiente y modificaciones en esta característica (revisado por Drezner 2017). Por lo tanto, las espinas y las costillas pueden tener implicaciones importantes a nivel fisiológico en *H. costaricensis*.

El único reporte en la literatura con respecto a la morfología de espinas de plantas de la familia Cactaceae cultivadas *in vitro*, tiene que ver con una comparación entre tallos normales e hiperhídricos de *Mammillaria gracilis* (Peharec *et al.* 2010). Estos autores, al comparar tallos normales e hiperhídricos regenerados a partir de callos y sus respectivas plantas madre en invernadero, cuantificaron un menor número de areolas en tallos *in vitro*, con una diferencia más marcada en tallos hiperhídricos; además, los autores encontraron que la longitud de las espinas de las plantas en invernadero eran más largas que las de las plantas cultivadas *in vitro*, y *ex vitro* poseían mayor variabilidad. Se debe tomar en cuenta que las condiciones de cultivo *in vitro* pueden inducir estrés oxidativo en el cultivo sobre los tejidos y causar hiperhidricidad en cladodios (Balén *et al.* 2009) y, por lo tanto, generar respuestas morfológicas diferentes. Los resultados obtenidos en *Hylocereus costaricensis* de este estudio, muestran un comportamiento distinto, pues las plantas *in vitro* tienen una tendencia a presentar mayor tamaño y número de espinas por areola y, según el PCA, mayor variabilidad. Cabe destacar el individuo S5, clon de la variedad San Ignacio, que presentó un comportamiento extremo que se puede visualizar en el PCA (Figura 8).

No se encontraron reportes de variaciones en el número de costillas por cladodio ni la circularidad transversal del cladodio entre plantas *ex vitro* e *in vitro*. La estimación circularidad transversal del cladodio podría verse afectada por la cantidad y el grosor de las costillas, por lo que pueden ser variables relacionadas. Mauseth (2006) menciona que en la región interna del cladodio se almacena agua, y que cambios en el estatus hídrico de estos puede hacer que el cladodio se contraiga o se expanda; por lo tanto, la circularidad puede verse afectada por la absorción y almacenamiento de agua de cada cladodio. En el PCA (Figura 8) se observa que estas dos variables se encuentran proyectadas de forma similar en la dimensión 2. El número de costillas de un cladodio puede verse por afectado fluctuaciones en procesos hídricos y fotosintéticos (Drezner 2017). Por lo tanto, la pitahaya al ser cultivada en un ambiente con una humedad relativa del aire considerablemente mayor y, con adición exógena de una fuente de carbono (i.e.,

sacarosa), es probable que los cambios en el número de costillas tenga relación con el hecho de ser cultivada *in vitro*. Las condiciones ambientales a las que son sujetas las plantas a la hora de su micropropagación pueden generar cambios a nivel metabólico.

Por ejemplo, el metabolismo CAM (i.e., metabolismo ácido de las crasuláceas, por sus siglas en inglés) puede verse considerablemente afectado en cladodios del cactus *Caryphanta minima* cultivados *in vitro*, favoreciendo que luego del proceso de aclimatación puedan absorber CO₂ durante el día (Malda *et al.* 1999). Asimismo, se ha determinado que la densidad estomática de cladodios de *H. undatus* es menor en condiciones *in vitro*, que en cladodios cultivados *ex vitro* (Herrera-Martínez *et al.* 2015); sin embargo, los mismos autores determinaron que lo contrario (i.e., mayor densidad estomática en cladodios cultivados *in vitro*) ocurre en cladodios de *Opuntia ficus-indica* y de *Escantria chiotilla*. Por lo tanto, es probable que el comportamiento de las espinas y costillas en cladodios de *H. costaricensis* debe estudiarse a nivel de especie, pues probablemente existan diferencias importantes en niveles taxonómicos superiores.

Además, podría ser posible el desarrollo de un modelo experimental a partir de este comportamiento de las espinas y las costillas diferente en plantas *in vitro* para determinar, en este caso, posibles factores que afecten dichas características en *H. costaricensis*, tomando en cuenta sus posibles implicaciones en la fisiología de esta especie. En general, es posible concluir que las variaciones detectadas en las características que tienen que ver con las espinas, el número de costillas y circularidad del cladodio, probablemente tengan que ver con procesos fisiológicos inducidos por el cambio de ambiente. De hecho, Mauseth (2006) menciona que en *Hylocereus* spp., al ocurrir un cambio en el número de costillas por cladodio, la cantidad de costillas puede llegar a estabilizarse rápidamente al formar nuevos tallos a partir de cladodios jóvenes si las condiciones de cultivo así lo permiten.

En cuanto a la variable de altura de la ondulación, como se muestra en los PCAs generados para la segunda (Figura 13) y tercera (Figura 14) comparación, su comportamiento se encuentra relacionado al de la circularidad y al número de costillas, por lo que, probablemente las tendencias encontradas correspondan a procesos similares a los descritos anteriormente. La variable de volumen del cladodio puede ser un indicador del crecimiento *in vitro* del explante, por lo que las diferencias encontradas pueden ser producto de una respuesta diferente del variedad al medio de multiplicación utilizado. Las diferencias entre individuos pueden ser provocados por procesos de variación fenotípica estocástica (i.e., variaciones fenotípicas de un mismo variedad dentro de un mismo ambiente) (Vogt 2015), lo cual puede ser causada por gradientes internos de reguladores

de crecimiento luego de su aplicación exógena, por lo que a la hora de formar brotes en diferentes puntos del explante, es posible obtener cladodios con patrones de crecimiento y distintos.

Multiplicación por vía indirecta

No fue posible la regeneración de brotes de forma indirecta, por medio de la formación de callos. Sin embargo, los callos mostraron la formación de estructuras radicales, incluyendo ápices y pelos radicales (Figuras 18 y 19). La regeneración de raíces a partir de callos ya ha sido reportada en líneas celulares generadas a partir de plantas la familia Cactaceae, mediante la utilización de secciones de cotiledones, hipocótilos y raíces de *Stenocereus gummosus* y de *Ferocactus peninsulæ* (Shishkova *et al.* 2007). Los explantes utilizados en este estudio para la inducción de formación de callo correspondían a secciones transversales de cladodio que contenían areolas, la corteza y anillos vasculares (Figura 29). Las areolas incluyen yemas laterales capaces de formar hojas modificadas que, en el caso de *Hylocereus* spp. son espinas; por otro lado, la corteza del cladodio contiene una región con células fotosintéticas en empalizada con alto contenido de clorofila, una corteza con células más grandes y con menor contenido de clorofila en el medio y, una corteza interior con células que rodean al anillo vascular (Mauseth 2006). Por lo tanto, los callos pueden haberse formado a partir de diversos tipos de células en distintos tipos de tejidos.

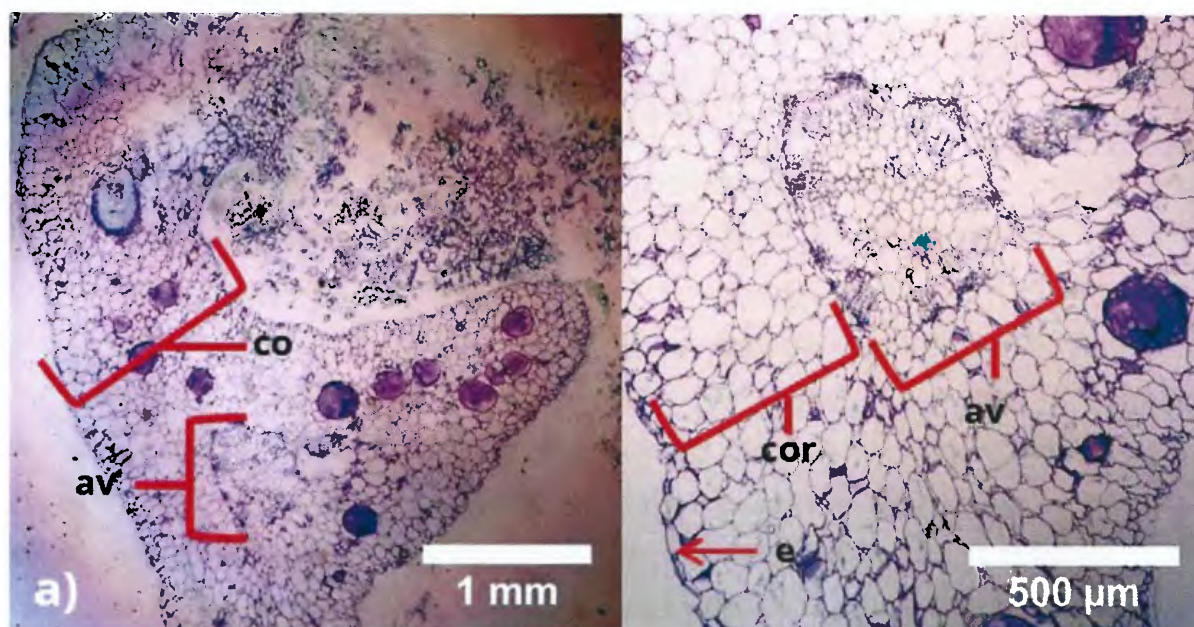


Figura 29. Sección transversal de un cladodio de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) cultivado *in vitro* observado por medio de un microscopio de luz. a) vista a 40X, b) vista a 100X. co = costilla, e= epidermis, cor = corteza, av = anillo vascular. Cortes realizados por B.Sc. Miguel Benavides. Fotografía de elaboración propia. El brillo y el contraste de las imágenes fueron ajustados con ImageJ.

En la literatura, específicamente en *Arabidopsis*, se encuentra evidencia de que los callos generados a partir de tejidos vegetativos no sufren procesos completos de dediferenciación, y que, por el contrario, manifiestan comportamientos similares a los de un meristema radical. En el caso de *Arabidopsis*, Cuando secciones de tallo o de raíz se colocan en un medio de cultivo con la adición de una fuente exógena de auxinas y citoquininas en proporciones similares, se forma callo a partir de las células del periciclo adyacentes a los polos del xilema (revisado por Ikeuchi *et al.* 2013). En un reporte hecho por Sugimoto *et al.* (2010) se determinó que el perfil de genes transcritos en callos generados a partir de órganos aéreos y subterráneos de *Arabidopsis* muestran actividad similar a la del meristema radical. Además, estos mismos autores, determinaron que la formación de callo fue bloqueada en mutantes de *Arabidopsis* sin capacidad de formar raíces laterales. Como se mencionó anteriormente, las secciones de cladodio poseían tejido vascular y, por lo tanto, es probable que la formación del callo provenga de las células del periciclo y, sea esa una posible razón por la cual los callos regeneraron raíces. Más adelante se discutirán posibles roles de la metilación del genoma en este proceso. Por último, los callos de Orejona lograron diferenciar raíces en un mayor tiempo en comparación con los de San Ignacio; sin embargo, el

ritmo de formación de órganos en un callo puede depender de la variedad bajo las mismas condiciones de cultivo (Shishkova *et al.* 2007).

Análisis epigenético

El meristema de las plantas está sujeto a regulación por mecanismos epigenéticos, los cuales modulan la inducción o represión de genes importantes en el mantenimiento de dicho meristema, estabilizando la identidad celular y la organización de los tejidos (revisado por Birnbaum y Roudier 2017). La metilación de citosinas como marca epigenética es mitóticamente heredable (Jones 2012). Con el fin de evaluar posibles cambios durante el proceso de cultivo *in vitro* de explantes de pitahaya, se decidió trabajar con este tipo de marcas epigenéticas. El análisis de metilación de este estudio utilizó dos aproximaciones para analizar posibles variaciones durante el proceso de establecimiento *in vitro*, multiplicación por vía directa y la inducción de la formación de callo. En primer lugar, se estudió la presencia y metilación en sitios CCGG, según la sensibilidad a la metilación de las enzimas *Hpa* II y *Msp* I, buscando dichos sitios por medio del uso de cuatro imprimadores ISSRs. En segundo lugar, se cuantificó el nivel de metilación total del ADN. Por lo anterior, las conclusiones se basarán tomando en cuenta las limitaciones de la información generada a partir de los métodos utilizados.

Entre las limitaciones más importantes de la metodología MS-ISSR, y que se comparte con el MSAP, es que es posible analizar solamente el estado de metilación de algunos sitios CCGG (de acuerdo con los imprimadores seleccionados), lo cual contempla sólo una parte de los fenómenos que ocurren a nivel de metilación del genoma y de las islas CpG (Fulnecek y Kovarik 2014). Las islas CpG (i.e., secuencias cortas y ricas en repeticiones de citosinas y guaninas- p = grupo fosfato-) son regiones que se encuentran sujetas a metilación, y una proporción importante de estas islas están a ligadas a la actividad transcripcional de diversos genes (Ashikawa 2001). Por otro lado, hay evidencia del rol de la metilación de islas CpG en la capacidad regenerativa de células meristemáticas (Birnbaum y Roudier 2017). Es por ello que la metodología MS-ISSR se consideró que podría resultar útil para detectar cambios en la metilación, pero únicamente en sitios CCGG.

El método MS-ISSR, como se menciona en la sección de *Materiales y métodos*, es una derivación de la metodología reportada por Cai *et al.* (1996), con la diferencia de que se amplifican por medio de PCR regiones entre microsatélites, en lugar de utilizar imprimadores aleatorios. La metodología de MS-ISSR ha sido utilizada, por ejemplo, para analizar la variación somaclonal en plantas de *Secale cereale* provenientes de embriogénesis somática (Linacero *et al.*

2011), de *Spinacia oleracea* tratadas con 5-azacitidina (Gao *et al.* 2014) y, para evaluar variaciones en híbridos somáticos de *Solanum tuberosum* (Tiwari *et al.* 2015), entre otros. En estos artículos mencionados anteriormente, normalmente se utilizan entre 11 y 35 imprimadores. Una de las ventajas principales de esta metodología es que se puede hacer una evaluación más rápida de posibles cambios a nivel epigenético que con otras metodologías (Wang *et al.* 2004) en comparación con el MSAP (Park *et al.* 2009). Otra ventaja es que, si se aumenta el número de marcadores a utilizar, es posible analizar también variaciones genéticas en una población clonal, al analizar los patrones de bandas generados por los imprimadores ISSR en las muestras de ADN sin digerir con ninguna endonucleasa (Bairu *et al.* 2011, Fan *et al.* 2013). De hecho, en las electroforesis generadas en este estudio (Figuras 21, 22, 23 y Anexo 8), es posible observar patrones de bandas que no se reproducen en todos los individuos dentro de una misma variedad. Sin embargo, para realizar este tipo de análisis también es necesario aumentar el número de marcadores a utilizar.

En este estudio, como una aproximación inicial, se utilizó una cantidad considerablemente menor de marcadores moleculares con respecto a los estudios mencionados anteriormente, sin embargo, fue posible detectar sitios CCGG, probablemente con estados distintos de metilación dependiendo del individuo analizado. Por ejemplo, en San Ignacio, fue posible notar que las plantas madre en invernadero e *in vitro* mostraron un patrón de metilación similar en las plantas madre en invernadero, plantas madre *in vitro* y en algunos individuos regenerados de forma directa. Por otro lado, en dos de los callos fue posible detectar los mismos sitios con probablemente, las mismas citosinas internas metiladas (Figura 24). En Orejona (Figura 25) y en Cebra (Figura 26) no se observó un patrón claro en el estado de metilación de los sitios CCGG detectados, por lo que probablemente exista mayor variabilidad en este sentido. Esto coincide con el hecho de que en las variedades Orejona y Cebra no se detectó diferencias significativas en el nivel de metilación total del genoma (Figura 28).

Al observar el efecto de la aplicación de la 5-azacitidina sobre la inducción de formación de nuevos brotes en explantes de San Ignacio y Orejona, se observó que dicha molécula inhibió la formación de brotes (Figura 27), lo que indica que probablemente hay un efecto de esta molécula sobre el proceso de regeneración de brotes a partir de yemas preformadas. La 5-azacitidina es una molécula que induce la reducción en los niveles de metilación del genoma, al interactuar con metiltransferasas (Griffin *et al.* 2016) como la que codifica el gen *METHYLTRANSFERASE 1 (MET 1)*. El gen *MET1* es uno de los que regula el estado de metilación en sitios CpG en plantas metilando a

las citosinas (Finnegan *et al.* 1996, Kankel *et al.* 2003). Al cuantificar los niveles totales de metilación en el ADN de los explantes de San Ignacio tratados con 5-azacitidina, se detectó una reducción en el estado de metilación del ADN del explante, con respecto al testigo. Sin embargo, en Orejona no fue posible observar este comportamiento. Cabe notar que, en Orejona, los niveles de metilación del testigo fueron considerablemente menores que los de San Ignacio (ANOVA, $p < 0.05$). Por otro lado, tal vez exista una relación con el hecho de que, en esta variedad, no fue posible observar un patrón en los niveles totales de metilación, ni detección de sitios CCGG metilados, en el ADN de la planta madre en invernadero, planta madre *in vitro*, los clones ni los callos. Lo anterior, probablemente ello es producto de que la metilación global del genoma no es el único mecanismo con un rol en el comportamiento de las plantas de pitahaya *in vitro* estudiadas en este caso y que, incluso, pueden existir respuestas en variedades distintas.

En cuanto a la inhibición de la formación de brotes por parte de la aplicación de 5-azacitidina, es probable que exista un rol de la actividad de metiltransferasas en este proceso en *Hylocereus costaricensis*. Por otro lado, los callos de San Ignacio mostraron niveles de metilación menores que los del resto de individuos, y no hubo formación de brotes. El gen *WUS*, en conjunto con el gen *AUXIN RESPONSE FACTOR 3 (ARF3)*, regulan la formación de brotes en callos de *Arabidopsis* y, son regulados en parte por metilación de islas CpG ubicadas en regiones cercanas a dichos genes (Li *et al.* 2011). *WUS* codifica un factor de transcripción que se encuentra en mayor proporción expresado en el centro de organización de los meristemas y se encarga de su homeostasis (Yadav *et al.* 2011), y *ARF3* codifica otro factor de transcripción importante en la percepción de auxinas y el desencadenamiento de expresión de genes relacionadas a estas (Li *et al.* 2016). En callos generados a partir del mutante *met1* de *Arabidopsis*, la activación del gen *WUS* ocurre en menor tiempo que en el tipo silvestre, lo cual también causó que los callos regeneraran brotes en menor tiempo en el mutante (Li *et al.* 2011), lo que sugirió que la desmetilación de sitios CpG cercanos al gen *WUS* pudo tener un rol en la inducción de formación de brotes. Sin embargo, existen otros mecanismos de metilación no dependientes de islas CG que también regulan la competencia de formación de brotes (Birnbaum y Roudier 2017). Por lo tanto, no se puede reducir la explicación de la no formación de brotes en los callos al estado de metilación general del genoma. Además, en cuanto a los brotes tratados con 5-azacitidina, este agente es capaz de inducir la transcripción de transposones en *Arabidopsis* (Griffin *et al.* 2016) por lo que existen otros efectos colaterales de utilizar esta molécula. Por último, cabe resaltar la observación de que, si bien se inhibió la formación de brotes en las areolas de los explantes, no hubo inhibición

de la formación de raíces las secciones de cladodio. Sin embargo, no se encontró información que respalde la observación.

CONCLUSIONES

Es probable que los cambios morfológicos observados en los explantes de pitahaya sometidos al proceso de establecimiento y multiplicación *in vitro* sean producto de reacciones fisiológicas normales al cambio de un ambiente *ex vitro* a uno *in vitro*. En la literatura se documenta que las características evaluadas en este estudio que presentaron comportamientos diferentes en cuanto al origen del explante, la variedad y el individuo, poseen variaciones importantes en diferentes condiciones ambientales, e incluso se han reportado interacciones ecológicas con implicaciones en la fisiología de las plantas de la familia Cactaceae. También es posible que existan diferencias en estas respuestas en distintas variedades, por lo que se debe estudiar el caso de *Hylocereus* con mayor detalle. No se encontró variabilidad fenotípica que se pueda aseverar como variación somaclonal en el modelo experimental estudiado.

Si bien no fue posible la regeneración de brotes a partir de callos de explantes provenientes de plantas madre *in vitro*, los callos formados mostraron regeneración de raíces, indicando que poseen un estado de desdiferenciación incompleto, con diferencias entre las variedades San Ignacio y Orejona. La literatura reporta que los callos que son capaces de formar brotes, tienen un comportamiento transcriptómico e histológico similar al de un meristema radical. Por lo tanto, probablemente sea necesario explorar estímulos diferentes (i.e., concentraciones y proporciones de auxinas y citoquininas), pues posiblemente exista competencia para la formación de brotes en los callos generados.

En cuanto a la evaluación epigenética, al momento de este reporte, se concluye que probablemente no existe un patrón claro en las variedades Orejona y Cebra en cuanto a los estados de metilación de sitios CCGG y su relación con el proceso de cultivo *in vitro*, si se toma en cuenta lo obtenido en la cuantificación de la metilación total del genoma de los individuos analizados. Probablemente sea necesario aumentar el número de repeticiones a la hora de cuantificar los niveles totales de metilación. En San Ignacio, es probable que exista un patrón en cuanto al cultivo *in vitro* de explantes y células y, a los niveles generales de metilación del genoma y en los sitios CCGG detectados con el imprimador UBC 835. Sin embargo, lo observado por medio

de MS-ISSR debe ser estudiado en pasos posteriores para ser confirmado, por medio del uso de mayor número de imprimadores.

Prospecciones futuras

En cuanto a los cambios morfológicos encontrados, podría resultar importante explorar el comportamiento distinto de la variable de número de espinas por areola y la longitud de las espinas, encontrado en plantas madre en invernadero con respecto a las plantas cultivadas *in vitro*. Además, puede resultar pertinente estudiar en *Hylocereus* el comportamiento de las variables de número de costillas por areola y de la circularidad, por las posibles implicaciones fisiológicas de estas variables en plantas en campo. El cultivo *in vitro* de *Hylocereus* puede servir como un modelo que genere variación en estas características.

Finalmente, en los callos de San Ignacio obtenidos en este estudio, el nivel de metilación total del genoma fue el menor detectado, en comparación con los demás individuos, sin embargo, los callos solo pueden regenerar raíces. Tomando en cuenta lo mencionado anteriormente, probablemente este estado de metilación menor tenga que ver con los procesos de división y de organización celular que se encontraron en los cortes histológicos. Sin embargo, es posible también que se requiera de factores adicionales, como proporciones distintas de auxina y citoquininas para la regeneración de brotes.

Para confirmar la aparición de los posibles sitios CCGG detectados, probablemente sea interesante aislar las bandas y enviarlas para su secuenciación, con el fin de continuar con análisis más específicos de dichas regiones. Además, es necesario aumentar el número de marcadores ISSR a utilizar, con el fin de aumentar la posibilidad de que se encuentren patrones que dependan del origen del explante que se analiza.

La metodología MS-ISSR, si se utiliza mayor cantidad de imprimadores, se pueden cuantificar cambios a nivel genético en los individuos estudiados. Como se observa en las electroforesis realizadas, existen bandas que presentaron polimorfismos, dentro de una misma variedad en las muestras sin digerir con ninguna de las enzimas de restricción utilizadas, lo cual puede ser producto de algún tipo de cambio genético.

LITERATURA CITADA

- Angulo-Bejarano, PI; Paredes-López, O. 2011. Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). *Scientia Horticulturae* 128(3): 283-288.
- Ashikawa, I. 2001. Gene-associated CpG islands in plants as revealed by analyses of genomic sequences. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 26(6):617-625.
- Bairu, MW; Aremu, AO; Van Staden, J. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63(2):147-173.
- Balen, B; Tkalec, M; Pavoković, D; Pevalek-Kozlina, B; Krsnik-Rasol, M. 2009. Growth conditions in vitro culture can induce oxidative stress in *Mammillaria gracilis* Tissues. *Journal of Plant Growth Regulation* 28(1):36-45.
- Bertin, P; Bouharmont, J. 1997. Use of somaclonal variation and in vitro selection for chilling tolerance improvement in rice. *Euphytica* 96(1):135-142.
- Birnbaum, KD; Roudier, F. 2017. Epigenetic memory and cell fate reprogramming in plants. *Regeneration* 4(1):15-20.
- Bisognin, DA. 2011. Breeding vegetatively propagated horticultural crops. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 11:35-43.
- Bobadilla-Landey, R; Cenci, A; Georget, F; Bertrand, B; Camayo, G; Dechamp, E; Herrera, JC; Santoni, S; Lashermes, P; Simpson, J; Etienne, H. 2013. High genetic and epigenetic stability in *Coffea arabica* plants derived from embryogenic suspensions and secondary embryogenesis as revealed by AFLP, MSAP and the phenotypic variation rate. *PLoS One* 8(2):1-15.
- Britton, NL; Rose, JN. 1969. *The Cactaceae: descriptions and illustrations of plants of the cactus family, Volume 2*. Nueva York, Estados Unidos, Courier Corporation. 242 p.
- Cai, Q; Guy, CL; Moore, GA. 1996. Detection of cytosine methylation and mapping of a gene influencing cytosine methylation in the genome of *Citrus*. *Genome* 39(2): 235-242.
- Casas, A; Caballero, J; Valiente-Banuet, A; Soriano, JA; Dávila, P. 1999. Morphological variation and the process of domestication of *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) in Central Mexico. *American Journal of Botany* 86(4):522-533.

- Cota-Sánchez, J; Remarchuk, K; Ubayasena, K. 2006. Ready-to-use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter* 24(2):161-167.
- de Medeiros, L; de Ribeiro, R; Gallo, L; de Oliveira, E; Demattê, M. 2006. In vitro propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84(2):165-169
- Di Rienzo, JA; Casanoves, F; Balzarini, MG; Gonzalez L., Tablada, M; Robledo, CW. 2016. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Dolezel, J; Greilhuber, J; Suda, J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2(9):2233-2244.
- Drezner, TD. 2017. Shape and size adjustments of a cactus with rib and furrow morphology. *Journal of Arid Environments* 138:1-8.
- Encheva, J; Köhler, H; Friedt, W; Tsvetkova, F; Ivanov, P; Encheva, V; Shindrova, P. 2003. Field evaluation of somaclonal variation in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and its application for crop improvement. *Euphytica* 130(2):167-175.
- Esquivel, P; Araya-Quesada, Y. 2012. Características del fruto de la pitahaya (*Hylocereus* sp.) y su potencial de uso en la industria alimentaria. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 3(1):113-129.
- Fan, Q-J; Zheng, S-C; Yan, F-X; Zhang, B-X; Qiao, G; Wen, X-P. 2013. Efficient regeneration of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) and an assessment of the genetic fidelity of in vitro-derived plants using ISSR markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 88(5): 631-637.
- Finnegan, EJ; Peacock, WJ; Dennis, ES. 1996. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(16):8449-8454.
- Fulnecek, J; Kovarik, A. 2014. How to interpret Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) profiles? *BMC Genetics* 15(1):2.
- Gao, W; Li, S; Li, Z; Huang, Y; Deng, C; Lu, L. 2014. Detection of genome DNA methylation change in spinach induced by 5-azaC. *Molecular and Cellular Probes* 28(4):163-166.
- Godwin, ID; Aitken, EA; Smith, LW. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18(9):1524-1528.

- Gómez, J. 2011. Inducción in vitro de callo de *Hylocereus* sp. y análisis de color. Tesis de Maestría. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 75 p.
- Griffin, PT; Niederhuth, CE; Schmitz, RJ. 2016. A Comparative analysis of 5-azacytidine- and zebularine-Induced DNA demethylation. *G3: Genes|Genomes|Genetics* 6(9):2773-2780.
- Grimaldo-Juárez, O; Terrazas, T; García-Velásquez, A; Cruz-Villagas, M; Poce-Medina, J.F. 2007. Morphometric analysis of 21 pitahaya (*Hylocereus undatus*) genotypes. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 9: 99-117.
- Hernández-Hernández, T; Hernández, HM; De-Nova, JA; Puente, R; Eguiarte, LE; Magallon, S. 2011. Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American Journal of Botany* 98(1):44-61.
- Herrera, JC; D'Hont, A; Lashermes, P. 2007. Use of fluorescence in situ hybridization as a tool for introgression analysis and chromosome identification in coffee (*Coffea arabica* L.) *Genome* 50(7): 619-626.
- Herrera-Martínez, V; Ríos-Hernández, L; Garcidueñas-Piña, C; Lara-Ibarra, A; Adabache-Ortiz, A; Soria-Guerra, RE; Pérez-Molphe-Balch, E; Morales-Domínguez, JF. 2015. Effect of culture conditions on stomatal density and stomatal index in four cactus species. *Haseltonia* 20:43-50.
- Hua, Q; Chen, P; Liu, W; Ma, Y; Liang, R; Wang, L; Wang, Z; Hu, G; Qin, Y. 2015. A protocol for rapid in vitro propagation of genetically diverse pitaya. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120(2):741-745.
- Ikeuchi, M; Sugimoto, K; Iwase, A. 2013. Plant callus: Mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell* 25(9):3159-3173.
- Jones, PA. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics* 13(7):484.
- Junqueira, KP; Faleiro, FG; Bellon, G; Junqueira, NTV; Fonseca, KGd; Lima, CA; Santos, ECd. 2010. Variabilidade genética de acessos de pitaya com diferentes níveis de produção por meio de marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura* 32:840-846.
- Kaepler, SM; Kaepler, HF; Rhee, Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43(2-3):179-188.

- Kankel, MW; Ramsey, DE; Stokes, TL; Flowers, SK; Haag, JR; Jeddeloh, JA; Riddle, NC; Verbsky, ML; Richards, EJ. 2003. Arabidopsis MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* 163(3):1109-1122.
- Khattab, S; El Sherif, F; El-Garhy, HA; Ahmed, S; Ibrahim, A. 2013. Genetic and phytochemical analysis of the in vitro regenerated *Pilosocereus robinii* by ISSR, SDS-PAGE and HPLC. *Gene* 14(13):026.
- Krishna, H; Alizadeh, M; Singh, D; Singh, U; Chauhan, N; Eftekhari, M; Sadh, RK. 2016. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement (en línea). *3 Biotech* 6(1):54. Consultado el 7 ene. 2018. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0389-7>.
- Le Bellec, F; Vaillant, F; Imbert, E. 2006. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. *Fruits* 61(04): 237-250.
- Lê, S; Josse, J; Husson, F. 2008. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software* 25(1):1-18.
- Li, R; Qu, R; Bruneau, A; Livingston, D. 2010. Selection for freezing tolerance in St. Augustine grass through somaclonal variation and germplasm evaluation. *Plant Breeding* 129(4):417-421.
- Li, W; Liu, H; Cheng, ZJ; Su, YH; Han, HN; Zhang, Y; Zhang, XS. 2011. DNA Methylation and histone modifications regulate de novo shoot regeneration in *Arabidopsis* by modulating WUSCHEL expression and auxin signaling (en línea). *PLoS Genetics* 7(8). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3158056/>
- Li, S-B; Xie, Z-Z; Hu, C-G; Zhang, J-Z. 2016. A review of auxin response factors (ARFs) in plants (en línea). *Frontiers in Plant Science* 7. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00047>.
- Linacero, R; Rueda, J; Esquivel, E; Bellido, A; Domingo, A; Vazquez, AM. 2011. Genetic and epigenetic relationship in rye, *Secale cereale* L., somaclonal variation within somatic embryo-derived plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 47(5):618-628.
- Loik, ME. 2008. The effect of cactus spines on light interception and Photosystem II for three sympatric species of *Opuntia* from the Mojave Desert. *Physiologia Plantarum* 134(1):87-98.

- Loyola-Vargas, V; Ochoa-Alejo, N. 2012. An Introduction to Plant Cell Culture: The Future Ahead. In Loyola-Vargas, VM; Ochoa-Alejo, N. eds. 2012. Plant Cell Culture Protocols. HumanaPress. p. 1. 1-8 p.
- Malda, G; Backhaus, RA; Martin, C. 1999. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of in vitro cultured cactus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58(1):1-9.
- Mauseth, JD. 2006. Structure-function relationships in highly modified shoots of Cactaceae. *Annals of Botany* 98(5):901-926.
- Menezes, MOT; Taylor, NP; Zappi, DC; Loiola, MIB. 2015. Spines and ribs of *Pilosocereus arrabidaei* (Lem.) Byles & G.D. Rowley and allies (Cactaceae): Ecologic or genetic traits? *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 214:44-49.
- Miguel, C; Marum, L. 2011. An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany* 62(11):3713-3725.
- Mohamed-Yaseen, Y. 2002. Micropropagation of pitaya (*Hylocereus untatus* Britton et Rose). In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 38(5): 427-429.
- Morton, J. 1987. Strawberry pear. *Fruits of warm climates*. Miami, FL: 347-348.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3):473-497.
- Neelakandan, AK; Wang, K. 2012. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Reports* 31(4):597-620.
- Néjia, Z; Badra, B; Manel, K; Abdelwahed, G. 2012. Genetic stability of long-term micropropagated *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. plantlets as assessed by molecular tools: Perspectives for *in vitro* conservation. *Industrial Crops & Products* 36:59-64.
- Nerd, A; Mizrahi, Y. 1997. Reproductive biology of cactus fruit crops. *Horticultural Reviews* 18:321-346.
- Ortiz-Hernández, YD; Carrillo-Salazar, JA. 2012. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a short review. *Comunicata Scientiae* 3(4):220-237.
- Park, SY; Murthy, HN; Chakrabarthy, D; Paek, KY. 2009. Detection of epigenetic variation in tissue-culture-derived plants of *Doritaenopsis* by methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 45(1):104-108

- Peharec, P; Posilović, H; Balen, B; Krsnik-Rasol, M. 2010. Spine micromorphology of normal and hyperhydric *Mammillaria gracilis* Pfeiff. (Cactaceae) shoots. *Journal of Microscopy* 239(1):78-86.
- Pistelli, L; Iacona, C; Miano, D; Cirilli, M; Colao, MC; Mensuali-Sodi, A; Muleo, R. 2012. Novel *Prunus* rootstock somaclonal variants with divergent ability to tolerate waterlogging. *Tree Physiology* 32(3):355-368.
- Pratta, G; Zorzoli, R; Picardi, LA. 2000. Multivariate analysis as a tool for measuring the stability of morphometric traits in *Lycopersicon* plants from in vitro culture. *Genetics and Molecular Biology* 23(2):479-483.
- Reinerio-Benega, G; Bert, S; Tel-Zur, N. 2009a. Androgenesis in the vine cacti *Selenicereus* and *Hylocereus* (Cactaceae). *Plant Cell, Tissue & Organ Culture* 96(2):191
- Reinerio-Benega, G; Aroldo, C; Bert, S; Tel-Zur, N. 2009b. Gynogenesis in the vine cacti *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Cell Reports* 28(5):719.
- Rivard, SR; Cappadocia, M; Vincent, G; Brisson, N; Landry, BS. 1989. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses of plants produced by in vitro anther culture of *Solanum chacoense* Bitt. *Theoretical and Applied Genetics* 78(1):49-56.
- Rodriguez-Enriquez, J; Dickinson, HG; Grant-Downton, RT. 2011. MicroRNA misregulation: an overlooked factor generating somaclonal variation? *Trends in Plant Science* 16(5):242-248.
- Sánchez-Chiang, N; Jiménez, VM. 2009. Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agronomía Mesoamericana* 20(1):135-151.
- Schindelin, J; Arganda-Carreras, I; Frise, E; Kaynig, V; Longair, M; Pietzsch, T; Preibisch, S; Rueden, C; Saalfeld, S; Schmid, B; Tinevez, J-Y; White, DJ; Hartenstein, V; Eliceiri, K; Tomancak, P; Cardona, A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9(7):676-682
- Shishkova, S; García-Mendoza, E; Castillo-Díaz, V; Moreno, NE; Arellano, J; Dubrovsky, JG. 2007. Regeneration of roots from callus reveals stability of the developmental program for determinate root growth in Sonoran Desert Cactaceae. *Plant Cell Reports* 26(5):547-557.
- Smulders, MJM; de Klerk, GJM. 2011. Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation* 63(2):137-146.

- Stelpflug, SC; Eichten, SR; Hermanson, PJ; Springer, NM; Kaeppler, SM. 2014. Consistent and heritable alterations of DNA methylation are induced by tissue culture in maize. *Genetics* 198(1): 209-218.
- Stewart, C; Via, L. 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques* 14(5):748-750.
- Sugimoto, K; Jiao, Y; Meyerowitz, EM. 2010. Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Developmental Cell* 18(3):463-471.
- Tao, J; Qiao, G; Wen, X-P; Gao, G-L; Liu, T; Peng, Z-J; Cai, Y-Q; Chen, N; Yan, F-X; Zhang, B-X. 2014. Characterization of genetic relationship of dragon fruit accessions (*Hylocereus* spp.) by morphological traits and ISSR markers. *Scientia Horticulturae* 170(0):82-88
- Tel-Zur, N; Dudai, M; Raveh, E; Mizrahi, Y. 2012. Selection of interspecific vine cacti hybrids (*Hylocereus* spp.) for self-compatibility. *Plant Breeding* 131(5):681-685.
- Tiwari, JK; Saurabh, S; Chandel, P; Singh, BP; Bhardwaj, V. 2015. Assessment of genetic and epigenetic variations in potato somatic hybrids by methylation-sensitive ISSR and RAPD markers. *Bangladesh Journal of Botany* 44(1):45-50.
- Verma, P; Khan, SA; Mathur, AK; Srivastava, A; Shanker, K. 2015. Tryptophan metabolism and evaluation of morphological, biochemical and molecular variations in a field grown plant population derived via direct adventitious shoot bud regeneration from pre-plasmolysed leaves of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 123(2):357-375.
- Viñas, M. 2011. Aislamiento, purificación y cultivo de protoplastos viables de pitahaya (*Hylocereus* sp. (Weber) Britton y Rose). Tesis de Maestría. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Universidad de Costa Rica.
- Viñas, M; Fernández-Brenes, M; Azofeifa, A; Jiménez, V.M. 2012. In vitro propagation of purple pitahaya (*Hylocereus costaricensis* [F.A.C. Weber] Britton & Rose) cv. Cebra. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 48(5):469-477.
- Vogt, G. 2015. Stochastic developmental variation, an epigenetic source of phenotypic diversity with far-reaching biological consequences. *Journal of Biosciences* 40(1):159-204.
- Wang, QM; Wang, L. 2012. An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. *Plant Cell Reports* 31(9):1535-1547.
- Wang, S; Tran, EJ. 2013. Unexpected functions of lncRNAs in gene regulation. *Communicative & Integrative Biology* 6(6):e27610.

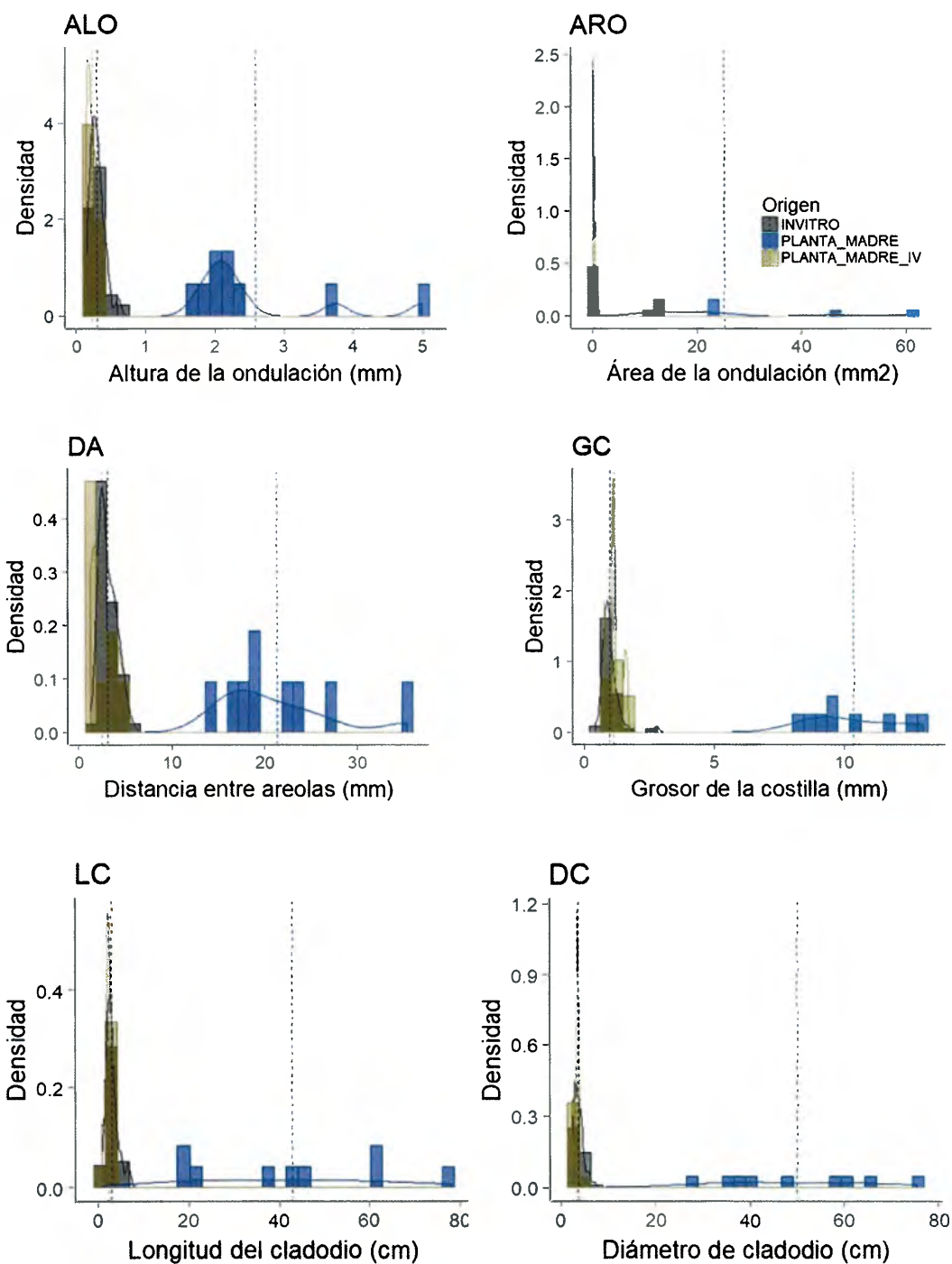
- Wang, Y; Lin, X; Dong, B; Wang, Y; Liu, B. 2004. DNA methylation polymorphism in a set of elite rice cultivars and its possible contribution to inter-cultivar differential gene expression. *Cellular & Molecular Biology Letters* 9(3):543-556.
- Wej, T; Simko, V. 2017. R package "corrplot": visualization of a correlation matrix (version 0.84). Disponible en <https://github.com/taiyun/corrplot>
- Yadav, RK; Perales, M; Gruel, J; Girke, T; Jönsson, H; Reddy, GV. 2011. WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. *Genes & Development* 25(19):2025-2030
- Yang, Z; Yang, X; Huang, D. 1998. Studies on somaclonal variants for resistance to scab in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) through in vitro selection for tolerance to deoxynivalenol. *Euphytica* 101(2):213-219.
- Zhao, X; Jia, E; Yang, W; Dong, Y; Liu, B. 2006. DNA methylation polymorphism in a set of elite maize inbred lines revealed by methylation-sensitive ISSR analysis. *Cereal Research Communications* 34(2/3):879-886.

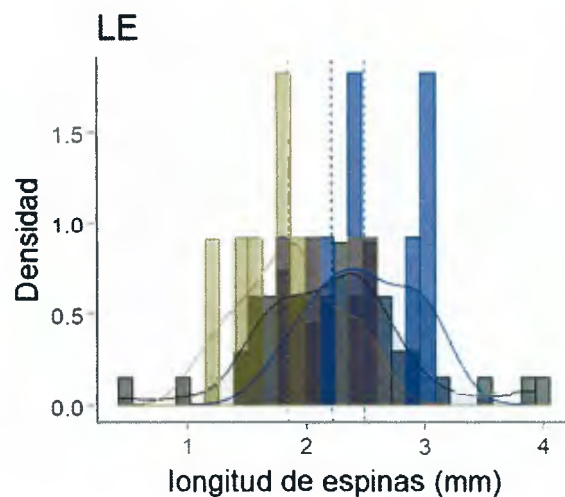
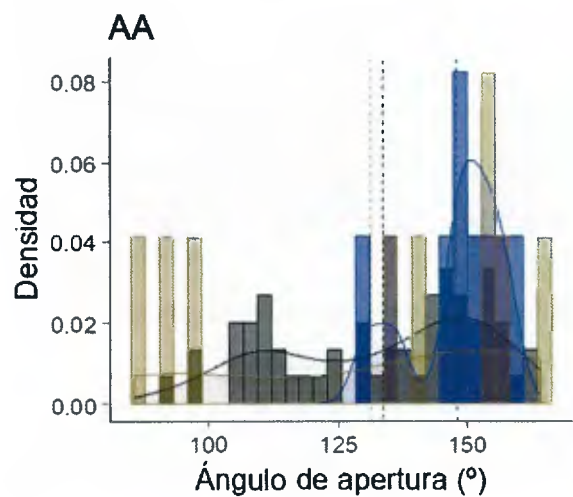
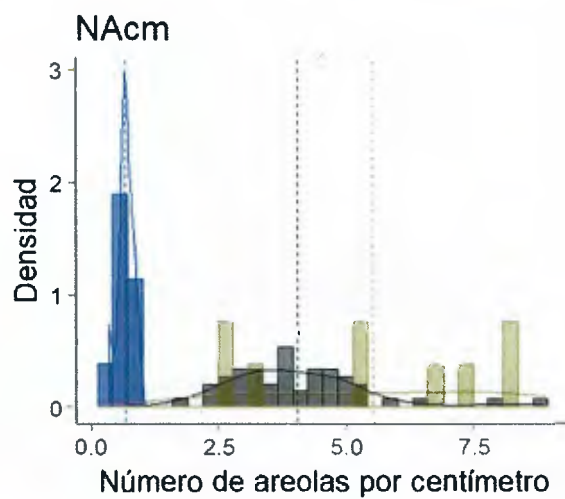
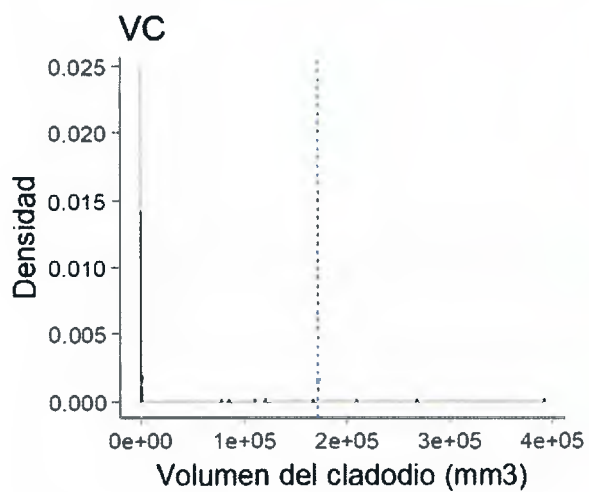
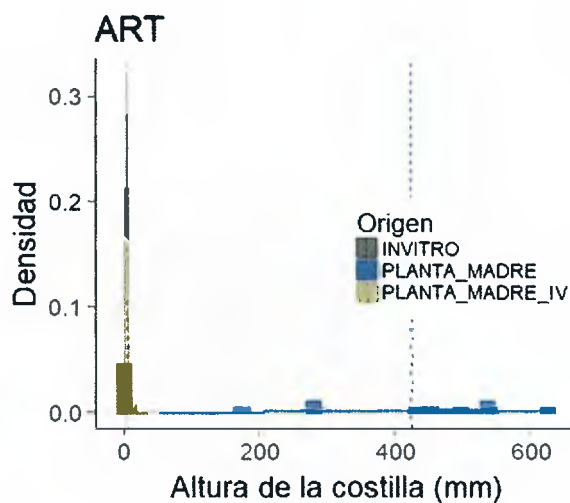
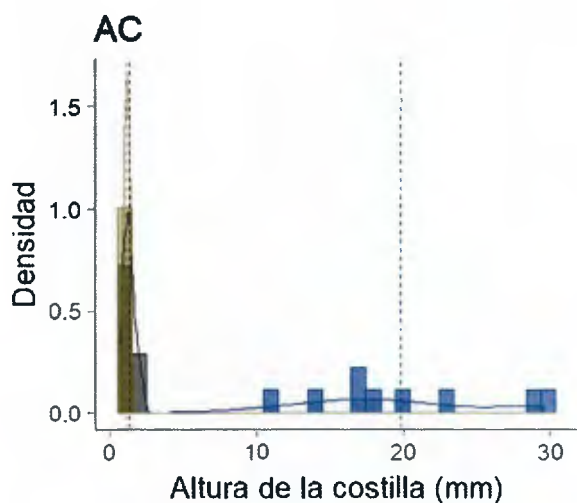
Anexos

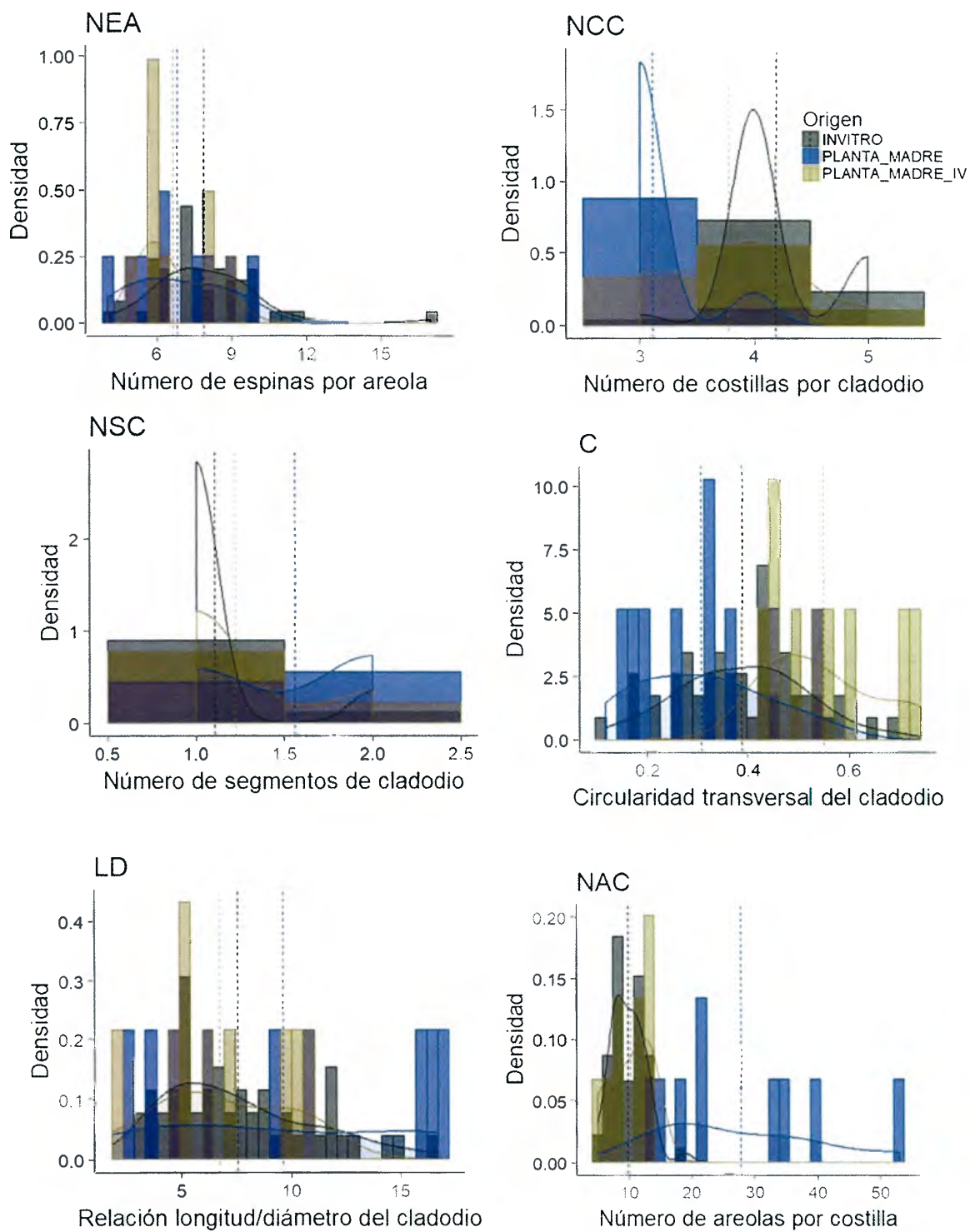
Anexo 1. Cuantificación de la concentración y calidad del ADN utilizado en este estudio.

Id	Origen	Variiedad	Conc. ADN (ng/ μ L)	A260/A230	A260/A280
C2	Regeneración directa	Cebra	168	2,793	2,061
C3	Regeneración directa	Cebra	274	1,801	2,056
C4	Regeneración directa	Cebra	396	1,006	1,939
C5	Regeneración directa	Cebra	205	2	2,03
C6	Regeneración directa	Cebra	251	2,525	2,061
C7	Regeneración directa	Cebra	194		3,833
C8	Regeneración directa	Cebra	412	1,393	1,988
CM	Planta madre invernadero	Cebra	465	2,429	2,045
CMi	Planta madre <i>in vitro</i>	Cebra	361	2,384	2,071
O11	Regeneración directa	Orejona	293	2,15	2,067
O12	Regeneración directa	Orejona	144	2,021	2,079
O13	Regeneración directa	Orejona	238	2,069	2,57
O2	Regeneración directa	Orejona	638	1,538	2,002
O5	Regeneración directa	Orejona	350	1,747	2,041
O6	Regeneración directa	Orejona	359	10,8	2,507
O7	Regeneración directa	Orejona	156	2,066	2,039
O8	Regeneración directa	Orejona	201		2,59
OA1	Ensayo 5-azac (Testigo)	Orejona	840	4,494	2,072
OA2	Ensayo 5-azac (Testigo)	Orejona	166	2,982	2,101
OA3	Ensayo 5-azac (Testigo)	Orejona	908	3,661	2,089
OA4	Ensayo 5-azac (100 μ M)	Orejona	262	2,467	2,071
OA5	Ensayo 5-azac (100 μ M)	Orejona	221	2,38	2,051
OA6	Ensayo 5-azac (100 μ M)	Orejona	438	2,042	2,061
OC1	Callo	Orejona	148	2,233	2,062
OC2	Callo	Orejona	362	2,554	2,068
OC3	Callo	Orejona	427	2,322	2,055
OM	Planta madre invernadero	Orejona	160	1,37	2,013
OMi	Planta madre <i>in vitro</i>	Orejona	93,4	2,984	2,066
S1	Regeneración directa	San Ignacio	495	1,669	2,035
S2	Regeneración directa	San Ignacio	281	1,702	2,055
S3	Regeneración directa	San Ignacio	182	1,555	2,005
S5	Regeneración directa	San Ignacio	519	2,534	2,105
SA1	Ensayo 5-azac (Testigo)	San Ignacio	1937	2,956	2,094
SA2	Ensayo 5-azac (Testigo)	San Ignacio	1400	3,102	2,039
SA3	Ensayo 5-azac (Testigo)	San Ignacio	1364	3,14	2,051
SA4	Ensayo 5-azac (100 μ M)	San Ignacio	875	2,098	1,911
SA5	Ensayo 5-azac (100 μ M)	San Ignacio	559	2,228	2,072
SA6	Ensayo 5-azac (100 μ M)	San Ignacio	607	2,202	2,037
SC1	Callo	San Ignacio	1296	3,069	1,993
SC2	Callo	San Ignacio	879	4,519	2,06
SC3	Callo	San Ignacio	658	6,159	2,053
SM	Planta madre invernadero	San Ignacio	104	1,62	1,85
SMi	Planta madre <i>in vitro</i>	San Ignacio	210	2,281	2,927

Anexo 2. Histogramas de densidad de todas las variables morfológicas, tomando en cuenta los valores aportados por las plantas madre en invernadero, plantas madre *in vitro* y las poblaciones clonales (primera comparación) agrupando a los tres variedades (San Ignacio, Orejona y Cebra) de plantas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) analizadas en este estudio.







Anexo 3. Eigenvalores y correlación de variables con la dimensión 1 y 2, producto del análisis de componentes principales al comparar entre plantas madre en invernadero y plantas *in vitro* (primera comparación).

Dimensión	Eigenvalor	Proporción de la varianza	Proporción de la varianza acumulada
1	2,36	0,39	0,39
2	1,68	0,28	0,67
3	0,97	0,16	0,84
4	0,52	0,09	0,92
5	0,32	0,05	0,98
6	0,14	0,02	1

Variables	Dimensión 1	Dimensión 2
AA	0,62	0,33
C	-0,08	-0,66
LE	0,85	0,34
NEA	0,91	0,03
NCC	0,6	-0,67
NSC	-0,24	0,74

Anexo 4. Análisis estadísticos primera comparación.**Análisis de la varianza**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
C	72	0,34	0,30	28,82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,46	4	0,12	8,71	<0,0001
Origen	0,28	2	0,14	10,50	0,0001
Genotipo	0,17	2	0,09	6,53	0,0026
Error	0,89	67	0,01		
Total	1,35	71			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,09206

Error: 0,0133 gl: 67

Origen	Medias n	E.E.	
PLANTA_MADRE	0,31	9	0,04 A
INVITRO	0,40	54	0,02 B
PLANTA MADRE IV	0,55	9	0,04 C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,06766**

Error: 0,0133 gl: 67

Genotipo	Medias n	E.E.	
CEBRA	0,36	25	0,03 A
OREJONA	0,40	29	0,03 A
SANIGNACIO	0,49	18	0,03 B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	Origen	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
NCC	INVITRO	56	4,20	0,48	4,00	19,02	<0,0001
NCC	PLANTA_MADRE	9	3,11	0,33	3,00		
NCC	PLANTA MADRE IV	9	3,78	0,67	4,00		

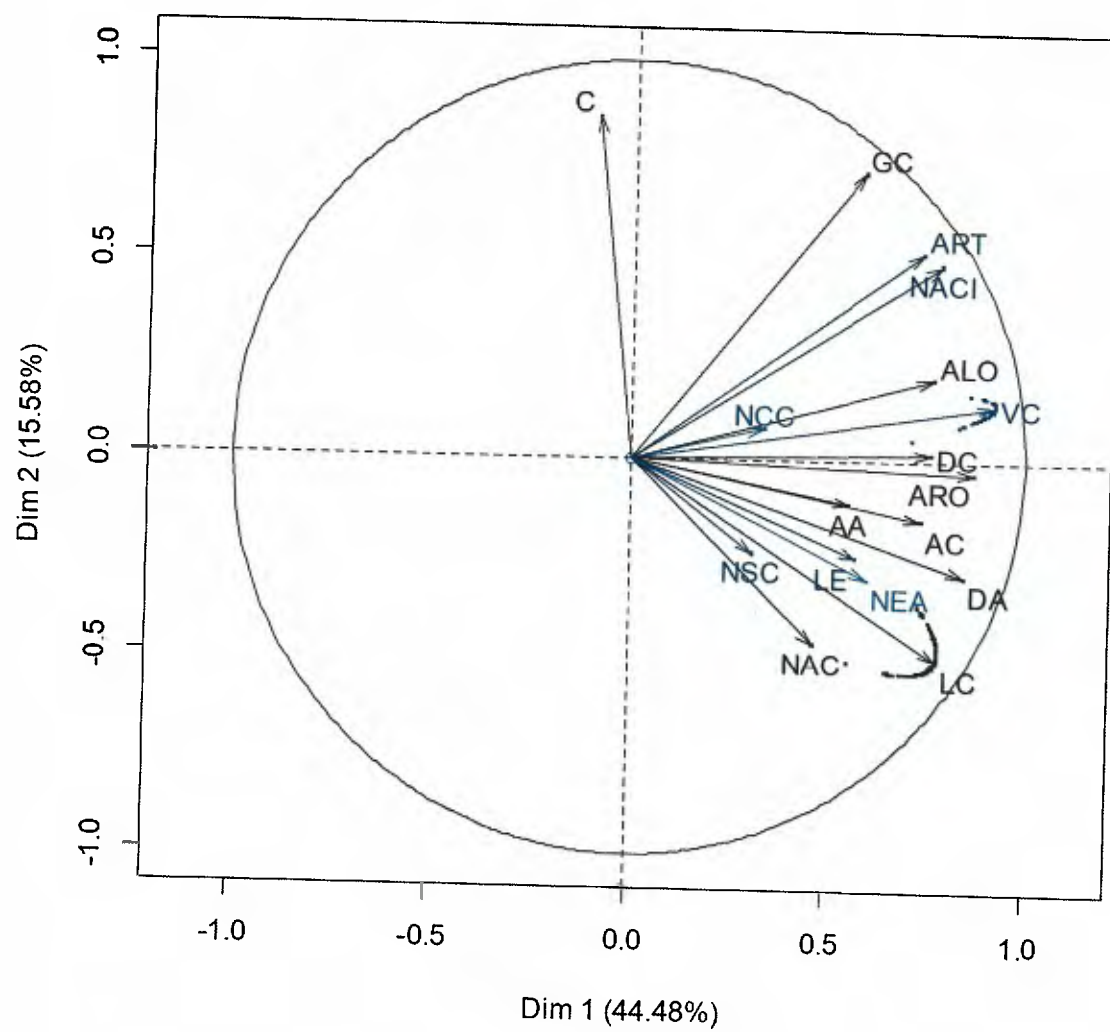
Trat.	Ranks	
PLANTA_MADRE	10,33	A
PLANTA_MADRE_IV	30,39	B
INVITRO	43,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Anexo 5. Eigenvalores, correlación de variables con la dimensión 1 y 2, y gráfico de valores permutados producto del análisis de componentes principales al comparar entre plantas *in vitro* (segunda comparación).

Dimensión	Eigenvalor	Proporción de la varianza	Proporción de la varianza acumulada
1	7.51	0.44	0.44
2	2.70	0.16	0.60
3	2.43	0.14	0.74
4	1.50	0.09	0.83
5	1.28	0.08	0.91
6	0.59	0.03	0.94
7	0.41	0.02	0.97
8	0.21	0.01	0.98
9	0.15	0.01	0.99
10	0.09	0.01	0.99
11	0.05	0	1
12	0.04	0	1
13	0.02	0	1
14	0.01	0	1
15	0	0	1
16	0	0	1
17	0	0	1

Variables	Dimensión 1	Dimensión 2
AA	0,53	-0,19
AC	0,73	-0,12
ALO	0,78	0,21
ARO	0,87	-0,05
ART	0,72	0,56
C	-0,15	0,84
DA	0,85	-0,31
DC	0,77	0,07
GC	0,57	0,75
LC	0,78	-0,5
LE	0,58	-0,25
NAC	0,48	-0,43
NACI	0,77	0,49
NCC	0,33	0,05
NEA	0,61	-0,3
N5C	0,29	-0,22
VC	0,92	0,17

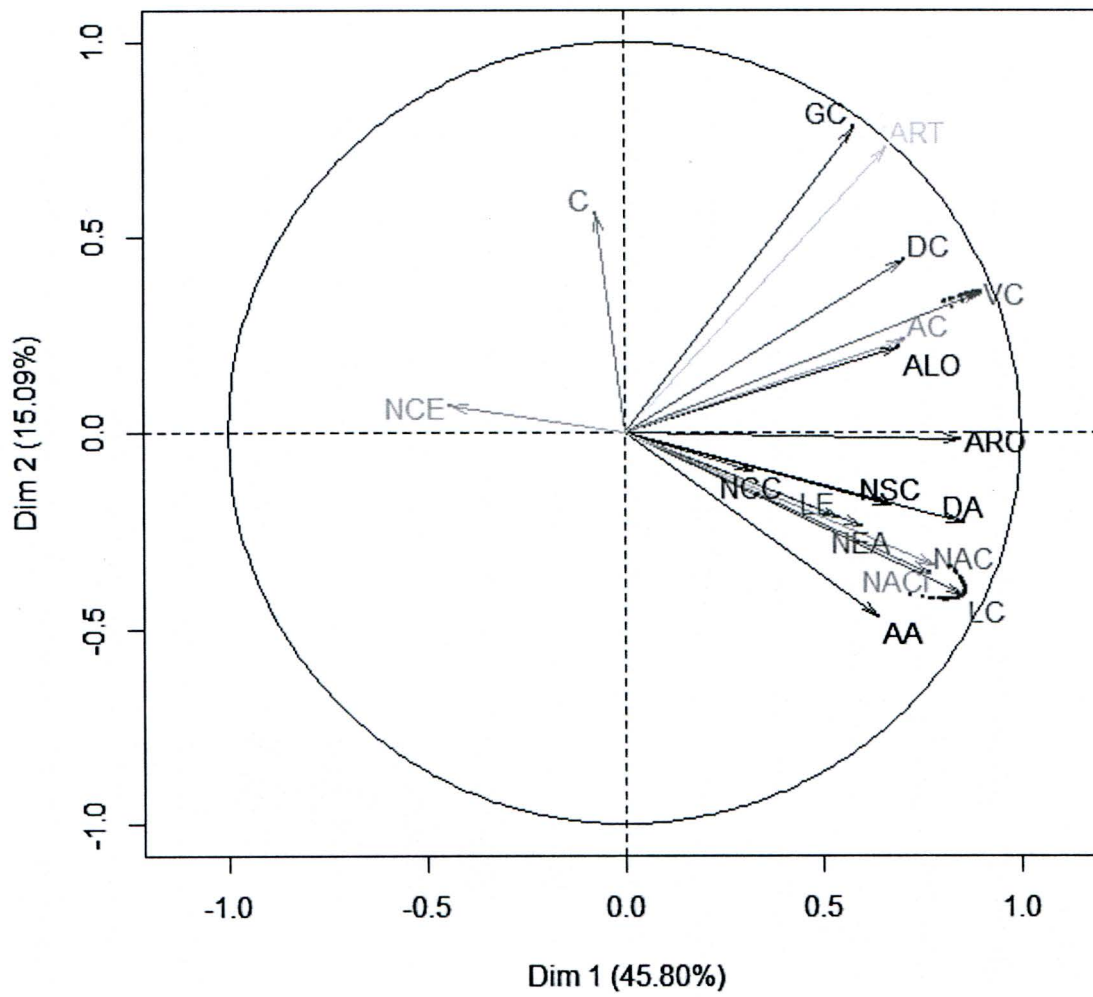


Anexo 6. Eigenvalores, correlación de variables con la dimensión 1 y 2, y gráfico de valores permutados producto del análisis de componentes principales al comparar entre plantas *in vitro* (tercera comparación).

Lambda	Valor	Proporción	Proporción de la varianza acumulada
1	8,17	0,45	0,45
2	2,82	0,16	0,61
3	2,53	0,14	0,75
4	1,78	0,1	0,85
5	1,04	0,06	0,91
6	0,49	0,03	0,93
7	0,47	0,03	0,96
8	0,3	0,02	0,98
9	0,19	0,01	0,99
10	0,1	0,01	0,99
11	0,06	3,60E-03	1
12	0,02	1,30E-03	1
13	0,01	7,10E-04	1
14	0,01	4,20E-04	1
15	0,01	3,20E-04	1
16	2,80E-04	1,50E-05	1
17	2,10E-05	1,20E-06	1
18	0	0	1

Variables	CP 1	CP 2
AA	0,63	-0,56
ALO	0,69	0,18
ARO	0,84	-0,03
DA	0,85	-0,22
LE	0,54	-0,23
GC	0,56	0,77
NEA	0,6	-0,23
NCC	0,3	-0,19
N5C	0,66	-0,16
NAC	0,79	-0,31
LC	0,86	-0,39
DC	0,71	0,5
AC	0,69	0,31
ART	0,64	0,75
VC	0,89	0,39
C	-0,13	0,47
NCE	-0,41	0,12
NACI	0,79	-0,33

Variable representation



Anexo 7. Análisis estadísticos de la segunda comparación

Análisis de la varianza

logVC

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
logVC	60	0,29	0,22	13,55

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,46	5	0,29	4,33	0,0022
Variedad	0,21	2	0,10	1,53	0,2252
Origen	0,06	1	0,06	0,95	0,3333
Variedad*Origen	0,20	2	0,10	1,49	0,2337
Error	3,64	54	0,07		
Total	5,09	59			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,20140

Error: 0,0673 gl: 54

Variedad	Medias	n	E.E.
O	1,77	23	0,08 A
S	1,93	15	0,08 A
C	1,96	22	0,08 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,18809

Error: 0,0673 gl: 54

Origen	Medias	n	E.E.
Mi	1,84	9	0,09 A
RD	1,93	51	0,04 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

logARO

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
logARO	65	0,52	0,48	31,96

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,26	5	0,45	12,62	<0,0001
Variedad	0,92	2	0,46	12,88	<0,0001
Origen	0,37	1	0,37	10,35	0,0021
Variedad*Origen	0,04	2	0,02	0,51	0,6022
Error	2,12	59	0,04		
Total	4,38	64			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,14262

Error: 0,0359 gl: 59

Variedad	Medias	n	E.E.
O	-0,87	27	0,06 A
S	-0,63	15	0,06 B
C	-0,45	23	0,06 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,13609

Error: 0,0359 gl: 59

Origen	Medias	n	E.E.
Mi	-0,76	9	0,06 A
RD	-0,54	56	0,03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

logLC

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
logLC	61	0,50	0,45	40,32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,23	5	0,25	10,83	<0,0001
Variedad	0,09	2	0,04	1,90	0,1597
Origen	0,09	1	0,09	3,87	0,0543
Variedad*Origen	0,23	2	0,12	5,06	0,0096
Error	1,25	55	0,02		
Total	2,49	60			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,11637

Error: 0,0228 gl: 55

Variedad	Medias	n	E.E.
O	0,27	23	0,05 A
5	0,34	15	0,05 A B
C	0,39	23	0,05 B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,10922**

Error: 0,0228 gl: 55

Origen	Medias	n	E.E.
Mi	0,28	9	0,05 A
RD	0,39	52	0,02 A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***logART**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
logART	63	0,04	0,00	45,29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,15	5	0,03	0,51	0,7662
Variedad	0,06	2	0,03	0,54	0,5834
Origen	0,01	1	0,01	0,11	0,7368
Variedad*Origen	1,3E-03	2	6,5E-04	0,01	0,9887
Error	3,25	57	0,06		
Total	3,40	62			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,18207

Error: 0,0570 gl: 57

Variedad	Medias	n	E.E.
O	0,48	26	0,07 A
C	0,57	22	0,07 A
5	0,58	15	0,08 A

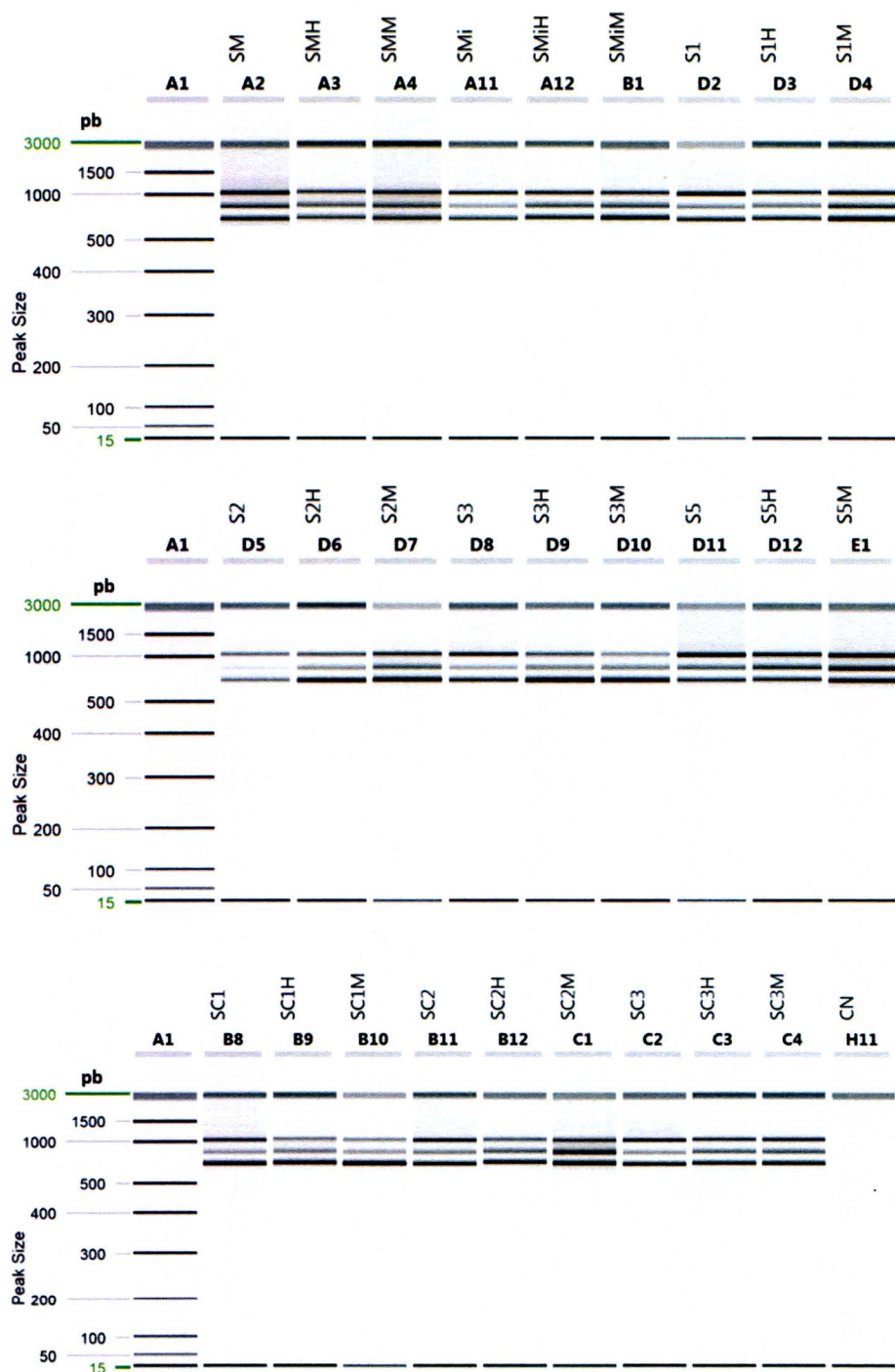
*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)***Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,17216**

Error: 0,0570 gl: 57

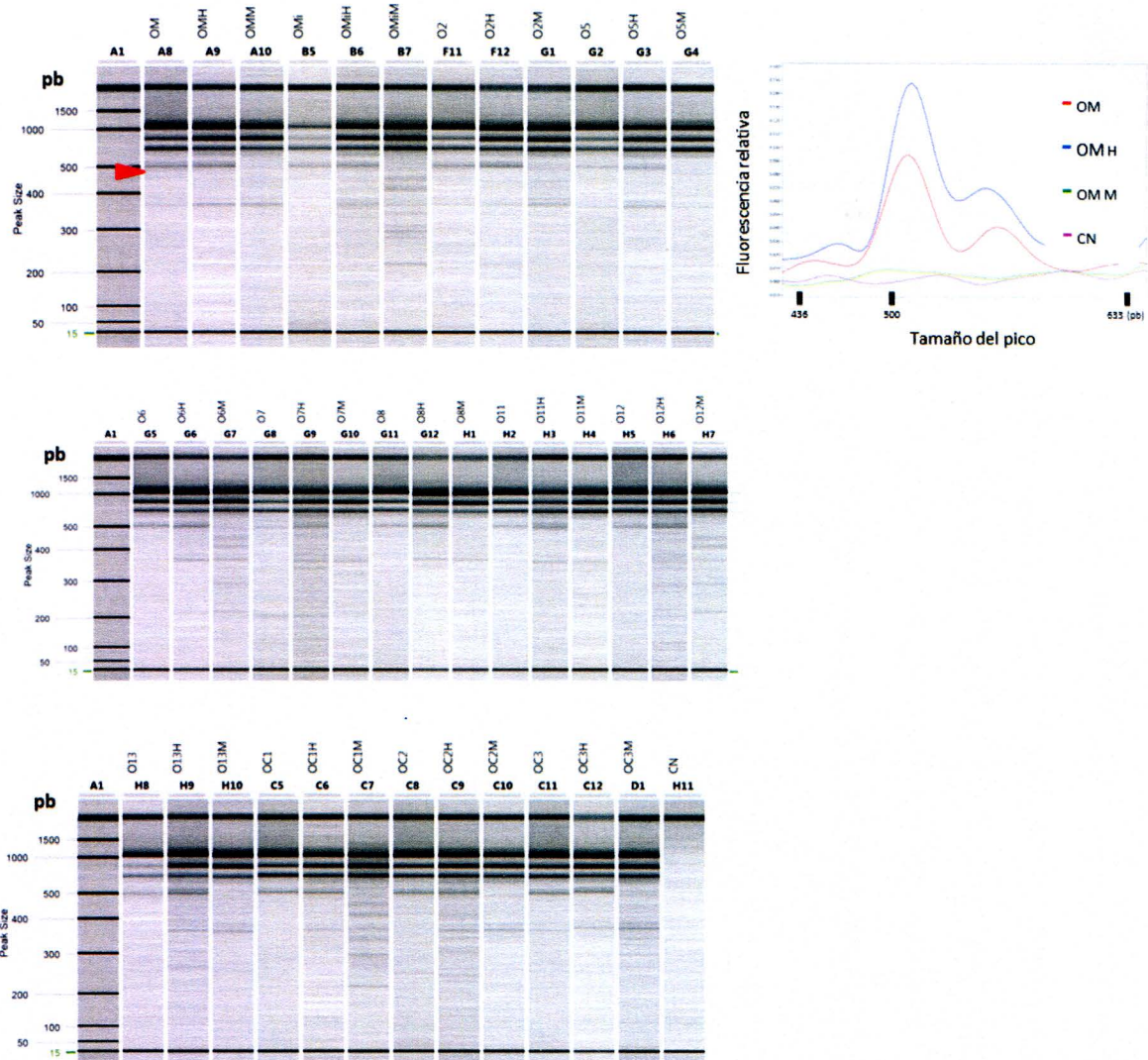
Origen	Medias	n	E.E.
RD	0,53	54	0,03 A
Mi	0,56	9	0,08 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

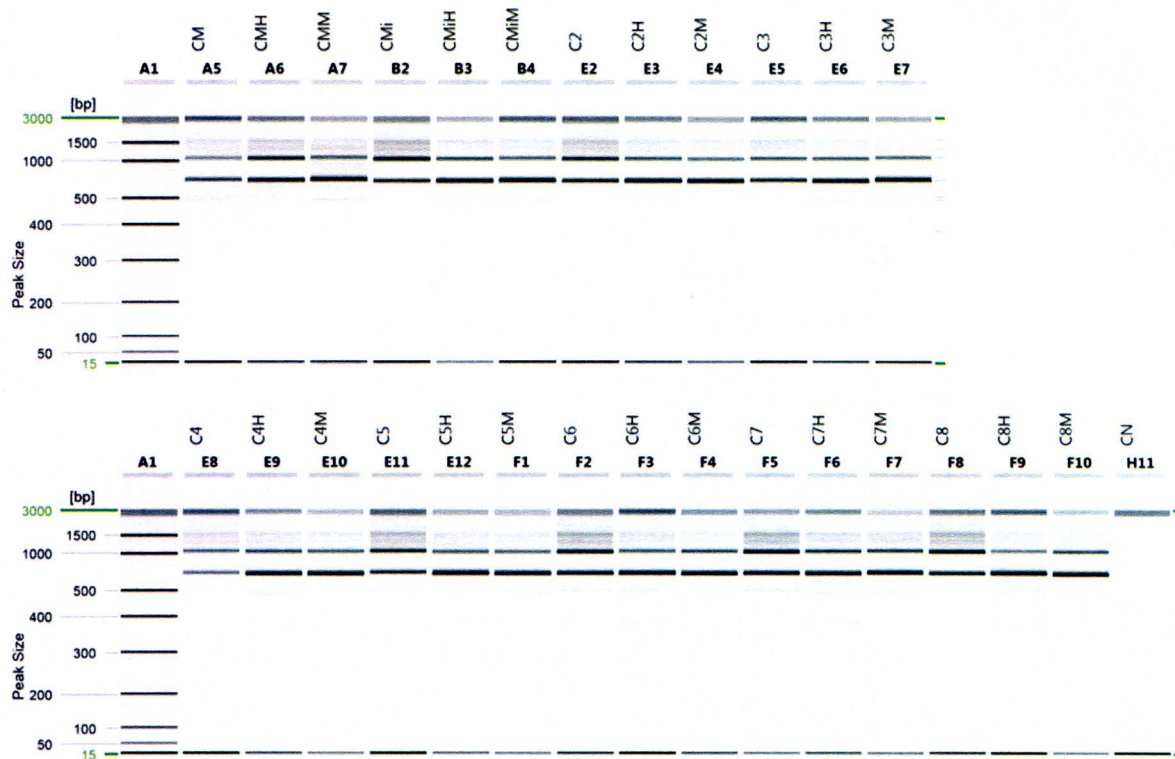
Anexo 8. Geles electrónicos de electroforesis capilar correspondiente a las muestras de ADN amplificadas con los imprimadores UBC 824, 825 y 856.



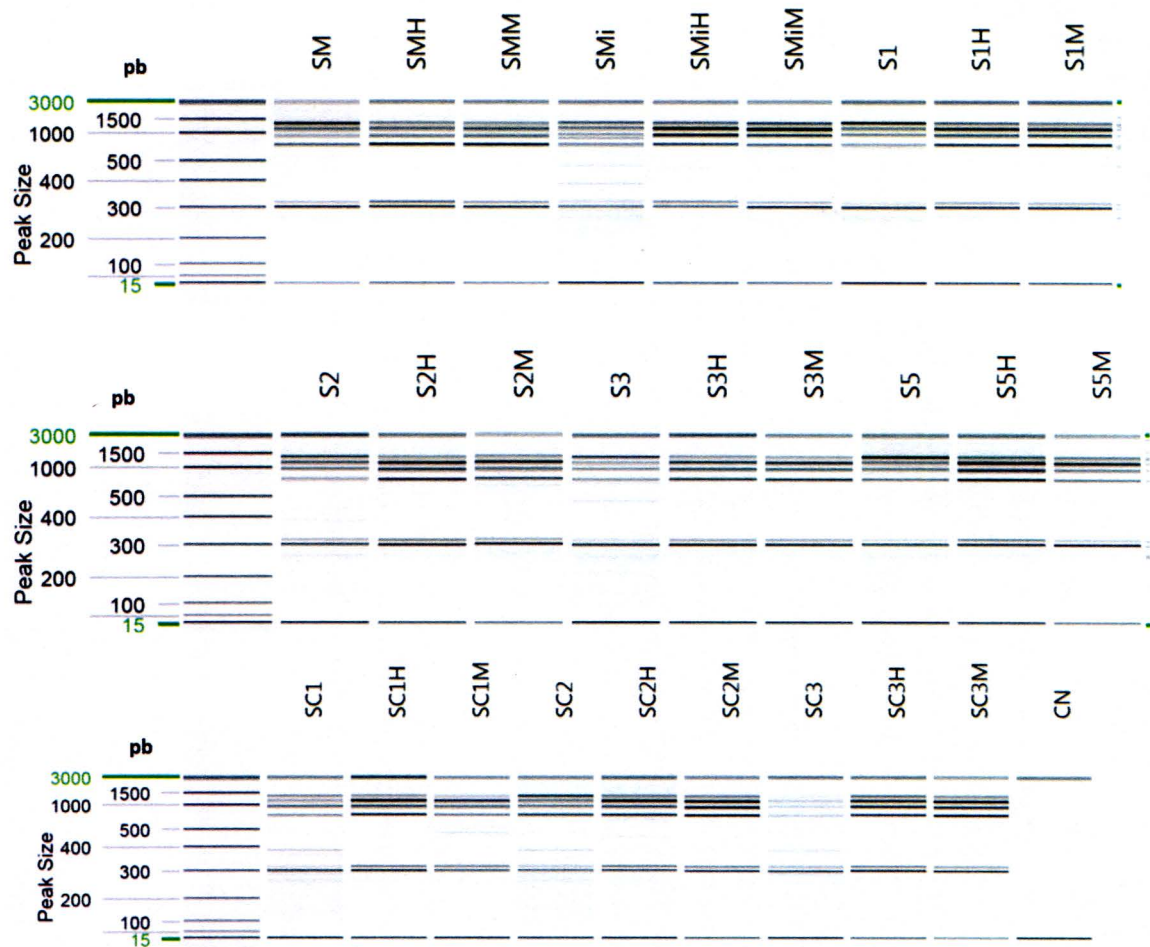
Anexo 8.1. Gel electrónico generado a partir de la corrida por medio de electroforesis capilar de productos de PCR, utilizando el imprimador UBC 824, con ADN de tejidos de *Hylocereus costaricensis*, variedad San Ignacio (S) de la planta madre (M), planta madre establecida *in vitro* sin reguladores de crecimiento (Mi), plantas regeneradas de forma directa (1, 2, 3 y 5), digeridos con las enzimas de restricción sensibles a metilación *Hpa* II (H) y *Msp* I (M), sin digerir, y el respectivo control negativo (CN). La primera columna de cada gel corresponde al marcador de peso molecular.



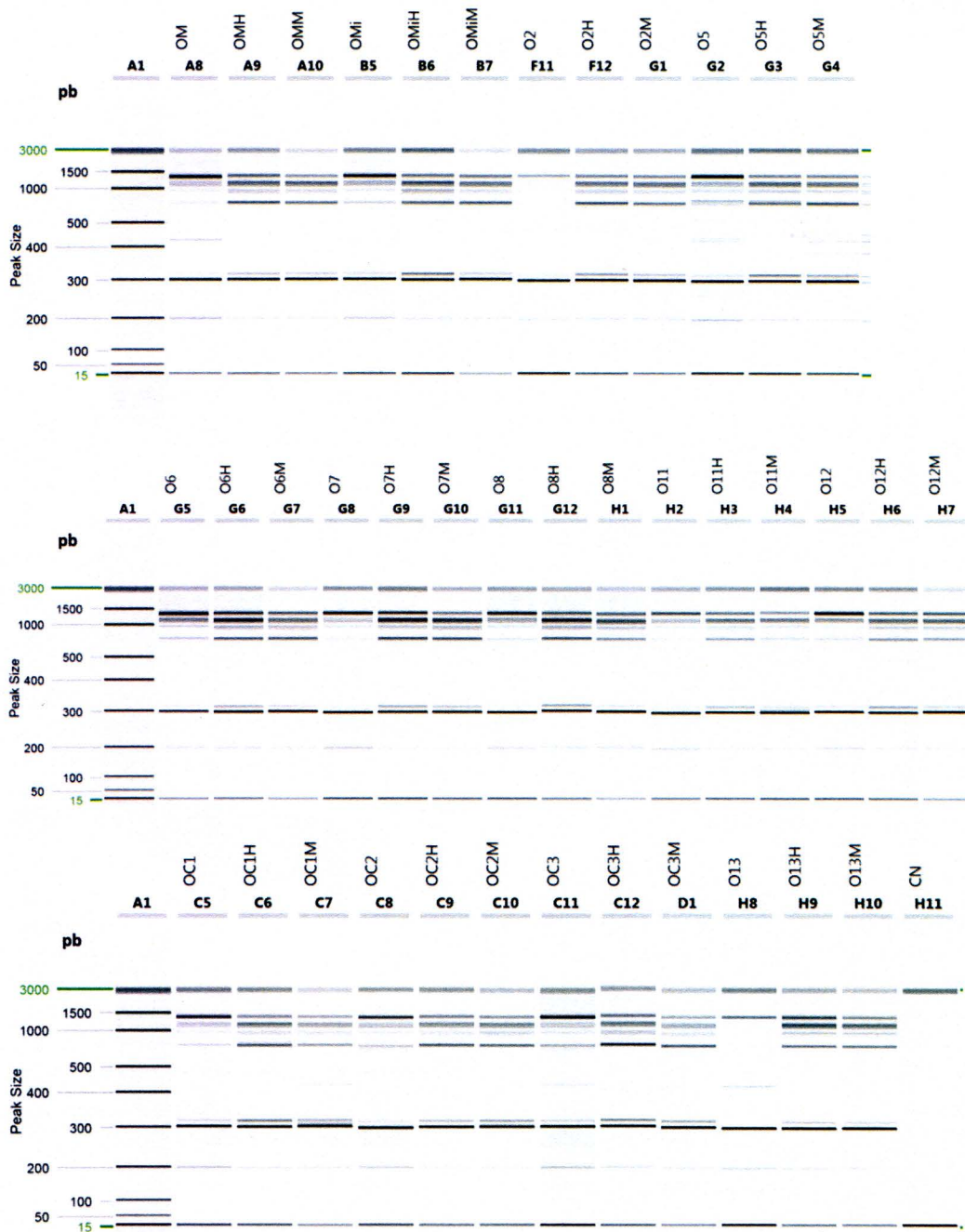
Anexo 8.2. Gel electrónico generado a partir de la corrida por medio de electroforesis capilar de productos de PCR, utilizando el imprimador UBC 824, con ADN de tejidos de *Hylocereus costaricensis*, variedad Orejona (O) de la planta madre (M), planta madre establecida *in vitro* sin reguladores de crecimiento (Mi), plantas regeneradas de forma directa (2, 5, 6, 7, 8, 11, 12 y 13) y callos (C1, C2 y C3), digeridos con las enzimas de restricción sensibles a metilación *Hpa* II (H) y *Msp* I (M), sin digerir, y el respectivo control negativo (CN). La primera columna de cada gel corresponde al marcador de peso molecular. Se incluyen electroferogramas de casos representativos de las bandas que resultaron polimórficas (señaladas en el gel con un triángulo) luego de la digestión con las enzimas de restricción.



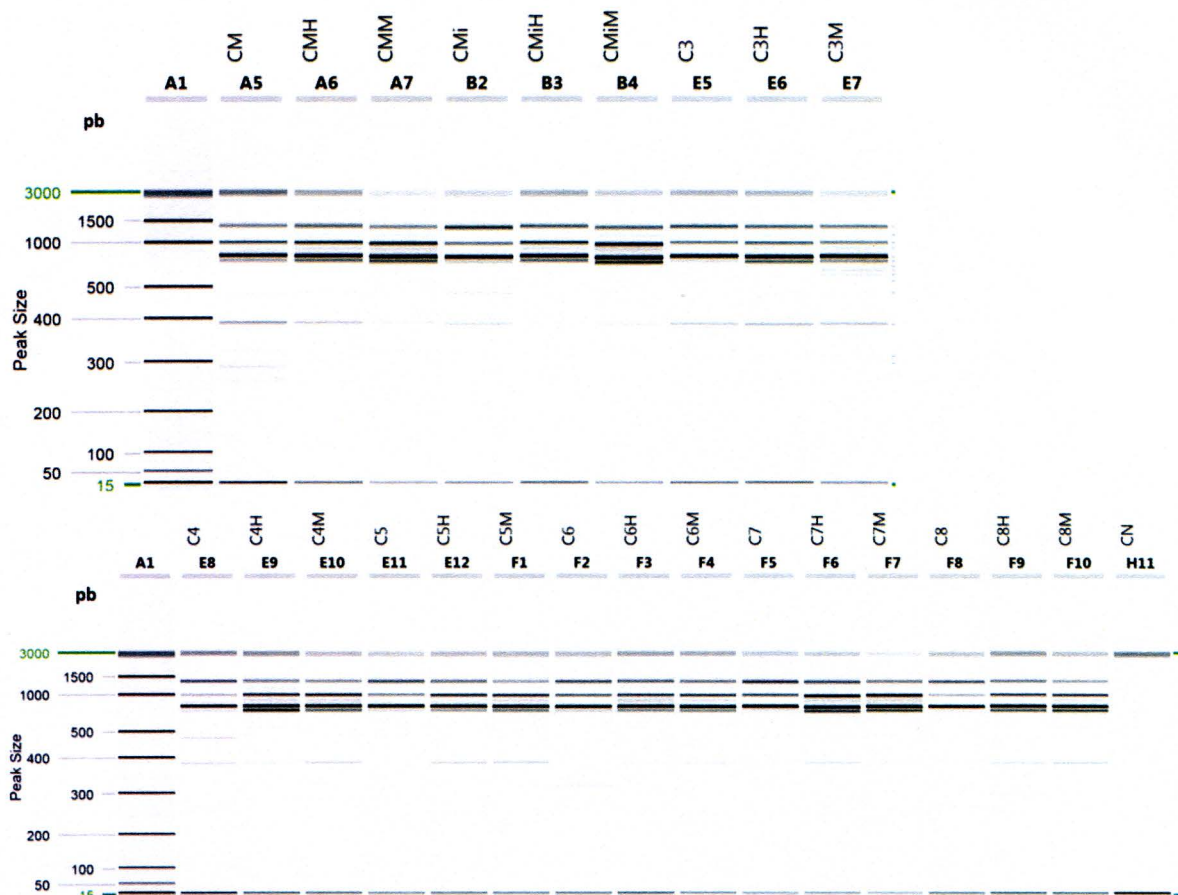
Anexo 8.3. Gel electrónico generado a partir de la corrida por medio de electroforesis capilar de productos de PCR, utilizando el imprimador UBC 824, con ADN de tejidos de *Hylocereus costaricensis*, genotipo Cebra (C) de la planta madre (M), planta madre establecida *in vitro* sin reguladores de crecimiento (Mi), plantas regeneradas de forma directa (2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8), digeridos con las enzimas de restricción sensibles a metilación *Hpa* II (H) y *Msp* I (M), sin digerir, y el respectivo control negativo (CN). La primera columna de cada gel corresponde al marcador de peso molecular.



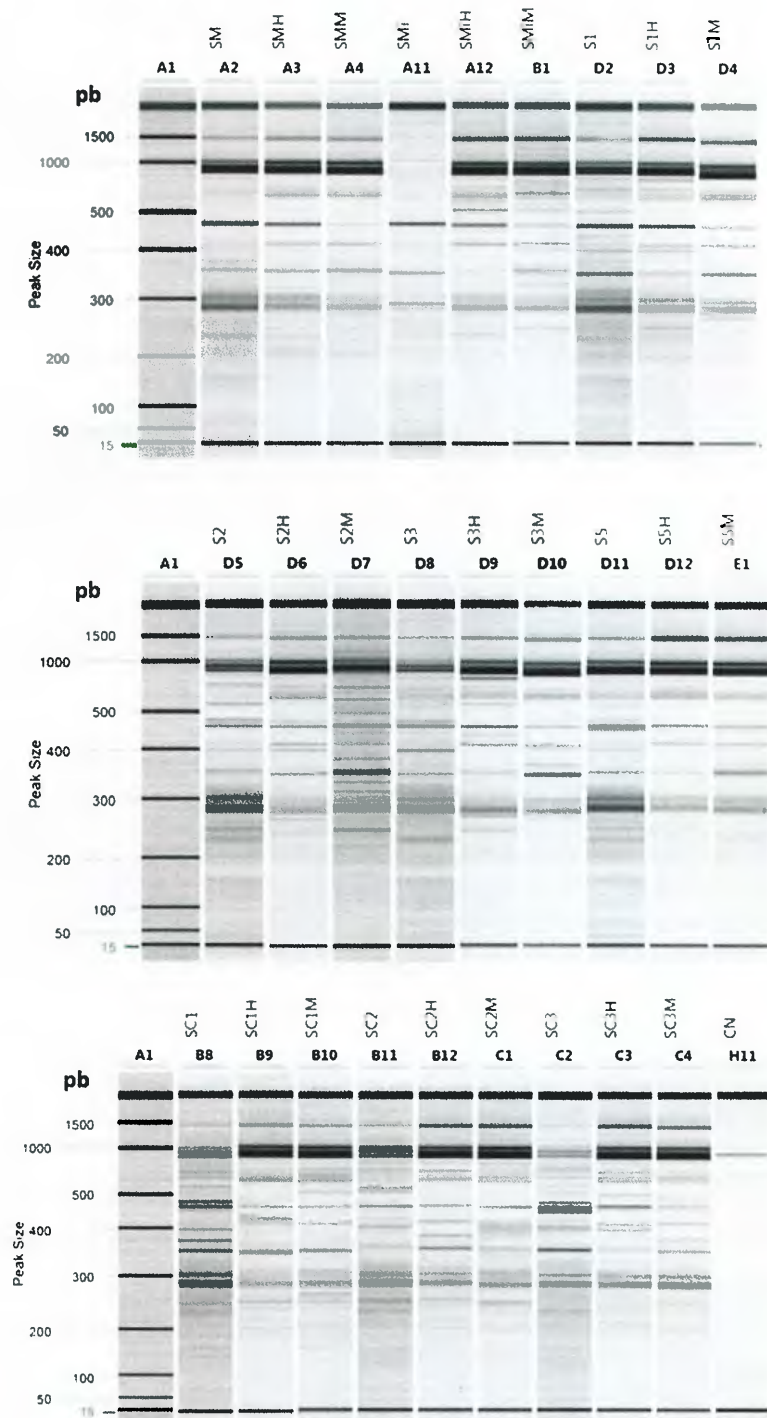
Anexo 8.4. Gel electrónico generado a partir de la corrida por medio de electroforesis capilar de productos de PCR, utilizando el imprimador UBC 825, con ADN de tejidos de *Hylocereus costaricensis*, variedad San Ignacio (S) de la planta madre (M), planta madre establecida *in vitro* sin reguladores de crecimiento (Mi), plantas regeneradas de forma directa (1, 2, 3 y 5), digeridos con las enzimas de restricción sensibles a metilación *Hpa* II (H) y *Msp* I (M), sin digerir, y el respectivo control negativo (CN). La primera columna de cada gel corresponde al marcador de peso molecular.



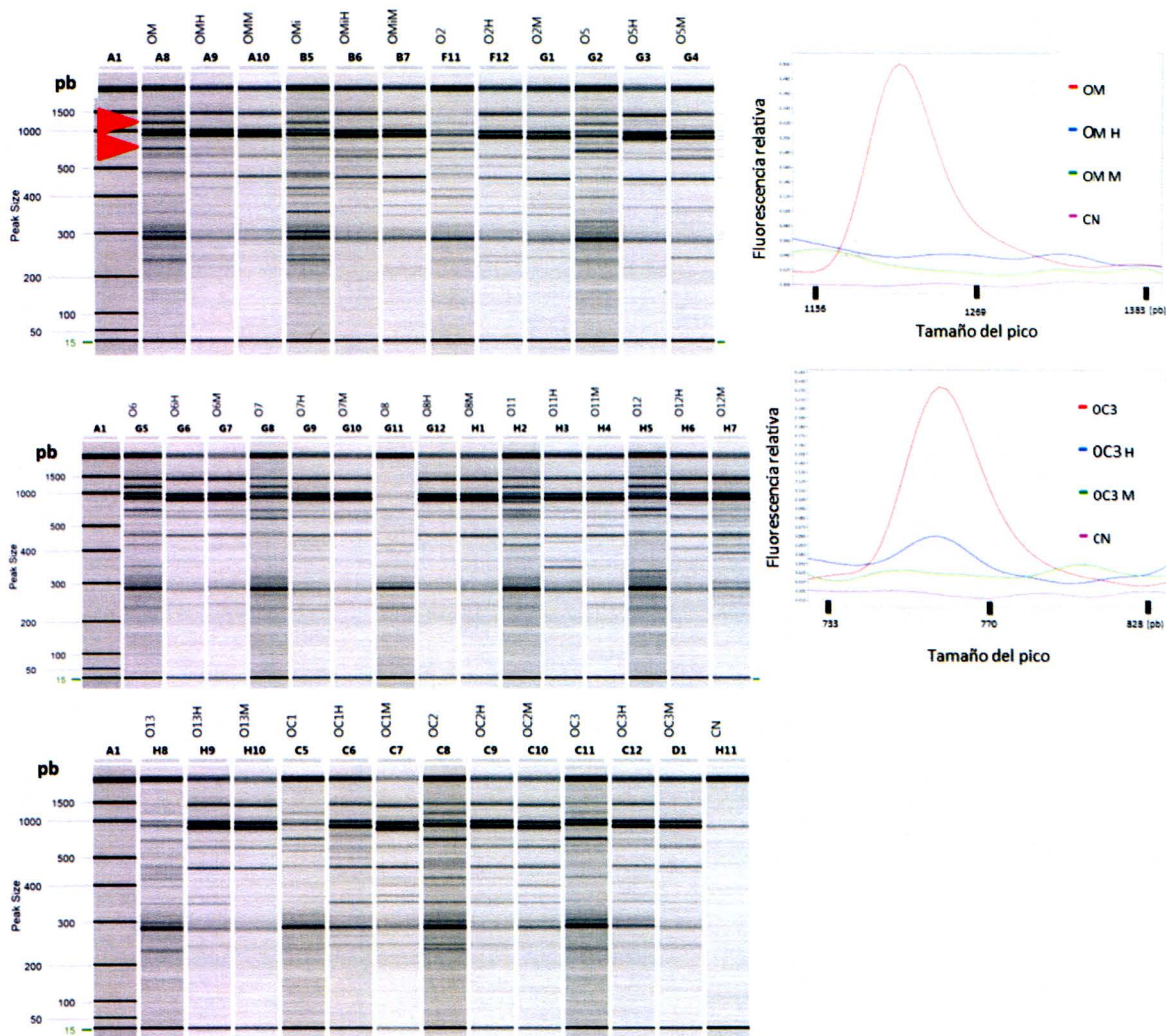
Anexo 8.5. Gel electrónico generado a partir de la corrida por medio de electroforesis capilar de productos de PCR, utilizando el imprimador UBC 825, con ADN de tejidos de *Hylocereus costaricensis*, variedad Orejona (O) de la planta madre (M), planta madre establecida *in vitro* sin reguladores de crecimiento (Mi), plantas regeneradas de forma directa (2, 5, 6, 7, 8, 11, 12 y 13) y callos (C1, C2 y C3), digeridos con las enzimas de restricción sensibles a metilación *Hpa* II (H) y *Msp* I (M), sin digerir, y el respectivo control negativo (CN). La primera columna de cada gel corresponde al marcador de peso molecular. Se incluyen electroferogramas de casos representativos de las bandas que resultaron polimórficas (señaladas en el gel con un triángulo) luego de la digestión con las enzimas de restricción.



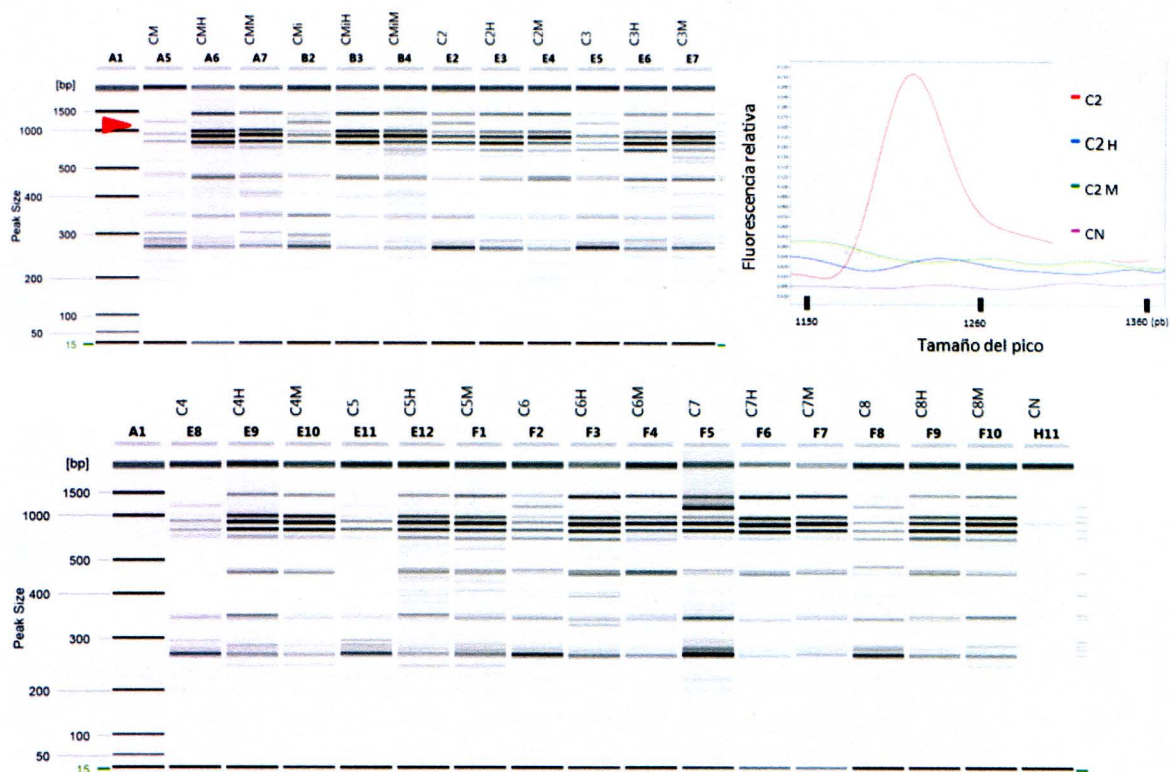
Anexo 8.6. Gel electrónico generado a partir de la corrida por medio de electroforesis capilar de productos de PCR, utilizando el imprimador UBC 825, con ADN de tejidos de *Hylocereus costaricensis*, genotipo Cebrá (C) de la planta madre (M), planta madre establecida *in vitro* sin reguladores de crecimiento (Mi), plantas regeneradas de forma directa (2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8), digeridos con las enzimas de restricción sensibles a metilación *Hpa* II (H) y *Msp* I (M), sin digerir, y el respectivo control negativo (CN). La primera columna de cada gel corresponde al marcador de peso molecular.



Anexo 8.7. Gel electrónico generado a partir de la corrida por medio de electroforesis capilar de productos de PCR, utilizando el imprimador UBC 856, con ADN de tejidos de *Hylocereus costaricensis*, variedad San Ignacio (S) de la planta madre (M), planta madre establecida *in vitro* sin reguladores de crecimiento (Mi), plantas regeneradas de forma directa (1, 2, 3 y 5), digeridos con las enzimas de restricción sensibles a metilación *Hpa* II (H) y *Msp* I (M), sin digerir, y el respectivo control negativo (CN). La primera columna de cada gel corresponde al marcador de peso molecular.



Anexo 8.8 Gel electrónico generado a partir de la corrida por medio de electroforesis capilar de productos de PCR, utilizando el imprimador UBC 856, con ADN de tejidos de *Hylocereus costaricensis*, variedad Orejona (O) de la planta madre (M), planta madre establecida *in vitro* sin reguladores de crecimiento (Mi), plantas regeneradas de forma directa (2, 5, 6, 7, 8, 11, 12 y 13) y callos (C1, C2 y C3), digeridos con las enzimas de restricción sensibles a metilación *Hpa* II (H) y *Msp* I (M), sin digerir, y el respectivo control negativo (CN). La primera columna de cada gel corresponde al marcador de peso molecular. Se incluyen electroferogramas de casos representativos de las bandas que resultaron polimórficas (señaladas en el gel con un triángulo) luego de la digestión con las enzimas de restricción.



Anexo 8.9. Gel electrónico generado a partir de la corrida por medio de electroforesis capilar de productos de PCR, utilizando el imprimador UBC 856, con ADN de tejidos de *Hylocereus costaricensis*, genotipo Cebra (C) de la planta madre (M), planta madre establecida *in vitro* sin reguladores de crecimiento (Mi), plantas regeneradas de forma directa (2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8), digeridos con las enzimas de restricción sensibles a metilación *Hpa* II (H) y *Msp* I (M), sin digerir, y el respectivo control negativo (CN). La primera columna de cada gel corresponde al marcador de peso molecular. Se incluyen electroferogramas de casos representativos de las bandas que resultaron polimórficas (señaladas en el gel con un triángulo) luego de la digestión con las enzimas de restricción.

Anexo 9. Análisis estadístico de comparación de medias de niveles de metilación total en muestras tratadas con 5-azacitidina.

Análisis de la varianza: explantes de la variedad San Ignacio tratados con 5-azacitidina.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Metilacion	6	0,67	0,58	13,46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	526,41	1	526,41	7,97	0,0477
Tratamiento	526,41	1	526,41	7,97	0,0477
Error	264,25	4	66,06		
Total	790,65	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=18,42554

Error: 66,0617 gl: 4

Tratamiento	Medias n	E.E.
S(5-azac)	51,00 3	4,69 A
S(T)	69,73 3	4,69 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de la varianza: explantes de la variedad Orejona tratados con 5-azacitidina.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Metilacion	6	0,05	0,00	23,80

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	10,94	1	10,94	0,22	0,6613
Tratamiento	10,94	1	10,94	0,22	0,6613
Error	196,01	4	49,00		
Total	206,95	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DM5=15,86931

Error: 49,0033 gl: 4

Tratamiento	Medias n	E.E.
O(5-azac)	28,07 3	4,04 A
O(T)	30,77 3	4,04 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de la varianza: nivel de metilación en plantas sometidas al proceso de regeneración directa y callos de la variedad San Ignacio.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Metilacion	12	0,88	0,83	14,32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4889,40	3	1629,80	18,75	0,0006
Tratamiento	4889,40	3	1629,80	18,75	0,0006
Error	695,32	8	86,92		
Total	5584,72	11			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=17,55342

Error: 86,9150 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.
SC	40,30	3	5,38
SRD	59,43	3	5,38
SM	64,17	3	5,38
SMi	96,43	3	5,38

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de la varianza: nivel de metilación en plantas sometidas al proceso de regeneración directa y callos de la variedad Orejona.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Metilacion	12	0,25	0,00	28,10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	594,34	3	198,11	0,90	0,4807
Tratamiento	594,34	3	198,11	0,90	0,4807
Error	1753,64	8	219,21		
Total	2347,98	11			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=27,87659

Error: 219,2050 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.
OM	44,07	3	8,55
ORD	47,43	3	8,55
OC	59,33	3	8,55
OMi	59,90	3	8,55

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de la varianza: nivel de metilación en plantas sometidas al proceso de regeneración directa de la variedad Cebra

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Metilacion	9	0,50	0,33	29,93

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2544,54	2	1272,27	2,95	0,1280
Tratamiento	2544,54	2	1272,27	2,95	0,1280
Error	2584,93	6	430,82		
Total	5129,46	8			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=41,46876

Error: 430,8211 gl: 6

Tratamiento	Medias	n	E.E.
CRD	47,63	3	11,98 A
CM	71,80	3	11,98 A
CMi	88,60	3	11,98 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 10. Imagen tomada células luego del proceso de extracción en puntas de raíz de *Hylocereus costaricensis* cultivado *in vitro*.

