

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PROPAGACIÓN IN VITRO DE *ACANTHOCEREUS TETRAGONUS* (L.)  
HUMMELINCK (CACTACEAE)

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

SABY YANIRA CRUZ MALDONADO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2020

## Dedicatoria

A mis padres, Adalberto Cruz Zúniga y Helga Yadira Maldonado

## Agradecimientos

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento al director de esta tesis, el Dr. Víctor Jiménez, por el apoyo brindado con sugerencias e ideas y por la apertura ofrecida desde que lo contacté. Por su orientación y atención a mis consultas sobre metodología, mi agradecimiento a la M.Sc. Andrea Holst. También al M.Sc. William Solano por formar parte de mi comité de tesis. Al Dr. Eric Guevara, director del posgrado, por siempre estar anuente a ayudarme. Finalmente, gracias a la Dra. María Viñas, por la revisión cuidadosa que ha realizado de este texto y sus sugerencias. Quiero agradecer a cada uno de los profesores del programa de la maestría, ya que ellos me brindaron herramientas para desarrollarme como profesional y como investigadora. Los conocimientos y experiencias adquiridos con cada uno de ellos son invaluable. Asimismo, agradezco al personal y estudiantes del Laboratorio de Biotecnología del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), con quienes compartí estos años. También, a la Dra. Lilian Ferrufino de la Universidad Autónoma de Honduras, por ver un potencial en mí y siempre motivarme a mejorar y superarme como profesional.

Este trabajo de investigación también es fruto del apoyo de personas que nos estiman, sin el cual no hubiese tenido la fuerza y energía para crecer como persona y como profesional. Por ello, agradezco a mi familia, porque son quienes me han motivado a seguir mis sueños a pesar de las dificultades. Gracias a mis amigos, a los que ya tenía y a los que hice, en especial a las hermanas Torres Ulate, que siempre estuvieron para mí en los momentos difíciles. Por último, quiero agradecer al Programa Regional del Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD), por haberme concedido una beca para poder llevar a cabo mis estudios en la Universidad de Costa Rica, por abrirme las puertas al mundo. Sin su apoyo, esto no hubiese sido posible. A todos, muchas gracias.

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

---

Dr.sc.agr. María Viñas Meneses  
**Representante del Decano  
Sistema de Estudios de Posgrado**

---

Dr.sc.agr. Víctor M. Jiménez  
**Director de Tesis**

---

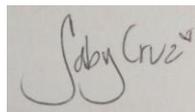
M.Sc. Andrea Holst Sanjuán  
**Asesora**

---

M.Sc. William Solano Sánchez  
**Asesor**

---

Dr. Eric Guevara Berger  
**Director del Programa de Posgrado  
en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales**



Firmado digitalmente por  
SABY YANIRA CRUZ  
MALDONADO(FIRMA)  
Fecha: 2020.06.14 18:28:05

---

Saby Yanira Cruz Maldonado  
**Candidata**

## TABLA DE CONTENIDO

|                                                                                                                                                                                                               |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Dedicatoria.....                                                                                                                                                                                              | ii   |
| Agradecimientos .....                                                                                                                                                                                         | iii  |
| Resumen.....                                                                                                                                                                                                  | vi   |
| Abstract .....                                                                                                                                                                                                | viii |
| Lista de figuras .....                                                                                                                                                                                        | x    |
| 1. Introducción.....                                                                                                                                                                                          | 1    |
| 2. Objetivos .....                                                                                                                                                                                            | 4    |
| 2.1 Objetivo General.....                                                                                                                                                                                     | 4    |
| 2.2 Objetivos específicos.....                                                                                                                                                                                | 4    |
| 3. Revisión de literatura .....                                                                                                                                                                               | 5    |
| 3.1 Clasificación y descripción morfológica de <i>Acanthocereus tetragonus</i> .....                                                                                                                          | 5    |
| 3.2 Clasificación y descripción morfológica de <i>Hylocereus costaricensis</i><br>(especie utilizada como comparador) .....                                                                                   | 6    |
| 3.3 Usos comunes de los cactus .....                                                                                                                                                                          | 9    |
| 3.4 Usos potenciales de <i>Acanthocereus tetragonus</i> .....                                                                                                                                                 | 9    |
| 3.5 Las areolas en la familia Cactaceae .....                                                                                                                                                                 | 13   |
| 3.5.1 Estructura y desarrollo de una areola .....                                                                                                                                                             | 13   |
| 3.6 Propagación in vitro.....                                                                                                                                                                                 | 16   |
| 4. Materiales y Métodos.....                                                                                                                                                                                  | 19   |
| 4.1 Material Vegetal .....                                                                                                                                                                                    | 19   |
| 4.2 Desinfección .....                                                                                                                                                                                        | 20   |
| 4.2.1 Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl) para la<br>desinfección de explantes .....                                                                                                   | 20   |
| 4.2.2 Efecto de la concentración de NaOCl y etanol en el oscurecimiento de<br>los explantes .....                                                                                                             | 23   |
| 4.2.3 Efecto del uso de polivinilpirrolidona (PVP) para la disminución del<br>oscurecimiento y de Supresor Microbiológico (SB) como controlador de<br>microorganismos en el establecimiento de explantes..... | 24   |
| 4.3 Establecimiento, brotación y crecimiento inicial .....                                                                                                                                                    | 26   |
| 4.3.1 Efecto del BAP a una concentración de entre 0 y 60 $\mu$ M sobre la<br>brotación inicial de <i>A. tetragonus</i> e <i>H. costaricensis</i> .....                                                        | 26   |
| 4.3.2 Efecto del tiempo de exposición a 20 $\mu$ M de BAP sobre la formación de<br>brotes .....                                                                                                               | 27   |
| 4.3.3 Efecto de la utilización de Mtop para la inducción de brotes.....                                                                                                                                       | 28   |
| 4.3.4 Efecto del tipo de explante .....                                                                                                                                                                       | 29   |

|                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.5 Efecto de la posición de las areolas .....                                                                                                                                | 30 |
| 4.3.6 Efecto de la oscuridad en la brotación.....                                                                                                                               | 31 |
| 4.3.8 Histología de areolas con indicios de brotes obtenidos medio de cultivo con BAP .....                                                                                     | 32 |
| 4.4 Enraizamiento .....                                                                                                                                                         | 35 |
| 4.5 Análisis estadístico .....                                                                                                                                                  | 35 |
| 5. Resultados.....                                                                                                                                                              | 36 |
| 5.1 Desinfección .....                                                                                                                                                          | 36 |
| 5.1.1 Efecto de la concentración de NaOCl para la desinfección de explantes .....                                                                                               | 36 |
| 5.1.2 Efecto de la concentración de NaOCl y etanol en el oscurecimiento de los explantes .....                                                                                  | 37 |
| 5.1.3 Efecto del uso de PVP para la disminución del oscurecimiento y de Supresor Microbiológico SB como controlador de microorganismos en el establecimiento de explantes ..... | 39 |
| 5.2 Establecimiento, brotación y crecimiento inicial .....                                                                                                                      | 39 |
| 5.2.1 Efecto del BAP a una concentración de entre 0 y 60 $\mu$ M para la iniciación de brotes en <i>A. tetragonus</i> e <i>H. costaricensis</i> .....                           | 39 |
| 5.2.2 Efecto del tiempo de exposición a 20 $\mu$ M de BAP sobre la formación de brotes .....                                                                                    | 44 |
| 5.2.3 Efecto de la utilización de Mtop sobre la inducción de brotes .....                                                                                                       | 45 |
| 5.2.4 Efecto del tipo de explante .....                                                                                                                                         | 46 |
| 5.2.5 Efecto de la posición de las areolas .....                                                                                                                                | 47 |
| 5.2.6 Efecto de la oscuridad sobre la brotación .....                                                                                                                           | 48 |
| 5.2.7 Histología de los brotes obtenidos en medio de cultivo con BAP .....                                                                                                      | 49 |
| 5.3 Enraizamiento .....                                                                                                                                                         | 52 |
| 6. Discusión .....                                                                                                                                                              | 54 |
| 6.1 Desinfección .....                                                                                                                                                          | 54 |
| 6.2 Establecimiento, brotación y crecimiento inicial .....                                                                                                                      | 57 |
| 6.3 Enraizamiento.....                                                                                                                                                          | 62 |
| 7. Perspectivas y conclusiones .....                                                                                                                                            | 62 |
| 8. Bibliografía citada .....                                                                                                                                                    | 64 |

## Resumen

La especie *Acanthocereus tetragonus* (Cactaceae) ha sido poco estudiada. Históricamente se ha usado en cercos vivos, como ornamental, medicinal y alimento, aprovechando sus tallos, el botón floral y sus frutos. Generalmente, los cactus se multiplican por semillas o por medios vegetativos tradicionales. Sin embargo, las técnicas de cultivo in vitro proveen ventajas, ya que, una vez que se ha definido el protocolo para una especie, se puede obtener un número mayor de plantas. El objetivo de este estudio fue desarrollar un protocolo de propagación in vitro para la reproducción de *A. tetragonus*. A pesar de que no se alcanzó a definir el protocolo, se realizaron diferentes estudios que ayudan a orientar la respuesta in vitro de esta especie. Entre los distintos factores evaluados, se estudió el efecto de la concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl) en la desinfección de explantes, la combinación de NaOCl y etanol sobre el oscurecimiento de los mismos, el uso de polivinilpirrolidona (PVP) como antioxidante, el efecto de seis concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP), el tiempo de exposición de los explantes a BAP y el uso de meta-topolina (Mtop). También se evaluó el efecto del tipo y posición de los explantes sobre la brotación y la producción espontánea de raíces in vitro. Además, se hicieron cortes histológicos de los brotes producidos in vitro para comprobar su integridad estructural y determinar el sitio de origen de los brotes. Todo lo anterior fue contrastado con el comportamiento in vitro de *Hylocereus costaricensis*, especie relacionada en la cual se ha logrado la propagación in vitro con éxito. En las pruebas de desinfección no se encontraron diferencias entre tratamientos. Sin embargo, se optó por 1% de NaClO ya que es la concentración más baja con la que se obtienen porcentajes de contaminación aceptables. También, la adición de 0.2% de PVP al medio de cultivo redujo el problema de oscurecimiento presentado en los explantes. Además, se observó que cualquier concentración, entre 20 y 60  $\mu\text{M}$  de BAP, sirve para iniciar la brotación de areolas de *A. tetragonus*. En cambio, solamente 160  $\mu\text{M}$  de Mtop indujo la brotación en esta especie. Con los cortes histológicos se observó que los brotes se formaron en el surco del lado apical de las espinas, quedando estas en la base. Esto indica que los nuevos brotes eran de origen axilar. Además, se postula que la producción espontánea de raíces posiblemente se debió a la síntesis *de novo* de auxina provocada por cortes hechos en los explantes.

## Abstract

*Acanthocereus tetragonus* (Cactaceae) is a species commonly used in different Mesoamerican countries, but it has been understudied. Historically, it has been used for living fences, as ornamental, source of medicine and food by consuming its stems, the floral buds, and its fruit. Generally, cacti are multiplied by sexual propagation, through seeds, or by traditional vegetative means. However, in vitro culture techniques provide advantages once a protocol for a species is defined because a greater number of plants can be obtained. The aim of this study was to develop an in vitro propagation protocol for the reproduction of *A. tetragonus*. Although the protocol could not be defined, different studies were carried out to help guiding the in vitro response of this species. Among the different factors evaluated, the effect of the concentration of sodium hypochlorite (NaOCl) on the disinfection of explants, the combination of NaOCl and ethanol on browning of the explants, the use of PVP as an antioxidant, the effect of six concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP), the time of exposure of the explants to BAP and the use of meta-topoline (Mtop) for shoot induction were studied. The effect of the type and position of the explants, the histology of the shoots produced in vitro, and the spontaneous in vitro rooting were also evaluated. All this was compared with the in vitro response of *Hylocereus costaricensis*, a related species that has been successfully propagated in vitro. Main results show that 1% NaOCl succeeds in disinfecting the explants but it is necessary to add 0.2% of PVP to the culture medium to counteract the explant oxidation. It was also observed that areole sprouting starts with any BAP concentration between 20 and 60  $\mu\text{M}$ , producing one shoot per explant, while only 160  $\mu\text{M}$  Mtop is effective. The histological analysis showed that the shoots formed in the groove of the apical side of the spines. These observations confirm that new shoots are of axillary origin. In addition, the observed spontaneous root production was possibly due to *de novo* synthesis of auxin caused by cuts made in the explants.

## Lista de cuadros

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1) Tratamientos utilizados para modificar el protocolo de desinfección de explantes de <i>A. tetragonus</i> e <i>H. costaricensis</i> . .....                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 23 |
| Cuadro 2) Tratamientos utilizados en los que se empleó PVP y Supresor Microbiológico (SB) para contrarrestar el oscurecimiento y contaminación de explantes en la etapa de establecimiento. ....                                                                                                                                                                                                                                                 | 25 |
| Cuadro 3) Tratamientos evaluados de BAP a una concentración de 20 $\mu$ M con diferentes tiempos de exposición. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 28 |
| Cuadro 4) Protocolo para la histología de areolas de cactus con base en Prophet et al. (1995). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 34 |
| Cuadro 5) Brotación, altura promedio de los brotes y porcentaje de callo producidos en los explantes de <i>A. tetragonus</i> e <i>H. costaricensis</i> con los tratamientos de Mtop y BAP. Tratamientos: ca= MS sin citoquinina (testigo absoluto); c= MS con 20 $\mu$ M de BAP (testigo); T1= MS + 20 $\mu$ M de Mtop; T2= MS + 40 $\mu$ M de Mtop; T3= MS + 80 $\mu$ M de Mtop; T4= MS + 160 $\mu$ M de Mtop. Evaluado a las ocho semanas..... | 45 |

## Lista de figuras

- Fig. 1) Representación de una A) areola, B) inflorescencia y C) fruto de *Acanthocereus tetragonus* (L.) Hummelinck (Imagen propia). .....6
- Fig. 2) Representación de una A) areola B) vista lateral de la inflorescencia y C) fruto de *Hylocereus costaricensis* (F.A.C. Weber) Britton & Rose (Imagen propia).....8
- Fig. 3) Pasos para el establecimiento in vitro de explantes de *A. tetragonus*: A) se cortaron cladodios de plantas que se encontraban en invernadero, (B) se llevaron al laboratorio, (C y D) se lavaron con agua de grifo y se cepillaron con jabón, (E) se cortaron en secciones de 5-7 cm, (F) se realizó el procedimiento secuencial del protocolo de desinfección, (G) en la cámara de flujo se enjuagaron los explantes y (H) se sembraron en un tubo de cultivo con medio MS suplementado con sacarosa al 5% y solidificado con 8 g/l de agar. ....22
- Fig. 4) Escala de oscurecimiento de los explantes luego del proceso de desinfección en *A. tetragonus*. .....24
- Fig. 5) Explante de *A. tetragonus* utilizado para obtener mayor número de brotes. El explante se obtuvo de cortes transversales de cladodios con 5 cm de altura y dejando 2 a 3 areolas por costilla. A) Cladodio y B) Nuevo explante. ....30
- Fig. 6) Posición de las areolas en cladodios de *A. tetragonus*. Las areolas ubicadas en la parte distal (en la punta) se consideraban A) apicales, las areolas en la parte central B) mediales y las que se ubicaban proximalmente eran C) basales. ....31
- Fig. 7) Porcentaje de contaminación de los explantes de *A. tetragonus* e *H. costaricensis* desinfectados con 1% y 1.5% de NaOCl luego de cuatro semanas

de cultivo in vitro. A) Porcentaje de contaminación de explantes en la primera introducción; B) Porcentaje de contaminación de explantes en la segunda introducción. \*Los valores señalados con letras iguales no son significativamente diferentes en ninguna de las dos introducciones, de acuerdo con un análisis de Chi-cuadrado,  $P > 0.05$ . Se usaron 10 repeticiones por tratamiento. Cada repetición constaba de una areola por tubo con medio de cultivo suplementado con 5% de sacarosa y gelificado con 8 g/l de agar. Número de explantes evaluados= *A. tetragonus*: Introducción I, 1%= 7, 1.5%=6; Introducción II, 1%= 6, 1.5%=4; *H. costaricensis*: Introducción I, 1%= 2, 1.5%=1; Introducción II, 1%= 1, 1.5%=6.....37

Fig. 8) Porcentaje de contaminación y oscurecimiento en *A. tetragonus* (A) e *H. costaricensis* (B) luego de cuatro semanas de cultivo en distintos tratamientos de desinfección con NaOCl y etanol. Tratamientos: T1= etanol 70% + NaOCl 1%, T2= sin etanol + NaOCl 1%, T3= Etanol 70% + NaOCl 0.7%, T4= Sin etanol + NaOCl 0.7% \*Los valores señalados con letras distintas indican que fueron significativamente diferentes de acuerdo con un análisis de Chi-cuadrado ( $P < 0.05$ ). Se usaron 10 repeticiones por tratamiento y se pusieron en medio de cultivo MS suplementado con 5% de sacarosa y gelificado con 8 g/l de agar. Evaluado a las cuatro semanas. Número de explantes evaluados= *A. tetragonus*: T1= 10, T2= 9, T3= 9, T4= 5; *H. costaricensis*: T1= 8, T2= 10, T3= 10, T4= 8.....38

Fig. 9) Porcentaje de contaminación y oscurecimiento en explantes de *A. tetragonus* (A) e *H. costaricensis* (B) luego de seis semanas en los distintos tratamientos con PVP y Supresor microbiológico. \*Los valores señalados con letras distintas

son significativamente diferentes de acuerdo con un análisis de Chi-cuadrado,  $P < 0.05$ . Tratamientos: T1= Ninguna modificación, T2= enjuague con PVP 0.7%, T3= Medio MS con PVP 0.2%, T4= enjuague con PVP 0.7% + Medio MS con PVP 0.2%, T5= enjuague con PVP 0.7 + Medio MS con PVP 0.2% + SB 2 ml/l, T6= enjuague con PVP 0.7 + SB 2 ml/l. Se usaron 10 repeticiones por tratamiento. Los explantes se pusieron en medio de cultivo MS suplementado con 5% de sacarosa y gelificado con 8 g/l de agar. Evaluado a las cuatro semanas. Número de explantes evaluados= *A. tetragonus*: T1= 9, T2= 7, T3= 10, T4= 6, T5= 10, T6= 8; *H. costaricensis*: T1= 10, T2= 10, T3= 10, T4= 10, T5= 10, T6= 10.....40

Fig. 10) Porcentaje de brotación de las areolas de *A. tetragonus* (A) e *H. costaricensis* (B) con distintas concentraciones de BAP. Evaluación realizada a las ocho semanas. Se hizo un análisis de regresión cuadrática y se usaron 10 repeticiones por tratamiento. Se pusieron en un medio de cultivo MS suplementado con sacarosa al 5%, PVP al 0.2% y gelificado con 8 g/l de agar. Número de explantes evaluados por tratamiento: *A. tetragonus*: 0  $\mu$ M= 6, 10  $\mu$ M= 6, 20  $\mu$ M= 6, 30  $\mu$ M= 7, 40  $\mu$ M= 6, 50  $\mu$ M= 7, 60  $\mu$ M= 6; *H. costaricensis*: 0  $\mu$ M= 5, 10  $\mu$ M= 7, 20  $\mu$ M= 6, 30  $\mu$ M= 7, 40  $\mu$ M= 6, 50  $\mu$ M= 6, 60  $\mu$ M= 5.....41

Fig. 11) Longitud promedio de los brotes obtenidos de areolas de *A. tetragonus* (A) e *H. costaricensis* (B). Evaluación realizada después de tres meses en medio de cultivo MS con PVP al 0.2% y distintas concentraciones de BAP. Valores con una misma letra no son estadísticamente significativos ( $P > 0.05$ ) de acuerdo con una prueba de Kruskal-Wallis. \*Barras representan el error estándar. Número de explantes evaluados por tratamiento: *A. tetragonus*: 0  $\mu$ M= 6, 10

$\mu\text{M}$ = 6, 20  $\mu\text{M}$ = 6, 30  $\mu\text{M}$ = 7, 40  $\mu\text{M}$ = 6, 50  $\mu\text{M}$ = 7, 60  $\mu\text{M}$ = 6; *H. costaricensis*:  
 0  $\mu\text{M}$ = 5, 10  $\mu\text{M}$ = 7, 20  $\mu\text{M}$ = 6, 30  $\mu\text{M}$ = 7, 40  $\mu\text{M}$ = 6, 50  $\mu\text{M}$ = 6, 60  $\mu\text{M}$ = 5. ....42

Fig. 12) Porcentaje de oscurecimiento de explantes de 1 cm con una areola de *A. tetragonus* después de ocho semanas en medio de cultivo MS con PVP al 0.2% y diferentes concentraciones de BAP. \*Tratamientos con distintas letras presentaron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con una prueba de Kruskal-Wallis ( $P < 0.05$ ). Número de explantes evaluados por tratamiento: *A. tetragonus*: 0  $\mu\text{M}$ = 6, 10  $\mu\text{M}$ = 6, 20  $\mu\text{M}$ = 6, 30  $\mu\text{M}$ = 7, 40  $\mu\text{M}$ = 6, 50  $\mu\text{M}$ = 7, 60  $\mu\text{M}$ = 6; *H. costaricensis*: 0  $\mu\text{M}$ = 5, 10  $\mu\text{M}$ = 7, 20  $\mu\text{M}$ = 6, 30  $\mu\text{M}$ = 7, 40  $\mu\text{M}$ = 6, 50  $\mu\text{M}$ = 6, 60  $\mu\text{M}$ = 5. ....42

Fig. 13) Porcentaje de callo producido en explantes de 1 cm con una areola de *H. costaricensis* en medio de cultivo MS con PVP al 0.2% y diferentes concentraciones de BAP, suplementado con 5% de sacarosa y gelificado con 8 g/l de agar. Evaluación realizada ocho semanas después de su introducción al medio de cultivo. \*Tratamientos con letras diferentes presentaron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con una prueba de Chi cuadrado ( $P < 0.05$ ). El número de explantes es como en Fig. 12. ....43

Fig. 14) Formación de callo en explantes de *Hylocereus costaricensis* en medio de cultivo MS con PVP al 0.2% y diferentes concentraciones de BAP suplementado con 5% de sacarosa y gelificado con 8 g/l de agar. A) formación en la base de los nuevos brotes; o B) formación del callo sin crecimiento del brote. C) frecuencia según el tipo de callo. Evaluado ocho semanas después de su introducción al medio de cultivo. Tratamientos con letras diferentes presentaron

- diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con una prueba de Chi cuadrado ( $P < 0.05$ ).....43
- Fig. 15) Porcentaje de oscurecimiento de los explantes de *A. tetragonus* luego de cuatro semanas de cultivo expuestos a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de BAP durante diferentes tiempos. Tratamientos: ca= MS sin BAP; c= MS + exposición permanente a 20  $\mu\text{M}$  de BAP; t1 = MS + exposición a 20  $\mu\text{M}$  de BAP por dos semanas; t2 = MS + exposición a 20  $\mu\text{M}$  de BAP por tres semanas; t3 = MS + exposición a 20  $\mu\text{M}$  de BAP por cuatro semanas. Se evaluaron 10 repeticiones por tratamiento. Tratamientos con letras diferentes presentaron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con una prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). Número de explantes evaluados: ca= 7, c= 6, t1= 6, t2= 6, t3= 7. ....44
- Fig. 16) Explante con brote de *A. tetragonus* sin elongación (flecha roja) producido en medio de cultivo MS con 20  $\mu\text{M}$  de BAP (testigo) después de ocho semanas de cultivo. ....45
- Fig. 17) Porcentaje de oscurecimiento de los explantes de *A. tetragonus* (A) e *H. costaricensis* (B) cultivados en medio MS adicionado con diferentes tratamientos de citoquininas. Tratamientos: T1 = 20, T2=40, T3= 80, T4= 160  $\mu\text{M}$  de Mtop, ca= MS sin citoquinina (testigo absoluto); c= MS con 20  $\mu\text{M}$  de BAP (testigo). Evaluado después de ocho semanas. \*Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes de acuerdo con una prueba post-hoc paramétrica de Tukey con un 95% de confianza. Número de explantes evaluados: 6 en todos los tratamientos. ....46
- Fig. 18) A) Explantes de *A. tetragonus* e *H. costaricensis* fotografiados después de dos semanas en medio de cultivo MS con 20  $\mu\text{M}$  de BAP; B y C) Oxidación de

los explantes de *A. tetragonus*; D) Oxidación en explante *H. costaricensis* y E) contaminación de explante de *H. costaricensis*. .....47

Fig. 19) Brotación de las areolas A) *A. tetragonus* y B) *H. costaricensis* según la posición en el cladodio. Los explantes se pusieron en medio de cultivo MS con 20  $\mu$ M de BAP, suplementado con sacarosa al 5% y gelificado con 8 g/l de agar. Se evaluaron después de ocho semanas. \*Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes de acuerdo con una prueba post-hoc paramétrica de Tukey con un 95% de confianza. A = apical, M = medial y B = basal. Número de explantes evaluados por cada tratamiento: 10.....48

Fig. 20) Brote de *A. tetragonus* inducido en la oscuridad. (A) Brote etiolado desarrollado después de ocho semanas en medio de cultivo MS con 20  $\mu$ M de BAP en oscuridad total y (B) El mismo brote después de dos semanas en luz directa, el cual recuperó su coloración. ....49

Fig. 21) Brotes en areolas de *A. tetragonus*: A) Brote obtenido en cultivo in vitro con BAP, después de ocho semanas; B) Brote obtenido en invernadero por decapitación de los ápices del cladodio, después diez semanas.....49

Fig. 22) Corte longitudinal de areolas en cultivo in vitro de *A. tetragonus*: A Base de la areola (BA), Primordios foliares PF); B-C Formación de espinas: Base de la espina (BE), proyecciones en las espinas (PE); D-E Formación secuencial de espinas y tricomas: Base de areola (BA), Zona de elongación de la espina (EE), Tricomas (Tri); F Zona central (ZC) y Zona periférica (ZP); G Epidermis (Ep), hipodermis (Hp), Células mucilaginosas (CM) y Parénquima (Pa). ....51

Fig. 23) Explantes de *A. tetragonus* que formaron raíces en medio de cultivo MS suplementado con sacarosa al 5%, 8 g/l de agar, diferentes concentraciones de

BAP y PVP al 0.2%. A-C) después de dos meses en cultivo y D-F) después de 4 meses en cultivo.....52

Fig. 24) Promedio de raíces producidas en explantes de *A. tetragonus* después de dos meses en medio de cultivo MS con diferentes concentraciones de BAP. Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes de acuerdo con una prueba post-hoc de Tukey con un 95% de confianza. Número de explantes evaluados: 6. ....53

Fig. 25) Longitud de las raíces producidas en explantes de *A. tetragonus* después de 4 meses en medio de cultivo MS con diferentes concentraciones de BAP. \* Las barras representan el error estándar. Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes de acuerdo con una prueba post-hoc de Tukey con un 95% de confianza. Número de explantes evaluados: 6.. .....53



UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

SEP Sistema de  
Estudios de Posgrado

**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

Yo, Saby Yanira Cruz Maldonado con cédula de identidad 6000631, en mi condición de autor del TFG titulado Propagación in vitro de Acanthocereus tetragonus (L.) Hummelink & (Cactaceae)

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI  NO \*

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: \_\_\_\_\_ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

**INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:**

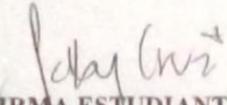
Nombre Completo: Saby Yanira Cruz Maldonado

Número de Carné: B69508 Número de cédula: 6000631

Correo Electrónico: sy-champloo@hotmail.com

Fecha: 14/05/20 Número de teléfono: 4504 32846083

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Víctor M. Jiménez

  
FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

## 1. Introducción

La familia Cactaceae está constituida aproximadamente por 1750 especies (Christenhusz y Byng 2016). Es nativa del continente americano y su distribución va desde Canadá hasta Argentina (Bravo-Hollis y Scheinvar 1999). Culturalmente es un grupo importante ya que se encuentra entre los taxones de plantas más llamativos que tienen una larga historia de uso humano. Varias especies de cactus se cultivan en más de 30 países. Unas 674 especies se aprovechan en horticultura, 64 especies son de uso medicinal y veterinario y 154 especies son utilizadas como fuente de alimento humano (Goettsch et al. 2015). De hecho, para la industria alimenticia este grupo es de interés ya que varias especies son una fuente de colorantes naturales gracias a las betalaínas, las cuales, además, poseen propiedades bioactivas y aplicaciones que promueven la salud al ser incluidas en la dieta diaria (Martins et al. 2017).

Una especie que ha sido comúnmente aprovechada pero que se ha estudiado muy poco es *Acanthocereus tetragonus* (L.) Hummelinck. Su distribución natural está limitada a Mesoamérica e históricamente se ha empleado en cercos vivos, como ornamental, medicinal y como alimento, ya que las partes juveniles de sus tallos son comestibles. Además, se consume el botón floral y su fruto. Este último se conoce comúnmente como pitahaya, al igual que los frutos de especies de los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus* (Meza 2011).

El consumo tradicional de cladodios y frutos de *A. tetragonus* ha despertado el interés por estudiar sus propiedades y se han realizado investigaciones sobre la composición química de sus tallos inmaduros (Juárez Cruz et al. 2012). Asimismo, se estudió el proceso de deterioro poscosecha de sus frutos, donde se analizó los síntomas presentados durante su almacenamiento y la actividad de enzimas vinculadas con este proceso y el

sistema antioxidante en frutos cosechados en su madurez fisiológica (Baquero-Duarte et al. 2005). Igualmente se han hecho estudios para inhibir lesiones provocadas por frío en el fruto mediante el uso del choque térmico (Dueñas-Gómez et al. 2008).

Generalmente, los cactus se multiplican por propagación sexual mediante semillas, o bien, por medios vegetativos empleando esquejes, rebrotes o hijuelos, e injertos. Sin embargo, existen técnicas de cultivo in vitro que proveen ventajas sobre los métodos convencionales ya que aprovechan las areolas, que se pueden ver como braquiblastos o ramas especializadas que cuentan con meristemos, que tienen el potencial de producir una planta completa a partir de ellos (Mauseth, 2006). Una vez definido un protocolo de propagación in vitro para una especie en específico, se puede obtener un mayor número de plantas que por otros métodos (Lema-Ruminska y Kulus 2014). Además, mediante estas técnicas, en conjunto con técnicas moleculares, se puede establecer un stock de plantas a partir del cual programas de mejoramiento pueden optimizar el material de un cultivo de interés a plantar en el campo (Brown y Thorpe, 1995).

Para definir un protocolo eficiente de propagación de plantas mediante crecimiento y desarrollo de yemas in vitro se deben establecer las condiciones idóneas para las diferentes etapas. Primero, se debe empezar con la desinfección de los explantes, luego introducir a condiciones de cultivo in vitro e inducir la brotación, después multiplicar los brotes, seguido de su enraizamiento y por último su aclimatación en condiciones *ex vitro* (Mroginski et al. 2010).

Diferentes especies de cactus se han propagado mediante técnicas de cultivo in vitro. Entre ellas se pueden mencionar: *Mammillaria mathildae* Kraehenb. & Krainz (García-Rubio y Malda-Barrera 2009), *Copiapoa chanaralensis* F. Ritter, *Copiapoa hypogaea* Ritter, *Eriogyne aurata* (Pfeiff.) Backeb.,

*Cleistocactus winteri* D.R. Hunt, *Eriosyce napina* (Phil.) Katt., *Mammillaria elongata* DC., *Cumulopuntia sphaerica* (Foerster) E.F. Anderson, *Cylindropuntia cylindrica* (Lam.) F.M. Knuth, *Trichocereus* sp. (A. Berger) Riccob, *Rhipsalidopsis gaertneri* (Regel) Moran y *Cereus peruvianus* (L.) Mill. (Seemann et al. 2007). También se han reproducido especies amenazadas del género *Turbinicarpus* (Backeb.) Buxb. & Backeb (De la Rosa Carrillo et al. 2012), entre otras. El Laboratorio de Biotecnología del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica, realizó un estudio para desarrollar un protocolo para el establecimiento y propagación in vitro de *Hylocereus costaricensis* mediante la activación de areolas (Viñas et al. 2012).

Se conoce que *A. tetragonus* se cultiva de forma tradicional en huertos familiares en varios lugares como Veracruz, Oaxaca y la región de la Huasteca en México (Meza 2011). Sin embargo, no existen estudios sobre la reproducción y cultivo in vitro de esta especie. Por ello, con la presente investigación se busca definir un protocolo eficiente de propagación de *A. tetragonus* para tener una fuente sostenida de plántulas, las cuales en un futuro puedan ser aprovechadas en estudios fisiológicos y para programas de mejoramiento de esta especie, así como para establecer plantaciones cuyas plantas puedan ser utilizadas como fuente de alimento, de pigmentos naturales, como ornamentales y como patrón para injertos.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo General**

Desarrollar un protocolo de propagación in vitro para la reproducción de *Acanthocereus tetragonus* (L.) Hummelinck

### **2.2 Objetivos específicos**

- 1) Definir un método de desinfección e introducción de explantes (areolas) para el establecimiento in vitro de *Acanthocereus tetragonus*.
- 2) Determinar los reguladores de crecimiento adecuados para la fase de establecimiento y brotación de yemas.
- 3) Determinar los reguladores de crecimiento adecuados para la multiplicación de brotes.
- 4) Inducir la formación de raíces in vitro mediante el uso de reguladores de crecimiento para obtener plántulas completas.
- 5) Concretar las condiciones idóneas de aclimatación necesarias para la transferencia exitosa de plántulas hacia condiciones de invernadero.

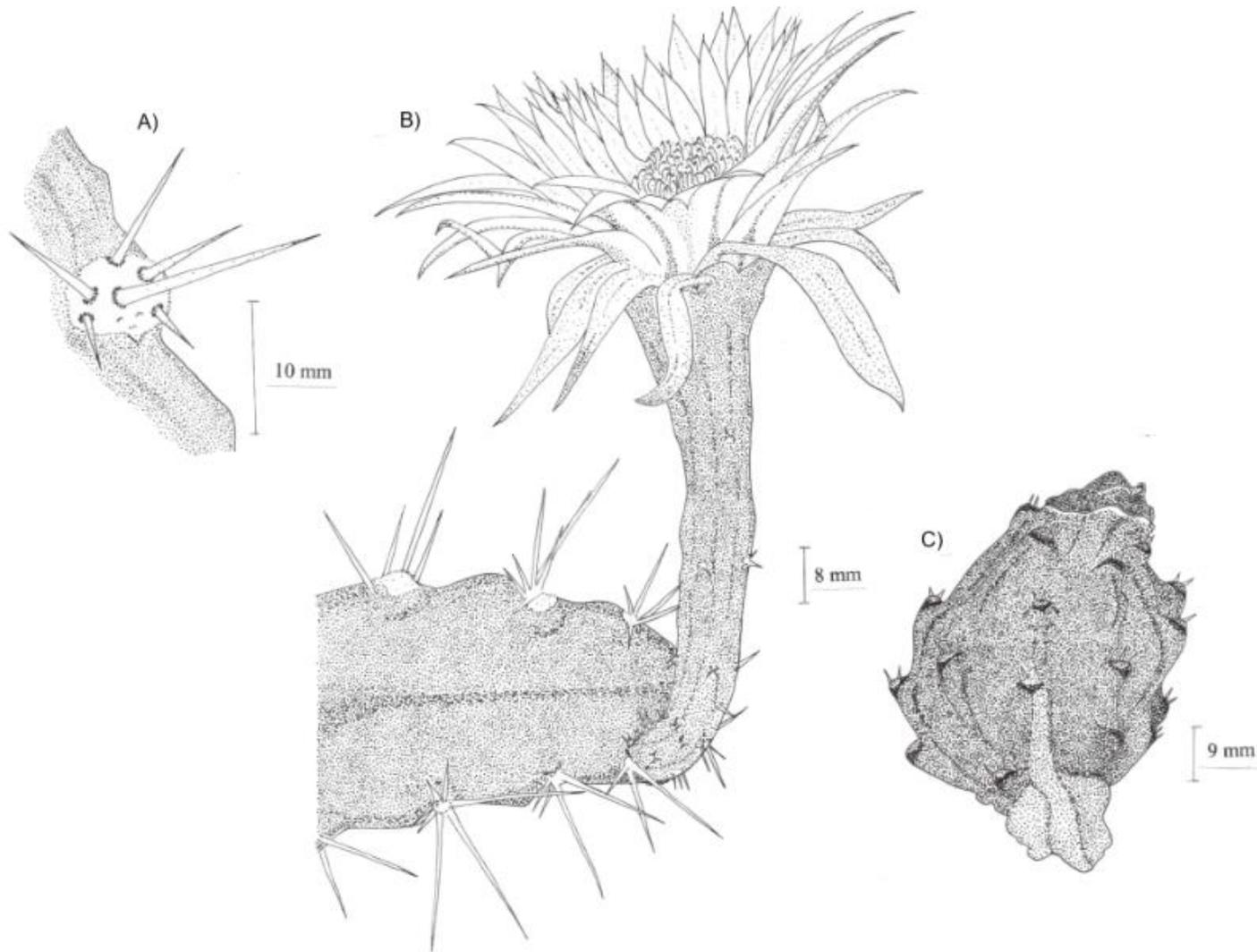
### 3. Revisión de literatura

#### 3.1 Clasificación y descripción morfológica de *Acanthocereus tetragonus*

Etimológicamente, *Acanthocereus* proviene del griego “akanthos, akantha” que significa espinas; y *Cereus*, un género de cactus columnares espinosos. El epíteto *tetragonus* proviene del griego “tetra” que significa cuatro y “gonia” que significa ángulo o esquina, por la forma de sus tallos (Egglí y Newton 2004a).

Esta especie tiene **tallos** generalmente de 2 a 3 m de longitud, pudiendo llegar a 7 m; en lugares abiertos son más o menos arqueados o decumbentes; los troncos viejos se hacen cilíndricos con aproximadamente 5 cm de diámetro, tienen una corteza mucilaginosa, de espinas y haces leñosos duros. Los cladodios son de 3 a 8 cm de ancho, con 3 a 5 costillas poco crenadas; los cladodios jóvenes son casi cilíndricos, con 6 a 8 costillas. Las **areolas** en las ramas normales están distantes entre 3 a 5 cm. Tienen **espinas** grises, aciculares hasta subuladas. Las espinas radiales, al principio, están en grupos de entre 6 y 7 y tienen de 1 a 4 cm de longitud. En cambio, la espina central solitaria es más larga que las radiales (Fig. 1A). Sus **flores** tienen una longitud de entre 14 y 20 cm; tienen areolas con un fieltro café y algunas espinas subuladas; los segmentos exteriores del perianto son verdes y los segmentos interiores son blancos y acuminados (Fig. 1B). Su **fruto** es oblongo, rojo y comestible (Fig. 1C) (Bravo-Hollis 1978).

La distribución natural de esta especie va desde el sur de Florida en Estados Unidos, pasando por México, Centroamérica y llegando hasta Colombia, Venezuela y Guadalupe (Bravo-Hollis 1978). En Costa Rica, se distribuye desde Guanacaste hasta el Valle Central y en el cañón del río Térraba (Chízmar-Fernández 2009).



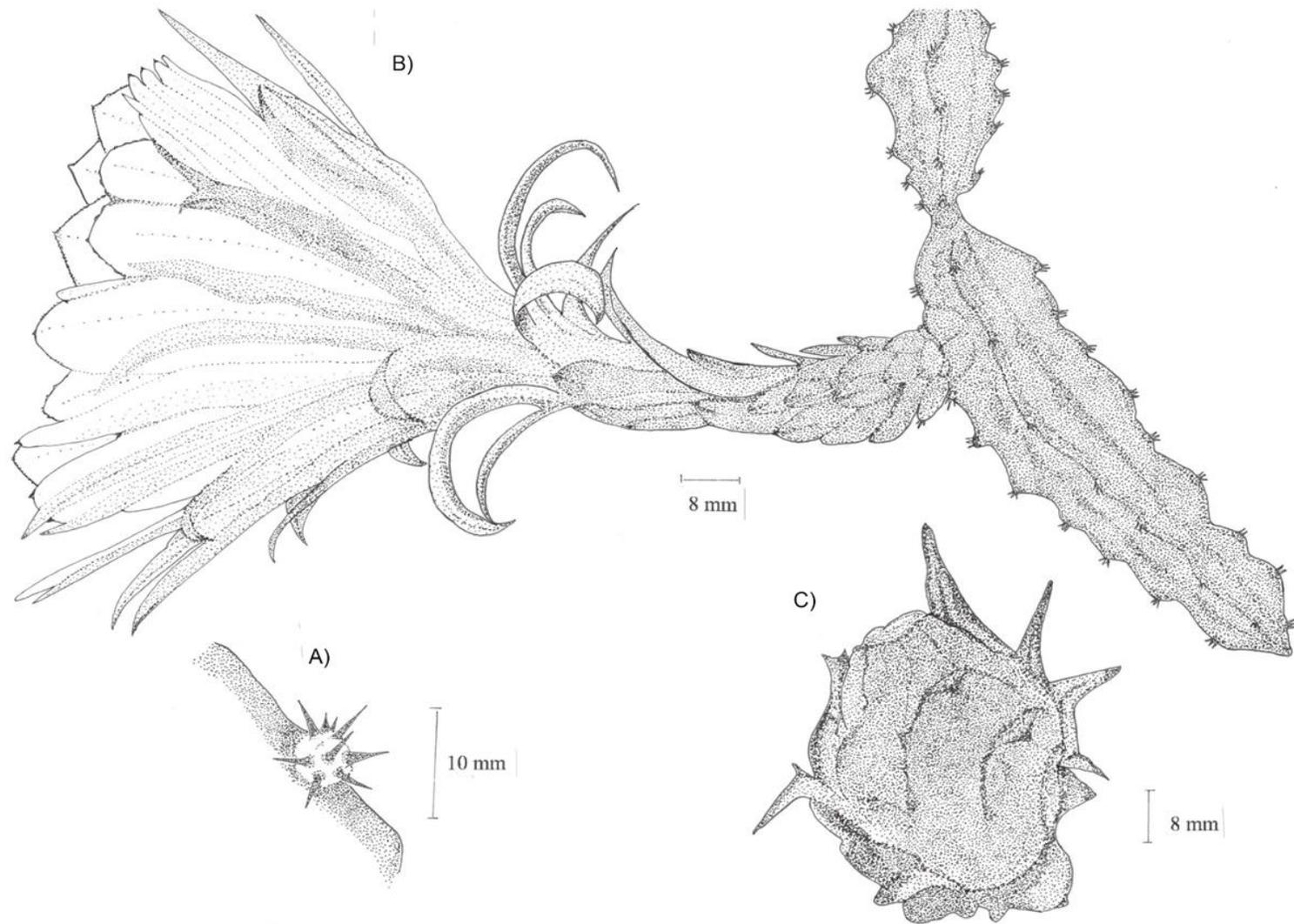
**Fig. 1)** Representación de una A) areola, B) inflorescencia y C) fruto de *Acanthocereus tetragonus* (L.) Hummelinck (Imagen propia).

### 3.2 Clasificación y descripción morfológica de *Hylocereus costaricensis* (especie utilizada como comparador)

El género *Hylocereus* proviene del griego “Hyle”, que significa bosque, y “cereus” el género de cactus columnares. En el caso específico de la especie *H. costaricensis*, se le dio este nombre ya que Costa Rica fue el lugar donde se colectó primero un espécimen al momento de su descripción (Eggli y Newton 2004b).

Estos cactus son trepadores, por lo común epífitos. Sus **tallos** son triangulares y tienen costillas más o menos onduladas; las ramas producen raíces aéreas. Las **areolas** están provistas con espinas cortas de color café (Fig. 2A). Sus **flores** tienen una longitud de hasta 30 cm, son nocturnas, infundibuliformes, con un limbo tan largo como el tubo o más (Fig. 2B); el ovario y el tubo llevan grandes escamas foliáceas, con las axilas provistas de fieltro, lana o cerdas, pero sin espinas; los segmentos exteriores del perianto son semejantes a las escamas del tubo, pero más largos; los segmentos interiores del perianto son angostos, agudos o acuminados, generalmente blancos, rara vez con tinte rosa. El **fruto** tiene grandes escamas foliáceas persistentes, sin espinas, es comestible y comúnmente se le conoce como “pitahaya” (Fig. 2C) (Rivas-Rossi 1998; Bravo-Hollis 1978).

Su distribución natural va de Nicaragua hasta Panamá. En Costa Rica se ha registrado en Guanacaste, el Pacífico Central, la Península de Nicoya, las cordilleras de Guanacaste y Tilarán y el Valle Central, así como en los valles de los ríos Candelaria, General y Grande de Térraba (Chízmar-Fernández 2009). También se cultiva en Nicaragua y Costa Rica para la producción de frutos y exportarlos principalmente a Europa y Estados Unidos. Generalmente, se propaga por clones a partir de plantas silvestres seleccionadas del campo (Nerd et al. 2002).



**Fig. 2)** Representación de una A) areola B) vista lateral de la inflorescencia y C) fruto de *Hylocereus costaricensis* (F.A.C. Weber) Britton & Rose (Imagen propia)

### **3.3 Usos comunes de los cactus**

La habilidad que tienen los cactus para prosperar en ambientes en los cuales muchas otras especies son incapaces de hacerlo, es lo que los hace de interés para estudios biotecnológicos y de fitomejoramiento para expandir el rango de productos que ofrecen, enfocándose primero en entender los mecanismos moleculares detrás de características útiles e interesantes, y luego en usar estos conocimientos para desarrollar cultivos que se adapten mejor a las necesidades humanas (Chapman et al. 2002).

La mayoría de los frutos de cactáceas comercialmente aprovechados pertenecen a la subfamilia Cactoideae y se conocen en Latinoamérica como pitaya o pitahaya. A diferencia de los frutos de la especie *Opuntia ficus-indica*, de la subfamilia Opuntioideae, las pitahayas carecen de gloquidios y tienen semillas pequeñas digeribles. La corteza puede tener o no espinas, pero las espinas generalmente son grandes y se remueven fácilmente cuando el fruto madura (Nerd et al. 2002). Se considera que el inicio de su domesticación es reciente y las primeras publicaciones de prácticas serias de su cultivo son de hace aproximadamente cuarenta años (Le Bellec et al. 2006), ya que desde 1980 se han hecho esfuerzos por cultivar diferentes especies de pitahayas de los géneros *Hylocereus*, *Selenicereus*, *Cereus* y *Stenocereus* (Nerd et al. 2002; Le Bellec et al. 2006).

### **3.4 Usos potenciales de *Acanthocereus tetragonus***

El cactus *A. tetragonus* ha sido tradicionalmente utilizado para cercos vivos, como ornamental y alimento. Además, desde el punto de vista etnobotánico, a esta especie se le han atribuido propiedades medicinales para controlar la diabetes, hipertensión arterial, curar úlceras intestinales y estreñimiento (Juárez-Cruz, 2007). Aunque hasta el momento no hay estudios científicos que lo respalden. En México, es la segunda especie de cactus, después del

nopal, cuyas partes verdes son las más usadas para la alimentación humana (Cruz, 2010).

A pesar de los usos y propiedades antes mencionados, *A. tetragonus* no es una especie que se ha domesticado. Por ello, para su comercialización en mercados se aprovechan ampliamente las plantas silvestres. El precio del kilogramo de cladodios de esta especie ronda entre \$12.00 y \$15.00 y en ocasiones llega a costar hasta \$20.00 y los rollos que tienen entre 5 a 6 piezas tienen un precio de \$8.00 a \$10.00 (Juárez-Cruz, 2007).

A diferencia de México, en Centroamérica, *A. tetragonus* es utilizado principalmente como cerco vivo (Grijalva-Pineda 2006). Sin embargo, se ha visto que esta especie es rica en fibra y proteína y es una planta con potencial alimenticio por ser económico y nutritivo. Por ello, en países como Guatemala se está considerando como una opción de cultivo alternativo (Juárez-Cruz, 2007; Cabrera-Rivera, 2013).

Habitualmente, las líneas de investigación para el mejoramiento de cactus se han enfocado en expandir el área de producción, mejorar la calidad y productividad de los cactus para llegar a nuevos mercados y agregar nuevas características que permitan el desarrollo de nuevos usos (Chapman et al. 2002). En este sentido, podría iniciarse un proceso de manejo y domesticación de *A. tetragonus* para tener un cultivo con características seleccionadas que sean del agrado de los consumidores de esta especie, ya sean para aprovechar sus partes vegetativas o su fruto.

Los injertos son técnicas utilizadas convencionalmente para la propagación de plantas. Se basa en la unión de una sección de una planta que aporta un sistema radicular conocido como portainjerto o patrón, con un sistema de vástagos llamado injerto, los cuales subsecuentemente crecen y se desarrollan como una planta compuesta (Hartmann et al. 2010). Esto permite tener plantas con características de dos o más tipos de especies, haciendo

posible la producción de ciertos cultivos que se desarrollan en condiciones que normalmente hubieran sido negativas para una de las dos especies, generalmente para el injerto (Hartmann et al. 2010; Hartmann et al. 2014). En este caso, *A. tetragonus* podría ser empleado como patrón para injertos de otras especies de importancia económica como las pitahayas, de los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus*, ya que podría aportar un sistema radicular mejor desarrollado al ser una especie de hábito terrestre y, por ejemplo, mejorar la absorción de agua y nutrientes de la especie injertada (Dubrovsky y North 2002).

Las betalaínas son pigmentos con estructura y biosíntesis distintivos en la naturaleza y solamente se han encontrado en ciertas familias dentro del orden Caryophyllales (Clement et al. 1994). Estos pigmentos presentan colores que se pueden agrupar en betacianinas de color rojo a violeta y betaxantinas de color amarillo a naranja (Ali y El-Mohamedy 2011). Estos pigmentos se consideran como una alternativa natural y segura para el color rojo sintético y han sido estudiados principalmente en remolacha, actualmente la única fuente comercial de betalaínas utilizada para colorantes alimenticios (Rodríguez-Amaya, 2016). Aunque hay una amplia variedad de usos que se le pueden dar a estos pigmentos, existe una limitada fuente de especies que los producen en la naturaleza y, en particular, un pequeño número de plantas comestibles. Lo anterior ha llevado hacia el mejoramiento y búsqueda de nuevas fuentes y técnicas para la obtención de estos pigmentos. Varios esfuerzos se pueden aplicar y uno de estos es el explorar especies alternativas de plantas y cultivos para la extracción de betalaínas (Polturak y Arahoni 2017).

Debido a la presencia de estos pigmentos, los frutos de las cactáceas se han propuesto como una fuente prometedora de colorantes naturales (Stintzing et al. 2002a; Stintzing et al. 2002b). Los estudios se han enfocado en los frutos de las especies *Opuntia ficus-indica* (Stintzing et al. 2002a; Butera et al. 2002; Gentile et al. 2006; Cejudo-Bastante et al. 2014; Albano et al., 2015),

*Hylocereus polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose (Stintzing et al. 2002b; Harivaindaran et al. 2008; Wybraniec et al. 2009; Rebecca et al. 2010; Woo et al. 2011), *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. ex Pfeiff.) (García-Barrera et al. 1998; Herrera-Hernández et al. 2011) y *Stenocereus* spp. (García-Cruz et al. 2012; García-Cruz et al. 2013; Pérez-Loredo et al. 2015). Sin embargo, los frutos de *A. tetragonus* producen un color rojo en su cáscara y pulpa, visualmente distintos a los producidos en, por ejemplo, *Hylocereus* spp. Aunque no existen estudios publicados sobre los pigmentos en *A. tetragonus*, esta especie podría ser otra fuente más para la obtención de betalaínas, ampliando aún más la gama de colores naturales que se podrían aprovechar en la industria alimenticia.

Aparte de los usos potenciales para el consumo humano antes mencionados, esta especie también tiene otras utilidades que podrían ser exploradas y explotadas. Por ejemplo, es conocido que la industria textilera es causante de un alto impacto ambiental debido al consumo de grandes cantidades de agua y, al mismo tiempo, por producir aguas residuales contaminadas con colorantes. La remoción de estos contaminantes requiere de tratamientos fisicoquímicos que sean apropiados (Phani Madhavi et al. 2014). Se han estudiado coagulantes de origen vegetal que sean eficientes en el proceso de saneamiento de aguas residuales de la industria textilera y se han usado coagulantes de especies como *Moringa oleifera* (Jadhav y Mahajan 2012) y *Zea mays* (Mandloi et al. 2004).

En el caso de las cactáceas, se ha evaluado el uso de cladodios de *Opuntia ficus-indica*, y se demostró que extractos de esta especie pueden ayudar en el proceso de saneamiento de aguas con colorantes tóxicos, como el rojo HE7B, gracias al mucílago que contiene esta planta (Vishali y Karthikeyan 2014). En otro estudio, se usó extractos de los cladodios de *A. tetragonus* para evaluar su viabilidad y eficiencia como biocoagulante, y se encontró que esta especie puede reducir hasta en un 90% la concentración de colorantes en el agua. Su eficacia tiene un amplio rango de acción de valores de pH y,

aunque la dosis del biocoagulante necesaria es más alta que la de los coagulantes químicos, la cantidad de sedimento que se forma es menor. Por eso lo recomiendan como una alternativa para el tratamiento de aguas residuales de textiles (Chetana et al. 2015).

### **3.5 Las areolas en la familia Cactaceae**

Todas las plantas con flores producen una yema en la axila de cada una de sus hojas. Cada yema contiene un pequeño grupo de células meristemáticas, las cuales son capaces de dividirse y crear nuevas células y tejidos. Un aspecto evolutivo de las plantas es que mientras un vástago produce hojas, simultáneamente produce una nueva yema en la axila de cada una de esas hojas nuevas (Mauseth 2017a).

Las areolas son estructuras que se encuentran solamente en las cactáceas y son yemas axilares conocidas también como yemas laterales, las cuales cumplen un papel importante en la vida de estas plantas al producir estructuras como espinas, flores y ramas (Mauseth, 2006).

#### **3.5.1 Estructura y desarrollo de una areola**

Las areolas son yemas axilares altamente modificadas. Cada yema axilar se localiza dentro de una hendidura en los tallos y surge a partir de la tercera o cuarta capa de células más cercana a la superficie del tallo durante los estadios de desarrollo más tempranos y poseen una red de tejidos vasculares que se encuentra justo debajo de ellas (Mauseth 2006).

Generalmente, en las plantas con flores, al menos dos haces vasculares van desde el centro del tallo hacia las yemas: uno llamado “traza de la yema” que va hacia la yema y el otro, una “traza foliar” que va hacia la hoja, que forma la axila dónde la yema se localiza (Mauseth 2006). En los cactus, varios pequeños haces vasculares se dirigen hacia las espinas, pero ningún haz

entra en ellas. Al parecer, los haces apenas forman una red debajo de las agrupaciones de espinas ya que nunca se han encontrado dentro de una, por lo que puede que simplemente lleven agua y nutrientes cerca de la base de las mismas. No obstante, esto es algo que debe ser estudiado aún más (Mauseth 2017a).

Cuando una areola es estimulada para desarrollarse también lo hacen los haces vasculares que la atraviesa. Nuevas células son agregadas a las trazas de la yema, no solo aumentando su capacidad de transporte de agua y nutrientes, sino que también proveen sostén para soportar una flor o una rama pesada en desarrollo (Schwager et al., 2015).

Las areolas solamente tienen un periodo corto en el cual sus características son determinadas por la planta o el ambiente. Una vez que una plántula alcanza dos o tres años y es lo suficientemente fuerte para producir areolas y espinas robustas, ya no invierte recursos en el desarrollo de las primeras areolas, aunque se pueden encontrar areolas viejas en un cactus que producen una o dos espinas nuevas. Esto parece ser esporádico, pero después de decapitar un tallo para forzarlo a producir nuevos brotes, muchas areolas viejas debajo del corte empiezan a producir espinas nuevas. Esto se debe a que la decapitación rompe la dominancia apical (Mauseth 2017a).

Sin embargo, después de que una espina madura, todas sus células mueren. De esta forma, no necesita suplementos de agua y nutrientes y la red vascular muere. Si una areola se mantiene dormante toda su vida, entonces también lo hacen sus haces vasculares. Pero si el meristemo de la areola rompe la dormancia y crece, ya sea como una rama vegetativa o como una inflorescencia, entonces el tejido vascular crece de tal forma que pueda suplir suficiente agua y azúcares (Mauseth 2017a).

### 3.5.2 Meristemo apical del vástago (SAM)

Un grupo de células en división es lo primero en formarse en una areola, las que se convierten en el meristemo apical del vástago (SAM) de la yema axilar (Boke 1944; Mauseth, 2017b). La primera actividad del SAM es la formación de un primordio de espinas, el cual siempre se desarrolla al lado del SAM más cercano a la hoja subtendiente. En un tallo común, las células se expanden hacia arriba, elevando el SAM y haciendo espacio para las hojas a lo largo de un tallo. Pero en un cactus, mientras algunas de las células producidas por el SAM se desarrollan en espinas, otras se expanden hacia afuera, de tal forma que la areola crece como un disco elongado, proveyendo espacio para nuevas espinas (Mauseth 2017b).

En muchas areolas, el SAM siempre se mantiene dormante. Por lo general, solo algunas de las areolas se desarrollan para formar nuevos cladodios y otras se desarrollan en inflorescencias. Por ello, el SAM es considerado como un reservorio de células saludables, potencialmente capaces de crecer en el caso de que el tallo principal sea dañado o cortado (Mauseth 2006; Mauseth 2017b).

Cuando una areola es estimulada para desarrollarse, sus células meristemáticas aumentan el metabolismo, crecen rápido y se dividen, repitiendo sucesivamente este proceso. La areola reactivada produce primordios foliares en espirales. También el tallo crece hacia arriba como un tallo cilíndrico y no hacia afuera como si fuera un disco. Si la areola se desarrolla en una rama vegetativa, este proceso se puede repetir varias veces, pero si la areola ha sido dirigida a producir una inflorescencia, entonces después de que ha hecho algunas hojas, el SAM cambia a hacer primordios de pétalos, luego primordios de los estambres y finalmente primordios de los carpelos. Por último, el SAM de una inflorescencia se desorganiza, ya que este meristemo no es persistente (Mauseth 2016).

### **3.6 Propagación in vitro**

El cultivo in vitro es un conjunto de técnicas empleadas para el desarrollo aséptico de células, tejidos y órganos bajo condiciones físicas y químicas controladas. La base teórica para el cultivo de tejidos vegetales fue propuesta por Gottlieb Haberlandt en sus notas sobre cultivo de células en la Academia Alemana de Ciencias en 1902 (Thorpe, 2007; Vasil, 2008). Se emplea para estudiar procesos fisiológicos y genéticos en plantas, así como en el comercio para la producción masiva de plantas de interés económico (Thorpe, 2007).

Las técnicas de cultivo de células y tejidos vegetales han sido utilizadas por mucho tiempo como sistemas biológicos importantes para estudios básicos y como herramientas biotecnológicas para la propagación clonal de plantas en programas de mejoramiento de cultivos y manipulación genética de los mismos. Se puede usar en la multiplicación de especies que naturalmente se reproducen asexualmente, pero también se aprovecha en especies con problemas de germinación de semillas, que son recalcitrantes y que se caracterizan por ser viables por corto plazo (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo 2018).

La propagación in vitro de plantas puede llevarse a cabo principalmente por tres vías: 1) promoviendo la proliferación de yemas apicales y axilares y luego enraizarlas, 2) inducir la formación de yemas adventicias y su consiguiente enraizamiento (organogénesis) y, 3) embriogénesis somática. Cada alternativa puede aplicarse a varias especies de plantas con diferentes eficiencias, dependiendo del antecedente genético y la capacidad regenerativa, el medio de cultivo y las condiciones de incubación (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

Los cactus son plantas de importancia en la horticultura e investigación. En estas plantas se aplican técnicas de cultivo in vitro para evadir dificultades

como crecimiento lento y problemas relacionados con la propagación sexual y propagación vegetativa tradicional. Los primeros intentos exitosos de cultivo in vitro con fragmentos de cactus se dieron a finales de la década de los años 1950 e inicios de los 1960 con la especie *Trichocereus spachianus* (Riccob.). Después, se logró la regeneración de plántulas a partir de cultivos de callos mediante organogénesis dirigida. Sin embargo, esa aproximación experimental tuvo varios problemas ya que durante el cultivo de callos ocurrió la inducción de aneuploidías y poliploidías, la formación de quimeras heterogéneas, etc. (Steinhart 1962).

Desde el punto de vista de estabilidad genética, la clonación es un método relevante ya que puede aprovechar la estimulación in vitro de yemas dormantes para la formación de brotes. Los primeros en indicar esta posibilidad en cactáceas fueron Mauseth y Halperin (1975), quienes lograron obtener hojas a partir del cultivo de yemas axilares o areolas en *Opuntia polyacantha* con la adición de 6-bencilaminopurina (BAP). Una década después, Vyskot y JáRa (1984) probaron la metodología de Mauseth y Halperin con el objetivo de propagar en masa ciertas especies de cactus. Ellos demostraron que, mediante la activación de yemas axilares, era factible la propagación in vitro de *Astrophytum myriostigma*, *Mammillaria carmenae*, *M. prolifera* y *T. spachianus*.

Desde entonces, los estudios de propagación in vitro de cactáceas de interés agronómico se han enfocado en algunos géneros que son aprovechados principalmente por sus frutos y partes verdes, como *Opuntia* (Escobar et al. 1986; Mohammed-Yaseen et al. 1995; García-Saucedo et al. 2005).

El género *Hylocereus* incluye varias especies que producen frutos comestibles. Tradicionalmente se propagan por semillas o esquejes (Shimomura y Fujihara 1980), pero a finales de la década de los 70 se realizó el primer estudio de propagación in vitro de *Hylocereus calcaratus* (Johnson

y Emino 1979). El primer reporte de un método para la propagación in vitro de una especie de importancia económica de este género, *H. undatus*, ocurrió dos décadas después por Mohamed-Yasseen (2002). En ese estudio lograron la inducción de brotes con adición al medio de cultivo de la auxina ácido naftalenacético (ANA) y la citoquinina tidiazuron (TDZ). Ese mismo año, se publicó otro protocolo de propagación de *H. undatus* (Drew y Azimi 2002), en el cual usaron la citoquinina 2-isopentenil-adenina (2ip) con el mismo objetivo.

En Costa Rica, la especie *H. costaricensis* es un cactus que, por sus frutos, tiene potencial económico y por ello es de interés. Con esta especie se realizó un estudio para desarrollar un protocolo de propagación in vitro mediante la activación de areolas (Viñas et al. 2012), en el cual su propagación fue exitosa y obtuvieron brotes iniciales a partir de areolas con 30  $\mu\text{M}$  de la citoquinina BAP. A pesar de que *A. tetragonus* ha sido utilizada tradicionalmente, no existen investigaciones publicadas sobre su propagación in vitro.

#### 4. Materiales y Métodos

Los ensayos de esta investigación se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y en el invernadero del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Edificio B, en la Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

##### 4.1 Material Vegetal

Debido a la experiencia previa que se tenía en el Laboratorio de Biotecnología del CIGRAS con la propagación in vitro de *H. costaricensis*, se decidió comparar la respuesta de *A. tetragonus* con *H. costaricensis* en todos los ensayos de esta investigación.

Los cactus usados como plantas madre de *A. tetragonus* eran plantas silvestres que fueron obtenidas de dos fuentes: las primeras fueron recolectadas en la provincia de Puntarenas en el año 2016 y las segundas se compraron en el Vivero Forestal FUNDAZOO del Centro de Conservación Santa Ana en febrero de 2018, y todas se sembraron en el invernadero del CIGRAS en San Pedro de Montes de Oca. Las plantas de *H. costaricensis* cv. Cebra, eran plantas que habían sido previamente obtenidas de productores y que estaban en el invernadero.

Las plantas de ambas especies fueron multiplicadas en el invernadero para tener mayor material vegetal inicial para las introducciones in vitro. Esto se hizo decapitando los cladodios para eliminar la dominancia apical, cortándolos en secciones de aproximadamente 10 cm de longitud las cuales se sembraron en bandejas que contenían turba (Jiffy-Mix; Jiffy International AS, Kristiansand, Noruega) como sustrato y se esperó que enraizaran y produjeran brotes nuevos.

Posteriormente, los brotes obtenidos en el invernadero a partir del crecimiento de las areolas se utilizaron como explantes iniciales en los

ensayos. Para ello se cortaron secciones de aproximadamente 1 cm que contenían una areola. Solamente en el ensayo en el cual se probó el efecto del tipo de explante se usaron como explantes iniciales secciones de cladodios de 5 cm.

Para disminuir el inóculo de microorganismos que pudieran afectar el establecimiento in vitro, a las plantas (mantenidas en el invernadero) se les realizaron aplicaciones de Benomyl (Fungicida, ingrediente activo: benomil; Piscis, San José, Costa Rica) a 2 g/l y Agrimycin (Bactericida, ingrediente activo: estreptomycin y oxitetraciclina; Pfizer, México) a 2 g/l y 2 gotas/100 ml de Tween 20 (Sigma, San Luis, Misuri, Estados Unidos), dos veces por semana, desde tres semanas antes de cada introducción del material vegetal. Desde el punto de vista nutricional, también se le aplicó directamente al sustrato el fertilizante granulado Rosafert (12-12-17; Abonos Superior, Costa Rica) una vez cada mes y medio.

## **4.2 Desinfección**

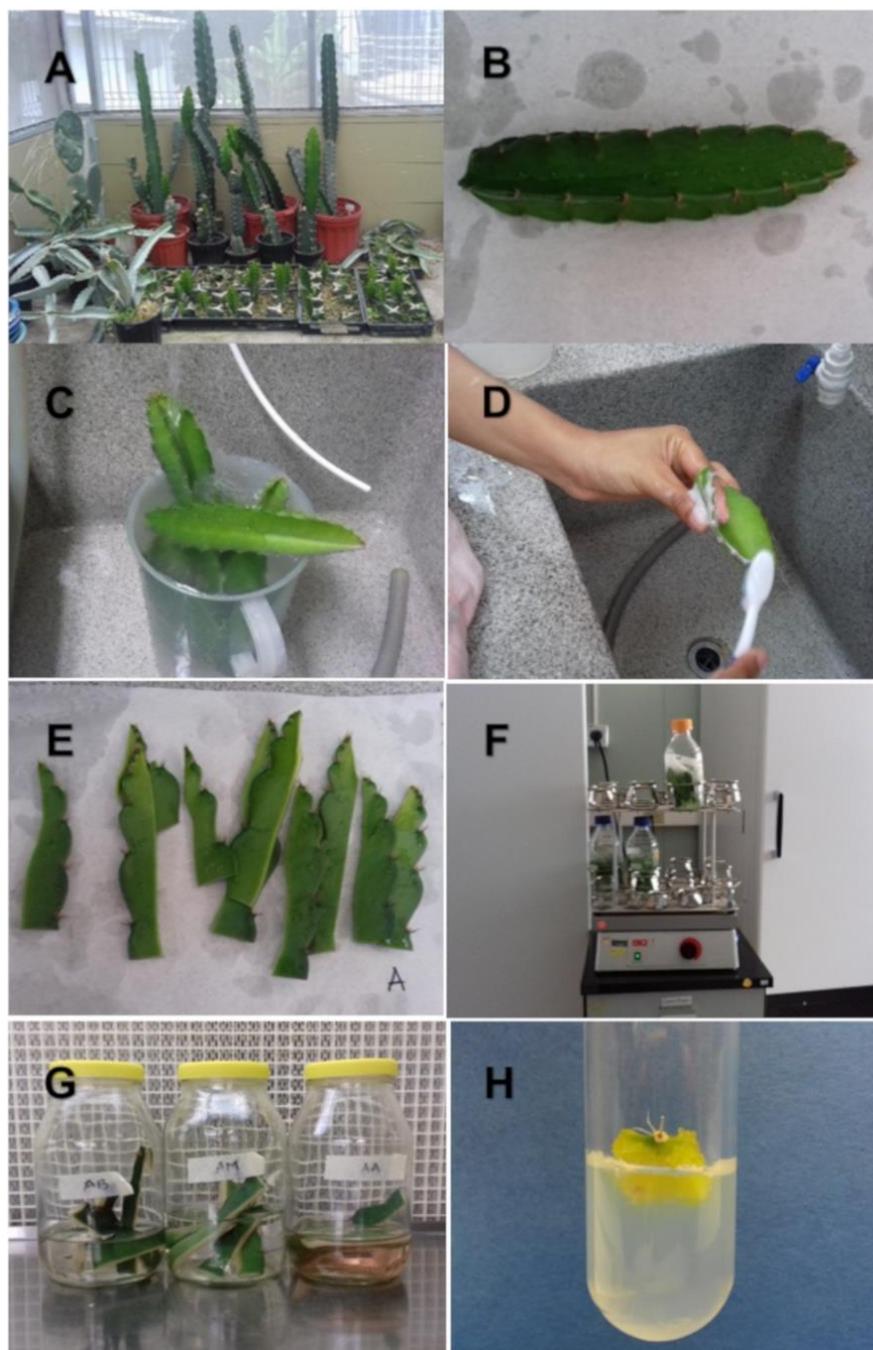
Para determinar la efectividad del protocolo propuesto para la desinfección de los explantes, se realizaron dos introducciones de explantes de *A. tetragonus* e *H. costaricensis*.

### **4.2.1 Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl) para la desinfección de explantes**

En el protocolo evaluado, en dos experimentos se usaron cladodios jóvenes con cuatro a seis meses de edad y de aproximadamente 15 cm de longitud y que contaban con quince a veinte areolas por costilla de *A. tetragonus* e *H. costaricensis* que estaban en el invernadero. Estos fueron llevados al laboratorio para continuar con el proceso de desinfección (Fig. 3). Una vez en el laboratorio, los cladodios se cortaron en secciones de 5-7 cm de longitud y se cepillaron con jabón, luego fueron lavados con agua de grifo por 15 minutos. Posteriormente, fueron tratados secuencialmente con el detergente alcalino Extran® (Merck, Darmstadt, Alemania) a 0.1% (w/v) por 10 minutos, seguido por una inmersión en etanol al 70% (v/v) por 30

segundos. Después, se pusieron en agitación (120 rpm) con una solución de 2 g/l de Benomyl y 2 g/l de Agrimycin más 2 gotas/100 ml de Tween 20 por 30 minutos. Posteriormente se procedió con la aplicación de los tratamientos de NaOCl a evaluar: 1.0 y 1.5% (v/v) más 2 gotas/100 ml de Tween 20 por 15 minutos (Viñas et al. 2012).

Por último, en la cámara de flujo laminar se hicieron cuatro lavados sucesivos con agua destilada estéril y se cortaron en secciones más pequeñas (de 1 cm), dejando una areola por explante, y se colocaron en tubos de ensayo con medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) sin reguladores de crecimiento, suplementado con sacarosa al 5% y gelificado con 8 g/l de agar. Para evaluar este experimento, se hicieron dos introducciones con explantes de *A. tetragonus* y de *H. costaricensis* como comparador, usando los mismos parámetros en ambas ocasiones.



**Fig. 3)** Pasos para el establecimiento in vitro de explantes de *A. tetragonus*: A) se cortaron cladodios de plantas que se encontraban en invernadero, (B) se llevaron al laboratorio, (C y D) se lavaron con agua de grifo y se cepillaron con jabón, (E) se cortaron en secciones de 5-7 cm, (F) se realizó el procedimiento secuencial del protocolo de desinfección, (G) en la cámara de flujo se enjuagaron los explantes y (H) se sembraron en un tubo de cultivo con medio MS suplementado con sacarosa al 5% y solidificado con 8 g/l de agar.

#### 4.2.2 Efecto de la concentración de NaOCl y etanol en el oscurecimiento de los explantes

A pesar de que con el protocolo propuesto en el primer ensayo se logró desinfectar satisfactoriamente los explantes, se observó que los mismos presentaban oscurecimiento superficial. Por ello, se hizo este otro ensayo, en el cual se modificaron las concentraciones de etanol y NaOCl para evaluar si estos eran factores que causaban daño a los tejidos y así cambiar las condiciones del protocolo de desinfección de los explantes para disminuir el daño.

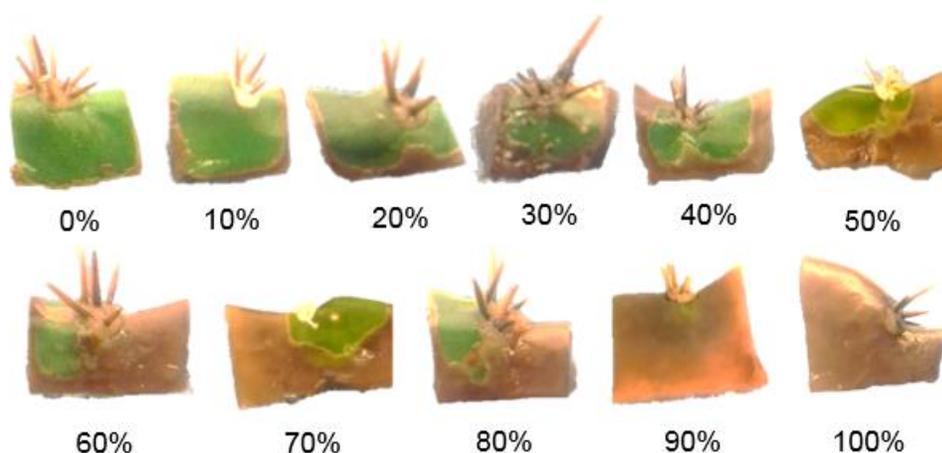
Para la introducción de los explantes se siguió el mismo procedimiento que en el ensayo anterior, con la diferencia de que se modificaron las concentraciones de NaOCl y etanol para los diferentes tratamientos (Cuadro 1). Este experimento también se realizó con explantes de *A. tetragonus* y de *H. costaricensis* como comparador. Como medio de cultivo base se utilizó el medio MS suplementado con 5% de sacarosa y 8 g/l de agar.

**Cuadro 1)** Tratamientos utilizados para modificar el protocolo de desinfección de explantes de *A. tetragonus* e *H. costaricensis*.

| Tratamiento | Modificaciones del protocolo de desinfección                                |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| T1(Testigo) | <u>Etanol al 70%</u> (v/v) (30 segundos)<br><u>NaOCl a 1%</u> (15 minutos)  |
| T2          | <u>Sin etanol</u><br><u>NaOCl a 1%</u> (15 minutos)                         |
| T3          | <u>Etanol a 70% (v/v)</u> (30 segundos)<br><u>NaOCl a 0.7%</u> (15 minutos) |
| T4          | <u>Sin etanol</u><br><u>NaOCl a 0.7%</u> (15 minutos)                       |

### Variables evaluadas

En estos dos primeros ensayos se contó con 10 repeticiones por tratamiento (Cuadro 1). Se evaluó porcentaje de contaminación y porcentaje de oscurecimiento durante cuatro semanas. El porcentaje de oscurecimiento de los explantes se determinó con base en una escala (Fig. 4). El porcentaje de contaminación se determinó con el número de explantes contaminados en relación con el total de explantes de cada tratamiento. Los datos fueron analizados mediante una tabla de contingencia y una prueba de chi cuadrado con el programa estadístico R studio 1.1.447 (R Studio Team, 2016).



**Fig. 4)** Escala de oscurecimiento de los explantes luego del proceso de desinfección en *A. tetragonus*.

#### **4.2.3 Efecto del uso de polivinilpirrolidona (PVP) para la disminución del oscurecimiento y de Supresor Microbiológico (SB) como controlador de microorganismos en el establecimiento de explantes**

Debido a que el oscurecimiento de los tejidos en los explantes de *A. tetragonus* persistía, y que este oscurecimiento se podía deber a un proceso de oxidación, se decidió evaluar el efecto del uso de PVP como antioxidante en el proceso de establecimiento de explantes al emplearlo en los enjuagues con agua al final del proceso de desinfección y/o en el medio de cultivo

utilizado para la introducción. Al mismo tiempo, en vista de que la contaminación seguía siendo variable, se evaluó el efecto del Supresor Microbiológico SB (Laboratorios Químicos ARVI S.A., Cartago, Costa Rica) en la disminución de contaminación de los explantes establecidos (Cuadro 2). Para este experimento, los explantes usados de ambas especies fueron desinfectados con NaOCl al 1% y etanol al 70%.

**Cuadro 2)** Tratamientos utilizados en los que se empleó PVP y Supresor Microbiológico (SB) para contrarrestar el oscurecimiento y contaminación de explantes en la etapa de establecimiento.

| <b>Tratamiento</b> | <b>Modificaciones del Protocolo de desinfección</b>                                                                                                                                                                     |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| T1                 | Ninguno (Testigo)                                                                                                                                                                                                       |
| T2                 | <b>Enjuague con PVP 0.7%</b> (45 minutos en cámara de flujo laminar)                                                                                                                                                    |
| T3                 | Siembra en <b>medio MS con PVP 0.2%</b>                                                                                                                                                                                 |
| T4                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Enjuague con PVP a 0.7%</b> (45 minutos en cámara de flujo laminar)</li> <li>• <b>Siembra en medio de cultivo MS con PVP 0.2%</b></li> </ul>                                |
| T5                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Enjuague con PVP 0.7%</b> (45 minutos en cámara de flujo laminar)</li> <li>• <b>Siembra en medio de cultivo MS con PVP 0.2% + Supresor Microbiológico 2 ml/l</b></li> </ul> |
| T6                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Enjuague con PVP 0.7%</b> (45 minutos en cámara de flujo laminar)</li> <li>• <b>Siembra en medio de cultivo MS con Supresor Microbiológico 2 ml/l</b></li> </ul>            |

### Variables evaluadas y análisis estadístico

Se contó con 10 repeticiones por tratamiento, cada repetición constaba de 1 areola por tubo de ensayo. Se evaluó porcentaje de explantes contaminados y porcentaje de oscurecimiento durante cuatro semanas. El porcentaje de oscurecimiento de los explantes se determinó con base en la escala indicada (Fig. 4). El porcentaje de contaminación se determinó con el número de explantes contaminados en relación con el total de explantes de cada tratamiento. Los porcentajes fueron analizados mediante una tabla de contingencia y una prueba de chi cuadrado con el programa estadístico R studio 1.1.447 (R Studio Team, 2016).

## **4.3 Establecimiento, brotación y crecimiento inicial**

### **4.3.1 Efecto del BAP a una concentración de entre 0 y 60 $\mu$ M sobre la brotación inicial de *A. tetragonus* e *H. costaricensis*.**

En cactáceas, la citoquinina más usada y efectiva para inducir la formación de brotes es la BAP (Pérez-Molphe-Balch et al., 2014). Por ello, en este ensayo se decidió usar esta citoquinina para inducir brotación. Los tratamientos evaluados incluyeron un gradiente de concentraciones de BAP: 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60  $\mu$ M. Este experimento se realizó con explantes de *A. tetragonus* y de *H. costaricensis* como comparador, cada una con 10 repeticiones por tratamiento. Cada repetición constaba de una areola en un tubo de cultivo, las cuales fueron desinfectadas con NaOCl al 1% y etanol al 70%. Como medio de cultivo base se utilizó el medio MS suplementado con sacarosa al 5% y PVP al 0.2% y gelificado con 8 g/l de agar.

### Variables evaluadas

Se evaluó el porcentaje de contaminación, porcentaje de oscurecimiento, porcentaje de formación de callo, porcentaje de brotación y longitud de los brotes durante un mes y posteriormente una vez al mes durante 3 meses. La

longitud de los brotes se midió en cm con una regla. El porcentaje de oscurecimiento de los explantes se determinó con base en la escala descrita en la Fig. 4. Los porcentajes de contaminación, brotación y formación de callo se determinaron con el número de explantes contaminados, brotados o con presencia de callo en relación con el total de explantes.

#### **4.3.2 Efecto del tiempo de exposición a 20 $\mu$ M de BAP sobre la formación de brotes**

Debido a que en la prueba anterior se encontró que las concentraciones de BAP entre 20 y 60  $\mu$ M iniciaron una brotación similar en los explantes de *A. tetragonus*, se decidió evaluar cuatro tratamientos con la concentración mínima (20  $\mu$ M de BAP), en los cuales varió el tiempo de exposición a esta concentración para determinar si hay diferencias en la inducción de brotes y si hay un efecto en el oscurecimiento de los explantes (Cuadro 3). Se usaron 10 repeticiones por tratamiento. Cada repetición constaba de una areola en un tubo de cultivo, las cuales fueron desinfectadas con NaOCl al 1% y etanol al 70%. Como medio de cultivo base se utilizó el medio MS suplementado con sacarosa al 5% y PVP al 0.2% y gelificado con 8 g/l de agar.

##### Variables evaluadas

Se evaluó porcentaje de contaminación, porcentaje de oscurecimiento, porcentaje de formación de callo, porcentaje de brotación y longitud de los brotes durante dos meses. La longitud de los brotes se midió en cm con una regla. El porcentaje de oscurecimiento de los explantes se determinó con base en la escala descrita en la Fig. 4. Los porcentajes de contaminación, brotación y formación de callo se determinaron con el número de explantes contaminados, brotados o con presencia de callo en relación con el total de explantes, respectivamente.

**Cuadro 3)** Tratamientos evaluados de BAP a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  con diferentes tiempos de exposición.

| Código | Tratamiento                                                                                                      |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CA     | Testigo absoluto: Explantes permanentemente en medio MS sin BAP por cuatro semanas                               |
| C      | Testigo: Explantes permanentemente en medio MS con 20 $\mu\text{M}$ de BAP por cuatro semanas                    |
| T1     | Explantes en medio MS con 20 $\mu\text{M}$ de BAP por dos semanas, transferencia posterior a medio MS sin BAP    |
| T2     | Explantes en medio MS con 20 $\mu\text{M}$ de BAP por tres semanas, transferencia posterior a medio MS sin BAP   |
| T3     | Explantes en medio MS con 20 $\mu\text{M}$ de BAP por cuatro semanas, transferencia posterior a medio MS sin BAP |

#### 4.3.3 Efecto de la utilización de Mtop para la inducción de brotes

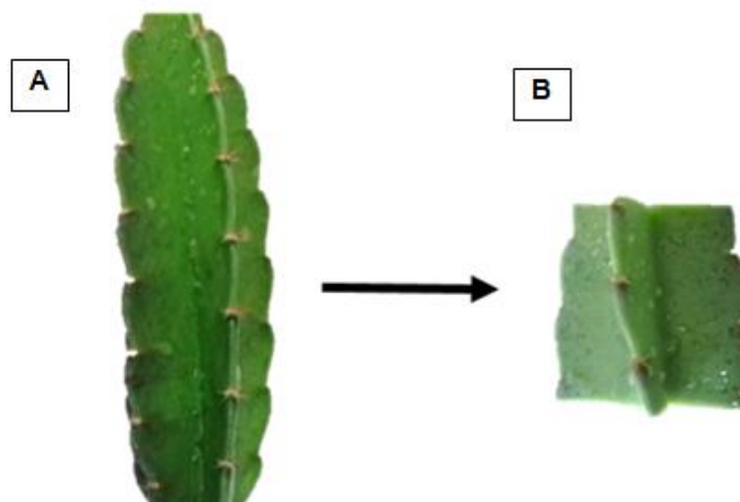
A pesar de que en el ensayo anterior el BAP indujo la brotación en los explantes, estos brotes tenían un crecimiento muy lento y algunos una morfología deficiente. Se ha reportado el uso de la citoquinina Mtop, como una alternativa a BAP para mejorar la morfogénesis in vitro (Werbrouck et al. 1996). Por lo expuesto anteriormente, se decidió evaluar esta citoquinina para la inducción de brotes en *A. tetragonus*. Los tratamientos evaluados consistieron en un gradiente entre 20 y 160  $\mu\text{M}$  de Mtop: 20, 40, 80 y 160  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  de BAP como testigo y medio MS sin citoquinina como testigo absoluto. Este ensayo se realizó con explantes de *A. tetragonus* e *H. costaricensis*. Se usaron 10 repeticiones por tratamiento. Cada repetición constaba de una areola en un tubo de cultivo, las cuales fueron desinfectadas con NaOCl al 1% y etanol al 70%. Como medio de cultivo base se utilizó el medio MS suplementado con sacarosa al 5% y PVP al 0.2% y gelificado con 8 g/l de agar.

### Variables evaluadas

Se evaluó el porcentaje de contaminación, porcentaje de oscurecimiento, porcentaje de formación de callo, porcentaje de brotación y longitud de los brotes durante dos meses. El porcentaje de oscurecimiento de los explantes se determinó con base en la escala descrita en la Fig. 4. Los porcentajes de contaminación, brotación y formación de callo se determinaron con el número de explantes contaminados, brotados o con presencia de callo en relación con el total de explantes.

#### **4.3.4 Efecto del tipo de explante**

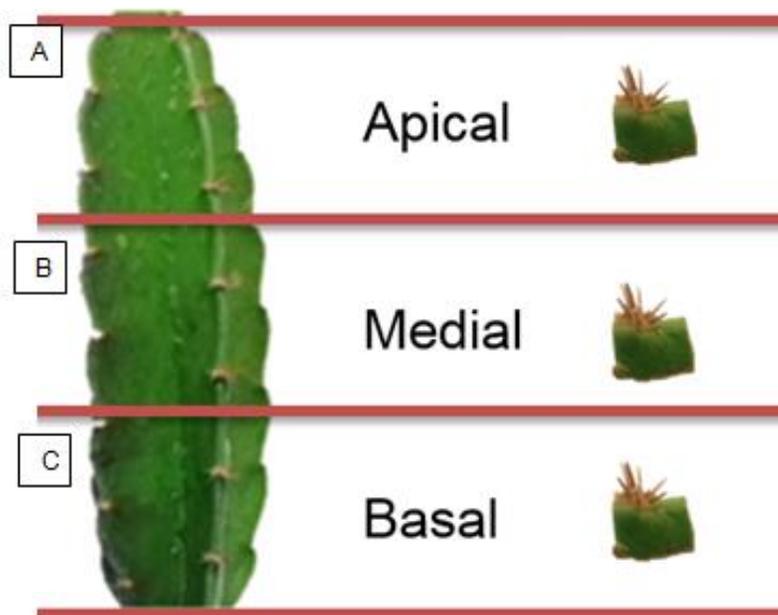
Este ensayo se realizó con explantes de *A. tetragonus* e *H. costaricensis*. con el fin de tener una mayor cantidad de brotes en menor tiempo. Se evaluó un explante de mayor tamaño con secciones de cladodios de 5 cm de altura con 2 a 3 areolas por costilla (Fig. 5) (Hua et al., 2015). Estos explantes se desinfectaron con NaOCl al 1% y etanol al 70% y se sembraron en frascos de vidrio con 40 ml de medio de cultivo MS con 20  $\mu$ M de BAP, suplementado con sacarosa al 5% y gelificado con 8 g/l de agar. Se usaron 10 repeticiones por tratamiento, un explante por frasco y se compararon con los explantes de 1 cm que se usaron en los otros experimentos.



**Fig. 5)** Explante de *A. tetragonus* utilizado para obtener mayor número de brotes. El explante se obtuvo de cortes transversales de cladodios con 5 cm de altura y dejando 2 a 3 areolas por costilla. A) Cladodio y B) Nuevo explante.

#### 4.3.5 Efecto de la posición de las areolas

En este ensayo los explantes se dividieron por la posición de las areolas en los cladodios. Se denominaron: apical, a las areolas que se encontraban en los primeros 5 cm desde el ápice hacia la base del cladodio; medial, a las areolas que se encontraban en los siguientes 5 cm del cladodio, quedando en la zona central; y basal, a las areolas que se encontraban en los últimos 5 cm cercanos a la base del cladodio (Fig. 6). Con este ensayo se buscaba evaluar si había una respuesta diferencial en la brotación según la posición de las areolas, esto con la idea de homogenizar el material inicial. Los explantes de *A. tetragonus* e *H. costaricensis* fueron cortados en secciones de 1 cm y contenían una areola por explante. Se utilizó como medio de cultivo base el medio MS con 20  $\mu$ M de BAP, suplementado con sacarosa al 5% y solidificado con 8 g/l de agar. Cada tratamiento constaba de 10 repeticiones y una repetición constaba de un explante con una areola por tubo de cultivo.



**Fig. 6)** Posición de las areolas en cladodios de *A. tetragonus*. Las areolas ubicadas en la parte distal (en la punta) se consideraban A) apicales, las areolas en la parte central B) mediales y las que se ubicaban proximalmente eran C) basales.

#### Variables evaluadas

Se evaluó el porcentaje de brotación y longitud de los brotes durante dos meses. La longitud de los brotes se midió en cm con una regla. El porcentaje de brotación se determinó con el número de explantes brotados en relación con el total de explantes.

#### **4.3.6 Efecto de la oscuridad en la brotación**

Con el fin de definir y ajustar una vía más efectiva para la inducción de brotes de *A. tetragonus*, se decidió evaluar si la oscuridad tiene un efecto en la iniciación y desarrollo de brotes. Para esto se pusieron explantes de 1 cm con una areola, de *A. tetragonus* e *H. costaricensis* en condiciones de oscuridad total, comparándolos con explantes expuestos a un fotoperiodo de

12 horas luz y 12 horas oscuridad, durante un mes. En este ensayo se usaron 10 repeticiones, cada repetición constaba de 1 areola en tubo con medio de cultivo MS con 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60  $\mu\text{M}$  de BAP, suplementado con 5% de sacarosa y gelificado con 8 g/l de agar.

#### **4.3.7 Condiciones generales de cultivo**

Durante la fase de establecimiento, brotación y crecimiento inicial, cada repetición constó de un tubo de cultivo de 150 x 25 mm con 10 ml de medio de cultivo y un explante de 1 cm con una areola, orientada de forma vertical, con la parte basal en contacto con el medio de cultivo; a excepción del ensayo del tipo de explante, en el cual se usó un explante de mayor tamaño en frascos de vidrio con 40 ml de medio MS. Los tubos de cultivo con los explantes se colocaron en un cuarto de crecimiento a  $23 \pm 1$  °C, con un fotoperiodo de 12 horas, a una intensidad lumínica de  $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , con excepción de los explantes que estaban en oscuridad total, y una humedad relativa del 72%.

Durante todos los ensayos se realizaron transferencias a medio de cultivo fresco cada mes y medio, con excepción del ensayo sobre el tiempo de exposición a 20  $\mu\text{M}$  de BAP. El pH de los medios de cultivo en todos los ensayos fue de  $5.80 \pm 0.01$  y se ajustó con soluciones de KOH de 0.01 a 1.00 M.

#### **4.3.8 Histología de areolas con indicios de brotes obtenidos medio de cultivo con BAP**

Se hizo un análisis histológico de explantes de *A. tetragonus* que iniciaron la brotación in vitro, para comprobar su integridad estructural y determinar el sitio de origen de los brotes. Para esto se seleccionaron explantes de 1 cm que contaban con areolas con indicios de crecimiento de brotes obtenidos en los ensayos. Estos se colocaron en una solución fijadora FAA (formalina,

etanol 70% y ácido acético en una relación 0.5:9:0.5), con el fin de conservar las características morfológicas de las muestras, durante tres días. Una vez fijadas, las muestras fueron procesadas siguiendo los pasos descritos en el Cuadro 4.

Después de procesadas, las muestras se incluyeron en parafina. Para esto se montaron en un molde metálico de inclusión. En el molde se colocó la muestra y se le agregó parafina mientras se presionaba contra el fondo del molde, de tal modo que la muestra se acomodara en la posición deseada. Después, se colocó el cassette de procesamiento sobre el molde y se relleno con parafina. Posteriormente, el cassette se congeló por 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se separó el bloque de parafina del molde de inclusión. Se continuó haciendo los cortes, los cuales se realizaron con un micrótopo y cuchillas con un grosor de 6  $\mu\text{m}$ . Una vez cortadas, las láminas se pusieron en un baño de flotación y se recogieron con un portaobjetos, posteriormente, se colocaron en una estufa a 65  $^{\circ}\text{C}$  por una hora. Finalmente, se tiñeron y se montaron. La tinción se hizo con Safranina al 0.5% (m/v) y azul alcian 0.5% (m/V). El montaje se realizó con un medio de montaje resinoso Permount™ (Fisher Scientific, New Hampshire, USA). Las láminas se fotografiaron en el Centro de Innovación en Tecnologías de Información y Comunicación para Ciencias Biológicas (CEITICB) de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH) con un Microscopio Olympus cx22led equipado con una cámara AmScope 3.1mp, software ToupView (Olympus, Tokio, Japón) a 40x, para observar las estructuras en los explantes y su posterior análisis.

**Cuadro 4)** Protocolo para la histología de areolas de cactus con base en Prophet et al. (1995).

| Pasos                         | Compuesto                               | Condiciones                                                 |
|-------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 1. Enjuague de muestras       | H <sub>2</sub> O de grifo (5 min)       |                                                             |
| 2. Deshidratación con alcohol | Alcohol etílico 70%                     | Llevar a 67 °C con un horno microondas y esperar 5 minutos  |
|                               | Alcohol etílico 90%                     | Llevar a 67 °C con un horno microondas y esperar 5 minutos  |
|                               | Alcohol etílico 100%                    | Llevar a 67 °C con un horno microondas y esperar 10 minutos |
| 3. Infiltración               | Solución 1:1 alcohol etílico y xilol    | Llevar a 67°C con un horno microondas y esperar 10 minutos  |
|                               | Xilol                                   | Llevar a 67°C con un horno microondas y esperar 10 minutos  |
|                               | Xilol                                   | Llevar a 67°C con un horno microondas y esperar 4 minutos   |
|                               | Aceite de parafina con vacío            | En estufa a 60 °C por 10 minutos                            |
|                               | Solución 1:1 xilol y parafina/paraplast | En estufa a 60 °C por 45 minutos                            |
|                               | Parafina/paraplast                      | En estufa a 60 °C por 30 minutos                            |

#### **4.4 Enraizamiento**

En los ensayos realizados en la etapa de establecimiento y brotación se observó la producción de raíces de forma espontánea en la base de los explantes. Por ello, no fue necesario hacer ensayos para promover el enraizamiento. En todos los ensayos se evaluó el número de raíces y la longitud de la raíz más larga por explante.

#### **4.5 Análisis estadístico**

A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA). Los resultados relacionados con la evaluación del porcentaje de oscurecimiento no cumplían con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, por lo que se les realizó una transformación angular ( $\text{Arcsin } \sqrt{\text{raíz}} (y)$ ). En las variables en las que se observaron diferencias significativas se realizó una prueba de separación de medias de Tukey con un nivel de significancia del 5%. Cuando los datos no cumplían con los supuestos se aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia del 5%. Para determinar si el uso de BAP tuvo un efecto en la inducción de brotes se hizo un análisis de regresión cuadrática. Para evaluar el efecto de la posición de areolas, se evaluó la brotación como una variable categórica e igualmente la formación de callo. Por ello, se analizaron mediante una tabla de contingencia y una prueba de chi cuadrado. Todos los análisis se realizaron con el programa R studio 1.1.447 (R Studio Team, 2016).

## 5. Resultados

### 5.1 Desinfección

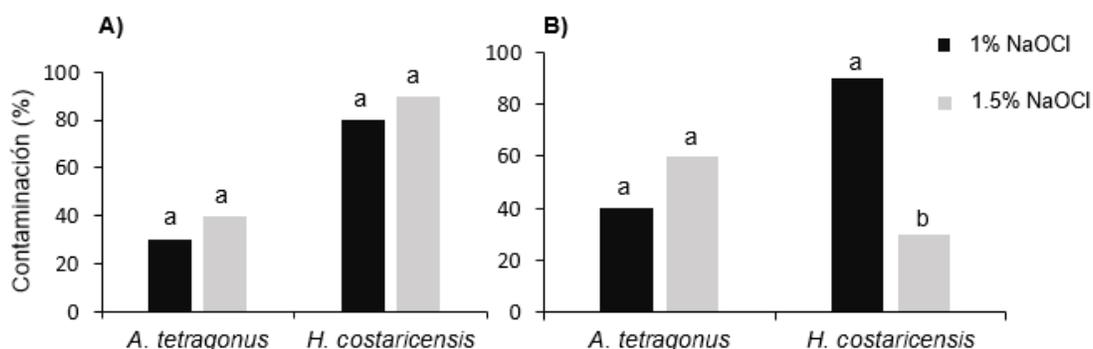
#### 5.1.1 Efecto de la concentración de NaOCl para la desinfección de explantes

Al evaluar las dos concentraciones de NaOCl (1% y 1.5%) con el objetivo de establecer un protocolo efectivo de desinfección para los explantes de *A. tetragonus*, se observó, al cabo de cuatro semanas, un 30% de contaminación con el tratamiento de NaOCl al 1% y un 40% de contaminación con 1.5%. En cambio, los explantes de *H. costaricensis* tuvieron mayores porcentajes de contaminación, llegando a 80% con el tratamiento de NaOCl al 1% y un 90% con 1.5%.

En la segunda introducción de explantes, los porcentajes de contaminación variaron. El 40% de los explantes de *A. tetragonus* se contaminaron con el tratamiento de NaOCl al 1% y el 60% de los explantes se contaminaron en el tratamiento con NaOCl al 1.5%. Por el contrario, los explantes de *H. costaricensis* presentaron un porcentaje de contaminación de 90% con NaOCl al 1%, siendo un resultado similar al obtenido en la primera introducción, pero en el tratamiento con 1.5% de NaOCl la contaminación disminuyó a 30%.

Aun así, en ninguna de las introducciones se encontró un efecto significativo ni sostenido de las concentraciones de NaOCl para la desinfección de los explantes de *A. tetragonus* ni de *H. costaricensis* ( $P > 0.05$ ), con excepción de los explantes de *H. costaricensis* de la segunda introducción que fueron desinfectados con 1.5% (Fig. 7). A pesar de estos resultados, se definió que 1% de NaOCl sería la concentración que se emplearía en los siguientes ensayos. Esta decisión fue basada en el ahorro de recursos, ya que es la

cantidad mínima necesaria para desinfectar los explantes de *A. tetragonus* y con la cual se obtuvieron porcentajes de contaminación aceptables.

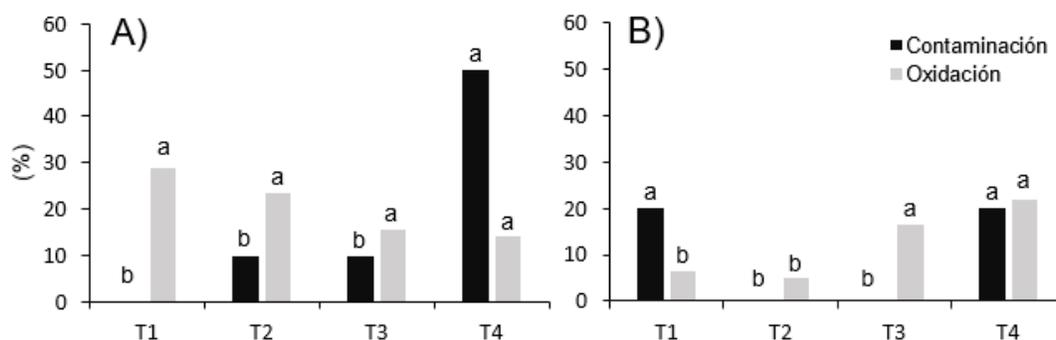


**Fig. 7)** Porcentaje de contaminación de los explantes de *A. tetragonus* e *H. costaricensis* desinfectados con 1% y 1.5% de NaOCl luego de cuatro semanas de cultivo in vitro. A) Porcentaje de contaminación de explantes en la primera introducción; B) Porcentaje de contaminación de explantes en la segunda introducción. \*Los valores señalados con letras iguales no son significativamente diferentes en ninguna de las dos introducciones, de acuerdo con un análisis de Chi-cuadrado,  $P > 0.05$ . Se usaron 10 repeticiones por tratamiento. Cada repetición constaba de una areola por tubo con medio de cultivo suplementado con 5% de sacarosa y gelificado con 8 g/l de agar. Número de explantes evaluados= *A. tetragonus*: Introducción I, 1%= 7, 1.5%=6; Introducción II, 1%= 6, 1.5%=4; *H. costaricensis*: Introducción I, 1%= 2, 1.5%=1; Introducción II, 1%= 1, 1.5%=6.

### 5.1.2 Efecto de la concentración de NaOCl y etanol en el oscurecimiento de los explantes

Debido a que en las introducciones posteriores se observó que el tejido de los explantes se oscurecía y, en algunos casos, este oscurecimiento cubría totalmente el explante con su consecuente pérdida, se evaluó si la combinación de NaOCl y etanol en la fase de desinfección eran causantes del oscurecimiento. Para esto se modificó el protocolo de desinfección y se usaron los cuatro tratamientos indicados en el Cuadro 1 que variaron en las concentraciones de NaOCl y etanol.

Luego de un mes de haberse hecho la introducción in vitro, no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados sobre el oscurecimiento de los explantes de *A. tetragonus* ( $P>0.05$ ) (Fig. 8). Sin embargo, visualmente los explantes de *A. tetragonus* del tratamiento 3 (T3) parecían estar menos oscuros y, junto con T1 y T2, presentaron menor contaminación que T4. En el caso de *H. costaricensis*, los explantes de los tratamientos 1 y 2 mostraron menor oscurecimiento que T3 y T4, mientras que T2 y T3 no se contaminaron. A pesar de que no hubo diferencias en el oscurecimiento entre tratamientos para *A. tetragonus*, se decidió utilizar el tratamiento 3 en los siguientes ensayos, pues con este se observó que fue el que afectó en menor grado los explantes de *A. tetragonus* y con el cual, a la vez, el porcentaje de contaminación fue aceptable.



**Fig. 8)** Porcentaje de contaminación y oscurecimiento en *A. tetragonus* (A) e *H. costaricensis* (B) luego de cuatro semanas de cultivo en distintos tratamientos de desinfección con NaOCl y etanol. Tratamientos: T1= etanol 70% + NaOCl 1%, T2= sin etanol + NaOCl 1%, T3= Etanol 70% + NaOCl 0.7%, T4= Sin etanol + NaOCl 0.7% \*Los valores señalados con letras distintas indican que fueron significativamente diferentes de acuerdo con un análisis de Chi-cuadrado ( $P<0.05$ ). Se usaron 10 repeticiones por tratamiento y se pusieron en medio de cultivo MS suplementado con 5% de sacarosa y gelificado con 8 g/l de agar. Evaluado a las cuatro semanas. Número de explantes evaluados= *A. tetragonus*: T1= 10, T2= 9, T3= 9, T4= 5; *H. costaricensis*: T1= 8, T2= 10, T3= 10, T4= 8.

### **5.1.3 Efecto del uso de PVP para la disminución del oscurecimiento y de Supresor Microbiológico SB como controlador de microorganismos en el establecimiento de explantes**

Al cabo de seis semanas de haberse hecho la introducción in vitro, se observó que la adición de PVP en el medio de cultivo (T3) redujo el oscurecimiento de los explantes de *A. tetragonus*, comparado con el testigo, mientras que el enjuague con PVP, junto con PVP en el medio de cultivo más bien lo aumentó. La adición del supresor microbiológico no causó ningún efecto sobre el oscurecimiento ni sobre la contaminación de los explantes en esta especie (Fig. 9). Por el contrario, ninguno de los explantes de *H. costaricensis* se contaminó y sus porcentajes de oscurecimiento siempre fueron bajos.

Con estos resultados y por las características de los explantes de *A. tetragonus* observadas en el tratamiento T3, en el cual sus tejidos no se oscurecieron, se decidió agregar PVP en el medio de cultivo en todos los ensayos posteriores.

## **5.2 Establecimiento, brotación y crecimiento inicial**

En esta fase se realizaron ensayos para determinar las condiciones y concentraciones de citoquininas para estimular la brotación inicial y, a la vez, un buen desarrollo de los brotes (morfología normal y elongación), con el fin de alcanzar un crecimiento que permitiera su posterior multiplicación.

### **5.2.1 Efecto del BAP a una concentración de entre 0 y 60 $\mu\text{M}$ para la iniciación de brotes en *A. tetragonus* e *H. costaricensis***

En este ensayo se observó la iniciación de brotes en más del 35% de los explantes de *A. tetragonus* a partir de 20  $\mu\text{M}$  de BAP, no así en *H.*

*costaricensis* (Fig. 10). Estos brotes tuvieron longitudes promedio de entre  $0.13 \pm 0.07$  cm y  $0.53 \pm 0.15$  cm (Fig. 11 A). En el caso de *H. costaricensis*, solamente las areolas en los tratamientos con 10 y 50  $\mu$ M de BAP produjeron brotes, los cuales presentaron longitudes promedio de  $0.17 \pm 0.17$  cm y  $0.07 \pm 0.03$  cm, respectivamente (Fig. 11 B). Sin embargo, estas no fueron significativamente distintas de acuerdo con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

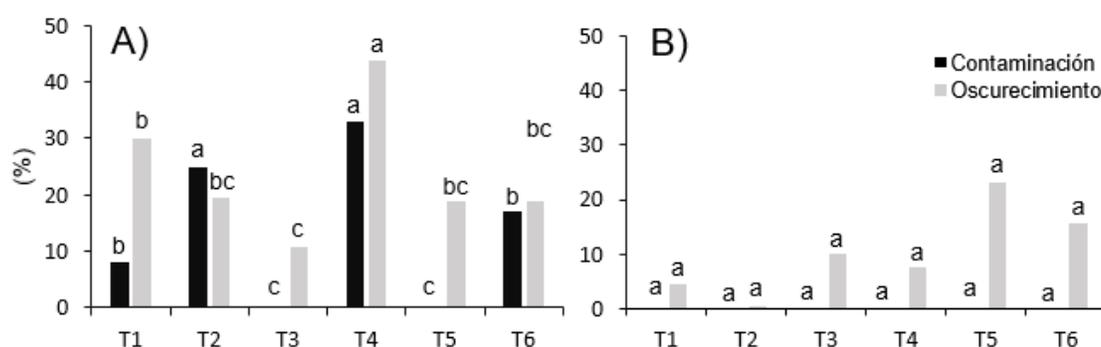
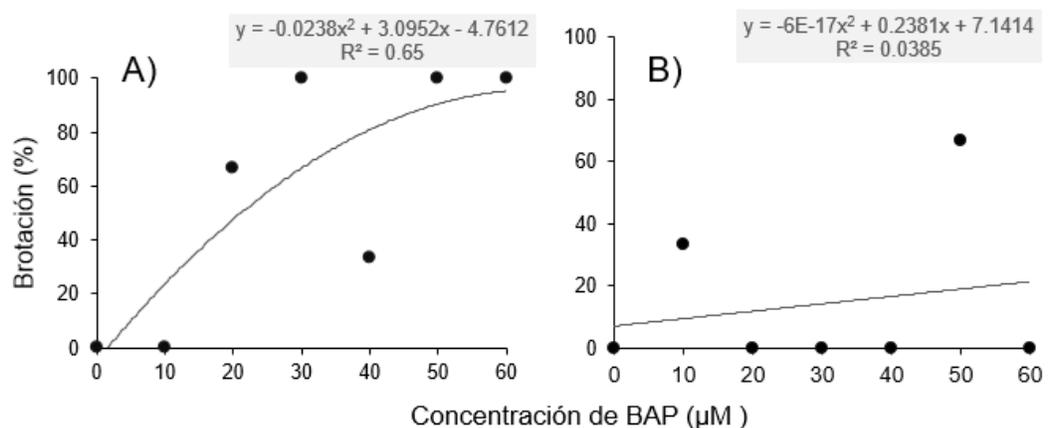
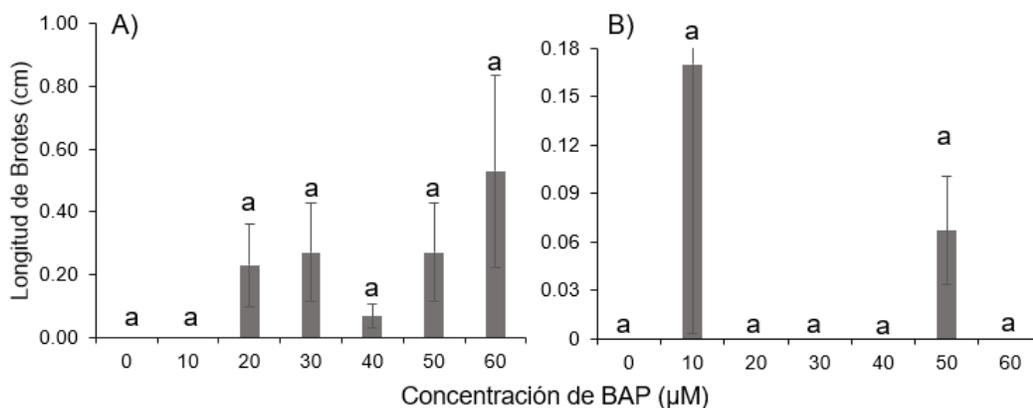


Fig. 9) Porcentaje de contaminación y oscurecimiento en explantes de *A. tetragonus* (A) e *H. costaricensis* (B) luego de seis semanas en los distintos tratamientos con PVP y Supresor microbiológico. \*Los valores señalados con letras distintas son significativamente diferentes de acuerdo con un análisis de Chi-cuadrado,  $P < 0.05$ . Tratamientos: T1= Ninguna modificación, T2= enjuague con PVP 0.7%, T3= Medio MS con PVP 0.2%, T4= enjuague con PVP 0.7% + Medio MS con PVP 0.2%, T5= enjuague con PVP 0.7 + Medio MS con PVP 0.2% + SB 2 ml/l, T6= enjuague con PVP 0.7 + SB 2 ml/l. Se usaron 10 repeticiones por tratamiento. Los explantes se pusieron en medio de cultivo MS suplementado con 5% de sacarosa y gelificado con 8 g/l de agar. Evaluado a las cuatro semanas. Número de explantes evaluados= *A. tetragonus*: T1= 9, T2= 7, T3= 10, T4= 6, T5= 10, T6= 8; *H. costaricensis*: T1= 10, T2= 10, T3= 10, T4= 10, T5= 10, T6= 10.

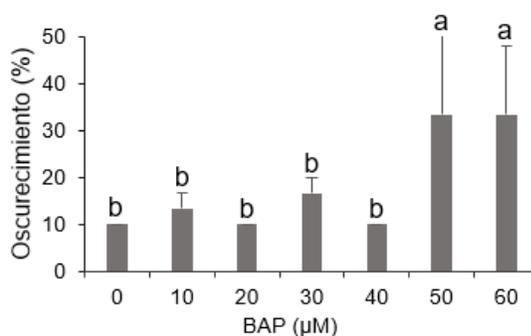


**Fig. 10)** Porcentaje de brotación de las areolas de *A. tetragonus* (A) e *H. costaricensis* (B) con distintas concentraciones de BAP. Evaluación realizada a las ocho semanas. Se hizo un análisis de regresión cuadrática y se usaron 10 repeticiones por tratamiento. Se pusieron en un medio de cultivo MS suplementado con sacarosa al 5%, PVP al 0.2% y gelificado con 8 g/l de agar. Número de explantes evaluados por tratamiento: *A. tetragonus*: 0 µM= 6, 10 µM= 6, 20 µM= 6, 30 µM= 7, 40 µM= 6, 50 µM= 7, 60 µM= 6; *H. costaricensis*: 0 µM= 5, 10 µM= 7, 20 µM= 6, 30 µM= 7, 40 µM= 6, 50 µM= 6, 60 µM= 5.

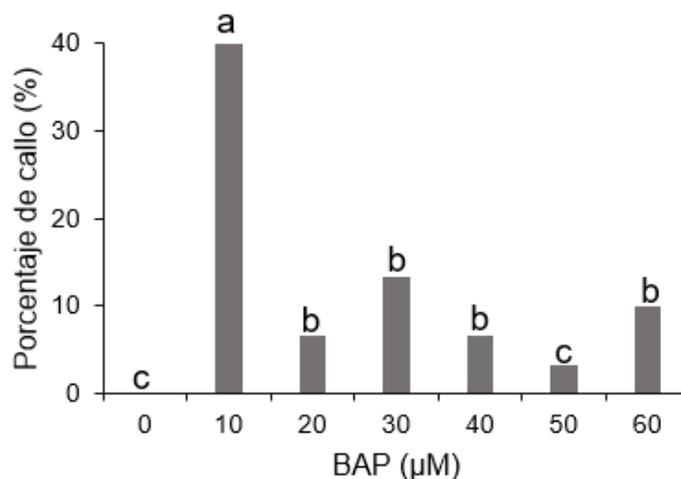
En cuanto al oscurecimiento, se encontraron valores significativamente mayores a partir de 50 µM de BAP (>35%, Fig. 12). Además, no se formó callo en ninguno de los tratamientos. En el caso de *H. costaricensis*, los explantes de 1 cm que contenían una areola, no presentaron daños por oscurecimiento en sus tejidos, pero sí formaron callo con porcentajes entre  $3.33 \pm 3.33\%$  y  $40 \pm 30\%$ , en todos los tratamientos con excepción del tratamiento con 0 µM de BAP, en el cual no se observó formación de callo (Fig. 13). Además, estos callos podían ser de dos tipos: callos que se formaban en la base de los nuevos brotes (Fig. 14 A) o un callo completo sin crecimiento de brotes (Fig. 14 B), siendo más frecuente este último (Fig. 14 C).



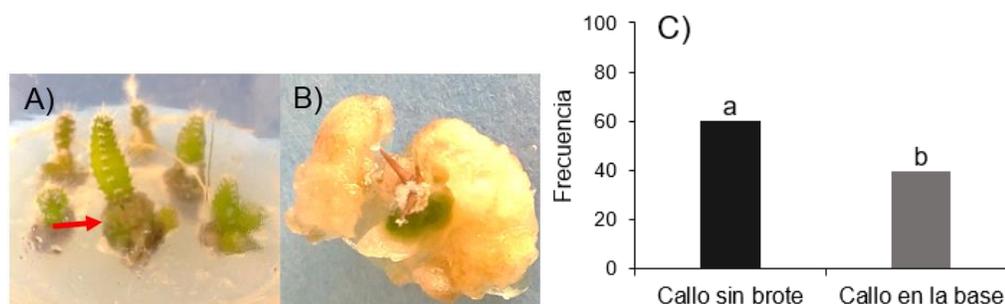
**Fig. 11)** Longitud promedio de los brotes obtenidos de areolas de *A. tetragonus* (A) e *H. costaricensis* (B). Evaluación realizada después de tres meses en medio de cultivo MS con PVP al 0.2% y distintas concentraciones de BAP. Valores con una misma letra no son estadísticamente significativos ( $P > 0.05$ ) de acuerdo con una prueba de Kruskal-Wallis. \*Barras representan el error estándar. Número de explantes evaluados por tratamiento: *A. tetragonus*: 0  $\mu\text{M}$ = 6, 10  $\mu\text{M}$ = 6, 20  $\mu\text{M}$ = 6, 30  $\mu\text{M}$ = 7, 40  $\mu\text{M}$ = 6, 50  $\mu\text{M}$ = 7, 60  $\mu\text{M}$ = 6; *H. costaricensis*: 0  $\mu\text{M}$ = 5, 10  $\mu\text{M}$ = 7, 20  $\mu\text{M}$ = 6, 30  $\mu\text{M}$ = 7, 40  $\mu\text{M}$ = 6, 50  $\mu\text{M}$ = 6, 60  $\mu\text{M}$ = 5.



**Fig. 12)** Porcentaje de oscurecimiento de explantes de 1 cm con una areola de *A. tetragonus* después de ocho semanas en medio de cultivo MS con PVP al 0.2% y diferentes concentraciones de BAP. \*Tratamientos con distintas letras presentaron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con una prueba de Kruskal-Wallis ( $P < 0.05$ ). Número de explantes evaluados por tratamiento: *A. tetragonus*: 0  $\mu\text{M}$ = 6, 10  $\mu\text{M}$ = 6, 20  $\mu\text{M}$ = 6, 30  $\mu\text{M}$ = 7, 40  $\mu\text{M}$ = 6, 50  $\mu\text{M}$ = 7, 60  $\mu\text{M}$ = 6; *H. costaricensis*: 0  $\mu\text{M}$ = 5, 10  $\mu\text{M}$ = 7, 20  $\mu\text{M}$ = 6, 30  $\mu\text{M}$ = 7, 40  $\mu\text{M}$ = 6, 50  $\mu\text{M}$ = 6, 60  $\mu\text{M}$ = 5.



**Fig. 13)** Porcentaje de callo producido en explantes de 1 cm con una areola de *H. costaricensis* en medio de cultivo MS con PVP al 0.2% y diferentes concentraciones de BAP, suplementado con 5% de sacarosa y gelificado con 8 g/l de agar. Evaluación realizada ocho semanas después de su introducción al medio de cultivo. \*Tratamientos con letras diferentes presentaron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con una prueba de Chi cuadrado ( $P < 0.05$ ). El número de explantes es como en Fig. 12.

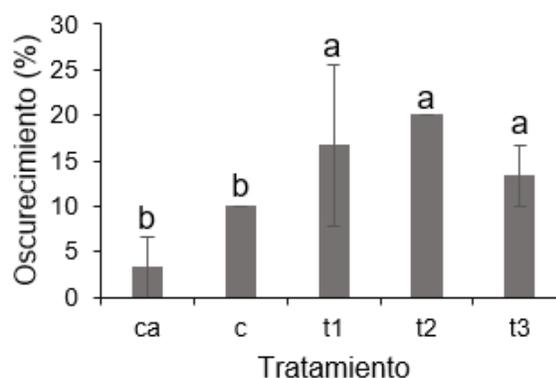


**Fig. 14)** Formación de callo en explantes de *Hylocereus costaricensis* en medio de cultivo MS con PVP al 0.2% y diferentes concentraciones de BAP suplementado con 5% de sacarosa y gelificado con 8 g/l de agar. A) formación en la base de los nuevos brotes; o B) formación del callo sin crecimiento del brote. C) frecuencia según el tipo de callo. Evaluado ocho semanas después de su introducción al medio de cultivo. Tratamientos con letras diferentes presentaron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con una prueba de Chi cuadrado ( $P < 0.05$ ).

### 5.2.2 Efecto del tiempo de exposición a 20 $\mu\text{M}$ de BAP sobre la formación de brotes

Los tratamientos T1 y T3 (Cuadro 3) fueron los únicos que indujeron la brotación de las areolas de *A. tetragonus*. Sin embargo, no se observaron diferencias entre tratamientos, ya que ambos iniciaron solamente la brotación del 33.33% de los explantes. Tampoco se encontró diferencia en la longitud de estos brotes según un análisis de varianza. Los brotes obtenidos en el T1 tenían una longitud de  $0.1 \pm 0.1$  cm y con el T3 fue de  $0.03 \pm 0.03$  cm ( $P > 0.05$ ). En contraste, ninguno de los tratamientos indujo la brotación en *H. costaricensis*.

El oscurecimiento en los explantes de *A. tetragonus* fue inferior al 25%, con diferencias entre los controles y los tratamientos ( $P < 0.05$ , Fig. 15). Además, los tratamientos evaluados no estimularon la formación de callos en los explantes. En *H. costaricensis* no se observó oscurecimiento de los explantes en ninguno de los tratamientos y tampoco se produjeron callos.



**Fig. 15)** Porcentaje de oscurecimiento de los explantes de *A. tetragonus* luego de cuatro semanas de cultivo expuestos a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de BAP durante diferentes tiempos. Tratamientos: ca= MS sin BAP; c= MS + exposición permanente a 20  $\mu\text{M}$  de BAP; t1 = MS + exposición a 20  $\mu\text{M}$  de BAP por dos semanas; t2 = MS + exposición a 20  $\mu\text{M}$  de BAP por tres semanas; t3 = MS + exposición a 20  $\mu\text{M}$  de BAP por cuatro semanas. Se evaluaron 10 repeticiones por tratamiento. Tratamientos con letras diferentes presentaron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con una prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). Número de explantes evaluados: ca= 7, c= 6, t1= 6, t2= 6, t3= 7.

### 5.2.3 Efecto de la utilización de Mtop sobre la inducción de brotes

Se evaluó el efecto de Mtop sobre la inducción de brotes en comparación con BAP. Después de ocho semanas, ninguna de las concentraciones evaluadas tuvo un efecto significativo sobre la brotación en *A. tetragonus*. El testigo indujo la brotación del 67% de los explantes y el tratamiento T4, indujo la brotación del 33% de los explantes. Sin embargo, los brotes producidos en ambos tratamientos se elongaron poco (Fig. 16 y Cuadro 5). De igual forma, estos tratamientos tampoco tuvieron un efecto en los explantes de *H. costaricensis* y no produjeron brotes (Cuadro 5).

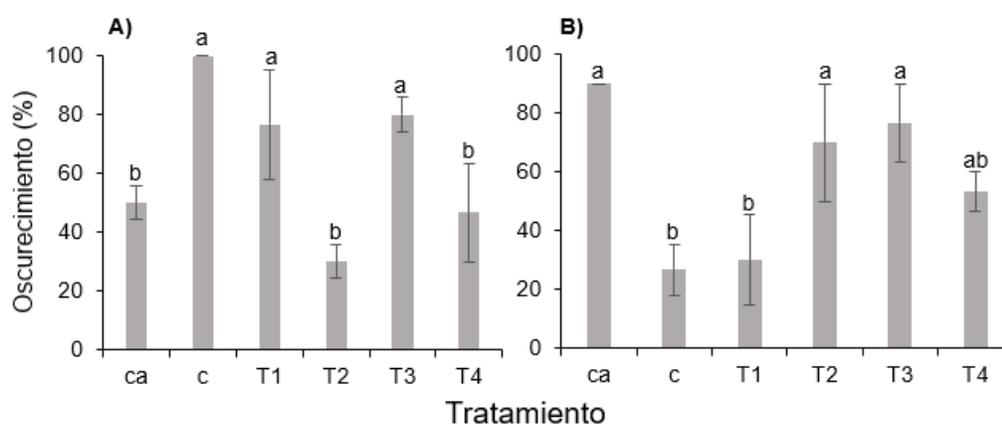


**Fig. 16)** Explante con brote de *A. tetragonus* sin elongación (flecha roja) producido en medio de cultivo MS con 20  $\mu$ M de BAP (testigo) después de ocho semanas de cultivo.

**Cuadro 5)** Brotación, altura promedio de los brotes y porcentaje de callo producidos en los explantes de *A. tetragonus* e *H. costaricensis* con los tratamientos de Mtop y BAP a las ocho semanas de cultivo. Tratamientos: ca= MS sin citoquinina (testigo absoluto); c= MS con 20  $\mu$ M de BAP (testigo); T1= MS + 20  $\mu$ M de Mtop; T2= MS + 40  $\mu$ M de Mtop; T3= MS + 80  $\mu$ M de Mtop; T4= MS + 160  $\mu$ M de Mtop.

| Tratamiento | <i>A. tetragonus</i> |             |           | <i>H. costaricensis</i> |             |           |
|-------------|----------------------|-------------|-----------|-------------------------|-------------|-----------|
|             | Brotación (%)        | Altura (cm) | Callo (%) | Brotación (%)           | Altura (cm) | Callo (%) |
| <b>Ca</b>   | 0                    | 0           | 0         | 0                       | 0           | 67        |
| <b>C</b>    | 67                   | 0.13±0.09   | 0         | 0                       | 0           | 6.7       |
| <b>T1</b>   | 0                    | 0           | 0         | 0                       | 0           | 0         |
| <b>T2</b>   | 0                    | 0           | 0         | 0                       | 0           | 33        |
| <b>T3</b>   | 0                    | 0           | 0         | 0                       | 0           | 0         |
| <b>T4</b>   | 33                   | 0.03±0.03   | 0         | 0                       | 0           | 26.7      |

En cuanto al efecto de los tratamientos sobre el oscurecimiento de los explantes, se observó un comportamiento muy variable. En el caso de *A. tetragonus* se encontró algunas diferencias, ya que los explantes del testigo con 20  $\mu\text{M}$  de BAP y los tratamientos 1 y 3 con Mtop presentaron mayor oscurecimiento en los tejidos en comparación a los explantes en otros tratamientos ( $p < 0.05$ ). En cambio, los explantes de *H. costaricensis* con el mayor porcentaje de oscurecimiento fueron los del testigo absoluto, en comparación con el testigo y el T1 (Fig. 17).

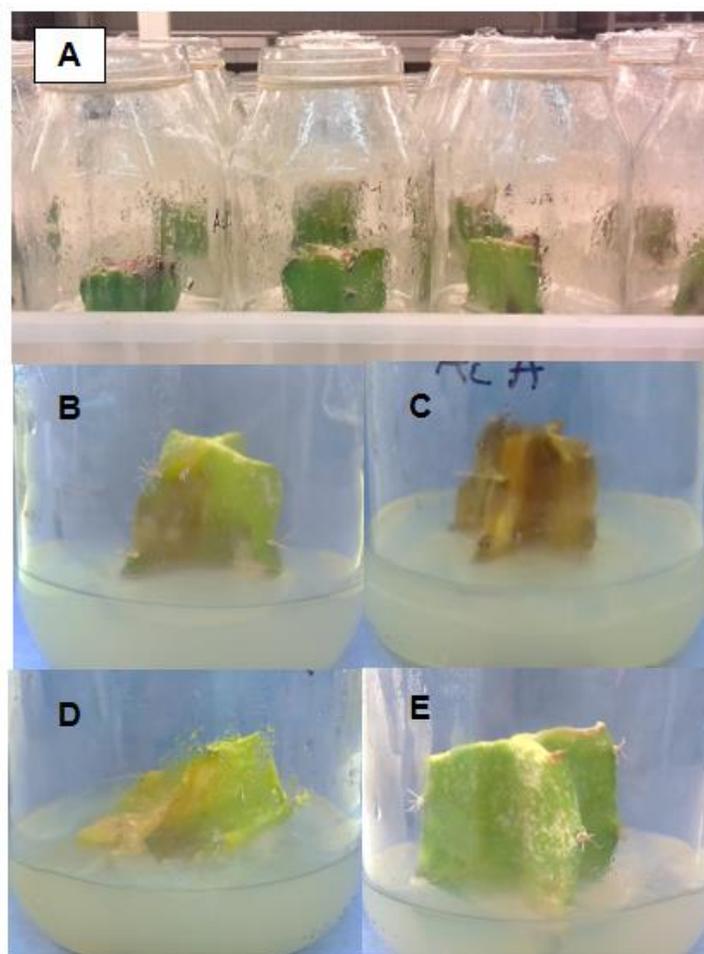


**Fig. 17)** Porcentaje de oscurecimiento de los explantes de *A. tetragonus* (A) e *H. costaricensis* (B) cultivados en medio MS adicionado con diferentes tratamientos de citoquininas. Tratamientos: T1 = 20, T2=40, T3= 80, T4= 160  $\mu\text{M}$  de Mtop, ca= MS sin citoquinina (testigo absoluto); c= MS con 20  $\mu\text{M}$  de BAP (testigo). Evaluado después de ocho semanas. \*Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes de acuerdo con una prueba post-hoc paramétrica de Tukey con un 95% de confianza. Número de explantes evaluados: 6 en todos los tratamientos.

#### 5.2.4 Efecto del tipo de explante

Este ensayo se hizo con la finalidad de tener una mayor cantidad de brotes en menor tiempo por unidad experimental. Se empleó como explante, cortes transversales obtenidos de secciones de cladodios de 5 cm de altura dejándole las cuatro costillas, las cuales contaban con 2 a 3 areolas por costilla. No fue posible evaluarlo para determinar su efectividad debido a que

todos los explantes de ambas especies se oxidaron y contaminaron por completo (Fig. 18). En cambio, solamente el 40% de los explantes de 1 cm se contaminaron.

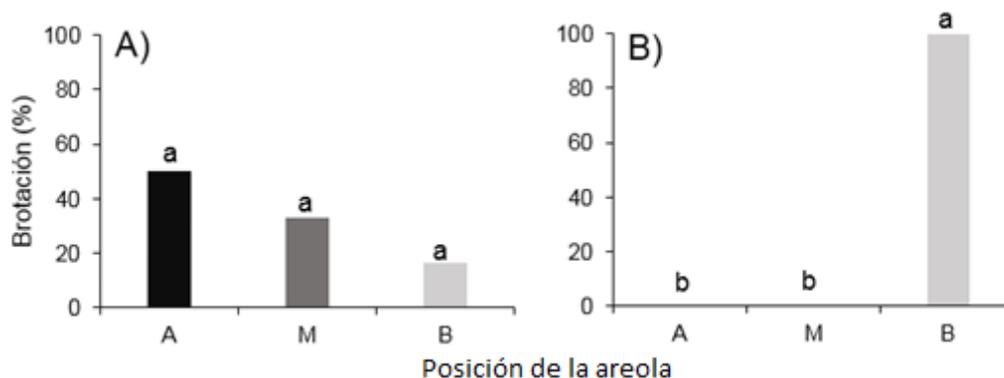


**Fig. 18)** A) Explantes de *A. tetragonus* e *H. costaricensis* fotografiados después de dos semanas en medio de cultivo MS con 20  $\mu$ M de BAP; B y C) Oxidación de los explantes de *A. tetragonus*; D) Oxidación en explante *H. costaricensis* y E) contaminación de explante de *H. costaricensis*.

### 5.2.5 Efecto de la posición de las areolas

Se evaluó si la posición (apical, medial, basal) de la que provenían las areolas tenía un efecto sobre la brotación. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los explantes para *A. tetragonus* ( $P > 0.05$ , Fig. 19 A). En

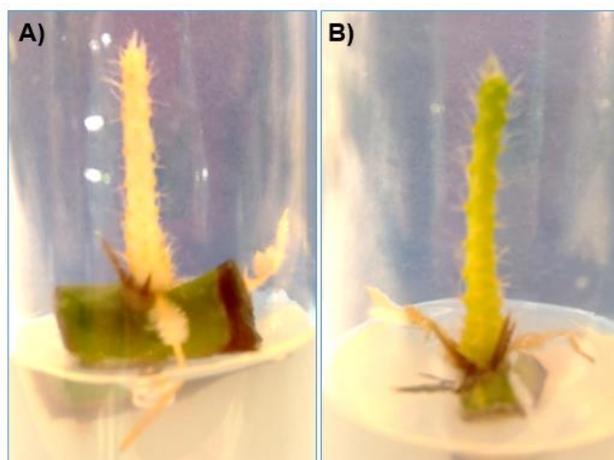
cambio, para los explantes de *H. costaricensis*, se encontró que los explantes que estaban en una posición basal inducían más la formación de brotes nuevos ( $P < 0.05$ , Fig. 19 B). Los explantes evaluados en este ensayo eran de un 1 cm y contaban con una areola.



**Fig. 19)** Brotación de las areolas A) *A. tetragonus* y B) *H. costaricensis* según la posición en el cladodio. Los explantes se pusieron en medio de cultivo MS con 20  $\mu\text{M}$  de BAP, suplementado con sacarosa al 5% y gelificado con 8 g/l de agar. Se evaluaron después de ocho semanas. \*Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes de acuerdo con una prueba post-hoc paramétrica de Tukey con un 95% de confianza. A = apical, M = medial y B = basal. Número de explantes evaluados por cada tratamiento: 10.

### 5.2.6 Efecto de la oscuridad sobre la brotación

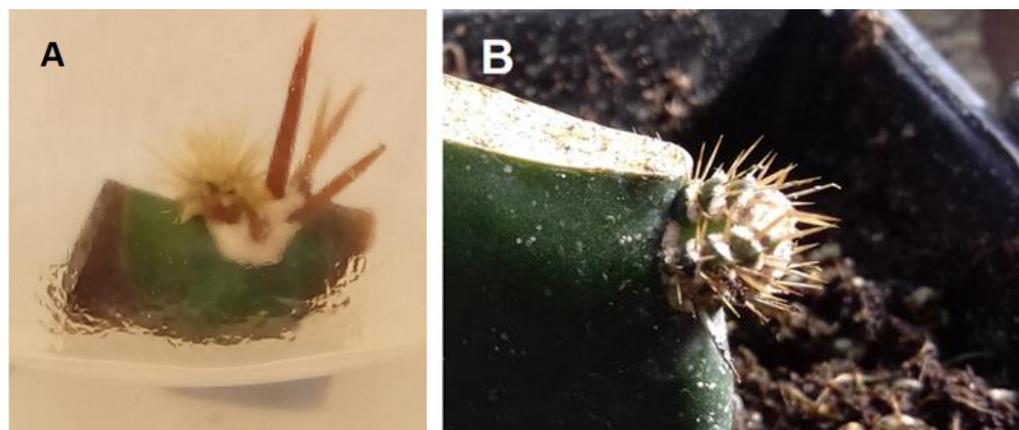
Se hizo una prueba para determinar el efecto de la oscuridad sobre la brotación de las areolas. Sin embargo, esta prueba no fue posible evaluarla ya que casi todos los explantes se oxidaron y contaminaron, quedando solamente un explante de *A. tetragonus* con el tratamiento de 20  $\mu\text{M}$  de BAP. Este explante se dejó en oscuridad y produjo un brote etiolado con una longitud de 1.5 cm y dos raíces con 1 cm de longitud. Posteriormente, este brote fue puesto en luz indirecta y después de dos semanas recuperó el color verde (Fig. 20).



**Fig. 20)** Brote de *A. tetragonus* inducido en la oscuridad. (A) Brote etiolado desarrollado después de ocho semanas en medio de cultivo MS con 20  $\mu$ M de BAP en oscuridad total y (B) El mismo brote después de dos semanas en luz directa, el cual recuperó su coloración.

### 5.2.7 Histología de los brotes obtenidos en medio de cultivo con BAP

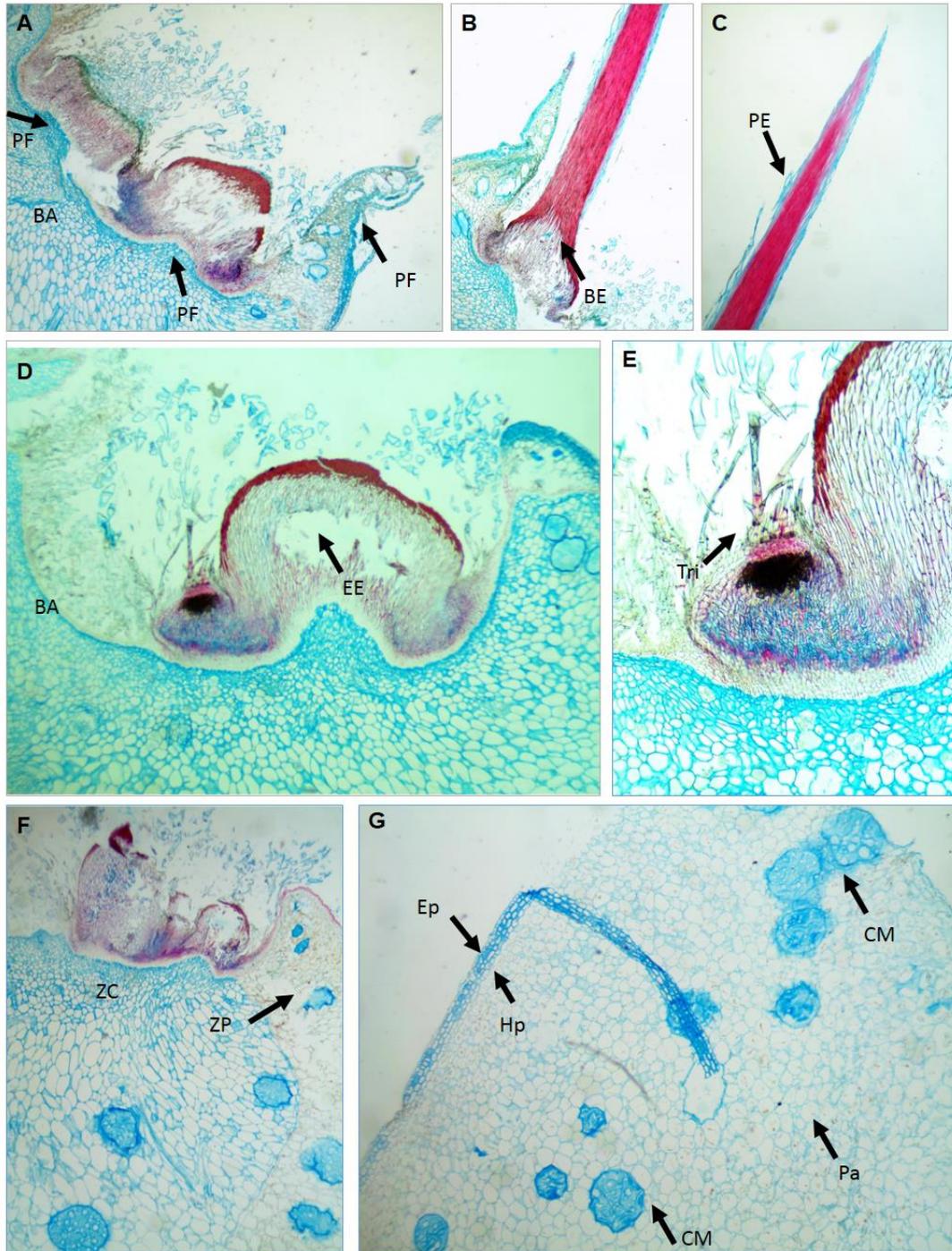
Los brotes que se iniciaban en medio de cultivo MS con BAP provenían del surco en el lado apical de las espinas, quedando estas en la base. Este mismo fenómeno se observó en los brotes en el invernadero (Fig. 21 A y B).



**Fig. 21)** Brotes en areolas de *A. tetragonus*: A) Brote obtenido en cultivo in vitro con BAP, después de ocho semanas; B) Brote obtenido en invernadero por decapitación de los ápices del cladodio, después diez semanas.

En los cortes longitudinales de areolas de *A. tetragonus* se pudo observar que existe un meristemo activo por la formación de protuberancias correspondientes a primordios foliares que se podrían desarrollar en brotes, espinas o tricomas (Fig. 22 A). Las espinas de la areola se desarrollaron justo a partir de la base de la misma. Estas espinas morfológicamente fueron más anchas en la base y se hicieron más estrechas hacia la punta mostrando proyecciones en su superficie, probablemente de lignina (Fig. 22 B y C).

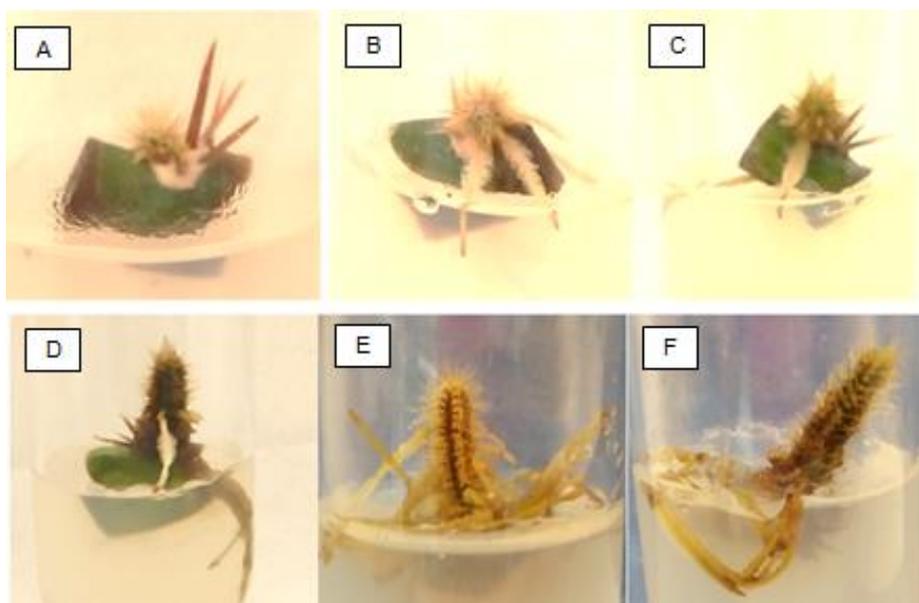
Conjuntamente, en la base de las espinas se observó una zona de elongación de la espina, la cual es el área de crecimiento activo de la misma y el resto de las células estaban lignificadas. Se observaron pequeños tricomas al lado de la base de la espina (Fig. 22 D y E). Igualmente, se puede ver que estas estructuras se formaron cerca de la zona central y llegaron hasta la zona periférica de la areola. En cuanto a los tejidos en la areola examinada, se observa que estaban en una zona conformada principalmente por un tejido esponjoso de parénquima que incluye células mucilaginosas y tiene una capa de epidermis e hipodermis maduras (Fig. 22 F y G).



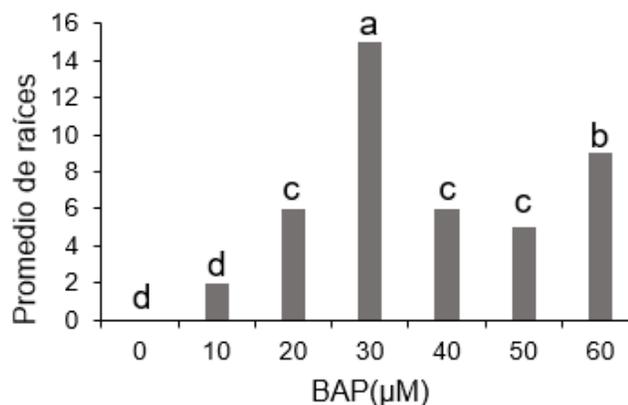
**Fig. 22)** Corte longitudinal de areolas en cultivo in vitro de *A. tetragonus*: **A** Base de la areola (BA), Primordios foliares PF); **B-C** Formación de espinas: Base de la espina (BE), proyecciones en las espinas (PE); **D-E** Formación secuencial de espinas y tricomas: Base de areola (BA), Zona de elongación de la espina (EE), Tricomas (Tri); **F** Zona central (ZC) y Zona periférica (ZP); **G** Epidermis (Ep), hipodermis (Hp), Células mucilaginosas (CM) y Parénquima (Pa).

### 5.3 Enraizamiento

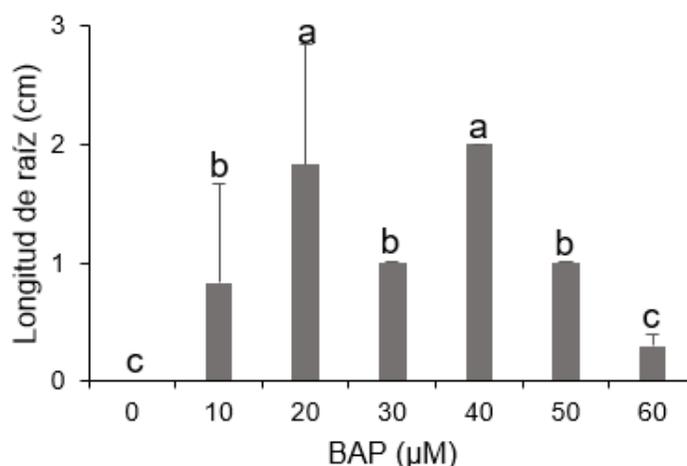
Para esta etapa no se realizaron pruebas para inducir enraizamiento ya que los explantes de *A. tetragonus* produjeron raíces espontáneamente a partir de las areolas en todos los tratamientos (Fig. 23). Sin embargo, se analizó si existió una relación entre la formación de raíces con las concentraciones de BAP utilizadas. Por ello, se analizó la longitud y el número de raíces producidas en cada uno de los tratamientos. En *A. tetragonus* se observó diferencias entre el número de raíces y las concentraciones de BAP ( $P < 0.05$ ), siendo las más largas las raíces de los explantes que estaban en el tratamiento con  $30 \mu\text{M}$  (Fig. 24). El 33% y 70% de los explantes que se encontraban con 10 y 20  $\mu\text{M}$ , produjeron raíces. En cambio, el 100% de los explantes con 30, 40, 50 y 60  $\mu\text{M}$  produjeron raíces. La longitud promedio de las raíces obtenidas estuvo entre de  $0.83 \pm 1.4 \text{ cm}$  y  $1.83 \pm 1.76 \text{ cm}$  (Fig. 25). En el caso de *H. costaricensis*, sus explantes no produjeron raíces.



**Fig. 23)** Explantes de *A. tetragonus* que formaron raíces en medio de cultivo MS suplementado con sacarosa al 5%, 8 g/l de agar, diferentes concentraciones de BAP y PVP al 0.2%. A-C) después de dos meses en cultivo y D-F) después de 4 meses en cultivo.



**Fig. 24)** Promedio de raíces producidas en explantes de *A. tetragonus* después de dos meses en medio de cultivo MS con diferentes concentraciones de BAP. Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes de acuerdo con una prueba post-hoc de Tukey con un 95% de confianza. Número de explantes evaluados: 6.



**Fig. 25)** Longitud de las raíces producidas en explantes de *A. tetragonus* después de 4 meses en medio de cultivo MS con diferentes concentraciones de BAP. \* Las barras representan el error estándar. Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes de acuerdo con una prueba post-hoc de Tukey con un 95% de confianza. Número de explantes evaluados: 6.

## 6. Discusión

### 6.1 Desinfección

Las variaciones en los porcentajes de contaminación pueden deberse al manejo de los explantes y a las características propias del material vegetal durante todo el proceso de establecimiento del cultivo (Cassells 2001). Por ello, obtener un cultivo 100% libre de contaminación es difícil. Cuando un protocolo de desinfección se considera satisfactorio es porque hay reproducibilidad de altos porcentajes de asepsia en diferentes introducciones (Bhojwani y Dantu 2013).

Al principio de esta investigación, varios aspectos del manejo del material vegetal pudieron tener influencia sobre la contaminación in vitro y provocaron que esta variara. Por ejemplo, en el momento de la aplicación de Agrimycin y Benomil, tres semanas antes de una introducción, las plantas madre en el invernadero estuvieron cerca de aspersores de agua automáticos, los cuales, al activarse, pudieron asperjarlas y así lavar los productos, con lo cual redujeron su efectividad. Sin embargo, una vez detectado este problema, las plantas fueron movidas a un lugar dónde el riego fuese totalmente controlado.

Después de haber realizado las dos pruebas para determinar el protocolo de desinfección en esta investigación, se escogió la concentración de 1% de NaOCl como la concentración para desinfectar los explantes de *A. tetragonus*, basándose en el ahorro de recursos y en la similitud de porcentajes de contaminación en las introducciones, obtenidos con esta concentración, los cuales fueron del 30% en la primera introducción y 40% en la segunda introducción. Pérez-Molphe-Balch et al. (1998) consideran que estos porcentajes de contaminación en cactáceas son aceptables debido a la dificultad que representa su desinfección por su morfología al tener estructuras como espinas y tricomas en las areolas, y crestas en las costillas, lo que complican que se pueda llegar desinfectar más efectivamente los explantes.

El NaOCl es usado preferiblemente como desinfectante para el establecimiento in vitro de varias especies por su amplio espectro antimicrobiano, acción rápida bactericida, alta solubilidad en agua, facilidad de uso, adecuada estabilidad relativa en soluciones, por ser relativamente poco tóxico para humanos, no ser inflamable y tener bajo costo (Fukuzaki 2006; Bhojwani y Dantu 2013). En cactáceas, se han empleado diferentes concentraciones de NaOCl que han resultado efectivas para el establecimiento de cultivos in vitro. Por ejemplo, para explantes de *Opuntia amyclaea* se usó NaOCl al 6% (Escobar et al. 1986); con *Sulcorebutia alba*, *S. mentosa* y *S. flavissima* emplearon NaOCl al 1.5% (Dabekaussen et al. 1991); con *Astrophytum myriostigma*, *Cephalocereus senilis* y *Nyctocereus serpentinus* se usó NaOCl al 2% (Pérez-Molphe-Balch et al. 1998) y, en el protocolo de Viñas et al. (2012), desinfectaron satisfactoriamente explantes de *Hylocereus costaricensis* con 1% de NaOCl.

La diversidad en las concentraciones de NaOCl utilizadas para la desinfección de explantes se debe principalmente a dos factores: 1) el tipo de explante inicial utilizado y 2) el tiempo de exposición de los explantes a la concentración de NaOCl. El contacto directo del explante con NaOCl durante la desinfección puede tener un efecto negativo severo en su capacidad regenerativa. Parte de este daño lo puede causar una reacción de hipersensibilidad en los explantes porque el NaOCl puede ser estresante para los tejidos (Cassells 2001). Al respecto, parámetros como la edad de la planta y el tamaño del explante pueden determinar la sensibilidad al proceso de desinfección, ya que se ha visto que explantes jóvenes y de menor tamaño sufren mayor daño durante la desinfección (Viñas et al. 2012). Así, dependiendo del explante inicial, se debe determinar la concentración y el tiempo de exposición a este compuesto para causar el menor daño posible, ya que la exposición a concentraciones altas por largo tiempo muestra efectos negativos en la capacidad regenerativa in vitro de las plantas (Yildiz et al. 2012).

Por lo anterior, en este trabajo constantemente se observó si se encontraban signos de daño en los explantes. En *A. tetragonus* siempre se observó oscurecimiento en los tejidos de los explantes después del proceso de desinfección, no así en *H. costaricensis*. El oscurecimiento in vitro es un problema generalmente causado por la oxidación de componentes celulares y de compuestos fenólicos, catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO), produciendo quinonas, especies químicas propensas a reaccionar y generar daño e incluso llevar a la muerte celular (Azofeifa 2009).

Tomar medidas preventivas en el momento de exposición de los explantes a los reactivos usados en la desinfección se hace necesario para minimizar estos problemas de oscurecimiento (Cassells 2001; Bhojwani y Dantu 2013). Cuando se disminuyó las concentraciones de NaOCl y etanol en el protocolo de desinfección, visualmente los explantes de *A. tetragonus* se oxidaron menos y de igual manera ocurrió con los explantes de *H. costaricensis*.

Aun así, con la modificación de las concentraciones de NaOCl y etanol no se resolvió por completo el oscurecimiento de los explantes de *A. tetragonus*. Al momento de hacer los lavados de los explantes provenientes de la parte apical de los cladodios en la cámara de flujo laminar, se observó una exudación color café rojiza y estos eran los que principalmente se oscurecían y en algunos casos se perdían completamente. Probablemente, este problema se debió a que eran explantes de tejidos jóvenes que, como se indicó antes, tienen una mayor sensibilidad a trazas de etanol y NaOCl, que permanecen en los tejidos aún después de los lavados con agua estéril, causando daños a los mismos (Abdul-Baki 1974).

En este estudio se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados para disminución del oscurecimiento, donde el tratamiento 3 fue en el cual visualmente se observó menor daño en el tejido de los explantes que estaban en un medio de cultivo que contenía 0.2% de PVP (Fig. 9). Pérez-Molphe-Balch et al. (1998) lograron controlar parcialmente la oxidación y excreción de compuestos fenólicos en explantes

de las especies *Coryphantha clavata*, *C. durangensis* y *Nyctocereus serpentinus* adicionando al medio de cultivo 0.2% de PVP. Este compuesto es una poliamida que tiene la capacidad de adsorber fenoles a través de puentes de hidrógeno, previniendo su oxidación y polimerización. Por ello, se utiliza en la prevención del oscurecimiento de tejidos, ya sea como enjuague al explante o su adición al medio de cultivo (George 1996).

## 6.2 Establecimiento, brotación y crecimiento inicial

La adición de BAP para la iniciación de brotes en esta investigación fue fundamental, pues esta respuesta no se dio cuando el medio de cultivo no estaba suplementado con esta citoquinina. De acuerdo con Aliyu y Mustapha (2007), en especies de cactáceas, la iniciación de yemas axilares requiere de bajos niveles o ausencia de auxina, pero siempre niveles moderados a altos de citoquininas.

La inducción de brotes en explantes de *A. tetragonus* se pudo conseguir con cualquier concentración entre 20 y 60  $\mu\text{M}$  de BAP. El análisis de regresión cuadrática mostraba un efecto en la iniciación de brotes en los explantes de acuerdo con las concentraciones de BAP y aparentemente existe un punto de inflexión entre las concentraciones entre 30 y 40  $\mu\text{M}$ . En otras especies de cactáceas se ha reportado la efectividad de diversas concentraciones de BAP para la brotación. Por ejemplo, Giusti et al. (2002) lograron la brotación de *Escobaria minima*, *Mammillaria pectinifera* y *Pelecyphora aselliformis* con 22.18  $\mu\text{M}$  de BAP y Viñas et al. (2012) consiguieron la brotación de explantes de *H. costaricensis* con 30  $\mu\text{M}$  de BAP. En otros reportes con especies de cactáceas concentraciones efectivas de BAP más bajas más bien fueron las que lograron estimular la brotación. Por ejemplo, se logró la brotación de *Opuntia amyclaea* con 10  $\mu\text{M}$  de BAP (Escobar et al. 1986); en *Mammillaria haageana* solamente fue necesario 4.4  $\mu\text{M}$  (Martínez-Vázquez y Rubluo 1989); y con las especies *Pelecyphora aselliformis*, *P. strobiliformis*, *Carnegiea gigantea*, *Pachycereus pringlei* y *Stenocereus thurberi* se tuvo

éxito con 4.4  $\mu\text{M}$  o 8.9  $\mu\text{M}$  de BAP (Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa 2002).

Al caracterizar la iniciación de brotes en este trabajo, se pudo observar que por cada areola de *A. tetragonus* se formaba solamente un brote y este era de crecimiento lento. Algo similar sucedió en el estudio realizado con el cactus columnar *Cereus peruvianus* (Machado y Prioli 1996), en el cual también reportan un brote por areola; igualmente con *Opuntia ellisiana* (Juárez y Passera 2002) e *H. costaricensis* (Viñas et al. 2012). Mientras que, en otras especies, como *Opuntia amyclaea*, se ha reportado el desarrollo de hasta 15 brotes por areola (Escobar et al. 1986), en *Echinofossulocactus* sp. se obtuvieron 12 brotes (Pérez-Molphe-Balch et al. 1998) y en *Opuntia ficus-indica* se produjeron 13.8 brotes en promedio (García-Saucedo et al. 2005). Estos resultados muestran que la respuesta a las concentraciones de los reguladores de crecimiento pueden ser particulares para las diferentes especies y esto probablemente está relacionado con su condicionamiento genético y fisiológico (Machakova et al. 2008; Shen et al. 2008; Viñas et al. 2012; Hua et al. 2015). La capacidad regenerativa in vitro de las plantas varía entre familias, especies e incluso entre genotipos de la misma especie (Yildiz 2012).

Con los cortes histológicos de areolas provenientes de cultivo in vitro, se observó que los brotes se formaron en el surco del lado apical de las espinas, quedando estas en la base. Lo anterior indica que los nuevos brotes fueron de origen axilar, como también se observó previamente en explantes de *Sulcorebutia alba* (Dabekaussen et al. 1991). Las regiones adyacentes de la areola (rama) se expandieron hacia afuera durante el proceso de maduración. Cuando esto sucede, la yema axilar joven se mueve hacia afuera por la superficie (Mauseth 2017a). Mauseth (2017b) plantea que las espinas son hojas modificadas y que todas se localizan a un lado del meristemo y, consecuentemente, los brotes emergen a la par de las espinas

y no del centro de estas. Esto también se observó en los brotes de *A. tetragonus* (Fig. 22).

En la búsqueda de otro método para aumentar la cantidad de brotes producidos *in vitro*, se usó un explante constituido por cortes transversales de cladodios de 5 cm de altura, pero este fue ineficiente porque se contaminó y oxidó. Hua et al. (2015) utilizaron este tipo de explante y lograron mayor eficiencia en la producción de brotes *in vitro*, ya que cada areola se activó y obtenían mayor número de brotes en crecimiento. Probablemente, en esta investigación este tipo de explante fue inadecuado porque su desinfección se dificultó por las espinas, en especial en el caso de *A. tetragonus*. Añadido a esto, al ser un explante más grande, hay mayor área para la presencia de inóculos contaminantes de microorganismos durante el cultivo, lo cual llevó a la pérdida total de los mismos por ambos factores.

La posición en el cladodio de la cual provenía el explante no tuvo efecto sobre inducción de la brotación en *A. tetragonus*. Resultados similares se han encontrado en otras especies, como en el caso de *Escobaria minima*, en la cual no hubo diferencias significativas sobre la brotación evaluada en explantes apicales, laterales y basales (Giusti et al. 2002). Esto puede estar relacionado con la distribución de hormonas endógenas dentro del cladodio. Normalmente las auxinas del meristemo apical se movilizan de forma basípeta (Brukhin y Morozova 2011). Esta distribución inhibe la brotación de las yemas axilares, pero, una vez decapitando este meristemo, se disminuye la producción de auxinas y, con ello, la dominancia apical, permitiendo que las citoquininas exógenas estimulen la división celular en las yemas axilares y así se dé la inducción de nuevos brotes.

Se ha visto, en experimentos con otros grupos de plantas, que la exposición por cortos periodos de tiempo a citoquininas y auxinas, seguida de una incubación en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, logra la inducción de brotes *in vitro* (Beyl, 2016). Sin embargo, este no fue el caso de *A. tetragonus*, ya que cuando se hizo el ensayo con diferentes tiempos de

exposición a 20  $\mu\text{M}$  de BAP, solamente los explantes que estuvieron permanentemente en esta citoquinina produjeron brotes nuevos. Por lo que esta especie necesita un tiempo de exposición prolongado a las citoquininas para estimular su brotación.

A lo largo del proceso de experimentación, también se observó que cuando las areolas de *A. tetragonus* se activaban no producían callos como un paso intermedio en la brotación, como suele suceder con otras cactáceas. En cambio, los explantes de *H. costaricensis* sí formaron callo en todos los tratamientos, con excepción de los explantes que estaban en medio de cultivo sin BAP. Se ha visto que el BAP puede causar efectos no deseados en los cultivos in vitro, ya que logra estimular una excesiva cantidad de tejido calloso y, en algunos casos, esta citoquinina puede inhibir la producción de brotes y raíces (Sánchez-Morán y Pérez-Molphe-Balch, 2007).

Identificar la citoquinina adecuada para inducir una respuesta determinada requiere de prueba y error ya que es frecuente encontrar que diferentes especies de plantas muestren mejores respuestas con ciertas citoquininas, o respondan solamente a una, o incluso que no respondan en lo absoluto (Beyl, 2016). En esta investigación se usó Mtop con explantes de *A. tetragonus* e *H. costaricensis* para tratar de incrementar la frecuencia de brotación. Sin embargo, no se promovió la brotación con este compuesto en la mayoría de los explantes. Solamente el 67% de los explantes que estaban en el testigo con 20  $\mu\text{M}$  de BAP y el 33% que estaban en el T4 con 160  $\mu\text{M}$  Mtop iniciaron la brotación en *A. tetragonus*. Por otro lado, hubo un efecto positivo del uso de Mtop, ya que, se observó que los tratamientos con esta citoquinina no presentaron oscurecimiento en los explantes.

La Mtop es una citoquinina aromática con una alta actividad en los tejidos vegetales (Strnad 1997). Ha sido propuesta como una alternativa para el BAP debido a su capacidad para estimular la generación de brotes con una eficiencia comparable (Werbrouck et al. 1996). Previamente, solo había un reporte del uso de Mtop en la familia Cactaceae con el cactus columnar

*Browningia candellaris*, en el cual también compararon su eficiencia con el efecto del BAP (Sánchez-Morán y Pérez-Molphe-Balch, 2007). En dicha investigación encontraron que el mejor resultado con BAP a una concentración de 2.2  $\mu\text{M}$  generaba un promedio de 8.4 brotes por explante, pero las concentraciones de Mtop producían resultados superiores a estos. La mejor respuesta se obtuvo con 2.1  $\mu\text{M}$ , con la cual se generaron en promedio 20.4 brotes por explante.

La baja respuesta de *A. tetragonus* a las concentraciones de Mtop utilizadas en este estudio pudo deberse a que eran muy altas e inhibieron la brotación; esto tomando en cuenta que la concentración más efectiva reportada para *B. candellaris* fue de solamente 2.1  $\mu\text{M}$  de Mtop. Por lo anterior, sería recomendable ampliar el rango de concentraciones a evaluar e incluir concentraciones más bajas. Otro factor que se debe tener en cuenta es la procedencia de los explantes. En el estudio de Sánchez-Morán y Pérez-Molphe-Balch (2007), los explantes usados provenían de plántulas de semillas germinadas in vitro y no de plantas adultas como en este estudio, lo que también pudo influir en su respuesta.

Para seguir buscando las condiciones idóneas para el cultivo in vitro de *A. tetragonus*, se estableció un ensayo para evaluar si la oscuridad influye sobre la brotación. Sin embargo, esta prueba no se evaluó ya que la mayoría de los explantes se oxidaron y contaminaron, quedando solamente un explante de *A. tetragonus* con el tratamiento de 20  $\mu\text{M}$  de BAP. Este explante produjo un brote etiolado, el cual, después de ser puesto en luz indirecta por dos semanas, recuperó el color verde. Anteriormente, este procedimiento se había evaluado solamente una vez para la activación de areolas en explantes de *Sulcorebutia alba* (Pierik, 1991), en el cual observaron que con baja irradiación la elongación de los brotes ocurría y la oscuridad provocaba la etiolación en los mismos. Pero, una vez puestos en luz estos retomaban su coloración y formaban brotes normales. Lo anterior concuerda con lo observado con el explante de *A. tetragonus* en este trabajo. Esto es un

indicador de que esta es una posible vía que se podría evaluar para la inducción de brotes en *A. tetragonus*.

### 6.3 Enraizamiento

El 100% de los explantes de *A. tetragonus* que fueron puestos en medio de cultivo MS con 20, 30 40, 50 y 60  $\mu$ M de BAP produjeron raíces espontáneamente. Este mismo fenómeno se ha observado en otros estudios de propagación in vitro con otras especies de cactus como *H. undatus* (Drew y Azimi 2002), *Notocactus magnificus* (de Medeiros et al. 2006); *H. costaricensis* (Viñas et al. 2012) y *Coryphantha elephantidens* (Bhau y Wakhlu 2015). Esto probablemente esté relacionado con las concentraciones de auxina presente en los explantes (Brasil et al. 2005; Viñas et al. 2012; Wybouw y De Rybel, 2019). Debido a que los explantes de *A. tetragonus* se oxidaban en las orillas, al momento de transferirlos siempre se eliminaba el tejido dañado con ayuda de un bisturí. Puede que este proceso de hacer una herida estimulaba la síntesis *de novo* de auxina y esto causaba el enraizamiento espontáneo. Se ha visto que la formación de raíces está regulada por varias señales que generan eventos relacionados con la producción endógena de hormonas. Una herida es una de las señales más fuertes que induce el proceso de enraizamiento *de novo* y una de las primeras respuestas a esta es la acumulación de auxina por una biosíntesis local (Olatunji et al. 2017).

El hecho de que se haya dado el fenómeno de enraizamiento espontáneo es importante, ya que esto evita que se tenga que inducir una fase de enraizamiento in vitro y así se acelera el proceso de aclimatación (Viñas et al. 2012).

## 7. Perspectivas y conclusiones

A pesar de que se hicieron diferentes experimentos buscando definir las condiciones adecuadas para la propagación in vitro de *A. tetragonus*, no se

pudo llegar a la fase de aclimatación, ya que surgieron diferentes inconvenientes a lo largo de las etapas de experimentación, como problemas de contaminación y oscurecimiento en la fase de desinfección y la necesidad de optimizar las condiciones de la fase de establecimiento e inducción de la brotación. Estas dificultades tuvieron que ser abordadas de forma sistemática hasta tratar de resolverlas. Es rescatable decir que *A. tetragonus* es una especie, que si bien es cierto se ha utilizado tradicionalmente en varios países, se conoce muy poco sobre ella. Los resultados obtenidos en esta investigación se pueden usar para sentar las bases para el desarrollo de un protocolo para su propagación in vitro y seguir experimentando a partir de este, para mejorar los parámetros y las condiciones del cultivo y obtener mejores respuestas. Igualmente, se pueden realizar otras investigaciones con esta especie, como estudiar el contenido fenólico en tejidos, contenido de cristales de oxalato y la composición de su pared celular, los cuales ayudarán a comprender de mejor manera el comportamiento in vitro de esta planta.

## 8. Bibliografía citada

- Abdul-Baki, AA. 1974. Hypochlorite and tissue sterilization. *Planta*, 115: 373-376
- Albano, C; Negro, C; Tommasi, N; Gerardi, C; Mita, G; Miceli, A; De Bellis, L; Blando, F. 2015. Betalains, phenols and antioxidant capacity in cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] fruits from Apulia (South Italy) genotypes. *Antioxidants*, 4(2): 269–280.
- Ali, NF; El-Mohamedy, RSR. 2011. Eco-friendly and protective natural dye from red prickly pear (*Opuntia Lasiacantha* Pfeiffer) plant. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15: 257–261.
- Aliyu, B; Mustapha, Y. 2007. Effect of different media on the *in vitro* growth of cactus (*Opuntia ficus-indica*) explants. *African Journal of Biotechnology*, 6(11): 1330-1331.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1): 153-175.
- Baquero-Duarte, LE; Castro-Rivera, JA; Narváez-Cuenca, CE. 2005. Catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasas en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*): maduración y senescencia. *Acta Biológica Colombiana* 10(2): 49-60.
- Beyl, C.A. 2016. PGRs and their use in micropropagation. Ed: Trigiano, R.N. y Gray, D.J. En: *Plant tissue culture, development, and biotechnology*. CRC Press. Londres, Inglaterra. 585 p.
- Bhau, BS; Wakhlu, AK. 2015. A highly efficient *in vitro* propagation protocol for elephant tusk cactus: *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.07.003>

- Bhojwani, SS; Dantu, PK. 2013. Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer 283 India, 309 p.
- Boke, NH. 1944. Histogenesis of the leaf and areole in *Opuntia cylindrica*. American Journal of Botany, 31: 299–316.
- Brasil, J; Jereissati, E; Santos, M; Campos, F. 2005. *In vitro* micropropagation of *Nopalea cochenillifera* (Cactaceae). Journal of Applied Botany and Food Quality, 79:160-162.
- Bravo-Hollis, H. 1978. Las Cactáceas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 743 p.
- Bravo-Hollis, H; Scheinvar, L. 1999. El interesante mundo de las cactáceas. Fondo de Cultura Económica. UNAM. México CONACyT, 233 pp.
- Brown, D.C.W; Thorpe, T.A. 1995. Crop improvement through tissue culture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 11(4): 409–415
- Brukhin, V; Morozova, N. 2011. Plant growth and development - basic knowledge and current views. Mathematical Modelling of Natural Phenomena, 6:1-53
- Butera, D; Tesoriere, L; Di Gaudio, F; Bongiorno, A; Allegra, M; Pintaudi, A.M; Kohen, R; Livrea, M.A. 2002. Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(23): 6895-6901.
- Cabrera-Rivera, PC. 2013. Evaluación del cactus (*Acanthocereus* spp., cactácea) con tres abonos orgánicos en Huehuetenango. Tesis de Licenciatura. Universidad Rafael Landívar. Quetzaltenango, Guatemala. 64 p.
- Cassells, AC. 2001. Contamination and its impact in tissue culture. Acta Horticulturae, 560: 353–359.

- Cejudo-Bastante, M.J; Chaalal, M; Louaileche, H; Parrado, J; Heredia, F.J. 2014. Betalain profile, phenolic content, and color characterization of different parts and varieties of *Opuntia ficus-indica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(33): 8491-8499.
- Chapman, B, Mondragon Jacobo, C; Bunch, RA; Paterson, AH. 2002. Breeding and Biotechnology. Ed: Nobel, PS. En: *Cacti: Biology and Uses*. University of California Press, Ltd. Berkeley and Los Angeles, California. 281 pp.
- Chethana, M; Gayatri, SL; Bhandari Vinay, M; Ranade Vivek, V; Raja, S. 2015. Application of biocoagulant *Acanthocereus tetragonus* (triangle cactus) in dye wastewater treatment. *Journal of Environmental Research and Development*, 9(3A): 813-821.
- Chízmar-Fernández, C. 2009. Plantas comestibles de Centroamérica. InBio, San José, Costa Rica. 360 p.
- Christenhusz, MJM; Byng, JW. 2016. The number of known plant species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261(3): 201-217
- Clement, JS; Mabry, TJ; Wyler, H; Dreiding, AS. 1994 Chemical Review and Evolutionary Significance of the Betalains. Ed: Behnke, H.D. y T.J. Mabry. En: *Caryophyllales Evolution and Systematics*. Springer, Alemania, 338 pp.
- Cruz, A.G. 2010. Extracción de pectina del jacube (*A. tetragonus* L.). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". Cohauila, México. 42 p.
- Dabekaussen, MAA; Pierik, RLM; van der Laken, JD; Hoek Spaans, J. 1991. Factors affecting areole activation in vitro in the cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. *Scientia Horticulturae*, 46: 283-294.

- De la Rosa Carrillo, ML; Domínguez-Rosales, M; Pérez Reyes, ME; Pérez Molphe Balch, E. 2012. Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género *Turbinicarpus*. *Interciencia* 37(2): 114-120.
- de Medeiros, LA; de Ribeiro, RCS; Gallo, LA; de Oliveira, ET; Demattê, MESP. 2006. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84:165–169.
- Drew, RA; Azimi, M. 2002. Micropropagation of red pitaya (*Hylocereous undatus*). *Acta Horticulturae*, 575:93–98.
- Dubrovsky, JG; North, GB. 2002. Root Structure and Function. Ed: Nobel, PS. En: *Cacti, Biology and Uses*. University of California Press, Ltd. Berkeley and Los Angeles, California. 280 p.
- Dueñas-Gómez, YM; Narváez-Cuenca, CE; Restrepo-Sánchez, LP. 2008. Inhibición de lesiones por frío de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) a través del choque térmico: catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasa. *Acta Biológica Colombiana* 13(1): 95-106.
- Eggl, U. y L.E. Newton. 2004a. *Acanthocereus tetragonus*. Etymological dictionary of succulent plant names. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, ISBN 978-3-662-07125-0. 266 p.
- Eggl, U. y L.E. Newton. 2004b. *Hylocereus costaricensis*. Etymological dictionary of succulent plant names. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, ISBN 978-3-662-07125-0. 266 p.
- Escobar, HA; Villalobos, AVM; Villegas, MA. 1986. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 7: 269-277.
- Fukuzaki, S. 2006. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Science*, 11(4): 147-157.

- García-Barrera, FA; Reynoso CR; González de Mejía, E. 1998. Estabilidad de las betalaínas extraídas del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). Food Science and Technology International, 4: 115-120.
- García-Cruz, L; Salinas-Moreno, Y; Valle-Guadarrama, S. 2012. Betalaínas, compuestos fenólicos y actividad antioxidante en pitaya de mayo (*Stenocereus griseus* H.). Revista Fitotecnia Mexicana, 35(5): 1-5.
- García-Cruz, L; Valle-Guadarrama, S; Salinas-Moreno, Y; Joaquín-Cruz, E. 2013. Physical, chemical, and antioxidant activity characterization of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruits. Plant Foods for Human Nutrition, 68(4): 403-410.
- García-Rubio, OR; Malda-Barrera, GX. 2009. Conservación *in situ* y *ex situ* de *Mammillaria mathildae*, cactácea endémica en peligro de extinción de la ciudad de Querétaro. CIENCIA, 2(1): 3-16.
- García-Saucedo, PA; Valdez-Morales, M; Valverde, ME; Cruz-Hernández, A; Paredes-López, O. 2005. Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 80: 215–219
- Gentile, C; Tesoriere, L; Allegra, M; Livrea, MA; D'alessio, P. 2006 Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. Annals of the New York Academy of Sciences, 1028(1): 481-486
- George, E. 1996. Plant propagation by tissue culture; part 2. In Practice. 2 ed. Exegetics Limited. England. 1361 p.
- Giusti, P; Vitti, D; Fiocchetti, F; Colla, G; Saccardo, F; Tucci, M. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. Scientia Horticulturae, 95: 319-332

Goettsch, B; Hilton-Taylor, C; Cruz Piñón, G; Duffy, JP; Frances, A; Hernández, HM; Inger, R; Pollock, C; Schipper, J; Superina, M; Taylor, NP; Tognelli, M; Abba, AM; Arias, S; Arreola-Nava, HJ; Baker, MA; Bárcenas, RT; Barrios, D; Braun, P; Butterworth, CA; Búrquez, A; Cáceres, F; Chazaro-Basañez, M; Corral Díaz, R; del Valle Perea, M; Demaió, PH; Duarte de Barros, WA; Durán, R; Faúndez Yancas, L; Felger, RS; Fitz Maurice, B; Fitz Maurice, WA; Gann, G; Gómez Hinostrosa, C; Gonzales Torres, LR; Griffith, MP; Guerrero, PC; Hammel, B; Heil, KD; Hernández-Oria, JG; Hoffmann, M; Ishihara, MI; Kiesling, R; Larocca, J; León de la Luz, JL; Loaiza, CR; Lowry, SM; Machado, MC; Majure, LC; Martínez Ávalos, JG; Martorell, C; Maschinski, J; Méndez, E; Mittermeier, RA; Nassar, JM; Negrón-Ortiz, V; Oakley, LJ; Ortega-Baes, P; Pin Ferreira, AB; Pinkava, DJ; Porter, JM; Puente-Martinez, R; Gamarra, JR; Saldivia Pérez, P; Sánchez Martínez, E; Smith, M; Sotomayor, JM; Stuart, SN; Tapia Muñoz, JL; Terrazas, T; Terry, M; Trevisson, M; Valverde, T; Van Devender, TR; Véliz-Pérez, ME; Walter, HE; Wyatt, SA; Zappi, D; Zavala Hurtado, JA; Gaston, KJ. 2015. High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nature Plants*, 15142, DOI: 10.1038/NPLANTS.2015.142

Grijalva-Pineda, A. 2006. Flora útil etnobotánica de Nicaragua. Agencia Española de Cooperación Internacional. Managua, Nicaragua. 350 p.

Harivaindaran, KV; Rebecca, OPS; Chandran S. 2008. Study of optimal temperature, pH and stability of dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel for use as potential natural colorant. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(18): 2259-2263

Hartmann, HT; Kester, DE; Davies, FT; Geneve, R. 2010. Principles of Grafting and Budding. Ed: Hartmann, HT y Kester DE. EN: Plant propagation: principles and practices. Upper Saddle River, NJ, Prentice-Hall.

- Hartmann, HT; Kester, DE; Davies, FT; Geneve, R. 2014. Principles of Grafting and Budding. Ed: Hartmann, HT y Kester DE. EN: Plant propagation: principles and practices. Kirby Street, London, Pearson Education Limited.
- Herrera-Hernández, MG; Guevara-Lara, F; Reynoso-Camacho, R; Guzmán-Maldonado, SH. 2011. Effects of maturity stage and storage on cactus berry (*Myrtillocactus geometrizans*) phenolics, vitamin C, betalains and their antioxidant properties. Food Chemistry, 129(4): 1744-1750
- Hua, Q., Chen P., Liu W., Ma Y., Liang R. Wang L., Wang Z., Hu G. y Qin Y. 2015. A protocol for rapid in vitro propagation of genetically diverse pitaya. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 120:741–745
- Jadhav, M.V; Mahajan YS. 2012. Study on locally available coagulant (*Moringa oleifera*) for removal of turbidity from water. Journal of Environmental Research and Development, 7(1): 361-367
- Johnson, J.L.; Emino, E.R. 1979. Tissue culture propagation in the Cactaceae. Cactus and Succulent Journal, 51:275–277.
- Juárez, MC; Passera, CB. 2002. *In vitro* propagation of *Opuntia ellisiana* Griff. and acclimatization to field conditions. Biocell 26: 319-324
- Juárez-Cruz, A. 2007. Estudio etnobotánico de la cruceta o jacube (*Acanthocereus* spp.) de la zona centro de Veracruz. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 84 p.
- Juárez Cruz, A; Rivera Muñoz, M; Sosa Montes, E; Goytia Jiménez, MA; González Hernández, VA; Bárcena Gama, R. 2012. Composición química de tallos inmaduros de *Acanthocereus* spp. e *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose. Revista Fitotecnia Mexicana 35 (2): 171 –175.

- Le Bellec, F; Vaillant, F; Imbert, E. 2006. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. *Fruits*, 61:237-250
- Lema Rumińska, J; Kulus, D. 2014. Micropropagation of cacti: a review. *Haseltonia*, 19: 46-63.
- Loyola-Vargas, VM; Ochoa-Alejo, N. 2018. An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. Ed: Loyola-Vargas, VM; Ochoa-Alejo, N. En: *Plant Cell Culture Protocols*. Springer Science. New York, Estados Unidos. 507 p.
- Machado, MFPS; Prioli, AJ. 1996. Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) by areole activation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 32: 199-203
- Machakova, I; Zazimalova, E; George, EF. 2008. Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. Ed: George, EF; Hall, MA; De Klerk, GJ. En: *Plant propagation by tissue culture*. Springer, Dordrecht, 175-204 pp.
- Mandloi, M; Chaudhari, S; Folkard, GK. 2004. Evaluation of natural coagulants for direct filtration. *Environmental Technology*, 25(4): 481-489
- Martínez-Vázquez, O; Rubluo, A. 1989. *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. *Journal of Horticultural Sciences* 64: 99-105
- Martins, N; Lobo-Roriz, C; Morales, P; Barrosa, L; Ferreira, ICFR. 2017. Coloring attributes of betalains: a key emphasis on stability and future applications. *Food and Functions*, 8:1357-1372
- Mauseth, JD. 2006. Structure–function relationships in highly modified shoots of Cactaceae. *Annals of Botany*, 98: 901-926.

- Mauseth, JD. 2016. Many cacti have leaves on their “flowers”. *Cactus and Succulent Journal*, 88(2):60-65.
- Mauseth, JD. 2017a. An introduction to cactus areoles part I. *Cactus and Succulent Journal*, 89(3):128-134.
- Mauseth, JD. 2017b. An introduction to cactus areoles part II. *Cactus and Succulent Journal*, 89(5):219-229.
- Mauseth, JD; Halperin, W. 1975. Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *American Journal of Botany*, 62: 869-77.
- Meza, MV. 2011. *Acanthocereus tetragonus*. *Cactáceas mexicanas: usos y amenazas*, pp. 41-44.
- Mohamed-Yasseen, Y. 2002. Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton & Rose). *In Vitro Cell and Developmental Biology—Plant*, 38:427-429.
- Mohamed-Yasseen, Y; Barringer, SA; Splittstoesser, WE; Schnell, RJ. 1995. Rapid propagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and plant establishment in soil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42:117-119.
- Mroginski, L; Sansberro, P; Flaschland, E. 2010. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. *Argenbio*. 650 p.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Nerd, A; Tel-Zur, N; Mizrahi, Y. 2002. Fruits of vine and columnar cacti. Ed: Nobel, PS. En: *Cacti biology and uses*. University of California Press, Berkeley y Los Angeles, California. 280 pp.

- Olatunji, D; Geelen, D; Verstraeten, I. 2017. Control of endogenous auxin levels in plant root development. *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms18122587
- Pérez-Loredo, MG; García-Ochoa, F; Barragán-Huerta, BE. 2015. Comparative analysis of betalain content in *Stenocereus Stellatus* fruits and other cactus fruits using principal component analysis. *International Journal of Food Properties* 19(2): 326-338.
- Pérez-Molphe-Balch, E; Pérez-Reyes, ME; Villalobos Amador, E; Meza Rangel, E; del Rocío Morones Ruiz, L; Lizalde Viramontes, HJ. 1998. Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 34: 131-135
- Pérez-Molphe-Balch, E; Dávila-Figueroa, CA. 2002. *In vitro* propagation of *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 38: 73-78
- Pérez-Molphe-Balch, E; Santos-Díaz, M; Ramírez-Malagón, R; Ochoa-Alejo, N. 2014. Tissue culture of ornamental cacti. *Scientia Agricola*, 72(6): 540-561
- Phani Madhavi, T; Srimurali, M; Nagendra Prasad, K. 2014. Color removal from industrial waste water using alum. *Journal of Environmental Research and Development*, 8(4): 890-894.
- Pierik, RLM. 1991. Factors affecting areole activation in vitro in the cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. Eds: Prakash, J. y Pierik, RLM. En: *Horticulture - New Technologies and Applications*, 181-188
- Polturak, G; Aharoni, A. 2017. “La Vie en Rose”: Biosynthesis, sources, and applications of betalain pigments. *Molecular Plant*, <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.10.008>

- Prophet, BE; Millis, B; Arrington, J; Sobin, L. 1995. Métodos Histotecnológicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. Registro de Patología de los Estados Unidos de América, Washington DC, EUA. 280 p.
- RStudio Team. 2016. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Rebecca, OPS; Boyce, AN; Chandran, S. 2010. Pigment identification and antioxidant properties of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). African Journal of Biotechnology, 9(10): 1450-1454.
- Rivas-Rossi, M. 1998. *Hylocereus costaricensis*. Cactáceas de Costa Rica. UNED. San José, Costa Rica. 108 p.
- Rodriguez-Amaya, DB. 2016. Natural food pigments and colorants. Current Opinion in Food Science, 7:20–26.
- Sánchez-Morán, MR; Pérez-Molphe-Balch, E. 2007. Propagación *in vitro* de *Browningia candularis* (Cactaceae) usando meta-topolina. Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas, 4: 17-19.
- Schwager, H; Neinhuis, C; Mauseth, JD. 2015. Secondary growth of the areole (leaf/bud) traces in *Hylocereus undatus* (Cactaceae) during the formation of branches or flowers. International Journal of Plant Sciences, 176: 762–769.
- Seemann, P; Rodríguez, C; Jara, G. 2007. Cultivo *in vitro* de cactáceas con fines de conservación *ex situ*. Agro Sur, 35(2):24-26
- Shen, X; Kane, ME; Chen, J. 2008. Effects of genotype, explant source, and plant growth regulators on indirect shoot organogenesis in *Dieffenbachia* cultivars. In Vitro Cell and Developmental Biology – Plant, 44:282–288.

- Shimomura, T; Fujihara, K. 1980. Stimulation of axillary shoot formation of cuttings of *Hylocereus trigonus* (Cactaceae) by pre-soaking in benzyladenine solution. *Scientia Horticulturae*, 13:289–296.
- Steinhart, CE. 1962. Tissue culture of a cactus. *Science*, 137: 545-546.
- Stintzing, FC; Schieber, A; Carle, R. 2002a. Identification of betalains from yellow beet (*Beta vulgaris* L.) and cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8): 2302-2307.
- Stintzing, FC; Schieber, A; Carle, R. 2002b. Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. *Food Chemistry* 77(1): 101-106.
- Strnad, M. 1997. The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum*, 101: 674-688.
- Thorpe, TA. 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37:169–180
- Vasil, I. K. 2008. A history of plant biotechnology: From the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports* 27:1423–1440.
- Viñas, M; Fernández, M; Azofeifa, A; Jiménez, VM. 2012. *In vitro* propagation of purple pitaya (*Hylocereus costaricensis* [F.A.C. Weber] Britton & Rose) cv. Cebra. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 48: 469-477.
- Vishali, S; Karthikeyan, R. 2014. Cactus *Opuntia (ficus-indica)*: An eco-friendly alternative coagulant in treatment of paint effluent. *Desalination and Water Treatment*, 19(1): 229-234.

- Vyskot, B; JáRa, Z. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. Journal of Horticultural Science, 59:3, 449-452.
- Werbrouck, SPO; Strnad, M; Van Onckelen, HA; Debergh, PC. 1996. Meta topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? Physiologia Plantarum, 98: 291-297.
- Woo, KK; Ngou, FH; Ngo, LS; Soong, WK; Tang, PY. 2011. Stability of betalain pigment from red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). American Journal of Food Technology, 6(2): 140-148.
- Wybouw, B; De Rybel, B. 2019. Cytokinin – a developing story. Trends in Plant Science, 24(2): 177-185
- Wybraniec, S; Stalica, P; Jerz, G; Kloze, B; Gebers, N; Winterhalter, P, Spórna, A; Szaleniec, M; Mizrahi, Y. 2009. Separation of polar betalain pigments from cacti fruits of *Hylocereus polyrhizus* by ion-pair high-speed countercurrent chromatography. Journal of Chromatography A, 1216(41): 6890-6899.
- Yildiz, M. 2012. The prerequisite of the success in plant tissue culture: high frequency shoot regeneration. Ed: Leva, A; Rinaldi, L. En: Recent advances in plant *in vitro* culture. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/51097>
- Yildiz, M; Özcan, S.F; Kahramanogullari, C.T; Tuna, E. 2012. The effect of sodium hypochlorite solutions on the viability and *in vitro* regeneration capacity of the tissue. The Natural Products Journal, 2: 328-331.