

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SEDE GUANACASTE  
CARRERA DESCONCENTRADA DE AGRONOMÍA

Evaluación de tres protocolos de desinfección para micropropagación de variedades de pitahaya (*Hylocereus* sp.) presentes en la Región Chorotega, Costa Rica

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO CON  
EL GRADO DE LICENCIADO EN AGRONOMÍA



Glenda Cordoncillo Alvarado


B42077

2022

Evaluación de tres protocolos de desinfección para micropropagación de variedades de pitahaya (*Hylocereus* sp.) presentes en la Región Chorotega, Costa Rica

Glenda Cordoncillo Alvarado

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO CON EL GRADO DE LICENCIADO EN AGRONOMÍA

  
M.Sc. Jacqueline Cerdas Solano

DIRECTORA DE TESIS

  
PhD. Alejandra Rodríguez Chaves

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

  
Lic. Edgar Vidal Vega Villalobos

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

  
M.Sc. Jorge Claudio Vargas Rojas

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

  
Ing. Glenda Cordoncillo Alvarado

SUSTENTANTE

## **Agradecimientos**

Primeramente, a Dios por protegerme en este periodo de estudio, por ayudarme a superar obstáculos y dificultades durante este proyecto personal y profesional.

A la Universidad de Costa Rica, Sede Guanacaste por permitirme concluir mi etapa como estudiante.

A mi directora de tesis y coordinadora de carrera M.Sc. Jacqueline Cerdas Solano, por su dedicación y apoyo durante todo el desarrollo de esta investigación. Agradezco cada uno de sus consejos tanto profesionales como personales.

A M.Sc. Claudio Vargas Rojas, por su aporte y apoyo en esta investigación.

A los profesores, PhD. Alejandra Rodríguez Chaves y Ing. Edgar Vidal Vega Villalobos, por sus consejos y aportes a este trabajo.

A mi Luis, por ser esa persona que siempre me apoya incondicionalmente, gracias por confiar en mí más de lo que yo misma lo hago.

A mi familia por ser ese motor que me motiva cada día a superarme.

A Robin Salguera Alvarado y Felipe Avendaño Castro por todo el apoyo brindado en estos años.

A mi amiga Isabel Marín Sánchez por estar siempre presente brindándome su apoyo incondicionalmente.

A todos y todas

¡Gracias!

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a Dios por permitirme cumplir mis metas y lograr un éxito más en mi vida personal y profesional.

A mi madre, mujer fuerte y valiente que me dio la oportunidad de soñar, gracias a ella he logrado uno de mis sueños.

A mi padre y hermana por apoyarme, brindarme sus palabras de aliento y tenerme presente siempre en sus oraciones.

A Luis Felipe por acompañarme y soportarme en este arduo proceso, fue parte fundamental en el logro de esta investigación, sin él no hubiera podido.

## Tabla de contenido

Resumen.....	1
1. Introducción .....	3
2. Objetivos.....	6
2.1. Objetivo General .....	6
2.2. Objetivos específicos .....	6
3. Marco teórico.....	6
3.1. Generalidades del cultivo de pitahaya ( <i>Hylocereus</i> sp) .....	7
3.2. Taxonomía de la planta de pitahaya ( <i>Hylocereus</i> sp).....	8
3.3. Morfología de la planta de pitahaya ( <i>Hylocereus</i> sp) .....	8
3.3.1. Las raíces de <i>Hylocereus</i> sp .....	8
3.3.2. Tallos o cladodios de <i>Hylocereus</i> sp .....	9
3.3.3. La flor de <i>Hylocereus</i> sp .....	10
3.3.4. El fruto de <i>Hylocereus</i> sp.....	10
3.3.5. Las semillas de <i>Hylocereus</i> sp .....	11
3.4. Antecedentes .....	12
3.4.1. Trabajos de micropropagación de pitahaya en otros países .....	12
3.4.2. Trabajos de micropropagación de pitahaya en Costa Rica .....	13
3.5. Micropropagación.....	13
3.5.1. Micropropagación en cactáceas .....	15
3.6. Reguladores de crecimiento en micropropagación <i>in vitro</i> .....	17
3.6.1. Auxinas.....	19
3.6.2. Citoquininas.....	20
3.7. Formación de callos en explantes <i>in vitro</i> .....	21
3.8. La asepsia y condiciones controladas en el laboratorio de biotecnología.....	22

3.9.	Explantos descartados en el cultivo de tejidos .....	23
3.9.1.	Microorganismos contaminantes en el cultivo in vitro de tejidos .....	23
3.9.2.	Explantos descartados por contaminación por hongos .....	24
3.9.3.	Explantos descartados por contaminación bacteriana .....	25
3.10.	Explantos descartados por oxidación .....	25
4.	Metodología .....	26
4.1.	Localización del proyecto .....	26
4.2.	Selección del material vegetal en campo .....	27
4.3.	Preparación del material vegetal en campo .....	27
4.4.	Preparación en el laboratorio de los implementos y medio de cultivo .....	27
4.5.	Recolección del material vegetal en campo .....	28
4.6.	Tratamientos desinfectantes .....	29
4.7.	Subcultivos .....	32
5.	Diseño del experimento .....	33
5.1.	Variables evaluadas .....	33
5.2.	Análisis de datos .....	34
5.3.	Modelo estadístico .....	34
6.	Resultados .....	35
6.1.	Resultados de los explantes con reguladores de crecimiento en el medio de cultivo (subcultivo) .....	37
7.	Discusión .....	39
7.1.	Tratamientos desinfectantes .....	39
7.2.	Variables evaluadas .....	39
7.2.1.	Explantos sanos .....	39
7.2.2.	Explantos con daños .....	40

7.3. Subcultivos.....	46
7.3.1. Variables brote y raíz.....	46
7.3.2. Presencia de callos en los explantes.....	47
8. Conclusiones .....	50
9. Recomendaciones .....	51
10. Literatura citada.....	52
11. Anexos .....	59

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la pitahaya roja ( <i>Hylocereus undatus</i> ).....	8
Cuadro 2. Resumen de la clasificación de los principales reguladores de crecimiento vegetal.....	18
Cuadro 3. Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962). ....	28
Cuadro 4. Tratamientos con las respectivas concentraciones y tiempo de exposición de cada desinfectante. ....	30
Cuadro 5. Proporción de la variable sana para cada tratamiento. ....	35
Cuadro 6. Porcentajes de daño en explantes descartados debido a hongos, bacterias y oxidación. ....	36
Cuadro 7. Porcentaje de daños por hongos, bacterias y oxidación en los explantes trasplantados a un medio de cultivo con reguladores de crecimiento. ....	38
Cuadro 8. Medias de la proporción de callosidad formada en los explantes en cada tratamiento. ....	38

## Índice de figuras

Figura 1. Detalle de las areolas para las diferentes variedades de <i>Hylocereus</i> sp. (Méndez y Coello, 2016). ....	9
Figura 2. Partes de la flor de <i>Hylocereus</i> sp (Méndez y Coello, 2016).....	10
Figura 3. Fruto de <i>Hylocereus</i> sp. (Osuna-Enciso et al. 2016).....	11
Figura 4. Fruto de <i>Hylocereus</i> sp. cortado longitudinalmente donde se aprecian las semillas (Ricalde y Andrade, 2009).....	11
Figura 5. Explante de <i>Hylocereus</i> sp utilizado en el proyecto. ....	14
Figura 6. Areola de una cactácea (Ceroni y Castro, 2013). ....	16
Figura 7. Estructura química del 3-Ácido Indolacético (Alcantara et al. 2019). ....	20
Figura 8. Estructura química del 6-Bencilaminopurina (Jordán y Casaretto, 2006). ....	20
Figura 9. Callos en explantes de <i>Hylocereus</i> sp. ....	21
Figura 10. Callo formado en la zona radicular de una plántula de pitahaya obtenida de la germinación in vitro de semilla sexual (Suárez et al. 2014).....	22



Figura 11. Explantes descartados debido a contaminación por hongos. Explante contaminado por hongo (A) / Medio de cultivo contaminado por hongo (B) / Hongos en las paredes del frasco de micropropagación (C).....	24
Figura 12. Explantes descartados por contaminación por bacterias (A, B). .....	25
Figura 13. Explante de pitahaya descartado por necrosis.....	26
Figura 14. Planta de pitahaya ( <i>Hylocereus</i> sp), seleccionada como planta madre. ....	26
Figura 15. Recolección del material vegetal: Implementos utilizados durante la recolección de material vegetal (A) / Material vegetal empacado en la hielera para el transporte al Laboratorio de Biotecnología (B).....	29
Figura 16. Procedimiento de desinfección previo a la introducción a la cámara de flujo laminar: Cortes de las areolas y colocación en beakers numerados (A) / Material vegetal con agua y Tween 20 (B) / Aplicación de alcohol al material vegetal en diferentes concentraciones (C). .....	30
Figura 17. Siembra de explantes de pitahaya ( <i>Hylocereus</i> sp) con la técnica in vitro..	31
Figura 18. Explante descartado (dañado), debido a presencia de hongos en el frasco de micropropagación.....	40
Figura 19. Explantes contaminados por hongo. El explante estaba sano, pero se encontró presencia de hongo en el medio de cultivo (A) / Presencia de hongo en el explante y medio de cultivo (B) y (C).....	42
Figura 20. Explante descartado debido a contaminación por bacteria. ....	43
Figura 21. Explantes descartados por necrosis (oxidación). .....	44
Figura 22. Explante contaminado con hongo y bacteria por factor humano.....	45
Figura 23. Explante de pitahaya con brote (A) / Explante de pitahaya con raíz (B). ....	47
Figura 24. Explante con callo en el área donde se realizó el corte. ....	48

## Resumen

Se evaluaron diferentes concentraciones de desinfectantes con el objetivo de establecer un protocolo de desinfección para la introducción *in vitro* de variedades de pitahaya (*Hylocereus* sp), en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Costa Rica, Sede Guanacaste, cultivadas en invernadero en la Finca Experimental de Santa Cruz. Los desinfectantes evaluados fueron alcohol al 60, 65 y 70%, e hipoclorito de sodio al 1,5, 2,5 y 3%, con distintos tiempos de inmersión. Para la introducción *in vitro* se utilizó areolas (yemas) laterales de plantas madre de pitahaya tratadas en campo con Beltanol 50 SL. El medio de cultivo utilizado fue el de Murashige y Skoog (1962), y la evaluación se realizó 15 días después de la siembra. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones por tratamiento. Se evaluó la proporción de explantes sanos y dañados (por hongos, bacterias y oxidación). Para contrastar la hipótesis de igualdad de medias poblacionales entre los distintos tratamientos, se realizó para cada variable un análisis de varianza bajo el enfoque de modelos lineales generalizados mixtos con distribución Bernoulli y función de enlace logaritmo. Para las variables con diferencias significativas entre tratamientos se realizó una prueba de separación de medias con el procedimiento de la diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher con un nivel de significación ( $\alpha$ ) igual a 0,05. Después de los 15 días de cada siembra se realizaron subcultivos con los explantes sanos para cada tratamiento con el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), con los reguladores de crecimiento 6-Bencilaminopurina (BAP 0,5 mg L<sup>-1</sup>) y 3-Ácido Indolacético (AIA 0,3 mg L<sup>-1</sup>), (Zambrano et al. 2015). Se utilizó el mismo modelo estadístico anteriormente mencionado y las variables evaluadas fueron la proporción de explantes sanos y dañados, con brotes, raíces y callos. Para los tratamientos desinfectantes se determinó que, existen diferencias significativas entre los tratamientos, el protocolo de desinfección con alcohol al 70%, e hipoclorito de sodio al 3%, fue el que presentó mayor proporción de explantes sanos, asimismo, el tratamiento con mayor proporción de explantes

dañados fue el compuesto por las concentraciones de 60% de alcohol y 1,5% de hipoclorito de sodio.

## 1. Introducción

Las diferentes especies de cactus o suculentas son cada vez más importantes para la alimentación a nivel mundial; una de ellas es la pitahaya, con mayor frecuencia se observan nuevos estudios e información sobre sus cuidados y métodos de propagación en campo (Esquivel y Araya, 2012; Vaillant et al. 2005).

La mayor producción se puede encontrar principalmente en zonas con clima seco, debido a que resiste condiciones severas de estrés hídrico, pero en la actualidad se pueden encontrar distintas variaciones de formas, colores y adaptaciones a lo largo y ancho de todo el continente americano (Yuqing et al. 2015).

Los países con mayor producción de pitahaya a nivel mundial son Israel, México y Nicaragua, pero los países proveedores del continente americano son Nicaragua, que comercializa la variedad roja y Colombia que exporta principalmente la variedad amarilla y pequeños volúmenes de pitahaya roja, además de ser el pionero en la exportación de esta fruta y actualmente el principal proveedor de pitahaya amarilla. Otros países productores que sobresalen en producción son Guatemala y Ecuador (Molina et al. 2014).

En Costa Rica la siembra de pitahaya es escasa y en pequeña escala, debido a que su uso y consumo no era difundido entre los costarricenses y la poca que se producía tenía como mercado meta a la población de origen nicaragüense residente en el país, quienes catalogan al producto como tradicional (García y Quirós, 2010).

Sin embargo, en los últimos años se presentó un aumento de la producción, principalmente en las provincias de Puntarenas y Guanacaste (Garbanzo et al., 2019). Según Piña (2018), en Costa Rica hay 50 hectáreas de pitahaya sembradas con fines comerciales en los últimos 8 años, y estima que con un buen manejo se podría obtener hasta 20 Kg de pitahaya por cosecha en una hectárea, lo que equivale en ingresos de hasta 40 millones de

colones si se vende a 2000 colones el kilogramo, además, el autor menciona que la Promotora de comercio exterior afirma que la pitahaya es uno de los cinco productos con mayor potencial en el ámbito comercial a nivel mundial.

Con el aumento de la producción de pitahaya también se incrementó el consumo de fruta fresca o procesada como pulpa, además, se pueden encontrar en los supermercados, puestos de venta de frutas, puestos de mercados municipales, y en la creación de productos derivados como helados, yogurt y mermeladas, permitiendo aumentar los nichos de mercado y mejorar la economía de los productores o de las pequeñas empresas en nuestro país (Garbanzo et al. 2019; García y Quirós, 2010).

Sin embargo, en nuestro país el cultivo de pitahaya en condiciones de campo se ve afectado por factores bióticos y abióticos que favorecen la aparición de patologías que pueden dañar tanto el tallo como a los frutos; algunos de los principales patógenos que afectan a la pitahaya son *Fusarium oxysporum*, *Fusicoccum* sp. *Dothiorella* sp. *Curvularia lunata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora* sp. y *Alternaria* sp. (Chuang et al. 2012; Lan et al. 2012; Retana et al. 2018). “En la Finca Experimental de Santa Cruz las plantas de pitahaya presentan problemas con la bacteria *Erwinia carotovora*” (Vega, E. comunicación personal, 23 de junio de 2021).

Otro problema que presenta la producción de pitahaya es que generalmente se realiza por medio de la propagación asexual en campo por el método de esquejes (cladodios) que es el utilizado actualmente, pero pueden ser afectados por hongos en las partes donde se realizan los cortes del esqueje, debido a las condiciones ambientales como temperatura y humedad a las que estén expuestos. El segundo método de propagación es por semillas sexuales, es poco usado por productores debido a que su desarrollo es muy lento, las plantas tienden a degradarse y puede tardar hasta siete años para poder obtener frutos (Méndez y Coello, 2016), por ende, el establecimiento de un protocolo de micropropagación garantizaría la obtención de una amplia cantidad de material sano y en menor tiempo para los productores de la región.

Debido al aumento de la producción de pitahaya en el país, y el interés de parte de los productores y pequeñas empresas por incrementar la oferta de fruta fresca y productos derivados, es que surge la necesidad de implementar un protocolo de desinfección para micropropagación de las variedades de pitahaya de la Región Chorotega, y así obtener material libre de patógenos y de adecuada calidad con el fin de brindar información para futuros proyectos de investigación y establecimientos de bancos de germoplasma del cultivo en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad de Costa Rica, Sede Guanacaste, y que posteriormente se pueda ofrecer material libre de patógenos a los productores de la región.

Algunas de las ventajas con las que contarían los productores de la región es que esta técnica ofrece la rápida respuesta de las células *in vitro* ante pequeños cambios en su medio ambiente con respecto a las plantas crecidas por métodos tradicionales, se permiten realizar estudios en un tiempo menor y bajo condiciones controladas que con plantas cultivadas por métodos tradicionales, por ende, la plántula se ofrecería en un corto tiempo y libre de patógenos (Calva y Pérez, 2005; Twyman et al. 2003).

Además, varios autores recalcan que la alta producción es una característica de las plantas obtenidas por propagación *in vitro*, así como la disminución del uso de agroquímicos ya que las plantas sufren una menor incidencia de plagas y, por ende, también se disminuyen los costos de producción (Jiménez y Agramonte, 2013).

## 2. Objetivos

### 2.1. *Objetivo General*

Evaluar tres protocolos de desinfección para la introducción *in vitro* de variedades de pitahaya (*Hylocereus* sp.), de la Región Chorotega, Costa Rica.

### 2.2. *Objetivos específicos*

- Seleccionar la concentración de las fuentes desinfectantes que permitan la obtención de un mayor porcentaje de explantes libres de patógenos de *Hylocereus* sp. en la técnica de introducción *in vitro* en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad de Costa Rica, Sede Guanacaste.
- Cuantificar el porcentaje de explantes de *Hylocereus* sp. libres de patógenos introducidos por la técnica *in vitro* en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad de Costa Rica.
- Establecer mediante el análisis estadístico cuál de los protocolos de desinfección es el más favorable para la introducción de material vegetal de *Hylocereus* sp. *in vitro* en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad de Costa Rica, Sede Guanacaste.

## 3. Marco teórico

En varios países del mundo la producción y comercialización de pitahaya se ha hecho más atractiva; ya que la planta es resistente y soporta periodos de sequía, lo que le permite un mayor potencial económico para las zonas áridas (Ojeda et al. 2012).

El aumento de la pitahaya en el mercado nacional e internacional requiere un mayor esfuerzo en la investigación que conduzca a mejorar la eficiencia del proceso de propagación, y a la obtención masiva y homogénea

de material con tolerancia a agentes patógenos; así como establecer protocolos confiables, como base para programas de transformación de plantas por ingeniería genética a partir de genotipos seleccionados (Suárez et al. 2014).

En la actualidad existen métodos biotecnológicos como la industria de la micropropagación, que se utiliza en gran escala en varios países del mundo, en algunos casos puede desplazar los sistemas tradicionales de producción de plantas (Ojeda et al. 2012).

### 3.1. Generalidades del cultivo de pitahaya (*Hylocereus* sp)

La pitahaya es una planta perenne, trepadora, epífita y crece comúnmente en árboles y piedras, debido a que no puede sostenerse por sí misma. Dentro de la familia de cactus trepadores epífitos existen dos géneros, que son el *Hylocereus* y *Selenicereus*. El primero presenta varias especies como *H. undatus*, *H. polyrhizus*, *H. purpusii*, *H. ocmaponis*, *H. triangularis* y *H. costaricensis*, las cuales son conocidas como pitahayas rojas y son cultivadas principalmente en Centro América e Israel; la especie *H. undatus* es la más cultivada y estudiada porque presenta una amplia variación morfológica, fisiológica y genética; sin embargo, actualmente no se cuenta con suficientes descripciones que permitan ayudar al reconocimiento de especies del género *Hylocereus* (Montesinos et al. 2015).

Al contrario del segundo género, que cuenta con 20 especies, siendo la más importante *S. megalanthus* conocida como pitahaya amarilla y se encuentra distribuida en Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela (Montesinos et al. 2015; Ricalde y Andrade, 2009)

A nivel comercial se utiliza sombra artificial en las plantas de pitahaya para atenuar de 30 a 60% la radiación, sin embargo, un exceso de sombra disminuye el porcentaje de producción de frutos y la adecuada obtención de flores (Andrade et al. 2006). Las temperaturas óptimas para un buen desarrollo



del cultivo son entre 18°C y 22°C y se necesitan entre 1200 a 2500 mm de lluvia al año, sin embargo, para que las plantas se desarrollen de mejor manera debe de haber un periodo seco bien marcado. Los mejores resultados en plantaciones comerciales se consiguen entre los 700 y 1900 msnm (García y Quirós, 2010).

### 3.2. Taxonomía de la planta de pitahaya (*Hylocereus* sp)

En el cuadro 1, se muestra la clasificación taxonómica para la pitahaya roja, que es la más común en la Región Chorotega.

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica de la pitahaya roja (*Hylocereus undatus*).

<b>Pitahaya roja</b>
Reino: Plantae
División: Magnoliophita
Clase: Mognoliopsida
Orden: Caryophillale
Familia: Cactaceaecactácea
Género: Hylocreeae
Especie: Undatus
Tribu: Hylocereeae
Categoría: fruta
Nombre científico: <i>Hylocereus undatus</i>

Fuente: (Alvarado, 2014; Esquivel y Araya, 2012)

### 3.3. Morfología de la planta de pitahaya (*Hylocereus* sp)

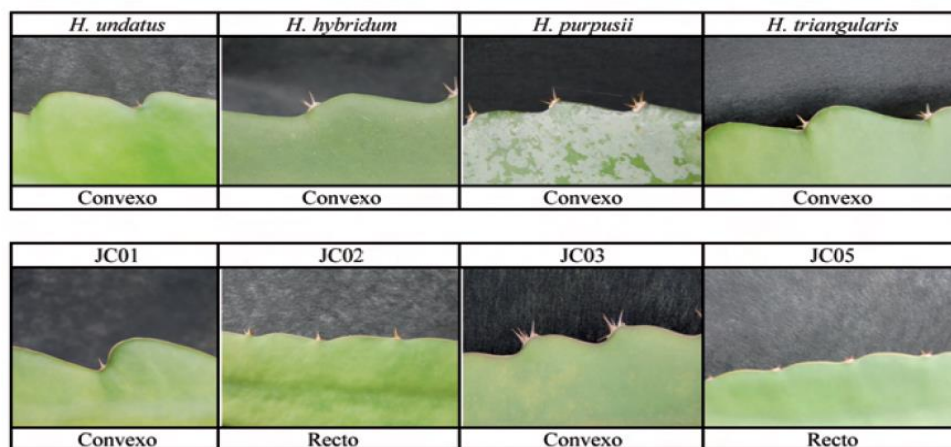
#### 3.3.1. Las raíces de *Hylocereus* sp

Existen dos tipos de raíces en la planta de pitahaya. Las primarias se encuentran en el suelo, pueden crecer de 5 a 25 cm y su área de expansión

es de aproximadamente 30 cm de diámetro; las segundas son las adventicias o secundarias que se desarrollan afuera del suelo, su función es fijar y sostener la planta al tutor y absorber sustancias nutritivas y agua del ambiente o de su hospedero. Las raíces laterales finas mueren cuando se presentan periodos de sequía y para disminuir la pérdida de agua de los tejidos se reduce hasta 10 veces la conductividad hidráulica en comparación con la del suelo; debajo de la epidermis se encuentran unas estructuras llamadas primordios preformadores que cumplen con la función de que se incremente la absorción de agua y nutrientes después de que el suelo es mojado de nuevo (Méndez y Coello, 2016).

### 3.3.2. Tallos o cladodios de *Hylocereus sp*

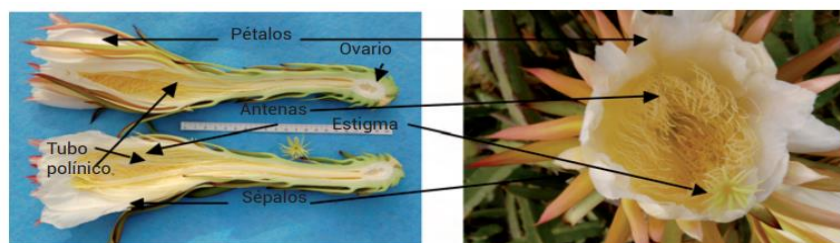
Los cladodios tienen la función de las hojas, son suculentos y de color verde, pero pueden cambiar a amarillo si estuvieron expuestos a la radiación solar. Su epidermis está constituida por estomas y cloroplastos, ayudan en la reserva de agua y la regulan en época seca, además tienen una cutícula fina y transparente que ayuda a reducir la transpiración. Como se muestra en la figura 1, pueden presentar tres aristas y grupos de espinas a lo largo de las areolas ubicadas en el borde, crecen en forma de segmentos y su longitud y serosidad dependerá de la variedad (OIRSA (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria). 2000).



**Figura 1.** Detalle de las areolas para las diferentes variedades de *Hylocereus sp*. (Méndez y Coello, 2016).

### 3.3.3. La flor de *Hylocereus sp*

Las flores son verdes, erectas y con el borde purpúreo. Cuando se abren presentan heliotropismo (dirige sus flores hacia la luz del sol o de la luna, en las primeras y últimas horas del día. Tienen una longitud aproximada de 30 cm y están cubiertas con numerosas escamas, como se presenta en la figura 2. Se producen en las areolas y tienen tépalos (término que se utiliza cuando es difícil diferenciar los pétalos y los sépalos de una flor) externos blancos con un ápice de color rojizo, los filamentos de las anteras son delgados y de color crema (Rivas, 1998). Esta también es efímera, ya que solo permanece abierta unas pocas horas antes de su dehiscencia; la antesis de la flor se suele producir sobre las 20 horas y su cierre definitivo se produce en torno a las 11 horas del día siguiente (Méndez y Coello, 2016).



**Figura 2.** Partes de la flor de *Hylocereus sp* (Méndez y Coello, 2016).

### 3.3.4. El fruto de *Hylocereus sp*

Es una baya de forma ovoide, alargada, la cáscara tiene unas formas que salen llamadas brácteas que son carnosas y cerosas; el mesocarpio es la parte comestible del fruto que está constituida por una pasta mucilaginosa con miles de pequeñas semillas blandas (Esquivel y Araya, 2012), las dimensiones del fruto dependen del material vegetal o especie, por medio de la cáscara se puede determinar si el fruto está maduro, debido a que este pierde su brillo (Figura 3). En algunas variedades la cáscara y la pulpa cambian de color; algunas tonalidades de la cáscara pueden ser rojas o amarillas y la pulpa puede ser de color blanca, roja o púrpura, esto depende mucho de la variedad (OIRSA (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria). 2000).



**Figura 3.** Fruto de *Hylocereus* sp. (Osuna-Enciso et al. 2016).

El género *Hylocereus* presenta polimorfismo en el ADN, lo que permite encontrar una gran variación de tipos que probablemente correspondan a la misma especie; para este género se encuentra distribuido a nivel mundial y cuenta con 16 especies reconocidas, entre ellas, *H. undatus*, *H. polyrhizus*, *H. costaricensis*, *H. triangularis* y *H. purpusii*, tradicionalmente conocidas como pitahaya roja (Montesinos et al. 2015).

Mientras que algunas de las variedades de pitahaya que se encuentran en Centro América son la roja grande, roja chica, roja orejona, amarilla, rosada, roja introducida, morada y cubana (Manzanero et al. 2014).

### 3.3.5. Las semillas de *Hylocereus* sp

Las semillas se encuentran distribuidas en toda la pulpa, como se muestran en la figura 4. Cuando comienza a desarrollarse el fruto son de color café oscuro, posteriormente cuando el fruto madura adquieren un color negro mate, tienen forma ovoide y la parte interna es de textura dura, superficie lisa y de color blanco (Méndez y Coello, 2016).



**Figura 4.** Fruto de *Hylocereus* sp. cortado longitudinalmente donde se aprecian las semillas (Ricalde y Andrade, 2009).

### 3.4. Antecedentes

#### 3.4.1. Trabajos de micropropagación de pitahaya en otros países

Según la revisión bibliográfica los países con investigaciones sobre micropropagación de pitahaya, son los mismos que presentan mayor producción del cultivo a nivel mundial; entre ellos México y Colombia. A continuación, se presentarán algunas de las investigaciones de desinfección de material vegetal de pitahaya realizadas en otros países y que fueron consultadas para el presente trabajo de investigación.

En uno de los trabajos desarrollados en Colombia por Suárez (2011), se utilizó alcohol al 70, 80 y 90% de concentración e hipoclorito de sodio al 3, 5 y 6% de concentración, como desinfectantes con diferentes tiempos de exposición y se obtuvo que al exponer los explantes por diez minutos a concentraciones de hipoclorito de sodio y alcohol superiores al 3% y 70%, respectivamente, se evitó su contaminación.

Otra investigación realizada también en Colombia por Suárez y colaboradores en el 2014, dice que los medios de cultivos suplementados con reguladores de crecimiento, especialmente con bajos niveles de auxina en combinación con niveles moderados a elevados de citoquinina estimulan la proliferación axilar.

También en una investigación desarrollada en México por Ojeda y colaboradores en el 2012, menciona que la proliferación de brotes *in vitro* es una alternativa viable de utilizarse en cactáceas y que se deben de desarrollar protocolos de micropropagación específicos para cada especie en particular.

Por último, Mállap y colaboradores (2020), evaluaron medios de cultivos con distintos reguladores de crecimiento; el tratamiento que contenía BAP (0,10 mg L<sup>-1</sup>) y ANA (3 mg L<sup>-1</sup>), mostró una incidencia significativamente superior en cuanto a la formación de callos en los explantes, con una media mayor a 80%.

### 3.4.2. Trabajos de micropropagación de pitahaya en Costa Rica

En nuestro país las investigaciones sobre micropropagación de pitahaya (*Hylocereus* sp), son escasas, pero existe una realizada por Viñas y colaboradores en el 2012, y es el único trabajo encontrado hasta el momento donde se mencionan factores con mayor similitud revisados en el presente trabajo de investigación.

Viñas y colaboradores (2012), utilizaron segmentos de tallo (aprox.50 cm de longitud), de plantas adultas de pitahaya (*Hylocereus costaricensis* [F.A.C. Weber] Britton & Rose cv. Zebra), cultivadas orgánicamente en Barranca, Puntarenas, Costa Rica; se les aplicó una mezcla de 2 g L<sup>-1</sup> de Agrimicina y 2 g L<sup>-1</sup> de Benomyl al menos tres semanas antes de la introducción al laboratorio como un aséptico en campo a las plantas madre antes de la siembra para disminuir la contaminación endógena de los explantes en el laboratorio.

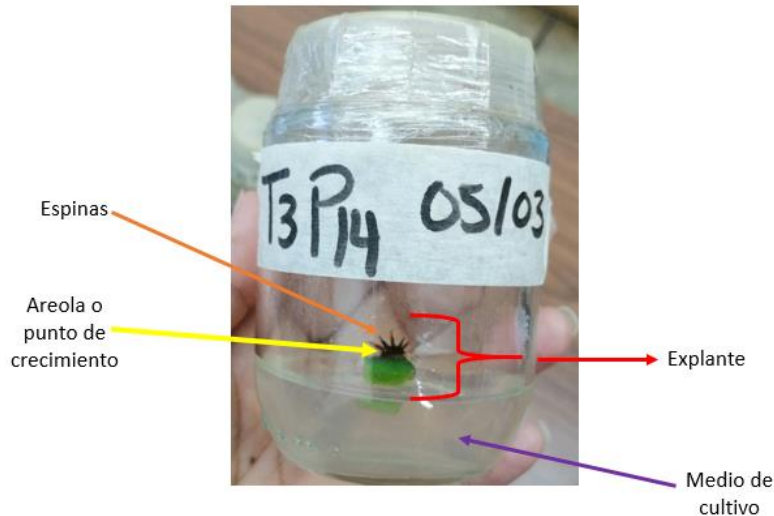
### 3.5. *Micropropagación*

La micropropagación es de gran interés porque tiene la cualidad de obtener en periodos de tiempo cortos y espacios reducidos grandes cantidades de vitroplantas, ya sean plantas utilizadas para reforestación, rescatar especies amenazadas o conservación *in vitro* de germoplasma valioso (Pérez, 2011).

El cultivo de tejidos es un conjunto de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo, protoplasto, célula, tejido u órgano), se cultiva asépticamente (Figura 5), en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Mroginski et al. 2010).

Lo anteriormente mencionado se debe al principio de totipotencia que es el proceso que tienen las células vegetales para formar una copia exacta del material genético de la planta a la que pertenece, lo que permite generar un nuevo individuo completo (Levitus et al. 2010).

Al trabajar en ambientes controlados se puede disminuir el porcentaje de infestación, por medio de la esterilización de los medios de cultivos y la desinfección de la superficie de los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos (Mroginski et al. 2010).



**Figura 5.** Explante de *Hylocereus* sp utilizado en el proyecto.

La elección del explante depende de la especie que se desea reproducir y el tipo de multiplicación a utilizar, además se debe de conocer la calidad de la planta madre, las condiciones fenológicas y fisiológicas, su estado de desarrollo y el tamaño del explante (Barba et al. 2001; Pérez, 2011). Existen tres vías para la multiplicación *in vitro* de las plantas: organogénesis, embriogénesis somática y propagación por yemas, ápices o meristemas (Pérez, 2011).

Generalmente se utilizan los ápices o meristemas apicales como explantes debido a que son áreas de síntesis de auxinas y presentan una concentración endógena alta, lo que impide el establecimiento de patógenos en el tejido vegetal (Carhuaricra et al. 2012).

En la organogénesis, se pueden formar raíces o brotes adventicios, los brotes son estructuras muy similares a una yema; este proceso puede ser

inducido por la presencia de citoquininas solas o combinadas con auxinas en explantes provenientes de tejidos jóvenes; por otro lado, la embriogénesis somática, también utilizada en micropropagación se describe como la capacidad que tiene cierto tipo de células para formar embriones en determinadas condiciones; los embriones somáticos tienen la capacidad de germinar y formar nuevas plantas idénticas a la planta madre (Pérez, 2011).

### 3.5.1. Micropropagación en cactáceas

Las especies de la familia Cactaceae tienen una limitada habilidad para poder reintegrarse demográficamente en un área perturbada y si lo hicieran su crecimiento natural sería bastante lento (Pérez, 2011). Por medio de investigaciones de nuevas técnicas de micropropagación, específicas para cada especie, se permite multiplicar variedades de cactáceas amenazadas o en peligro de extinción por daños en sus hábitats o bien porque se reproducen por semillas y tardan varios años para obtener frutos (Soltero y Portillo, 2015).

Como se mencionó anteriormente, las estructuras de las plantas utilizadas para micropropagación *in vitro* son las yemas o ápices, pero para el caso de la pitahaya (*Hylocereus* sp), a estas estructuras se les llama areolas, presentadas en la figura 6, las cuales a su vez son afelpadas; es una característica distintiva de toda la familia Cactaceae. De las areolas se originan las flores, frutos, las espinas, en ciertos cactus pequeños gloquidios (espinas delgadas desprendibles) y pelos que ayudan a tener una protección extra; pueden variar en número y abundancia en cada especie (UACJ (Universidad Autónoma de Ciudad Juárez), 2017).

Uno de los métodos más utilizados en los estudios sobre la micropropagación de las cactáceas, es la generación de brotes a través de la actividad de las aréolas. La activación de éstas se logra mediante la adición de citoquininas al medio de cultivo (Pérez, 2011). Se podría decir que en términos generales existen tres tipos de hormonas; auxinas (producen raíz), citoquininas (generan división celular) y giberelinas (generan elongación); pero



según la combinación, balance y concentración de las hormonas se pueden obtener distintos resultados (Jordán y Casaretto, 2011).



**Figura 6.** Areola de una cactácea (Ceroni y Castro, 2013).

En proyectos de investigación de micropropagación vegetal *in vitro*, es importante establecer bancos de germoplasma, que permitan mantener vitroplantas libres de patógenos para futuras investigaciones como la aclimatación, la velocidad de crecimiento, la viabilidad y la regeneración del material vegetal de la especie con la que se trabajó (*Hylocereus* sp), además, se debe de maximizar los recursos económicos, materiales y el tiempo invertido durante el desarrollo del proyecto.

En las siembras *in vitro* se deben de brindar una serie de condiciones para que se pueda dar un adecuado crecimiento de la especie que se desea reproducir y que, además, desarrolle características fenotípicas (brotes aéreos, raíces o callos), para su posterior utilización (Alcántara et al. 2017). En el caso de la pitahaya, las areolas cultivadas en un medio libre de reguladores del crecimiento no pueden iniciar brotes (Viñas et al. 2012), y se necesita una adecuada combinación de auxinas y citoquininas en el medio de cultivo para la diferenciación de tejidos (Pérez, 2011).

Es importante tener en cuenta que para el mantenimiento del tejido vegetal *in vitro* también se deben realizar subcultivos frecuentes para la renovación tanto del contenido nutricional del medio de cultivo, como los reguladores de crecimiento importantes para la diferenciación de tejido. Durante esta labor de mantenimiento del tejido *in vitro* se asume cierto riesgo, ya que el explante al ser manipulado podría presentar contaminación por hongos y bacterias por lo que es importante darle el seguimiento y estar atentos si se presenta este tipo de contaminación en el banco de germoplasma ubicado en el cuarto de crecimiento.

### 3.6. *Reguladores de crecimiento en micropropagación in vitro*

La presencia de fitohormonas en diferentes niveles permite que las plantas se desarrollen de diversas maneras, esto se debe al grado de ontogenia (formación y desarrollo individual de un organismo). En las células de las plantas por medio de las fitohormonas se da la división y elongación celular, pero en condiciones *in vitro* se observa que estas células inician procesos de diferenciación, es decir, permite que se formen nuevos órganos y estructuras (Jordán y Casaretto, 2011).

En el cultivo de tejidos *in vitro*, es común el uso de reguladores de crecimiento, que son similares a las fitohormonas, a diferencia de que estos son sintetizados químicamente o se obtienen de otros organismos; son sustancias estimuladoras y reguladoras del crecimiento vegetal (Alcantara et al. 2019). Como se muestra en el cuadro 2, se pueden clasificar según sus efectos inhibidores o estimulantes, según su estructura y actividad molecular, entre otros.

**Cuadro 2.** Resumen de la clasificación de los principales reguladores de crecimiento vegetal.

Fitohormonas	Varietades encontradas	Efecto a nivel vegetal	Efecto a nivel celular	Precursor orgánico
Auxinas	AIA AIB 2,4-D Ácido $\alpha$ -naftalenacético (NAA) (sintético)	Formación y elongación de tallos.	División y elongación celular. Diferenciación celular.	L-Triptofano
Giberelinas	GA1 GA2 GA3	Aumenta el desarrollo de tejidos de manera constante. Elongación de raíces, hojas jóvenes, floración.	Estimula elongación celular en respuesta a condiciones de luz y oscuridad.	ent-Kaureno
Citoquininas	Zeatina Benciladenina BAP	Induce la iniciación y elongación de raíces. Estimula la generación de brotes axilares.	Permite producir una alta proliferación y división celular. Se produce con mayor abundancia en las células de los ápices radiculares.	Adenina
Ácido abscísico	No Presenta	Regula y mantiene la dormancia de las semillas.	Promociona la producción de tejidos zigotos.	Isopentil Pirofosfato Carotenoides
Ácido salicílico	No presenta	Potencializa el crecimiento de la floración. Incrementa la longevidad floral.	Control de actividad fotosintética	Fenilalanina
Poliaminas	Cadaverina Putrecina Agmatina	Promueve la elongación y desarrollo de la raíz. Promueve el desarrollo del sistema radicular primario, lateral y adventicio.	Sintetizadas por medio de las células pertenecientes al sistema radicular	Arginina
Ácido jasmónico	Éster metálico de ácido jasmónico	Regulación del desarrollo de órganos embrionarios. Regulación de la germinación de semillas.	Regula el crecimiento y desarrollo celular. Importante función en la inmunidad vegetal.	1) ácido 12-oxofitodienoico (OPDA) 2) ácidos grasos poliinsaturados
Brasinoesteroides	Brasinolida 25HB	Controla el crecimiento de raíces. Regula la fotomorfogénesis	Regulación del metabolismo. Señalización celular. Control de la elongación y división celular.	Campesterol
Etileno	No presenta	Regula maduración y senescencia vegetal.	Capaz de ser producido por cualquier órgano vegetal. Potencializa la	Metionina

			acción de auxinas, ácido abscísico y citoquininas.	
Estrigolactonas	GR24 (sintético) Estrigol	Involucrado en respuestas adaptativas cuando se presenta deficiencia de fósforo y nitrógeno en el medio. Potencializa el desarrollo de raíces.	Controla el transporte de otras fitohormonas. Pueden inhibir la acción de las citoquininas.	Carotenoides

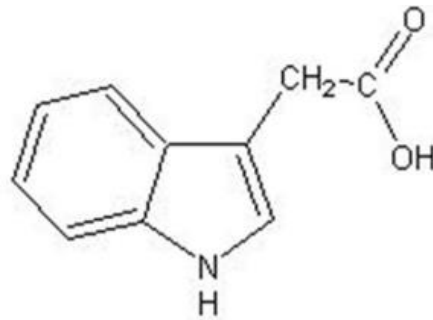
Fuente: Alcantara et al. (2019).

La auxina (AIA), tiene efecto sobre la producción de raíces en cactáceas, además, para la obtención simultánea de raíces y brotes se debe de brindar al explante una proporción adecuada de auxina (AIA) y citoquinina (BAP), en el medio de cultivo (Zambrano y Ríos, 2015). A continuación, se detallarán algunas de las principales características de las auxinas y citoquininas.

### 3.6.1. Auxinas

Las auxinas pueden distribuirse muy bien en la mayoría de las células y tejidos vegetales, tienen efecto sobre la división y crecimiento celular. Estas hormonas sintéticas son aplicadas para inducir diferenciación de tejidos, promover y dar origen a la formación de tejido embriogénico (callos), el desarrollo de raíces, tallos y hojas (Strosse et al. 2003; Martínez et al. 2016).

Algunas de las principales características del (AIA) 3-Ácido Indolacético (Figura 7), es que estimula la elongación celular, incrementa la permeabilidad celular, incrementa la síntesis de la pared celular vegetal, induce la producción específica de algunas proteínas e induce la producción del sistema radicular vegetal y dominancia apical Alcantara et al. 2019).

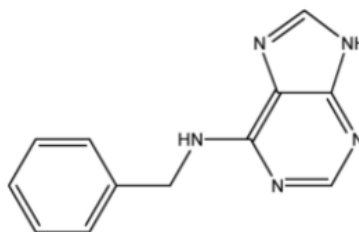


**Figura 7.** Estructura química del 3-Ácido Indolacético (Alcantara et al. 2019).

### 3.6.2. Citoquininas

El uso de citoquininas promueve la división celular ya que tiene la capacidad de estimular e inducir una alta proliferación y progresión del ciclo celular que a su vez provoca la iniciación de brotes, organogénesis y androgénesis, reduce la dominancia apical y favorece a la brotación y crecimiento de las yemas axilares (Jordán y Casaretto, 2011).

Las citoquininas estimulan la iniciación y elongación de raíces, así como también activan la senescencia de las hojas, estimulan el desarrollo fotomorfológico vegetal y juegan un importante rol en el aumento y generación de brotes vegetales. Una concentración similar entre auxinas y citoquininas puede inducir la proliferación de células no diferenciadas (meristemas o callos vegetales); lo que sugiere que una concentración ideal de ambas fitohormonas en un medio de cultivo estable o en un sustrato adecuado podría mejorar y acelerar el crecimiento vegetal (Alcantara et al. 2019).



**Figura 8.** Estructura química del 6-Bencilaminopurina (Jordán y Casaretto, 2006).

### 3.7. Formación de callos en explantes *in vitro*

Con la técnica de cultivo de tejidos *in vitro* se pueden desarrollar callos en diferentes órganos y tejidos de una planta. Un callo es el resultado de una herida o corte en donde se crea una masa amorfa debido a la proliferación de células del parénquima (Figura 9), se encuentran localizados en centros de actividad meristemática, a menudo aparecen en zonas de diferenciación vascular, no presentan patrones predecibles de organización o diferenciación; y desde el punto de vista funcional una de las características más importantes es que debido a su totipotencialidad es un recurso fundamental en el banco de germoplasma por su potencial para desarrollar brotes normales y embriones que formarán plántulas (Lallana y Lallana, 2003).



**Figura 9.** Callos en explantes de *Hylocereus* sp.

Para la formación de callos se pueden utilizar trozos vegetales como hojas o semillas, no obstante, la formación de callos dificulta el crecimiento de vástagos y raíces, hecho que se observó en un ensayo de Suárez y colaboradores en el 2014, especialmente en el medio M4, donde las raíces fueron escasas y engrosadas como se demuestra en la figura 10, además de que la formación del callo también puede generar menor estabilidad genética.



**Figura 10.** Callo formado en la zona radicular de una plántula de pitahaya obtenida de la germinación *in vitro* de semilla sexual (Suárez et al. 2014).

### 3.8. *La asepsia y condiciones controladas en el laboratorio de biotecnología.*

Un problema importante en la multiplicación de tejidos es la asepsia. Debido a que la contaminación por diversos microorganismos (hongos, levaduras, bacterias), afectan en la pérdida de los explantes. Según Pariani (2015), cuantificar las pérdidas es difícil pero un promedio del impacto de estos descartes en laboratorios dedicados a micropropagación es de aproximadamente un 10%.

La contaminación se entiende como cualquier crecimiento microbiano en el contenedor de cultivo de tejidos y puede ser por microorganismos que se encuentran en la superficie (ectófitos) e interior (endófitos) del explante o por la deficiencia en la manipulación de los operadores en el laboratorio (Ramírez, 2020).

Debido a los problemas de contaminación que pueden presentar los explantes, se deben de considerar diferentes aspectos dentro del laboratorio, como controlar las corrientes de aire, ya que las partículas del polvo que son arrastradas contienen esporas que pueden llegar directamente al explante o ser transportadas por el laboratorista o visitante. Es importante que en todos los laboratorios dedicados a la micropropagación *in vitro* de plantas cuenten con un estricto mantenimiento de limpieza para disminuir la carga microbiana ambiental (Gerónimo et al. 2016).

Además, el laboratorista debe portar un vestuario adecuado para realizar las siembras, como una gabacha, tapabocas, gorro y cubrezapatos, los cuales deben estar limpios, se debe lavar las manos y brazos con jabón y asperjarlos constantemente con alcohol antiséptico; por último, también es importante que el instrumental (pinzas, bisturí y agujas de disección), sea esterilizado previamente en la autoclave y flameado constantemente (Perea, 2009a).

Por otro lado, es importante controlar las condiciones ambientales del laboratorio para una adecuada incubación, esto se refiere a la temperatura, calidad e intensidad de luz, fotoperiodo y humedad para ayudar al proceso del desarrollo adecuado del explante (Bonilla y Abdelnour, 2017).

Algunos de los beneficios al utilizar esta técnica *in vitro* es que las plantas se mantienen libres de patógenos ya que es un método aséptico, se puede realizar una propagación masiva de plantas en espacios reducidos, conservación del germoplasma, incrementar la diversidad genética, permite obtener plantas idénticas con las características de la planta madre en un corto tiempo, además, se pueden propagar en cualquier época del año, por ende, aumentar el rendimiento de los cultivos y obtener material limpio, libre de patógenos como virus y enfermedades (Olmos et al. 2010).

### 3.9. *Explantos descartados en el cultivo de tejidos*

Las características que debe tener una vitropianta para que sea descartada depende mucho de los resultados que desea obtener el laboratorista o investigador. En el presente trabajo se descartaron los explantes contaminados por agentes microbiológicos (hongos y bacterias), y los que presentaron oxidación.

#### 3.9.1. Microorganismos contaminantes en el cultivo *in vitro* de tejidos

Los vitropatógenos son organismos que no son patógenos para las plantas en campo, pero si perjudiciales para las células, tejidos u órganos cultivados *in vitro*; estos pueden ser dañinos porque compiten con el explante



por los nutrientes del medio de cultivo y les provocan daños por la colonización de sus tejidos o la liberación de metabolitos tóxicos (Nicoloff, 2015).

Entre los contaminantes más comunes en las plantas cultivadas *in vitro* se mencionan los géneros fúngicos: Cladosporium, Aspergillus, Penicillium, Microsporium, Phialophora, Neurospora, Fusarium, Rhizopus, Curvularia, Alternaria, Candida, Rhodotorula, Chytridococcus, entre otros y a los géneros bacterianos; Bacillus y Staphylococcus (Díaz, 2010; Gerónimo et al. 2016).

Cada explante que presente vitropatógenos como hongos o bacterias, como se muestran en las figuras 11 y 12, respectivamente, se deben de descartar para evitar la contaminación de los demás explantes que se encuentran en el cuarto de crecimiento sin importar cuál sea.

### 3.9.2. Explantos descartados por contaminación por hongos

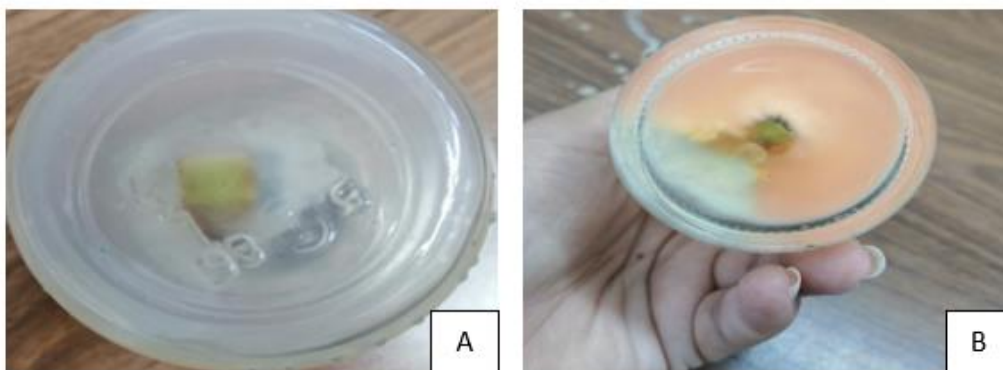
La contaminación por hongos en su gran mayoría se debe a hongos ambientales, los cuales a veces son difíciles de detectar porque en un inicio no son visibles sus hifas, pero transcurrido cierto tiempo después de la siembra *in vitro* su detección es fácil, ya que se observa su crecimiento en forma de colonias aisladas o alrededor de los explantes, hasta llegar a invadir toda la superficie del recipiente, sus colores pueden variar de blanco, amarillo pálido, gris o verde dependiendo de la especie del hongo contaminante (Perea, 2009b).



**Figura 11.** Explantes descartados debido a contaminación por hongos. Explante contaminado por hongo (A) / Medio de cultivo contaminado por hongo (B) / Hongos en las paredes del frasco de micropropagación (C).

### 3.9.3. Explantes descartados por contaminación bacteriana

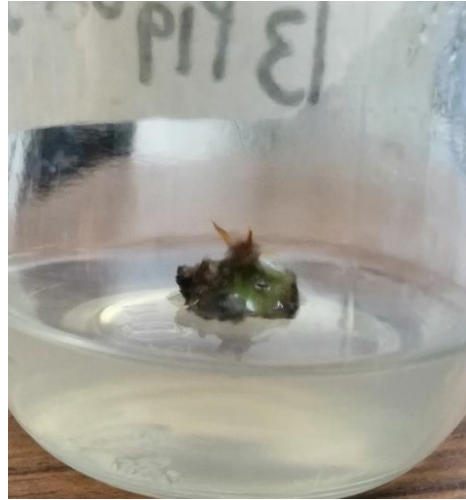
Otro de los contaminantes *in vitro* más comunes son las bacterias, pueden transferirse de la flora bacteriana de la piel, traspiración, boca, u otras partes del cuerpo del laboratorista (Recalde et al. 2003), además pueden crecer en el medio de cultivo, en la superficie del explante o en el sistema vascular de la planta, inclusive pueden escapar de los efectos de los desinfectantes superficiales; si se encuentran asociadas al tejido vegetal no se pueden distinguir colonias aisladas pero si una masa bacteriana acuosa o en forma de pliegues, halos o rosetas en el interior del medio de cultivo (Gerónimo et al. 2016).



**Figura 12.** Explantes descartados por contaminación por bacterias (A, B).

### 3.10. Explantes descartados por oxidación

El oscurecimiento de tejidos vegetales cultivados *in vitro* es la oxidación de diferentes componentes celulares y compuestos fenólicos catalizados por la enzima polifenol oxidasa (PPO), que produce quinonas, que son especies químicas que están predispuestas a reaccionar, que genera daños y la muerte celular, como se observa en la figura 13; esta enzima entra en contacto cuando la célula sufre algún daño o estrés, por ejemplo, durante el proceso de esterilización o por el corte, y generalmente se obtiene como resultado la muerte del explante (explantes necróticos, oscuros) (Azofeifa, 2009).



**Figura 13.** Explante de pitahaya descartado por necrosis

## 4. Metodología

### 4.1. Localización del proyecto

Para el presente trabajo se utilizaron plantas de pitahaya (*Hylocereus* sp) (Figura 14) Que se encontraban en macetas con un sistema de riego por goteo en uno de los invernaderos en la Finca Experimental de Santa Cruz (FESC), y los procesos de desinfección y siembra *in vitro* del material vegetal se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad de Costa Rica, Sede Guanacaste (Liberia).



**Figura 14.** Planta de pitahaya (*Hylocereus* sp), seleccionada como planta madre.

#### 4.2. Selección del material vegetal en campo

El 25 de enero del 2021, antes de dar inicio al proceso de desinfección de material vegetal de pitahaya, se realizó una visita a la Finca Experimental de Santa Cruz, para observar todas las plantas y determinar cuáles serían seleccionadas como plantas madre donadoras para la siembra *in vitro*. Debido a que no se cuenta con la identificación de las variedades de este cultivo en la FESC, se escogieron plantas vigorosas, con excelente aspecto para ser donadoras del material vegetal, es decir, se utilizó un muestreo por conveniencia. Finalmente, a estas plantas seleccionadas se les asignó un número y se rotularon para que posteriormente se pudiera conocer la procedencia de cada explante.

#### 4.3. Preparación del material vegetal en campo

A los individuos que fueron seleccionados como plantas madre donadoras, se les aplicó una dosis de 250 mL por hectárea (225  $\mu$ L por planta), de Beltanol 50 SL (Sulfato de 8-Hidroxiquinoleína), 15 días antes de la recolección del material vegetal.

#### 4.4. Preparación en el laboratorio de los implementos y medio de cultivo

El medio de cultivo (MC), que se utilizó fue Murashige y Skoog (1962), la composición del mismo se presenta en el cuadro 3. Primeramente, se prepararon soluciones madre que posteriormente se utilizaron para preparar los MC.

A la disolución del medio de cultivo se le ajustó el pH a 5,8 con la ayuda de un pHmetro de mesa y posteriormente se vertió en los frascos de reproducción *in vitro*, aproximadamente 33 mL de medio de cultivo por frasco. Por último, todos los frascos con el MC se esterilizaron con las demás herramientas (bisturí, pinzas, servilletas, algodón y de agua desionizada por semana), en la autoclave a una atmósfera de presión y 121 °C durante 15 minutos.

**Cuadro 3.** Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962).

Solución	Componente	Cantidad mg L <sup>-1</sup>
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
	KNO <sub>3</sub>	1900
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
B	KI	0,83
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,30
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,60
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
C	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
	Na <sub>2</sub> EDTA	1860
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1390
D	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> FeN <sub>2</sub> NaO <sub>8</sub>	37-43
	Acido nicótico (B3)	0,50
	Piridoxina (B6)-HCL	0,50
	Tiamina (B1)-HCL	0,10
	Glicina	100
	Sacarosa	30000
	Phytigel	3500
	pH	5,8

Fuente: (Murashige & Skoog, 1962).

#### 4.5. *Recolección del material vegetal en campo*

A los 15 días posteriores de la aplicación del Beltanol, se realizó la recolección del material vegetal, primeramente, se cortaron esquejes de 20-25 cm de las plantas madre que contenían yemas o areolas, se envolvieron en servilletas y se colocaron en bolsas plásticas rotuladas para mantener las condiciones adecuadas durante el traslado desde la FESC hasta el laboratorio de biotecnología (Figura 15).



**Figura 15.** Recolección del material vegetal: Implementos utilizados durante la recolección de material vegetal (A) / Material vegetal empacado en la hielera para el transporte al Laboratorio de Biotecnología (B).

#### 4.6. *Tratamientos desinfectantes*

##### 4.6.1. *Limpieza y desinfección del material vegetal para la introducción al Laboratorio de Biotecnología*

Para la introducción del material vegetal de pitahaya *in vitro*, los cladodios se cortaron en trozos de 2 a 3 cm y se colocaron en beakers rotulados con el número de la planta madre. A estos trozos se les agregó agua desionizada y de 4-5 gotas de tween 20 (tensoactivo de tipo polisorbato utilizado como detergente), por cada 100 mL de agua, por un lapso de 15 minutos, con agitación constante.

Durante este tiempo los trozos que contenían las areolas fueron cepillados con cuidado para quitar todas las impurezas que podrían contener, tanto en la parte vegetal como en las espinas. Pasados los 15 minutos, se descartó el agua con detergente para agregar agua desionizada y realizar un triple lavado, y así eliminar restos del detergente.



**Figura 16.** Procedimiento de desinfección previo a la introducción a la cámara de flujo laminar: Cortes de las areolas y colocación en beakers numerados (A) / Material vegetal con agua y Tween 20 (B) / Aplicación de alcohol al material vegetal en diferentes concentraciones (C).

Con el material vegetal limpio después del triple lavado, se agregó la disolución de alcohol con la concentración y el tiempo de exposición respectivo para cada tratamiento, como se muestra en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Tratamientos con las respectivas concentraciones y tiempo de exposición de cada desinfectante.

Tratamientos	Número de explantes/trat/siembra	Concentración de alcohol (%)	Tiempos de exposición en el alcohol (minutos)	Concentración de NaClO (%)	Tiempos de exposición en el NaClO (minutos)
T1	30	60	7	1,5	15
T2	30	65	5	2,5	13
T3	30	70	3	3	10

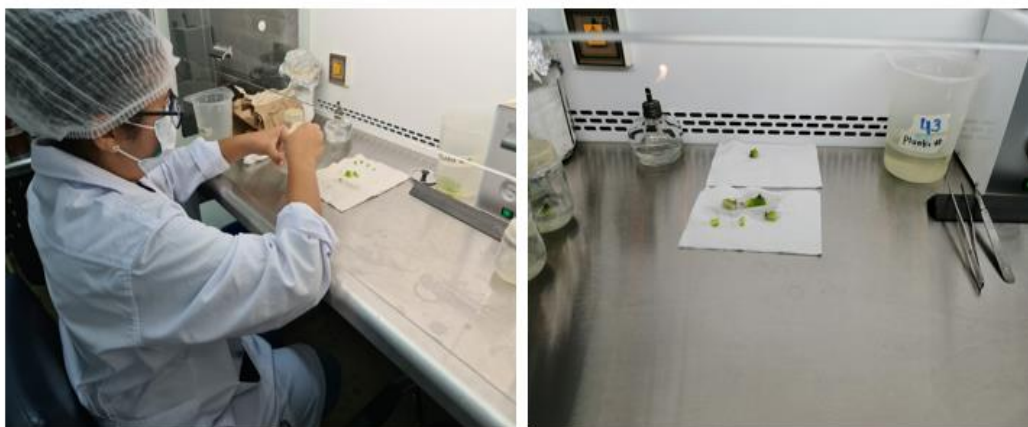
Fuente: (Ojeda-Zacarías et al. 2012; Suárez et al. 2014; Civatti et al. 2017; Mállap-Detquizán et al. 2022).

Posteriormente, se pasaron los beakers con el material vegetal y la disolución de alcohol a la cámara de flujo laminar, que previamente se limpió y desinfectó con alcohol al 70%. Pasado el tiempo de exposición de los explantes con el alcohol para cada tratamiento, se descartó el exceso de alcohol y se aplicó inmediatamente la disolución de hipoclorito de sodio (NaClO), de igual manera con las concentraciones y tiempos de exposición de cada tratamiento, como se presenta en el cuadro 4. Después de transcurrido el tiempo de exposición con el NaClO para cada tratamiento, se descartó y se realizó un triple lavado con agua desionizada y esterilizada. Todo dentro de la cámara de flujo laminar.

#### 4.6.2. Siembra *in vitro* en el Laboratorio de Biotecnología

Se realizó tres corridas en el tiempo, es decir, se realizaron tres introducciones *in vitro* en diferentes semanas con 30 explantes por tratamiento en cada siembra.

Para la siembra *in vitro*, dentro de la cámara de flujo laminar se extrajo la yema (areola) por medio de un corte en forma de “V”, para sembrarla en el medio de cultivo, posteriormente, se rotularon los frascos de micropropagación con los explantes con toda la información necesaria para conocer su procedencia.



**Figura 17.** Siembra de explantes de pitahaya (*Hylocereus* sp) con la técnica *in vitro*.

Por último, los frascos con los explantes ya sembrados en el MC fueron trasladados a un cuarto de crecimiento, donde las condiciones fueron de 24°C  $\pm$  2°C y la humedad relativa varió de 75 a 80%.

#### 4.6.3. Evaluación de los tratamientos desinfectantes

A los 15 días después de cada siembra *in vitro*, se evaluó la incidencia de daño, por presencia o ausencia de hongos, bacterias u oxidación de material vegetal manipulado, para conocer finalmente cual fue el mejor tratamiento desinfectante para la introducción al laboratorio.



#### 4.7. *Subcultivos*

Después de las primeras evaluaciones, los explantes sanos no presentaron ninguna diferenciación de tejidos, fue por esta razón que se tomó la decisión de subcultivarlos a un medio de cultivo con reguladores de crecimiento, con el fin de poder evaluar el crecimiento y la diferenciación del tejido vegetal (raíces, brotes y callos), y así poder evidenciar que el proceso de introducción no afecte el desarrollo vegetal de los tejidos manipulados.

##### 4.7.1. *Medio de cultivo con reguladores de crecimiento*

Para esta etapa del proyecto se utilizó el mismo medio de cultivo (Murashige & Skoog, 1962), con los reguladores de crecimiento 6-Bencilaminopurina (BAP 0,5 mg/L) y 3-Ácido Indolacético (AIA 0,3 mg/L), (Zambrano y Ríos, 2015). Por último, este fue vertido en los frascos de micropropagación y fueron esterilizados en la autoclave con las condiciones anteriormente mencionadas.

##### 4.7.2. *Subcultivos de los explantes de pitahaya*

Para los subcultivos se desinfectó la cámara de flujo laminar, y con la ayuda de un bisturí se limpió cada explante sano de tejidos endurecidos para facilitar la exposición del material vegetal al nuevo medio de cultivo.

Por último, los frascos con los reguladores de crecimiento y explantes subcultivados se taparon y se rotularon de igual manera con el número de la planta madre y fecha de ambas siembras para llevarlos al cuarto de crecimiento con las mismas condiciones de humedad relativa y temperaturas mencionadas anteriormente en el apartado 4.6.2.

#### 4.7.3. Evaluación de los subcultivos

Al igual que en la evaluación realizada para determinar los efectos de los tratamientos desinfectantes (apartado 4.6.3), se cuantificó el número de explantes con daños, ya que después de cada subcultivo *in vitro* se debe descartar aquellos afectados por la exposición a la manipulación de los respectivos procesos involucrados. Además, debido a la presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, se cuantificó la presencia de raíces, brotes o callos en los explantes libres de patógenos para conocer cual tratamiento presentó mayor cantidad de vitroplantas con diferenciación de tejidos.

### **5. Diseño del experimento**

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones por tratamiento. Dentro de cada repetición se evaluaron 90 explantes. El diseño de bloques completos al azar se usó para excluir el ruido que podría ocasionar los diferentes momentos de cosecha de los esquejes.

La unidad experimental consistió en un frasco de micropropagación de 200 mL de capacidad con 33 mL aproximadamente de medio de cultivo. En total se utilizaron 270 frascos para la primera etapa de desinfección.

#### 5.1. *Variables evaluadas*

Se midieron a los 15 días después de la siembra. La primera variable evaluada fue la proporción de explantes sanos; los cuales se identifican por medio de la observación detallada, si las vitroplantas no tenían presencia de hongos (estructura blanca, verde, gris o negra de consistencia esponjosa), o una sustancia acuosa en alguna parte del explante (espinas o material vegetal), en el frasco de micropropagación o medio de cultivo, entonces, se clasificaba como explante sano.

La segunda variable evaluada fue la proporción de explantes dañados, estos de igual manera se observaron detalladamente y se identificaron como

los afectados por hongos o bacterias en el material vegetal o medio de cultivo, además, también se clasificaban como explantes dañados a los que presentaban oxidación (oscurecimiento del tejido), es decir se consideraron en general como una sola variable. Por último, para el caso de los subcultivos las variables evaluadas fueron la proporción de explantes sanos, dañados y los que presentaban raíces, brotes y callos; en esta etapa de igual manera trascurridas las 2 semanas se observaron detalladamente los explantes para clasificarlos según la variable que presentaron.

## 5.2. *Análisis de datos*

Para contrastar la hipótesis de igualdad de medias poblacionales entre los distintos tratamientos, se realizó para cada variable un análisis de varianza bajo el enfoque de modelos lineales generalizados mixtos con distribución Bernoulli y función de enlace logaritmo, según el modelo que se especifica en la Ecuación 1, se usó un nivel de significación ( $\alpha$ ) igual a 0,05.

En las variables donde existieron diferencias significativas entre tratamientos se realizó una prueba de separación de medias con el procedimiento de la diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher con un nivel de significación ( $\alpha$ ) igual a 0,05.

## 5.3. *Modelo estadístico*

$$\log\left(\frac{p_{ijl}}{1 - p_{ijl}}\right) = \mu + \tau_i + b_j + s_{(j)l} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

$p_{ijl}$ : es la probabilidad de que un esqueje de la  $l$ -ésima madre en el  $i$ -ésimo bloque con el  $i$ -ésimo desinfectante estuviera sana o enferma.

$\mu$ : es la media general.

$\tau_i$ : es el efecto del  $i$ -ésimo desinfectante.

$b_j$ : es el efecto aleatorio del j-ésimo bloque.

$s_{(j)l}$ : Efecto aleatorio del sujeto (planta madre) dentro del bloque.

## 6. Resultados

Para conocer cuál de los tres protocolos de desinfección obtendría la mayor cantidad de explantes de pitahaya (*Hylocereus* sp), libres de patógenos fue necesario evaluar las variables de proporción de explantes sanos y la proporción de explantes con daños (hongos, bacterias u oxidación), según la metodología mencionada en el apartado 5.1, a los 15 días después de la siembra *in vitro*.

Como se muestra en el cuadro 5, para la primera siembra *in vitro* de explantes con diferentes concentraciones de desinfectantes, se determinó diferencias significativas entre los tratamientos.

**Cuadro 5.** Proporción de la variable sana para cada tratamiento.

Tratamientos	Proporción de explantes sanos
1	0,31 <sup>b</sup>
2	0,54 <sup>a</sup>
3	0,61 <sup>a</sup>

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

La media más baja de proporción de explantes sanos la obtuvo el tratamiento 1 (60% alcohol y 1,5% NaClO), y en los tratamientos 2 (65% alcohol y 2,5% NaClO) y 3 (70% alcohol y 3% NaClO), no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos; sin embargo, la media del tratamiento 3, fue ligeramente mayor que la del tratamiento 2, por ende, se determinó que la concentración de desinfectante del tratamiento 3, fue la que obtuvo mayor cantidad de vitroplantas de pitahaya sanas, en comparación con los demás tratamientos.

Por otro lado, para la variable determinada como proporción de explantes dañados, también se presentaron diferencias estadísticamente

significativas entre los tratamientos. La media de la variable daño para el tratamiento 1 fue de 0,69 y las de los tratamientos 2 y 3 fueron 0,46 y 0,39, respectivamente.

Es decir, el tratamiento con mayor proporción de plantas sanas mostró menor cantidad de plantas con daño y viceversa; por ende, se determinó que el tratamiento 3 fue el que obtuvo los mejores resultados el cual consistió en 70% alcohol y 3% NaClO durante 3 y 10 minutos respectivamente.

Asimismo, del total de explantes descartados por daños para cada tratamiento se determinó el porcentaje correspondiente a contaminación por hongos, bacterias u oxidación, para así poder conocer la relación entre los tratamientos desinfectantes con la incidencia de daño según el patógeno u oxidación en los explantes.

En el cuadro 6, se presenta el porcentaje de daños y el agente causal en los explantes descartados, se observó que en los tres tratamientos los hongos fueron los patógenos que dañaron en mayor cantidad a los explantes, el tratamiento 1, fue el que presentó mayor afectación debido a estos patógenos.

Para el caso de los explantes contaminados por bacterias se obtuvieron porcentajes de infestación bajos en todos los tratamientos, y, por último, los tratamientos 2 y 3 fueron los que obtuvieron mayores cantidades de explantes oxidados.

**Cuadro 6.** Porcentajes de daño en explantes descartados debido a hongos, bacterias y oxidación.

Tratamiento	PDH	PDB	PDO
1	52,7	4,5	42,9
2	39,3	3,4	57,3
3	44,9	1,3	53,8

PDH: Porcentaje de daño por hongos / PDB: Porcentaje de daño por bacterias / PDO: Porcentaje de daño por oxidación.

### 6.1. *Resultados de los explantes con reguladores de crecimiento en el medio de cultivo (subcultivo)*

Según el análisis estadístico para la variable sana, no se presentó diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos con reguladores de crecimiento. En esta etapa se subcultivaron todos los explantes sanos de la primera siembra *in vitro* de cada tratamiento, por ende, las proporciones para cada uno eran diferentes y no se pueden comparar; lo importante en esta etapa era que el explante llegara sano.

Las vitroplantas subcultivadas en esta segunda etapa presentaron una disminución en el porcentaje de contaminación, sin embargo, el mayor porcentaje de afectación fue debido a hongos patógenos, con 14% para el tratamiento 3, 6% para el tratamiento 1 y en el tratamiento 2 no se obtuvieron explantes contaminados por hongos (Cuadro 7).

Al igual que en la primera siembra *in vitro*, se obtuvieron bajos porcentajes de contaminación debido a bacterias, con 3% y 2% para los tratamientos 1 y 2 respectivamente, el tratamiento 3, no presentó ningún explante contaminado por bacterias; y solo se mostró un 4% de explantes oxidados en el tratamiento 2 (Cuadro 7).

Debido a la presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, los tres tratamientos presentaron brotes o raíces, en el tratamiento 1 el 3% de los explantes desarrollaron brotes y ninguno desarrolló raíz, en el tratamiento 2 no se desarrolló ningún brote, pero si un 2% de las vitroplantas presentaron raíces y por último el tratamiento 3 fue el que obtuvo mejores resultados, ya que el 2% de los explantes presentaron brotes y otro 2% raíces (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Porcentaje de daños por hongos, bacterias y oxidación en los explantes trasplantados a un medio de cultivo con reguladores de crecimiento.

Tratamiento	Variable	Suma	n	Porcentaje
1	Hongo	2	33	6
	Bacteria	1	33	3
	Oxidación	0	33	0
	Brote	1	33	3
	Raíz	0	33	0
2	Hongo	0	51	0
	Bacteria	1	51	2
	Oxidación	2	51	4
	Brote	0	51	0
	Raíz	1	51	2
3	Hongo	7	51	14
	Bacteria	0	51	0
	Oxidación	0	51	0
	Brote	1	51	2
	Raíz	1	51	2

Por último, como se presenta en el cuadro 8, en esta etapa también se presentó la formación de callos en los explantes, y según el análisis estadístico para la proporción de callosidad, se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. El tratamiento 3, fue el que presentó la media más alta para la proporción de callosidad con 0,34

**Cuadro 8.** Medias de la proporción de callosidad formada en los explantes en cada tratamiento.

Tratamiento	Callo
1	0,08 <sup>b</sup>
2	0,31 <sup>a</sup>
3	0,34 <sup>a</sup>

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

## 7. Discusión

### 7.1. *Tratamientos desinfectantes*

Para la variable de proporción de explantes sanos, los tratamientos desinfectantes 2 y 3 no presentaron diferencias estadísticamente significativas y fueron los que presentaron mejores resultados; sin embargo, el tratamiento 3, fue el que obtuvo mayor número de explantes sanos, además de ser el que tenía las concentraciones más altas de alcohol y NaClO con 70% y 3% respectivamente; entonces, se puede decir que conforme aumenta la concentración de un desinfectante en un protocolo de desinfección, se podrían obtener mayor número de explantes sanos. Según Bogado y colaboradores (2016), esto se debe a que los desinfectantes son agentes oxidantes para la desinfección de material vegetal, y una de sus ventajas es que actúan como germicidas, es decir que destruyen hongos, bacterias y virus.

Por ende, el tratamiento desinfectante 1, presentó la proporción más baja de explantes sanos debido a que contenía las concentraciones más bajas de los desinfectantes con 60% de alcohol y 1,5% de NaClO, brindando una menor desinfección superficial del material vegetal y favoreciendo la proliferación de microorganismos.

### 7.2. *Variables evaluadas*

#### 7.2.1. Explantes sanos

La variable respuesta del presente trabajo es la proporción de explantes sanos, sin embargo, es importante mencionar que en los tres tratamientos se obtuvieron vitroplantas sanas, pero el tratamiento 1, fue el que presentó menor cantidad (35 explantes), al contrario del tratamiento 3, que obtuvo 63 explantes libres de patógenos.

La obtención de mayor proporción de explantes sanos concuerda con los resultados de la investigación realizada por Suárez (2011), en la que utilizó tres protocolos de desinfección para pitahaya roja (*Hylocereus polyrhizus*) y

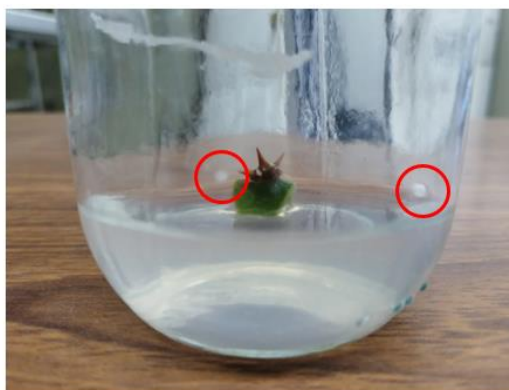


amarilla (*Selenicereus megalanthus*), y obtuvo como resultado que se evitó la contaminación de explantes en los protocolos con concentraciones de alcohol por encima del 70% y de hipoclorito de sodio superiores o iguales al 3%; al igual que el presente trabajo que se observó mayor proporción de explantes sanos en el tratamiento 3, que también tenía 70% y 3% de alcohol e hipoclorito de sodio respectivamente.

En los trabajos de investigación de propagación *in vitro* de material vegetal siempre se desea obtener individuos libres de patógenos para que sirvan de estrategia de producción de especies con importancia económica (Montiel et al. 2016). Por ende, la obtención de vitroplantas sanas en el presente trabajo fue muy importante, ya que dichos resultados podrían contribuir a futuras investigaciones en el cultivo de pitahaya en el Laboratorio de Biotecnología de la Sede Guanacaste de la Universidad de Costa Rica.

#### 7.2.2. Explantos con daños

Los explantes dañados fueron todos aquellos que presentaron microorganismos (hongos, bacterias), en alguna parte del explante, en el frasco de micropropagación, como se observa en la figura 18, o en el medio de cultivo y también se clasificaron como explantes dañados aquellos que cambiaron su coloración de verde a negro, es decir los explantes oxidados.



**Figura 18.** Explante descartado (dañado), debido a presencia de hongos en el frasco de micropropagación.

#### 7.2.2.1. Daños en explantes realizados por hongos

En esta investigación se obtuvieron 62 explantes contaminados debido a hongos; de los cuales se determinó el porcentaje de daño del patógeno para cada tratamiento. Como se puede observar en el cuadro 6, del apartado de resultados, el tratamiento con mayor porcentaje de explantes contaminados con hongos fue el 1, con un 53% y para el tratamiento 2 y 3 se obtuvo un 39% y 45% respectivamente.

Lo que concuerda con la investigación realizada por Sánchez y Salaverría en el 2004, en donde evaluaron tres concentraciones de hipoclorito de sodio (10-20-30%), durante tres periodos de inmersión (10-20-30 minutos), y en donde se observó que a medida que aumenta la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión la contaminación por hongos en los explantes disminuye.

Las contaminaciones fúngicas (Figura 19), en laboratorios de micropropagación comerciales son un problema considerable debido a que se encuentran con frecuencia. Si bien, aunque se tomen las medidas para una adecuada selección de material vegetal, siempre está la contaminación proveniente del explante, cuando es exógena la posibilidad de control de los principales contaminantes (hongos y bacterias) es significativa. Los hongos no solo pueden llegar del explante, sino que también lo pueden hacer durante la manipulación en el laboratorio o por el aire. Es por esta razón que se desarrollan protocolos de desinfección para cada especie que se quiere reproducir por medio de la técnica de cultivo de tejido vegetal (Aparecida et al. 2014).



**Figura 19.** Explantes contaminados por hongo. El explante estaba sano, pero se encontró presencia de hongo en el medio de cultivo (A) / Presencia de hongo en el explante y medio de cultivo (B) y (C).

#### 7.2.2.2. Daños en explantes realizados por bacterias

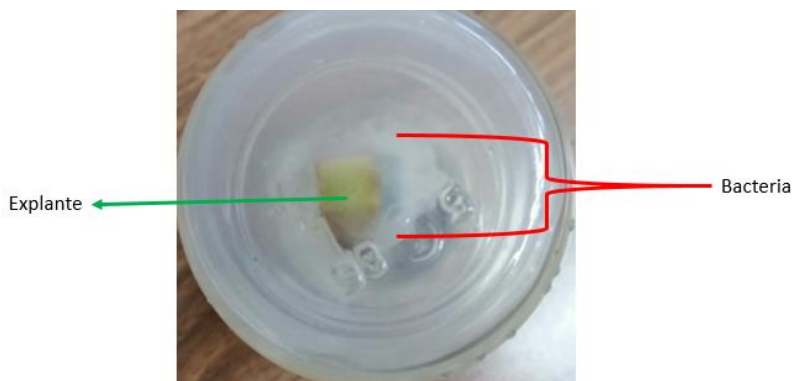
Según los resultados obtenidos (Cuadro 6), el porcentaje de contaminación de explantes por bacterias es mayor para el tratamiento 1, y menor en el tratamiento 3, con 4% y 1% respectivamente; lo que está directamente relacionado con las concentraciones de los desinfectantes utilizados en los protocolos de desinfección del material vegetal anteriormente mencionadas, pero se debe señalar la diferencia presentada entre los porcentajes de incidencia de bacterias, que son bajos en comparación con el de hongos que presentan porcentajes más altos.

El descarte de material vegetal debido a bacterias en el laboratorio (Figura 20), se presentó debido a la contaminación endógena, es decir, que las bacterias se encuentran presentes en el sistema vascular de la planta madre y al llegar o ser colocados en medios de cultivos proliferan por las condiciones idóneas para su desarrollo, y compiten con los explantes por los nutrientes y causan directa e indirectamente daño por colonización de sus tejidos, y pueden liberar en el medio, metabolitos tóxicos para las plantas (Aparecida et al. 2014).

En algunas investigaciones para disminuir la contaminación de los explantes se realizan aplicaciones de fungicidas y bactericidas a las plantas en campo, así se aseguran de que el material vegetal que se introducirá al

laboratorio tenga un menor porcentaje de contaminación que uno que no se haya tratado previamente. Un ejemplo de esta técnica se presenta en la investigación realizada por Viñas y colaboradores en el 2012, en donde a plantas de pitahaya que se encontraban en un invernadero se le realizaron tres semanas antes de iniciar el experimento de micropropagación aplicaciones de  $2 \text{ g L}^{-1}$  de Agrimicina y  $2 \text{ g L}^{-1}$  de Benomyl, los cuales son un bactericida y fungicida respectivamente.

Entonces, en el presente trabajo los bajos porcentajes de contaminación de explantes debido a bacterias podrían deberse a las aplicaciones de Beltanol 50 SL (fungicida-bactericida) realizadas a las plantas madre quince días antes de la recolección del material vegetal. Este fungicida-bactericida es sistémico por lo que aportó mayor protección, actuando de manera preventiva; es absorbido por los estomas o las raíces de las plantas hasta llegar a todos los tejidos conductores y así poder eliminar la enfermedad que afectaba a la planta (Rivero y Carlino, 2012).



**Figura 20.** Explante descartado debido a contaminación por bacteria.

#### 7.2.2.3. Daños en explantes debido a oxidación

Los desinfectantes además de ayudar a eliminar los contaminantes de la superficie de los explantes también pueden provocar un daño mínimo en las células vegetales (Iliev et al. 2010). Como se presenta en el cuadro 5, el tratamiento 3 mostró mayor proporción de explantes sanos, sin embargo, del total de explantes descartados para el tratamiento 3 (Cuadro 6), se observó un

54% de explantes oxidados (Figura 21); es decir, que del total de explantes descartados por daños en el tratamiento 3, aproximadamente la mitad fue por oxidación, debido al proceso abrasivo del desinfectante en concentraciones altas.

Los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, además de que la desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO), a diferentes concentraciones, promueve el oscurecimiento de los tejidos y la exudación de fenoles, otros factores que afectan la oxidación de la vitroplanta son los cortes que sufre, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (Azofeifa, 2009).

En un estudio realizado por Bogado y colaboradores en el 2016, se utilizaron distintas soluciones desinfectantes entre ellas el hipoclorito de sodio, los tratamientos 1 y 2 tenían este desinfectante en concentraciones de 1,5 y 3 g L<sup>-1</sup> y fueron expuestos por 30 minutos a ambas concentraciones obteniendo como resultado 3 y 10% de oxidación respectivamente, demostrando que dependiendo de la especie las concentraciones de desinfectante altas con tiempos de exposición largos pueden causar oscurecimiento de los tejidos.



**Figura 21.** Explantes descartados por necrosis (oxidación).

Sin embargo, a pesar del porcentaje de explantes que se pueden descartar debido a oxidación en una investigación de establecimientos de

protocolos de desinfección para una especie específica, la desinfección de materiales vegetales con hipoclorito de sodio sigue siendo una buena herramienta para establecer bancos de germoplasma en el laboratorio, pero, se pueden realizar investigaciones sobre la variación de los tiempos de exposición de los distintos materiales vegetales ante este desinfectante.

Cabe mencionar que en la presente investigación el 54% de explantes oxidados (Cuadro 6), del tratamiento 3, es del total de explantes descartados y no del total de explantes de la muestra, ya que el tratamiento 3, es el que presentó la media más alta de proporción de explantes sanos (Cuadro 5).

Por último, aunque por medio de las técnicas de micropropagación se pueden producir una gran cantidad de plantas de pitahaya y otras especies, el mayor problema que presentaron los explantes fue la contaminación, ya que existe una gran cantidad de microorganismos como levaduras, hongos filamentosos, bacterias, virus y micro-artrópodos (ácaros y trips), que se han identificado como contaminantes en el cultivo de tejidos vegetales (Altan et al. 2010).

La contaminación de los tejidos vegetales también se podría atribuir al factor humano (Figura 22); como menciona Cortés y colaboradores en el 2016, muchas de las colonias de hongos y bacterias que se encuentran presentes en los laboratorios pertenecen a la microbiota del ser humano y se pueden transferir a los explantes o medios de cultivo durante el proceso de manipulación o por medio del polvo del ambiente.



**Figura 22.** Explante contaminado con hongo y bacteria por factor humano.

### 7.3. *Subcultivos*

#### 7.3.1. *Variables brote y raíz*

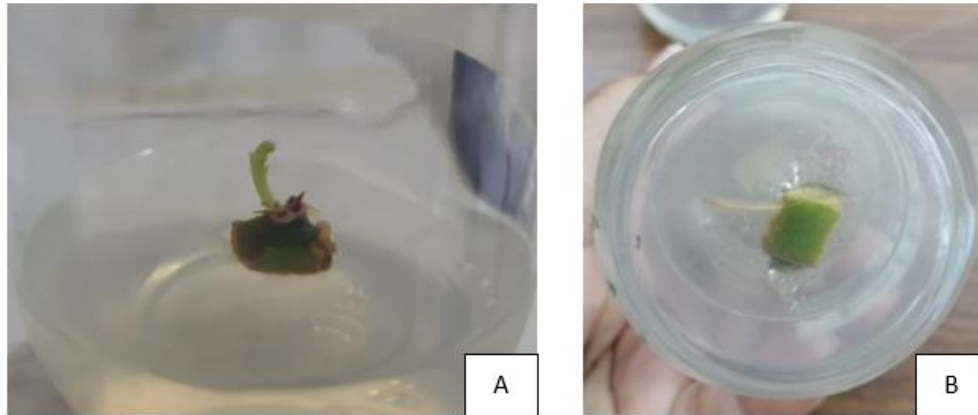
Para evitar fases adicionales en el cultivo *in vitro* de tejidos que aumenten costos y tiempo, es importante producir brotes y raíces, dicha obtención simultánea depende de la proporción de auxina/citoquinina (Pérez, 2011).

En la primera etapa de introducción y establecimiento de un protocolo de desinfección, no se obtuvieron brotes y raíces en los explantes porque se encontraban en un medio de cultivo básico sin reguladores de crecimiento. En la segunda etapa los medios de cultivo contenían reguladores de crecimiento y en los tres tratamientos se obtuvieron pocos explantes con brotes o raíces.

Según los resultados obtenidos por Viñas y colaboradores (2012), a los 84 días después de la siembra de los explantes, las areolas de pitahaya cultivadas en un medio libre de reguladores del crecimiento no pudieron iniciar los brotes. Por ende, ambos resultados confirman que el uso de reguladores de crecimiento es un factor eficiente para el rompimiento del letargo en yemas de cactáceas y al no haber presencia de estas no se presenta ninguna diferenciación de tejidos (Ojeda et al. 2012).

Por otro lado, el haber obtenido pocos explantes con brotes y raíces pudo deberse a que las evaluaciones se realizaron poco tiempo después del trasplante; ya que muchos de los explantes que se encuentran actualmente en el banco de germoplasma después de la evaluación del trabajo final de graduación presentan más brotes, raíces y callos que en el momento de la última evaluación.

Como se observa en el cuadro 7, en todos los tratamientos con reguladores de crecimiento se observaron explantes con brotes o raíces, pero el único que presentó ambas variables fue el tratamiento 3, como se muestran en la figura 23.



**Figura 23.** Explante de pitahaya con brote (A) / Explante de pitahaya con raíz (B).

Según un estudio realizado por Ojeda y colaboradores en el 2012, en donde utilizó un medio de cultivo básico de Murashige-Skoog (1962), adicionado con reguladores de crecimiento, los cuales fueron Zeatina, cinetina y 6- bencilaminopurina en proporción de  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  y  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ; se obtuvo un promedio de 8-9 brotes por tratamiento después de 12 semanas de la siembra. Posteriormente, con las vitroplantas se realizó un sub-cultivo que evaluaron a las 24 semanas después de ser subcultivados y obtuvieron que los tratamientos 3 ( $10 \text{ mg L}^{-1}$  de Zeatina y  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP) y 4 ( $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  de Cinetina y  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP) presentaron un promedio de 98 y 82 brotes respectivamente. Por ende, se deben de realizar evaluaciones en los explantes para contabilizar el número de brotes al menos 12 semanas después de la siembra.

### 7.3.2. Presencia de callos en los explantes

Los callos obtenidos en el presente trabajo, como se muestran en la figura 24, eran de color verde. Según Lallana y Lallana (2003), los callos pueden ser coloreados con antocianinas, verdes, blancos o amarillentos, la pigmentación puede ser en todo el callo, o con algunas regiones sin pigmentar; el cultivo de callos derivados de órganos que contienen clorofila podrá ser autotróficos en su nutrición. Los callos con clorofila, de cualquier manera, son



dependientes de azúcar exógeno para continuar creciendo, aún con adecuada intensidad de luz.



**Figura 24.** Explante con callo en el área donde se realizó el corte.

En el cuadro 8, se muestran las medias obtenidas para la variable proporción de callosidad, al igual que en las otras variables evaluadas, el tratamiento 3, es el que presenta la media más alta de proporción de callosidad con 0,34.

En el presente trabajo se obtuvieron 41 explantes totales con masas amorfas, surgidas de la proliferación de células del parénquima; estas se presentaron en algunas areolas y principalmente en los cortes ya que frecuentemente son el resultado de una herida (Lallana y Lallana, 2003), En el futuro, gracias al potencial de estos callos, en el laboratorio se pueden desarrollar raíces, brotes y embriones que formarán futuras plántulas.

Los callos se originaron principalmente en el área donde se realizaron los cortes para obtener el explante a multiplicar y en menor proporción en los puntos vegetativos de los cladodios (areolas). En una investigación realizada por Mendoza en el 2007, se menciona que el alto nivel de formación de callos en las zonas de los cortes se puede deber al contacto del material vegetativo expuesto con el medio de cultivo con los reguladores de crecimiento.

Por otro lado, también se presentó un aumento de callos en los explantes conforme se van realizando las siembras, esto se debe a que para las primeras siembras el material vegetal pudo estar más expuesto a estrés

por distintos factores, como permanecer por mayor tiempo en los recipientes con agua dentro de la cámara de flujo laminar mientras se realizaban las demás siembras.

Conforme el investigador realiza más repeticiones de este proceso mejora las técnicas de desinfección, siembra y los movimientos que realiza en la cámara de flujo laminar, permitiéndole disminuir la exposición de los explantes a patógenos por el cruce de manos, roces con la gabacha o el sacar las manos y no desinfectarlas antes de volverlas a ingresar a la cámara de flujo laminar; todos estos pequeños cambios van perfeccionando los diferentes procesos que implican directamente en menor estrés para el material vegetal, favoreciendo el aumento de explantes inocuos y mayor número de callos conforme se realizaban más siembras.

Por último, la incidencia de callos también se debe a la presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. La incorporación de auxinas al medio y la habilidad que tienen las plantas de sintetizarlas induce a la formación de callos (Perea, 2003; Criollo et al. 2016; Mállap, 2020).

Además, Ruvalcaba-Ruiz et al. 2010), afirma que el uso y combinación de las citoquininas (BAP) y auxinas (AIA), estimulan el desarrollo y crecimiento de los callos en cactáceas. Coincidiendo también con los resultados obtenidos por Suárez en el 2011, en donde utilizó cladodios de pitahaya amarilla *in vitro*, trabajados con reguladores de crecimiento con altas concentraciones de auxinas ( $3 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA) y citoquininas ( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP y  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de Kin) y donde el medio de cultivo denominado M4 obtuvo un 98% de presencia de callosidad.

## 8. Conclusiones

En el presente trabajo de investigación se evaluaron tres protocolos de desinfección para la introducción *in vitro* de material vegetal de pitahaya (*Hylocereus* sp), obtenido de la Finca Experimental de Santa Cruz de la Universidad de Costa Rica, Sede Guanacaste.

Estadísticamente, las concentraciones de las fuentes desinfectantes que permitieron obtener mayor número de explantes sanos en el cultivo *in vitro* de *Hylocereus* sp, fueron las de los tratamientos 2 y 3, ya que los mismos no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, la media para la variable de proporción de explantes sanos del tratamiento 3 (70% de alcohol y 3% de hipoclorito de sodio), fue la más alta (0,61), por ende, es el que obtuvo el mayor porcentaje de vitroplantas sanas.

Se determinó que el protocolo de desinfección del tratamiento 3, es el más favorable para la introducción de material vegetal de *Hylocereus* sp. *in vitro* en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad de Costa Rica, Sede Guanacaste.

Para los explantes en un medio de cultivo con reguladores de crecimiento, se determinó que el tratamiento 3 fue el que obtuvo mayor número de explantes con brotes, raíces y callos.

Para el presente trabajo se puede afirmar que el tratamiento 3, tiene las mejores combinaciones de concentraciones de desinfectantes y tiempos de exposición para la micropropagación *in vitro* de *Hylocereus* sp, y que se puede utilizar el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), con la combinación de los reguladores de crecimiento 6-Bencilaminopurina (BAP 0,5 mg L<sup>-1</sup>) y 3-Ácido Indolacético (AIA 0,3 mg L<sup>-1</sup>), (Zambrano *et al.* 2015), para un desarrollo simultáneo de brotes y raíces en las vitroplantas de pitahaya (*Hylocereus* sp).

Además, este proyecto de investigación facilitó un protocolo de desinfección *in vitro* para el material vegetal de pitahaya que se podrá utilizar en futuras investigaciones y se espera que en el futuro no tan lejano se pueda

brindar a los productores del cultivo de pitahaya un material más homogéneo, con mayor vigor y mejores poblaciones desde el punto de vista productivo y que le permita al productor planificar tiempos de siembra y producción.

## **9. Recomendaciones**

Que se realicen otros estudios o proyectos de investigación sobre el uso de otros desinfectantes, concentraciones y tiempos de exposición en la micropropagación del cultivo de pitahaya, debido a que la provincia de Guanacaste es una de las que presenta mayor producción en nuestro país.

Continuar con la aclimatación en un invernadero de las vitroplantas primeramente crecidas en el laboratorio de Biotecnología para que finalmente puedan salir a campo, y así poder brindar a los productores de pitahaya de la zona un material sano, de alta calidad, libre de virus y enfermedades.

No solo se recomienda realizar estudios en protocolos de desinfección e introducción de variedades de pitahaya, sino que también, se recomienda la investigación con reguladores de crecimientos en diferentes concentraciones para mejorar los resultados de obtención de brotes aéreos y raíces en el cultivo *in vitro*.

Por último, también se recomienda realizar estudios de identificación de variedades de pitahaya presentes en la Región Chorotega, ya que muchos de los pequeños productores de la zona desconocen la variedad que producen en sus fincas. Al identificar las variedades de pitahaya producidas permitirá homogenizar las plantaciones y así ofrecer un producto con características requeridas por el consumidor.

## 10. Literatura citada

- Alcantara, J. Acero, J. Alcántara, J. y Sánchez, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 17(32), 109–129. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702019000200109](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200109)
- Alcántara, J. Castilla, M. y Sánchez, R. (2017). Importancia de los cultivos vegetales *In vitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencia*, 1, 71–83. <https://www.researchgate.net/publication/343859326>
- Altan, F. Bürün, B. y Şahin, N. (2010). Fungal contaminants observed during micropropagation of *Lilium candidum* L. and the effect of chemotherapeutic substances applied after sterilization. *African Journal of Biotechnology*, 9(7), 991–995. <https://doi.org/10.5897/AJB08.090>
- Alvarado, J. (2014). Caracterización postcosecha de la calidad del fruto de pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) y roja (*Hylocereus undatus*). <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/4747/1/ALVARADOJos%C3%A9Apolonio.pdf>
- Andrade, J. Rengifo, E. Sima, L. Cervera, C. y Vargas-Soto, G. (2006). Microambientes de luz, crecimiento y fotosíntesis de la pitahaya (*Hylocereus undatus*) en un agrosistema de Yucatán, México. *Agrociencia*, 40(6), 687–697. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30240601>
- Aparecida, R. García, A. y Jasper, S. (2014). Soursop contamination and sprouting in function of the fungicide in the culture medium. *Comunicata Scientiae*, 5(3), 326–330. [www.ufpi.br/comunicata](http://www.ufpi.br/comunicata)
- Azofeifa-Delgado, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153–175. <https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990>
- Barba, Á. Luna, R. y Romero, A. (2001). Micropropagación de plantas. *Trillas Ed.* 17–37.
- Bogado, F. Vera, C. Ayala, P. Sansberro, P. y Luna, C. (2016). Uso de distintos desinfectantes superficiales para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Grevillea robusta*. *Revista de Investigaciones de La Facultad de Ciencias Agrarias - UNR*, 0(27), 011–016.

- Bonilla, V. y Abdelnour, A. (2017). Informe final de proyectos de investigación y extensión Arándano: Una opción para la diversificación de la agricultura en zonas altas II Fase. [https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/9163/Arandano\\_una\\_opcion\\_diversificacion\\_agricultura\\_zonas\\_altas.pdf?sequence=1](https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/9163/Arandano_una_opcion_diversificacion_agricultura_zonas_altas.pdf?sequence=1)
- Calva, G. y Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11), 1–16.
- Carhuaricra, K. Olivera, J. Gonzales, J. y Rodríguez, J. (2012). Introducción y multiplicación *in vitro* del cultivo de ajo variedad Morado Barranquino. *Rev. Peru. Biol*, 19(3), 341–344.
- Ceroni, A. y Castro, V. (2013). Manual de Cactus identificación y origen. In Ministerio del Ambiente Perú (Vol. 1). <https://www.minam.gob.pe/diversidadbiologica/wp-content/uploads/sites/21/2014/02/manual+de+cactus.compressed.pdf>
- Chuang, M. Ni, H. Yang, H. Shu, S. Lai, S. y Jiang, Y. (2012). First Report of Stem Canker Disease of Pitaya (*Hylocereus undatus* and *H. polyrhizus*) Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan. *Plant Disease*, 96(6), 906. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-11-0689-PDN>
- Civatti, L. M. Marchi, M. N. G. Schnadelbach, A. S. y Bellintani, M. C. (2017). *In vitro* multiplication and genetic stability of two species of *Micranthocereus* Backeb. (Cactaceae) endemic to Bahia, Brazil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 131(3), 537–545. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1304-6>
- Cortés, Y. Orozco, J. y Junco, J. (2016). Reducción del impacto ambiental negativo generado por los residuales en un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. *Biotecnología Vegetal*, 16(1), 37–43.
- Criollo, E. Insuasti, K. y Degaldo, W. (2016). Regeneración *in vitro* de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav. Sendt.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(2), 252–261. <https://doi.org/10.17584/rcch.2016v10i2.5750>
- Díaz, M. (2010). Fundamentos y técnicas de análisis microbiológicos. 22–50.
- Esquivel, P. y Araya, 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. <https://www.researchgate.net/publication/327110925>
- Garbanzo-León, G. Chavarría-Pérez, G. y Vega-Villalobos, E. (2019). Correlaciones alométricas en *Hylocereus costaricensis* y *H. monacanthus*

- (pitahaya): una herramienta para cuantificar el crecimiento. *Agronomy Mesoamerican*, 30(2), 425–436. <https://doi.org/10.15517/am.v30i2.33574>
- García, M. & Quirós, O. (2010). Análisis del comportamiento de mercado de la pitahaya (*Hylocereus undatus*) en Costa Rica. *Tecnología En Marcha*, 23(2), 14–24.
- Gerónimo, G. Pérez, B. Plata, G. y Aguirre, V. (2016). Capítulo 4: Contaminantes en el cultivo *in vitro*. In *Aplicación de cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos* (pp. 57–68). Universidad Mayor de San Simón.
- Iliev, I. Gajdošová, A. Libiaková, G. y Jain, S. (2010). Plant Micropropagation. In *Plant Cell Culture: Essential Methods* (p. 25). John Wiley and Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470686522.ch1>
- Jiménez, F. y Agramonte, D. (2013). Cultivo *in vitro* y macropropagación como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales. *Biotecnología Vegetal*, 13(1), 3–21. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/89/456>
- Jordán, M. y Casaretto, J. (2011). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. *Physical Review A - Atomic, Molecular, and Optical Physics*, 84(4), undefined-28.
- Lallana, V. y Lallana, M. (2003). Manual de prácticas de fisiología vegetal “*in vitro*” Facultad de Ciencias Agropecuarias - UNER (pp. 70–80). [http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/fisiologiaveg/m\\_didactico/manual\\_practicas/BDesarrolloED.pdf](http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/fisiologiaveg/m_didactico/manual_practicas/BDesarrolloED.pdf)
- Lan, G. He, Z. Xi, P. y Jiang. Z. (2012). First report of brown spot disease caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on *Hylocereus undatus* in Guangdong, Chinese mainland. *Plant Disease*, 96(11), 1702. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-12-0632-PDN>
- Levitus, G. Echenique, V. Rubinstein, C. Hopp, E. y Mroginski, L. (2010). *Biología y Mejoramiento Vegetal II*. (INTA). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Mállap-Detquizán, G. Vilca-Valqui, N. C. Benjamín Meléndez-Mori, J. Huaman-Huaman, E. y Oliva, M. (2022). Multiplicación *in vitro* de pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) a partir de plántulas obtenidas *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 33(1). <https://doi.org/10.15517/am.v33i1.45472>
- Mállap-Detquizán, G. Vilca-Valqui, N. Meléndez-Mori, J. Huaman-Huaman, E. Oliva, M. (2020). Multiplicación *in vitro* de pitahaya amarilla (*Hylocereus*

- megalanthus*) a partir de plántulas obtenidas *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 33(1), 45472. <https://doi.org/10.15517/am.v33i1.45472>
- Mállap, G. (2020). Evaluación de cuatro medios de cultivo con potencial para la multiplicación *in vitro* de la pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*), en la provincia Chachapoyas, Amazonas.
- Manzanero-Acevedo, L. Isaac-Márquez, R. Zamora-Crescencio, P. Rodríguez-Canché, L. Ortega-Haas, J. y Dzib-Castillo, B. (2014). Conservación de la pitahaya [*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose] en el estado de Campeche, México. *Foresta Veracruzana*, 16(1), 9–16.
- Martínez, Y. Orozco, J. y Horta, J. (2016). Reducción del impacto ambiental negativo generado por los residuales en un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. *Biología Vegetal*, 16(1), 37–43. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/508>
- Méndez, C. y Coello, A. (2016). El cultivo de la pitaya. [file:///C:/Users/Glenda%20y%20Luis/Documents/Anteproyecto/Pitahaya/Estos%20dias/subt\\_624\\_pitaya.pdf](file:///C:/Users/Glenda%20y%20Luis/Documents/Anteproyecto/Pitahaya/Estos%20dias/subt_624_pitaya.pdf)
- Mendoza, G. (2007). Propagación *in vitro* de *Astrophytum ornatum* (DE CANDOLLE) WEBER (Cactaceae), especie amenazada de extinción. <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/270/Ast%20rophytum%20ornatum.pdf?sequence=1>
- Molina, D. Vásconez, J. Veliz, C. y González, V. (2014). “Producción y Exportación de la Fruta Pitahaya hacia el mercado Europeo” (p. 9). [https://www.researchgate.net/publication/28797001\\_Produccion\\_Y\\_Exportacion\\_De\\_La\\_Fruta\\_Pitahaya\\_Hacia\\_El\\_Mercado\\_Europeo](https://www.researchgate.net/publication/28797001_Produccion_Y_Exportacion_De_La_Fruta_Pitahaya_Hacia_El_Mercado_Europeo)
- Montesinos, J. Rodríguez, L. Ortiz, R. Fonseca, M. Ruíz, G. & Guevara, G. (2015). Pitahaya (*Hylocereus* spp.) Un recurso fitogenético con historia y futuro para el trópico seco mexicano. *Cultivos Tropicales*, 36(especial), 67–76.
- Montiel-Frausto, L. Enríquez, J. y Cisneros, A. (2016). Propagación *in vitro* de *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Britton y Rose. *Biología Vegetal*, 16(2), 113–123.
- Mroginski, L. Sansberro, P. y Flaschland, E. (2010). *Biología y mejoramiento vegetal II*. I capítulo 1. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales (2da edición). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.



- Nicoloff, N. (2015). Capítulo 7: No siempre sale todo bien, problemas en el cultivo de tejidos vegetales. In *Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (Primera Edición, pp. 102–111). Editorial de la Universidad de la Plata.
- OIRSA (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria). (2000). Manual técnico, buenas prácticas de cultivo en pitahaya (p. 54). <https://doi.org/10.1>
- Ojeda-Zacarías, M. Vázquez-Alvarado, R. Santos-Haliscak, J. Moreno-Degollado, G. Aguirre-Arzola, V. Iracheta-Donjuan, L. López-Gómez, P. y Castellanos-Juárez, M. (2012). Micropropagación de pitahaya (*Hylocereus undatus* (HOWORTH)). *Revista Salud Publica y Nutrición, Edición especial* (4), 119–128.
- Olmos, S. Luciani, G. y Galdeano, E. (2010). PARTE IV Métodos de propagación y conservación de germoplasma. In *Biotecnología y mejoramiento vegetal II* (Vol. 2, pp. 351–376).
- Osuna-Enciso, T. Valdez-Torres, J. Sañudo-Barajas, J. Dolores Muy-Rangel, M. Hernández-Verdugo, S. Villarreal-Romero, M. y Osuna-Rodríguez, J. (2016). Fenología reproductiva, rendimiento y calidad del fruto de pitahaya (*Hylocereus undatus* (How.) Britton and Rose) en Culiacán, Sinaloa, México. *Agrociencia*, 50, 61–78. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v50n1/1405-3195-agro-50-01-61-en.pdf>
- Pariani, S. (2015). *Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. Capítulo 4. La incubadora, condiciones ambientales de cultivo y asepsia.* [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento\\_completo\\_\\_.pdf?sequence=1](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento_completo__.pdf?sequence=1)
- Perea, M. (2003). *Biotecnología Bananos y Plátano*. Editora Guadalupe.
- Perea, M. (2009a). *Cultivo de tejidos vegetales in vitro* (Primera edición). Universidad Nacional de Colombia. [http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad\\_de\\_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas\\_Libros/Biologia/Cultivo\\_de\\_Tejidos\\_Vegetales\\_In\\_Vitro/Cultivo\\_de\\_Tejidos\\_Vegetales\\_In\\_Vitro.pdf](http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad_de_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas_Libros/Biologia/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro.pdf)
- Perea, M. (2009b). *Cultivo de tejidos vegetales in vitro* (Primera edición). Universidad Nacional de Colombia.
- Pérez, J. (2011). Micropropagación de *Hylocereus megalanthus* (K. SCHUM. EX VAUPEL) RALF BAUER E *Hylocereus undatus* (HAWORTH) BRITTON Y ROSE, y caracterización molecular de brotes mediante

RAPDs.

<https://ninive.uaslp.mx/xmlui/bitstream/handle/i/3473/IAF1MIC01101.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Piña, J. (2018). La pitahaya: Cultivo con futuro en Costa Rica. *Germinar*, 18–19.
- Ramírez, J. (2020). Taller sobre la contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Universidad Francisco de Paula Santander. <https://www.studocu.com/co/document/universidad-francisco-de-paula-santander/biotecnologia-vegetal/taller-de-contaminacion-lab-biotecnologia/14655343>
- Recalde, D. Laborda, R. Tolsa, R. y Marqués, N. (2003). Manual de seguridad para operaciones en laboratorios de biotecnología y de tipos biológicos. <https://www.sprl.upv.es/pdf/manualbiotecnologia.pdf>
- Retana, K. Blanco, M. y Castro, O. (2018). Etiología del cáncer del tallo provocado por *Neoscytalidium dimidiatum* (penz) en *Hylocereus costaricensis*, en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 43(1), 21–33. <https://doi.org/10.15517/rac.v43i1.35646>
- Ricalde, F. y Andrade, J. (2009). La Pitahaya, una delicia tropical. *Ciencia*, 36–43.
- Rivas, M. (1998). *Cactáceas de Costa Rica*. (1 ed). Editorial Universidad Estatal a Distancia.
- Rivero, M. y Carlino, S. (2012). Manual para la aplicación de fitosanitarios. In *SENASA* (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) (p. 104). [http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL\\_SENASA/INFORMACION/GESTION%20AMBIENTAL/Manuales/6\\_Manual\\_Aplicadores.pdf](http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/INFORMACION/GESTION%20AMBIENTAL/Manuales/6_Manual_Aplicadores.pdf)
- Ruvalcaba-Ruiz, M. Rojas-Bravo, D. y Valencia-Botín, D (2010). Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12(1), 139–143. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93913074015>
- Sánchez-Cueva, M. y Salaverría, J. (2004). Control de la oxidación y contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria Xananassa* Duch). *Revista UDO Agrícola*, 4(1), 21–26.
- Soltero, R. y Portillo, L. (2015). Micropropagación de cactáceas mexicanas amenazadas. *Bol. Nakari*, 26(2), 13–17. <https://www.researchgate.net/publication/285204536>

- Strosse, H. Domergue, R. Panis, B. Escalant, J.-V. y Côte, F. (2003). Guías técnicas INIBAP 8 Suspensiones de células embriogénicas de banano y plátano. International Plant Genetic Resources Institute, 22. [www.ipgri.cgiar.org](http://www.ipgri.cgiar.org)
- Suárez, R. (2011). Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt & Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt & Rose. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/7991/7207004.2011.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Suárez, R. Caetano, C. y Ramírez, H. (2014). Multiplicación de *Selenicereus megalanthus* (pitahaya amarilla) e *Hylocereus polyrhizus* (pitahaya roja) vía organogénesis somática. In *Acta Agronomica* (Vol. 63, Issue 3, pp. 272–281). <https://doi.org/10.15446/acag.v63n3.40980>
- Twyman, R. Stoger, E. Schillberg, S. Christou, P. y Fischer, R. (2003). Molecular farming in plants: Host systems and expression technology. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 21, Issue 12, pp. 570–578). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.10.002>
- UACJ (Universidad Autónoma de Ciudad Juárez). (2017). Importancia de las cactáceas (pp. 2–3). [www.plantsrescue.com](http://www.plantsrescue.com)
- Vaillant, F. Perez, A. Davila, I. Dornier, M. y Reynes, M. (2005). Colorant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (*Hylocereus* sp.). *Fruits*, 60(1), 3–12. <https://doi.org/10.1051/FRUITS:2005007>
- Viñas, M. Fernández-Brenes, M. Azofeifa, A. y Jiménez, V. (2012). *In vitro* propagation of purple pitahaya (*Hylocereus costaricensis* [F.A.C. Weber] Britton & Rose) cv. Cebra. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 48(5), 469–477. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9439-y>
- Yuqing, H. Weiyuan, Y. Ling, M. Guangping, X. Zhongfeng, Z. Danjuan, Z. Chengxin, H. y Daxing, G. (2015). Physiological Effect on *Hylocereus undulatus* and *Hylocereus undatus* Under Simulated Karst Soil Water Deficiency. *Journal of Resources and Ecology*, 6(4), 269–275. <https://doi.org/10.5814/j.issn.1674-764x.2015.04.011>
- Zambrano-Foreno, C. y Ríos, J. (2015). Evaluación de reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *Hylocereus megalanthus* (pitahaya amarilla). *Revista Tumbaga*, 1(10), 76–87.

## 11. Anexos



Vitroplantas de *Hylocereus* sp de 26 a 33 semanas después de la siembra *in vitro* con brotes y raíces.