



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

CARRERA DE AGRONOMÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN

ESPECIALIDAD:

INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Previo a la Obtención del Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

**“ESTABLECIMIENTO Y CALLOGÉNESIS IN VITRO DE PITAHAYA
AMARILLA *HYLOCEREUS MEGALANTHUS*
(K. SCHUM. EX VAUPEL) RALF BAUER Y PITAHAYA ROJA *HYLOCEREUS*
UNDATUS. (HAW.) BRITTON
& ROSE”.**

MODALIDAD:

TRABAJO CIENTÍFICO

Autor:

SUAREZ ROLDAN MERLÍN JESÚS

DIRECTORA:

ING. LILIANA COROZO QUIÑONEZ MG. SC.

SANTA ANA – MANABÍ – ECUADOR

2017

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Título: Establecimiento y calogénesis in vitro de pitahaya amarilla *Hylocereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer y pitahaya roja *Hylocereus undatus*. (Haw.) Britton & Rose”

TESIS DE GRADO

Sometida a consideración del Tribunal de Revisión y Evaluación de Trabajo de Titulación y legalizada por el Honorable consejo Directivo como requisito previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRONOMO

APROBADO POR:

.....
.....
.....

CERTIFICACIÓN

Ingeniera Agrónomo

LILIANA COROZO QUIÑÓNEZ Mg. SC.

Certifica

Que el trabajo de titulación “**Establecimiento y callogénesis in vitro de pitahaya amarilla *Hylocereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer y pitahaya roja *Hylocereus undatus*. (Haw.) Britton & Rose**” es trabajo original del egresado Merlin Jesús Suarez Roldan, el cual fue realizado bajo mi dirección.

Ing. Liliana Corozo Quiñónez Mg. SC.
DIRECTORA DE TRABAJO DE TITULACIÓN

DEDICATORIA

A Dios por todas y cada una de las bendiciones presentes en este largo camino llamado vida, estar en el momento oportuno y justo y por esa suspicacia dada para resolver los inconvenientes que se presentan en la vida.

A mis progenitores; mi madre Luzmila Asunción Roldan y mi padre Indauro victoriano Suárez Cedeño, por todas y cada una de las facilidades prestadas para la educación y formación profesional que he adquirido durante el transcurso de mi subsistencia.

A mis hermanos, por todo el apoyo brindado siempre, en cada una de las actividades que eh realizado.

Y a todas y cada unas de las personas que de una u otra manera encontré al subir de la escalinata y me facilitaron para llegar paso a paso a un nuevo nivel.

Atentamente
Merlín Suárez

AGRADECIMIENTO

“El nivel de conocimiento no se mide por los títulos obtenidos, ni por el puesto que ocupamos, más aun por los años transcurridos, si no por el número de grandes problemas resueltos en el menor tiempo posible siendo estos sostenibles”.

A la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí, por ser parte de la formación profesional durante el lapso de tiempo que permanecí dentro de la institución.

A mi tutora la Ing. Liliana Corozo Quiñónez, por el aporte de sus conocimientos impartidos y sugerencias y ayuda durante todo el desarrollo de la investigación.

A mi revisor el Ing. Eduardo F. Héctor Ardisana, PhD. Por cada una de las sugerencias hechas para una mejor calidad de la investigación.

A la Ing. Fátima Macías Ponce, por la ayuda y facilidad prestada en el Laboratorio de Biotecnología, en el momento de realizar las diferentes combinaciones hormonales, para la investigación.

Atentamente
Merlín Suárez

RESUMEN

A PARTIR DE SEMILLAS GERMINADAS PREVIAMENTE EN MEDIO MS (MURASHIGE Y SKOOG) SE ESTANDARIZÓ UN PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE EXPLANTES *IN VITRO*, Y A SU VEZ OBTENER CALLOS A PARTIR DE HOJAS COTILEDONARES EN PITAHAYA AMARILLA (*HYLOCEREUS MEGALANTHUS*) Y PITAHAYA ROJA (*HYLOCEREUS UNDATUS*). ENSAYÁNDOSE LAS SIGUIENTES CONCENTRACIONES M1 (ANA1MG.L⁻¹ CON BAP0.5MG.L⁻¹); M2 (ANA1MG.L⁻¹ Y KIN0.3MG.L⁻¹); M3 (2,4-D1.5MG.L⁻¹ CON BAP0.5MG.L⁻¹); M4 (2,4-D1.5MG.L⁻¹ CON KIN0.3MG.L⁻¹), PARA OBTENER UN TOTAL DE OCHO TRATAMIENTOS, LAS CONDICIONES *IN VITRO* ESTUVIERON CONTROLADAS CON UN 70% DE HUMEDAD Y 25±2°C Y CON FOTOPERIODO 16/8 DE OSCURIDAD. En los medios tres y cuatro con combinaciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético se indujo la formación de callos a partir de explantes pero estos no fueron viables en cuanto a la regeneración de brotes para ninguno de los dos genotipos evaluados, a su vez, el ácido naftalenacético (ANA) en combinaciones con Bencilamino purina (BAP) y Kinetina mostraron mucho más eficiencia en cuanto a la regeneración de brotes a partir de callos preexistentes compactos, de color blanco y a su vez explantes con presencia de raíz, siendo los medios tres y cuatro los más adecuados para la formación de callos para ambos genotipos de pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus* e *Hylocereus undatus*), mientras que para la regeneración de callos viables las mejores combinaciones hormonales fueron de los medios P1M1, P1M2 y P1M1, P2M2 para pitahaya amarilla y roja respectivamente.

Palabras claves: CULTIVO *IN VITRO*, CALLOS, ORGANOGÉNESIS DIRECTA, ÁCIDO 2,4DICLOROFENOXI ACETICO.

SUMMARY

A PROTOCOL FOR OBTAINING EXPLANTS IN VITRO WAS STANDARDIZED FROM PRE-GERMINATED SEEDS IN MS (MURASHIGE AND SKOOG) MEDIUM AND COTYLEDONS WERE OBTAINED FROM COTYLEDONARY LEAVES IN YELLOW PITAHAYA (HYLOCEREUS MEGALANTHUS) AND RED PITAHAYA (HYLOCEREUS UNDATUS). ASSAYING THE FOLLOWING M1 CONCENTRATIONS (ANA1MG.L-1 WITH BAP0.5MG.L-1); M2 (ANA1MG.L-1 AND KIN0.3MG.L-1); M3 (2,4-D1.5MG.L-1 WITH BAP0.5MG.L-1); M4 (2,4- D1.5MG.L-1 WITH KIN0.3MG.L-1), IN ORDER TO OBTAIN A TOTAL OF EIGHT TREATMENTS, THE IN VITRO CONDITIONS WERE CONTROLLED WITH 70% HUMIDITY AND $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ AND WITH PHOTOPERIOD 16 / 8 OF DARKNESS. In media three and four, with combinations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, callus formation was induced from explants but these were not viable for shoot regeneration for either of the two genotypes evaluated; BAP and Kinetin combined with naphthalene acetic acid showed much more efficiency in the regeneration of buds from preexisting compact white calli and also explants with root presence. Media three and four were the most suitable for the formation of calli for both genotypes of yellow pitahaya (*Hylocereus megalanthus* e *Hylocereus undatus*), while for the regeneration of viable calli the best hormonal combinations were media M1 and M2 for red and yellow pitahaya.

Keywords: *in vitro* culture, calli, direct organogenesis, 2,4-dichlorofenoxy acetic acid.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	2
2. PROBLEMÁTICA.....	4
3. ANTECEDENTES.....	6
4. JUSTIFICACIÓN.....	8
5. OBJETIVOS.....	10
6. MARCO REFERENCIAL	11
6.1. GENERALIDADES DEL CULTIVO.....	11
6.1.1. <i>Historia y Distribución</i>	11
6.1.2. <i>Taxonomía y Morfología</i>	12
6.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y NUTRICIONAL	15
6.2.1. <i>Localización geográfica de la producción de pitahaya en Ecuador</i>	16
6.2.2. <i>Destinos de las Exportaciones ecuatorianas del Producto</i>	17
6.3. MÉTODOS DE PROPAGACIÓN TRADICIONAL	17
6.4. IMPORTANCIA DE LA PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> EN CACTÁCEAS	18
6.4.1. <i>Cultivo de Meristemos</i>	19
6.4.2. <i>Organogénesis</i>	20
7. DISEÑO METODOLOGICO	21
7.1. UBICACIÓN DEL ENSAYO	21
7.1.1. <i>Material genético</i>	21
7.2. METODOLOGÍA.....	22
7.2.1. <i>Factores estudiados</i>	22
7.2.2. <i>Tratamientos</i>	22
7.2.3. <i>Delineamiento experimental</i>	¡Error! Marcador no definido.
7.2.4. <i>Diseño experimental</i>	23
7.2.5. <i>Análisis Estadístico</i>	23
7.3. MANEJO DEL ENSAYO	23
7.3.1. <i>Establecimiento in vitro de semillas</i>	23
7.3.2. <i>Inducción a la callogénesis a partir de explantes</i>	26
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES	28
8.1. PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN	28
8.2. NÚMERO DE DÍAS A LA GERMINACIÓN	28
8.3. PRESENCIA Y AUSENCIA DE CALLOS	29
8.4. COLOR Y CONSISTENCIA DEL CALLO (FRIABLE O NO FRIABLE)	30
8.5. PRESENCIA/AUSENCIA DE RAÍCES.....	33
8.6. NÚMERO DE BROTES.....	34
9. CONCLUSIONES	35
10. RECOMENDACIONES	36
11. BIBLIOGRAFÍA.....	37

1. INTRODUCCIÓN

La estratégica posición geográfica en la que se encuentra ubicado Ecuador y la existencia de microclimas, favorece la producción de gran variedad de frutas no tradicionales entre ellas las pitahayas dentro de la oferta exportable, constituyendo para el país, una actividad de gran importancia económica y social en el sector agrícola (PROECUADOR 2012).

Las cactáceas son una familia con aproximadamente 1.600 especies, distribuidas desde Argentina hasta Canadá. (Wallace y Gibson 2002), citados por (Caetano, Escobar, y otros 2014), mencionan que éstas especies se caracterizan por el uso eficiente del agua cinco a diez veces más que otros cultivos convencionales en relación con la ruta fotosintética CAM (Metabolismo Acido de las Crasuláceas). Así mismo, constituyen un producto clave para el sector hortofrutícola, con una demanda importante principalmente por su sabor, apariencia, calidad y propiedades nutraceuticas.

Las especies que en las últimas décadas han tomado gran importancia en el mercado nacional y mundial, son *Hylocereus undatus* e *Hylocereus megalanthus*, esta importancia se debe a que su fruto es apreciado en los países europeos, por ser considerado exótico, lo cual genera expectativas en los países que se siembra, motivando a invertir, por la rentabilidad que genera el cultivo (Mizrahi, Nerd y Sitrit 2002, citados por Pérez 2011).

(Patiño 2002), en su libro “Historia y dispersión de los frutales nativos del neotrópico” recoge relatos en donde se hace referencia a 18 especies de los géneros *Selenicereus* e *Hylocereus*. Las regiones en donde se reportan estas cactáceas son México, Guatemala, Antillas Mayores (distinguiéndose las variedades moradas y amarillas), Panamá, Venezuela, Nuevo Reino de Granada, Ecuador, Perú y Bolivia.

En Latinoamérica, el principal productor de pitahaya es Colombia, en Ecuador según el INEC en el censo agropecuario del año 2000, la superficie sembrada con pitahayas es de 16.515ha, mientras que la superficie cosechada corresponde a un total de 110ha, las cuales

se encuentran distribuidas en las provincias: Bolívar, Guayas, Napo, Pastaza, Pichincha y Morona Santiago, destacando que en esta última provincia en el cantón Palora se cultiva una variedad autóctona de pitahaya amarilla, lo que convierte a esta zona en el ícono de desarrollo de la provincia (MAGAP 2016). Sin embargo, las normas del mercado internacional, son exigentes en estándares de calidad, por lo que se requiere realizar investigaciones que conduzca a elevar la calidad de la fruta y sobre todo, a la oferta de genotipos elites para siembra y manejo en la cadena productiva (Caetano 2010).

2. PROBLEMÁTICA

En la actualidad, la humanidad se enfrenta a importantes desafíos, los cuales se encuentran focalizados en el aumento de la población a nivel mundial, es por ello que, el aprovechamiento de los recursos genéticos que se encuentran disponibles en la naturaleza, debe ser de manera sostenible y eficiente, procurando que las áreas no aprovechadas, por las limitantes de recursos hídricos, puedan incorporarse a la productividad del país.

En consecuencia, los sistemas de cultivos, especialmente en áreas poco fértiles o propensas a la erosión, incluyen asociaciones de varias especies, cultivos intercalados y esquemas complejos de rotación. Muchos de esos sistemas no son lo suficientemente productivos como para satisfacer las necesidades de la población; por ello se hace necesario incorporar tecnologías apropiadas para hacerlos provechosos (Rubiano 2000).

Dentro de este contexto, cabe indicar que cactáceas como la tuna, pitahaya, y sábila, contribuyen a mitigar el efecto gas invernadero, son cultivos perennes, y su interés a nivel de agricultura se centra en los recursos que genera en los sectores que se dedican al manejo de este cultivo, mejorando con ello la calidad de vida de los habitantes de la zona, por el empleo de la mano de obra local.

Los cambios que se desarrollen dentro de la agricultura se orientan, a suplir las necesidades de los sectores agrícolas, como escasez de recursos hídricos y falta de tecnología con precisión en ecosistemas donde se desarrolle esta actividad, debido a que, las necesidades expuestas con anterioridad son las principales limitantes para poder producir alimentos y otras materias primas de interés para la población (Núñez 2007).

Cabe señalar que, además de los factores mencionados anteriormente se debe considerar que la pitahaya en Ecuador ya es un producto de exportación, aumentando con ello la demanda de esta fruta. Sin embargo, se debe tener en cuenta, que el hecho de utilizar parte de la planta como material de propagación, puede conducir a una explotación no sostenible de esta especie. De manera que, el cultivo de tejidos *in vitro* ofrece alternativas para la multiplicación y conservación de especies de cactáceas; debido a que esta técnica tiene el potencial de producir gran cantidad de plantas en un periodo corto de tiempo y espacio reducido (Pérez, Ramírez, y otros 2002, citados por Ávalos 2010).

3. ANTECEDENTES

El cultivo *in vitro*, es considerado de gran importancia en la propagación de especies, el cual comprende en su acepción amplia un heterogéneo grupo de técnicas, mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplastos, célula, tejido, órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Roca y Mroginski 1991).

(Pérez, Dávila, y otros 2008) indican que el cultivo *in vitro* es de gran interés por su aplicación en la obtención rápida de especies en peligro de extinción, así como en la conservación de germoplasma valioso. De la misma manera mencionan que mediante la propagación *in vitro* se pueden obtener plantas genética y fisiológicamente similares a la planta madre, las cuales fueron seleccionadas por sus características superiores o de interés.

Cabe señalar que los objetivos que se persiguen con la utilización del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son numerosos y diferentes. En este campo, la micropropagación es una técnica desarrollada principalmente para la producción en masa de plantas (Margará 1988; Roca y Mroginski 1993; Kite y Klein 1999 citados por Suárez 2011). Su principal ventaja es la multiplicación rápida de material clonal libre de enfermedades. Esta característica ha servido para introducir rápidamente en el mercado nuevas variedades de plantas obtenidas mediante la selección, mutación, programas de mejora o manipulación genética.

En las pitahayas, la principal forma de propagación es vegetativa, se realiza de manera tradicional, a partir de tallos y esquejes (cladodios), a través de la separación de los tallos de las plantas madres, con la finalidad de obtener una nueva planta, lo cual consiste en un trasplante directo al terreno definitivo o el establecimiento de viveros colocando el material vegetal en bolsas con sustrato hasta la formación de nuevos tallos. Otra técnica empleada en la multiplicación de esta especie, aunque no es muy común ni tan fácil, es la técnica del injerto a partir de vástagos y patrones seleccionados (Alka 2003; Cáliz de Dios y Castillo, 2004; Bastos, Pio, y otros 2006; Gunasena, Pushpakumara y Kariyagusam 2007; Estrada, Martínez, y otros 2008).

Los estudios sobre el cultivo *in vitro* de cactus se iniciaron en los años 50 y han estado enfocados a la formación de callos, a la proliferación de brotes, y a la evaluación de los efectos de auxinas, citocininas y giberelinas a partir de yemas axilares (Ordoñez 2003; Villalobos y Thorpe 1993; Estrada, Martínez, y otros 2008). En consecuencia, se han desarrollado sistemas de micropropagación para diferentes especies de cactus con una eficiencia en el establecimiento y en el enraizamiento de 80 a 100% (Ordoñez 2003).

En el cultivo *in vitro*, uno de los métodos más eficientes para producir masivamente material vegetal es a través de la inducción callogénesis, a partir de la cual se puede obtener una organogénesis indirecta o una embriogénesis somática indirecta. Mediante callogénesis se genera tejido de callo a partir de un explante, de preferencia juvenil, debido a que éste es morfo genéticamente más viable (Acuña 2004; citado por Jácome, Páez, y otros 2012) y eventualmente como lo cita (Freire 2003), con la ayuda de reguladores de crecimiento se estimula la formación de órganos (organogénesis indirecta) o de embriones somáticos (embriogénesis somática indirecta).

4. JUSTIFICACIÓN

En Ecuador no existen programas de investigación para el cultivo *in vitro* de pitahaya, a pesar de que esta especie se encuentra limitada por una serie de problemas, entre los que sobresalen los aspectos fitosanitarios asociados con el establecimiento comercial del cultivo a partir de métodos de propagación asexual, tales como estacas, que aunque son fáciles de realizar y eficientes, presentan bajas tasas de propagación, requieren grandes espacios (Estrada, Martínez, y otros 2008), y conllevan a la contaminación con esporas, principalmente, de hongos y bacterias de los géneros *Fusarium* spp., *Erwinia* spp y *Pseudomonas* spp (Araujo y Medina 2008).

Otro aspecto limitante está asociado a factores reproductivos como baja proporción de frutos desarrollados respecto al total de flores producidas por algunos genotipos y presencia de enfermedades, los cuales condujeron a la disminución de la productividad y de la calidad de la fruta y, por tanto, a la pérdida de rentabilidad del negocio. Sin embargo, la propagación en cactáceas es realizada de manera tradicional, utilizando gran cantidad de tallo para la multiplicación, lo que ocasiona daños severos en las plantas en estado de producción.

De manera que con esta investigación se espera aportar información sobre métodos de propagación *in vitro* a partir de hojas cotiledonares, con lo cual se pretende mejorar la eficiencia de procesos de propagación y a la obtención masiva y homogénea de material elite con características deseables para su multiplicación en campo.

Cabe mencionar que, la Universidad Técnica de Manabí de acuerdo a su artículo 5 del Reglamento de Becas¹ para los y las Estudiantes, establece que “las becas de graduación,

¹ Reglamento de Becas para los y las Estudiantes de la Universidad Técnica de Manabí, mismo que fue discutido y aprobado por el H. Consejo Universitario en sesiones del 23 de octubre y 8 de noviembre de 2012.

consisten en la entrega por una sola ocasión de un bono de graduación que le permita al estudiante la adquisición de materiales o insumos de hasta USD\$ 4,000.00 (cuatro mil 00/100 dólares americanos) para estudiantes que están por realizar su trabajo de graduación en la modalidad que se establece en este reglamento”, es por ello que, para el desarrollo de esta investigación se otorgó USD\$ 4000, los mismos que sirvieron para la adecuación del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad contribuyendo en el desarrollo de esta investigación, y a su vez adquirir conocimiento técnico-científico-universitario con la finalidad de elevar el nivel académico de los estudiantes que se forman como Ingenieros Agrónomos.

5. OBJETIVOS

General

Evaluar el comportamiento *in vitro* de pitahayas *Hylocereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) y *Hylocereus undatus* (Haw.) Britt & Rose., en las etapas de establecimiento y callogénesis.

Específicos

1. Desarrollar un protocolo para el establecimiento *in vitro* de dos clones de pitahaya: amarilla y roja.
2. Evaluar la respuesta de la pitahaya amarilla y roja a la inducción de callos.
3. Determinar la mejor concentración de auxinas y citoquininas para la inducción a la callogénesis.

6. MARCO REFERENCIAL

6.1. Generalidades del cultivo

6.1.1. Historia y Distribución

La pitahaya es una cactácea nativa de América, su explotación comercial se inició en Centroamérica y se ha extendido a Israel, Vietnam y Australia (Merten 2003; citado por Montesinos; Rodríguez, y otros 2015 71). Sus nombres comunes provienen de las Antillas, y estas se encuentran agrupadas dentro del orden de las Cactales, familia *Cactaceae*, subfamilia *cereoidae*, tribu *Hylocereae*, subtribu *Hylocereinae* y los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus* (Rodríguez 2000; citado por Suárez 2011 37).

La amplia distribución de esta especie ha permitido que a nivel mundial sea conocida por diversos nombres, entre ellos se pueden citar: “belle de nuit”, “poiredechardon” (Francia); “distelbirn” (Alemania); “Cinderellaplant”, “nightbloomingcereus”, “conderellaplant”, “queen of thenigth”, “crawlingcacti” y “strawberrypear” (países de habla inglesa); “thangloy” o fruta dragón (Japón Vietnam y Taiwán), “Zunlongguo” (China), “pitaya”, “frutaroja del Edén” (Israel); “cardo ananas”, “cato barse” (Portugal); “cardeirotrepador” o “cardo ananas” (Brasil); “junco”, “flor de caliz”, “pitajava”, “tasajo”, “reina de lanoche”, “Orijona” (Centro américa); “pitahaya roja/blanca/amarilla” (Colombia) (Esquivel 2004; citado por Suárez 2011 38).

Barthlott y Hunt (1993); citados por Pérez (2011 4), clasificaron 16 especies dentro del género *Hylocereus*, mientras que en el género *Selenicereus* ubicaron 20. De acuerdo a la nueva clasificación de Hunt 2006, el número de especies se redujo a 14 en el caso de *Hylocereus* y a 12 para *Selenicereus*. Las pitahayas que se cultivan de manera comercial son *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton & Rose en Colombia, Nicaragua, Vietnam y México. La pitahaya amarilla que se produce en Colombia, Ecuador e Israel pertenecía al género *Selenicereus*, actualmente corresponde al género *Hylocereus* y a la especie *megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer (Hunt 2006; citado por Pérez 2011 4).

Existen alrededor de 1500 a 2000 especies que se distribuyen desde Canadá hasta la Patagonia, de las cuales 35 tienen potencial como cultivo para la obtención de frutos, hortaliza fresca o forraje, pertenecientes principalmente a los géneros *Hylocereus*, *Selenicereus*, *Cereus*, *Leptocereus*, *Escontria*, *Myrtilloactos*, *Stenocereus* y *Opuntia*. El género *Hylocereus*, es el cactus trepador de mayor distribución a nivel mundial, presentando gran polimorfismo en el ADN, lo que implica encontrar una gran variación de tipos que probablemente corresponden a una misma especie. Se distribuye geográficamente en forma amplia en sitios donde las condiciones ecológicas son limitantes, lo cual representa un serio peligro para su sobrevivencia por diversas causas de origen natural y antropológico. El origen de este género se atribuye a las regiones boscosas del trópico y subtrópico de México, centro y Sur América. (Montesinos, Rodríguez, y otros 2015) En Ecuador el cultivo se introdujo desde hace 16 años, encontrándose distribuido en las provincias de Pichincha, Santo Domingo de los Tsáchilas y Imbabura (Molina, Váscomez y Gonzales 2009 2).

6.1.2. Taxonomía y Morfología

Según (Gunasena, Pushpakumara y Kariyagusam 2007; citados por Suarez 2011 33), ubican estas especies en las siguientes categorías:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Super división: Spermatophyta

División: Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales

Familia: Cactaceae

Subfamilia: Cactoideae

Tribu: Hylocereae

Género: *Selenicereus* y *Hylocereus*

Especie: *megalanthus* (Haw.) y *undatus* Britt & Rose

Nombre común: Pitahaya Amarilla y Roja

La taxonomía botánica de las pitahayas fue revisada por (Bauer 2003; citado por Pérez 2011 1) cambiando la nomenclatura para algunos géneros y especies, es por ello que el nombre actual para la pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* fue cambiado por *Hylocereus megalanthus*, esta especie, tiene características morfológicas tanto del género *Selenicereus* como *Hylocereus* (Britton y Rose 1963; citados por Pérez 2011 1), además de presentar compatibilidad entre cruces con ciertas especies de *Hylocereus spp*, por esta razón se cree que *Hylocereus megalanthus*, es producto de una hibridación intergenerica entre los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus* (Lichtenzveig, Abbo, y otros 2000; citados por Pérez 2011 1).

En el trabajo de (Tele-Zur, Abbo, y otros 2004; citados por Pérez 2011 58), los RAPDs analizados con dendrograma ubicaron a las clonas de Ecuador y Colombia en una posición intermedia entre el género *Hylocereus* y *Selenicereus* y en particular entre *S. grandiflorus* y *H. ocamponis*. Con la técnica de hibridación genómica *in situ* (GISH) ellos analizaron la homología de varias especies de *Hylocereus* y *Selenicereus* encontrándose que la composición genómica de *H. megalanthus* es similar a la de *S. grandiflorus* y *H. ocamponis*, y las diferencias morfológicas entre estas tres especies son debidas a diferencias en un pequeño número de genes lo que no representa una gran distancia genetica entre ellas, siendo probable que el origen de *H. megalanthus* sea por aloploidia resultante de la hibridación natural entre los diploides *S. grandiflorus* y *H. ocamponis*.

De acuerdo, a los resultados mostrados en el párrafo anterior se logró clasificar a las pitahayas (amarilla y roja) de la siguiente manera:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Super división: Spermatophyta

División: Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales

Familia: Cactaceae

Subfamilia: Cactoideae

Tribu: Hylocereae

Género: *Hylocereus*

Especie: *megalanthus* (Haw.) y *undatus* Britton & Rose

Nombre común: Pitahaya Amarilla y Roja

Pitahaya amarilla: *Hylocereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer

Pitahaya roja: *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose

- **Morfología**

De los estudios realizados para la caracterización botánica de las especies de los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus*, se han descrito límites morfológicos, los cuales definen la relación existente entre ellas, delimitados por el tamaño de las estructuras florales, por la ausencia o presencia de espinas y por la formas de los frutos. Sin embargo, las relaciones entre especies del género *Hylocereus* son más difusas por las similitudes en sus características morfológicas en tallos y flores pero no en los frutos (Cáliz de Dios y Castillo 2008; citados por Pérez 2011 5). La condición diploide constante permite señalar que las diferencias morfológicas en los frutos no están relacionadas con cambios en el nivel de ploidía.

La amplia distribución geográfica que tienen las especies de pitahaya indica su gran capacidad de adaptación a las diferentes condiciones ambientales. No obstante, entre las pitahayas hay varias características en común que permite generalizarlas para describirlas botánicamente: Son plantas perennes y requieren soporte porque su morfología les impide sostenerse, son resistentes a la sequía y prosperan desde el nivel del mar hasta 1850msn, requieren temperaturas de 18 a 24 °C, con precipitaciones de 650 a 1500 mm anuales, y su desarrollo mejor se logra en climas cálidos subhúmedos (Caetano 2010; citado por Suárez 2011 36).

Los tallos o cladodios, son suculentos, verdes y fotosintéticos, de epidermis o superficie exterior gruesa, característica que permite que se desarrollen bien en zonas de baja

precipitación, tienen hábitos trepadores y se ramifican en varios segmentos que pueden llegar a crecer hasta dos metros de largo en algunos clones. Se caracterizan por presentar costillas o aristas gruesas que los recorren longitudinalmente. Las hojas típicas se transforman en acúleos (de 2 a 4 mm) dispuestos en los bordes, formando fascículos en las denominadas aréolas (pequeñas almohadillas homólogas de las yemas que originan brotes e inflorescencias). El cierre de estomas, la presencia de mucílago y otras sustancias en los tallos regulan la pérdida excesiva de agua en la época seca, así como en las horas más calientes del día (Suárez 2011 34).

Las flores son hermafroditas y actinomorfas, se insertan directamente sobre los tallos, tienen forma tubular, son grandes (de 20 a 40 cm de longitud y hasta 25 cm en su diámetro mayor), muy vistosas, resultando atractivas para los polinizadores, fundamentalmente murciélagos en el caso de las pitahayas rojas; abren solamente en una ocasión en la noche, aparecen en general solitarias y presentan un periantio heteroclamídeo. El verticilo sexual masculino lo integran numerosos estambres dispuestos en espiral que producen granos de polen tricolpados. La flor presenta una cámara nectarial. El fruto es una baya globosa o subglobosa (dehiscente en *Hylocereus* e indehiscente en *Selenicereus*), mide en promedio de 8 a 15 cm de largo y de 6 a 10 cm de diámetro, su pericarpelo es de color rojo o amarillo. (Montesinos, Rodríguez, y otros 2015 69).

6.2.Importancia económica y nutricional

La importancia del cultivo de pitahaya se evidencia por, la gran variabilidad genética, adaptabilidad a diversas condiciones ambientales, productividad y rentabilidad. Es por ello que la demanda en el mercado internacional de pitahaya, ha permitido que esta especie gane un espacio dentro de los cultivos no tradicionales, y por ser considerada como una fruta exótica, tenga un elevado valor económico (Mizrahi, Nerd y Sitrit 2002; citados por Pérez 2011 1).

Por las características y bondades que presenta esta fruta puede ser consumida como producto fresco o procesado de diferentes maneras, sean estas en jugos, helados, yogurt, mermeladas etc. generalmente a nivel mundial se consume como fruta fresca, combinada con otras frutas exóticas (Ortiz, Acevedo y Martínez 2002; Gunasena, Pushpakumara y Kariyagusam 2007; citados por Suarez 2011 38).

Las pitahayas más estudiadas por su valor comercial son las *Hylocereus undatus* y *Hylocereus megalanthus* tanto por el color de la cáscara, como por el olor y sabor de su pulpa, estas y otras cualidades han conllevado a que esta cactácea se convierta en nuestro país en un cultivo de interés en la investigación y en la medicina.

6.2.1. Localización geográfica de la producción de pitahaya en Ecuador

En el país se identifican dos tipos de Pitahaya: roja (*Hylocereus undatus*) y amarilla (*Hylocereus megalanthus*), sin embargo es la pitahaya amarilla la que se cultiva en el callejón interandino, pudiendo llegar a pesar hasta 160gramos, mientras que la misma variedad proveniente de la Amazonia puede alcanzar un peso de 380 gramos tanto por el clima como por el proceso del cultivo.

En ASOPITAHAYA (2016) figuran las principales zonas de producción de pitahaya en el país detalladas a continuación:

Sierra: En Imbabura (García Moreno), Pichincha (Nanegalito, Nanegal, Nono, Los Bancos, Pedro Vicente Maldonado, Puerto Quito), Bolívar: (Echandia); Loja (Vilcabamba).

Amazonia: Santo Domingo de los Tsáchilas,(La Concordia, Julio Moreno).

Manabí: San Isidro, San Clemente.

Los Ríos: Quinsaloma, La Mana Ventanas.

Santa Elena: Santa Elena.

Guayas: Cerecita

El cultivo de pitahaya, en Ecuador ha sido visto como nueva alternativa de producción agrícola, que a más de elevar el nivel de vida de los productores, ha reducido la tasa de desempleo, generando un mayor peso a los rubros de la balanza de pagos, razón por la cual, el gobierno a través del Ministerio de Agricultura Ganadería Acuacultura y Pesca (MAGAP), ha impulsado la producción de este cultivo no tradicional, mediante el asesoramiento técnico y la concesión de préstamos (Erazo y Parra 2012; citado por Aguilar 2015 4). Actualmente son dos variedades comerciales conocidas y apetecidas por su contenido nutricional, sabor y aroma, así como por sus propiedades biofuncionales y medicinales, la variedad roja, de pulpa rosada o roja y sabor insípido; y la amarilla, de pulpa blanca y mejor producción, siendo más comercial debido a su sabor y mayor resistencia al transporte y almacenamiento (Orrico 2013; citado por Aguilar 2015 3).

6.2.2. Destinos de las Exportaciones ecuatorianas del Producto

Las exportaciones de pitahaya en el 2015 tuvieron mayor participación de los países asiáticos: Hong Kong presentó una participación de 53% con USD 1.7 millones, Singapur 20% con USD 639mil, Indonesia 7% con USD 229miles. Otros mercados importadores de la fruta desde Europa son países Bajos y Francia, con una participación del 5% y 3% respectivamente (BCE 2015).

6.3. Métodos de propagación tradicional

La pitahaya se puede propagar de forma sexual (semillas), asexual (estacas) y mediante micropropagación, siendo la propagación por estacas la más recomendada por presentar un mejor enraizamiento (Corres 2009; citado por Aguilar 2015 4). (Perea, Tirado, y otros 2010 120), mencionan también la propagación *in vitro* como otra técnica para la obtención de plantas de pitahaya. Los métodos de propagación de pitahaya se detallan a continuación:

Propagación Sexual. En este método de propagación, las semillas de pitahaya se obtienen directamente del fruto, se lavan y se tamizan varias veces hasta eliminar los residuos del mesocarpio, posteriormente son colocadas en almácigos para lograr su germinación. Sin

embargo, (Corres 2009; citado por Aguilar 2015 4) no recomienda este procedimiento para fines de explotaciones comerciales, debido a que la planta tarda de cuatro a seis años en llegar a su etapa productiva y requiere demasiados cuidados en la fase de semillero y vivero.

Propagación Asexual. Es el más empleado para la multiplicación comercial de cultivos de pitahayas, el mismo que consiste en cortar brotes, de una rama o el extremo del tallo en segmentos de 25 a 30 cm de largo provenientes de tallos con una edad de dos años los cuales deben cumplir condiciones óptimas de adaptación, sanidad, vigor y producción, y de frutas grandes bien formadas y dulces (Becerra 1987; citado por Perea, Tirado, y otros 2010 107).

6.4. Importancia de la propagación *in vitro* en cactáceas

Las técnicas que se utilizan en la propagación *in vitro*, ofrecen alternativas satisfactorias para la multiplicación de cactáceas, con esos métodos se logra reproducir gran número de plantas, tanto en tiempo como en espacio en relación a los sistemas convencionales, sin embargo, no todas las especies responden igual a las diferentes técnicas y concentraciones hormonales (Pérez, Pérez, y otros 2002 694). En estas condiciones, es factible diferenciar embriones a partir de células, tanto del esporofito como del gametofito. Este proceso de diferenciación se observó por vez primera en células suspendidas de *Daucus carota* (Reinert 1959 citado por Roca y Mroginski 1991 128), a partir de ese descubrimiento el número de especies que han mostrado esta capacidad regenerativa, ha incrementado notablemente (Evans, Sharp y Flick 1981; Dodds y Roberts 1982; citados por Roca y Mroginski 1991 133).

Cabe indicar, que los cactus han despertado curiosidad académica para realizar estudios *in vitro*, sin embargo, no se ha generado en gran número de especies la suficiente información científica que respalde esos resultados prácticos (Hubstenberger, Clayton y Phillips 1992; citados por Celi 2011 9). Los primeros estudios del cultivo *in vitro* en cactáceas

Mammillaria woodsi realizados por (Kolar, Bartek y Vyskot 1976; citados por Celi 2011 9). Además en la formación de callo y su proliferación (Nitsch 1951; Colomas 1971; Minocha y Mehra 1974; Hubstenberger, Clayton y Phillips 1992 citados por Celi 2011 9).

De la misma manera, más de 80 especies de esta familia han sido micropropagadas con diversos grados de éxito. Un ejemplo en la micropropagación de cactáceas es el de Rubluo, Chávez, y otros 1993; citados por Celi 2011 9), que evitaron la extinción de *Mammillaria san-angelensis*, especie de la cual existían solo cinco individuos en las poblaciones naturales. Las investigaciones efectuadas por estos autores permitieron no solo la propagación masiva de esta especie, sino su restablecimiento al sitio de origen (Rubluo, Reyes, y otros 1996 citados por Celi 2011 9).

Uno de los métodos más eficientes para poder reproducir masivamente material vegetal *in vitro* es a través de la inducción a callogénesis, a partir de la cual se puede obtener una organogénesis indirecta o una embriogénesis somática indirecta, mediante callogénesis se genera tejido de callo a partir de un explante, de preferencia juvenil debido a que este es morfo genéticamente más viable (Acuña, 2004 citado por Jácome, Páez, y otros 2012 2) y eventualmente como lo cita (Freire 2003; citado por Jácome, Páez, y otros 2012 2), con la ayuda de reguladores de crecimiento se estimula la formación de órganos (organogénesis indirecta) o de embriones somáticos(embriogénesis somática indirecta). Es por ello que, empleando este sistema se puede obtener cantidades virtualmente ilimitadas de plantas, ya que todo hace suponer que con cada célula suspendida en el medio de cultivo se está diferenciando una planta.

6.4.1. Cultivo de Meristemos

(Infante 1992; citado por Perea 2010 125), trabajó en la micropropagación de la especie *M. coccineus*, clasificada por (Briton y Rose 1963), dentro del grupo de las especies *selenicereus megalanthus* (actualmente *H. megalanthus*). Utilizando como explante inicial semillas germinadas en medio MS, para posteriormente utilizar el epicotilo o tallo fue sembrado en MS enriquecido con ácido naftalenacético en concentraciones de 0,05, 0,27 y 0,54_uM y benciladenina (BA) en concentraciones de 2.2 y 4.4_uM, observando después de

seis semana que la mayor proliferación de brotes se obtuvo en los tratamientos suplementados con 4.4_uM de BA y 0.27_uM de ANA logrando 7.8 brotes.

6.4.2. Organogénesis

Payro de la Cruz, Ruiz y Sánchez (1998); Pelah, Kaushik, y otros (2002); citados por Perea (2010 123), reportan el empleo de segmentos de partes proximales de los cotiledones de pitahaya amarilla *Hylocereus megalanthus*. Las mismas que fueron cultivados en medio básico Murashige y Skoog (M&S) (1962) suplementado con 200 uM de Thiadiazuron (TDZ) para promover la regeneración de yemas. El mejor medio para el alargamiento fue el MS libre de reguladores de crecimiento. El enraizamiento fue inducido en medio MS complementado con 5,3 uM de ANA. Igualmente se evaluó el efecto del thiadiazuron de morfogénesis de yemas axilares de *Hylocereus undatus*.

Morales, Treviño, y otros (2005); citados por Perea (2010 124), utilizando segmentos de los brotes transferidos al medio basal M&S suplementado con 8.88uM de bencilaminopurina (BAP), logró inducir la formación de numerosas yemas. Concluyendo que la capacidad de proliferación de estas especies genera un excelente sistema de propagación para el establecimiento de los cultivos comerciales.

7. DISEÑO METODOLOGICO

7.1.Ubicación del ensayo

La investigación se realizó durante los meses de julio/2016 a enero del /2017, en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí, ubicada en la parroquia Lodana del cantón santa Ana, provincia de Manabí; localizada geográficamente a 01° 09' de latitud sur y 80° 21' de longitud Oeste con una altitud de 47msnm.

7.1.1. Material genético

Se utilizaron semillas de dos genotipos de pitahaya (figura 1) amarilla y roja (*Hylocereus megalanthus*, e *Hylocereus undatus*) provenientes de dos lotes de multiplicación ubicados en las parroquias Lodana y Ayacucho pertenecientes al cantón Santa Ana.



Figura 1. Genotipos utilizados: A) *Hylocereus megalanthus* B) *Hylocereus undatus*

7.2. Metodología

Para el establecimiento *in vitro* de los materiales de pitahaya, amarilla y roja, se utilizó la metodología descrita por (Pelah, Kaushik, y otros 2002; citados por Perea 2010 123) con ciertas modificaciones (Anexo 1).

7.2.1. Factores estudiados

Factor A:

Materiales utilizados

P1. Pitahaya amarilla

P2. Pitahaya roja

Factor B:

Dosis de hormonas

M1 = ANA 1mg.L⁻¹ + BAP 0.5mg.L⁻¹

M2 = ANA 1mg.L⁻¹ + KIN 0.3mg.L⁻¹

M3 = 2.4-D1.5mg.L⁻¹ + BAP 0.5mg.L⁻¹

M4 = 2.4-D1.5mg.L⁻¹ + KIN 0.3mg.L⁻¹

7.2.2. Tratamientos

P1M1 (*H. megalanthus*: ANA 1mg / BAP 0.5mg)

P1M2 (*H. megalanthus*: ANA 1mg / KINETINA 0.3mg)

P1M3 (*H. megalanthus*: 2, 4-D 1.5mg / BAP 0.5mg)

P1M4 (*H. megalanthus*: 2, 4-D 1.5mg / KINETINA 0.3mg)

P2M1 (*H. undatus*: ANA 1mg / BAP 0.5mg)

P2M2 (*H. undatus*: ANA 1mg / KINETINA 0.3mg)

P2M3 (*H. undatus*: 2, 4-D 1.5mg / BAP 0.5mg)

P2M4 (*H. undatus*: 2, 4-D 1.5mg / KINETINA 0.3mg)

7.2.3. Diseño experimental

Los datos obtenidos en la fase de establecimiento de esta investigación y para la variable color y consistencia, fueron analizados mediante estadística descriptiva. Mientras que en las demás variables de la fase de inducción a callogénesis se utilizó un Diseño Experimental Completamente al Azar en Arreglo Factorial (2x4). El mismo que incluyó 8 tratamientos (combinaciones de especies por dosis de hormonas) y 3 repeticiones.

Fuente de variación	gl
Repeticiones	2
Tratamientos	7
A	1
B	3
A*B	3
Error	14
Total	23

7.2.4. Análisis Estadístico

Con los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza usando el procedimiento ANOVA de IMB SPSS Statistics 21. Y la comparación de medias se efectuó a través de la prueba Tukey, utilizando un nivel de significancia al 1 %.

7.3. Manejo del ensayo

7.3.1. Establecimiento *in vitro* de semillas

Las semillas se extrajeron de la pulpa de los frutos y se enjuagaron con abundante agua en un cedazo hasta eliminar el mucilago que las recubría (figura 2A), luego se lavaron con jabón líquido en un vaso de precipitación de 500ml por 5 minutos y se enjuagaron con agua corriente, seguidamente las semillas se colocaron en vasos de precipitación de 100ml para ambos materiales (figura 2 B y C), se taparon con papel aluminio y se llevaron a condiciones de asepsia (cámara de flujo laminar) para continuar con el proceso de desinfección (figura 2 D y E) se utilizó una solución al 1.1ppm de NaOCl (hipoclorito de

sodio con una concentración 5.25%) y gotas de Tween-20 durante 20 minutos, para finalmente enjuagar con agua esterilizada durante 5 ocasiones (figura 2 F).

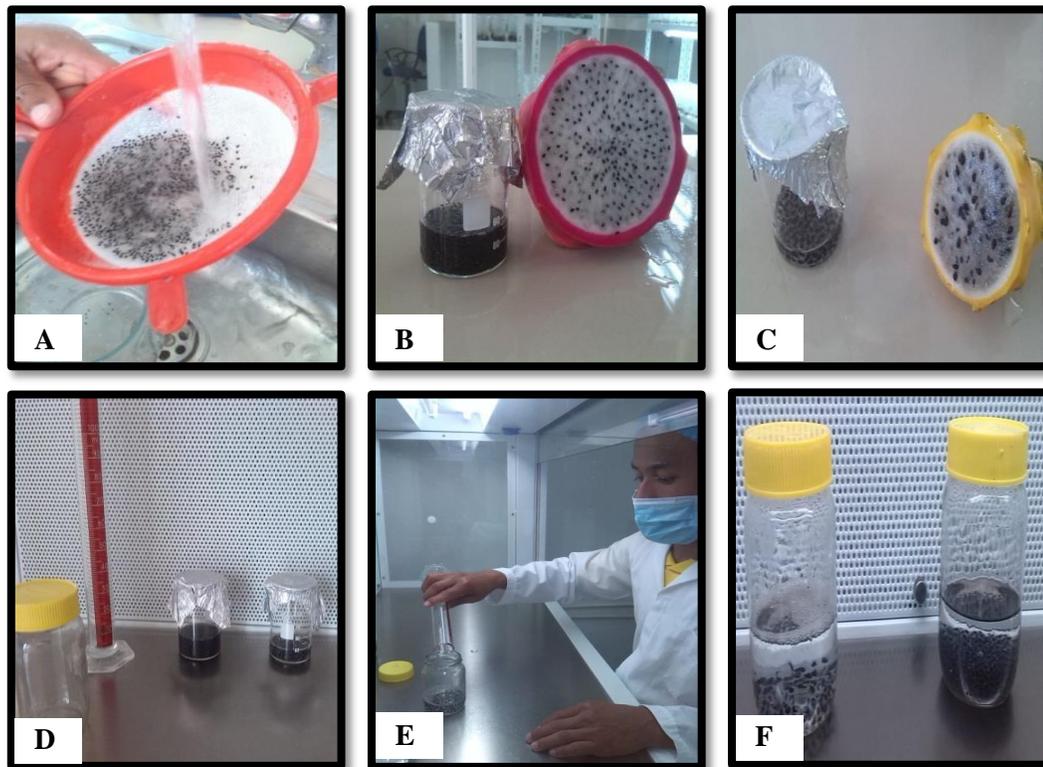


Figura 2. Desinfección de semillas de pitahaya: A) eliminación de mucilago. B) colocación de semilla de *H. Undatus* en vasos de precipitación. C) colocación de semilla de *H. megalanthus* en vasos de precipitación. D y E) semilla en cámara de flujo laminar. F) solución de hipoclorito de sodio para desinfectar semillas.

Una vez terminado el proceso de desinfección se procedió a la siembra de las semillas, las mismas fueron colocadas en tubos de ensayos de vidrios tipo gerber conteniendo medio de cultivo Murashige y Skoog (MS), así como 30gr/L de sacarosa, 0.10gr/L de Meso-inositol, 5ml/L de vitaminas, y 3gr/L de Gellan Gum, este medio fue elaborado previamente con pH ajustado a 5.7 y esterilizado en autoclave a 121°C por 20 minutos.

Para la siembra de las semillas en la cámara de flujo laminar se utilizó papel Kraft estéril con la finalidad de disminuir la contaminación y a su vez eliminar el agua sobrante en las semillas durante el proceso de desinfección, para esto, se utilizaron pinzas estériles y alcohol al 95% y un mechero para flamear las pinzas durante todo el proceso de siembra, se

procedió a colocar 5 semillas por cada tubo (figura 3 A), sembrándose un total de 200 semillas por cada material (figura 3 B), una vez realizada la siembra se procedió a sellar los tubos con cinta parafilm, así mismo se etiquetaron los tubos con fecha de siembra y tipo de material. El material se colocó en el cuarto de cultivo del laboratorio a 25 ± 2 °C y un fotoperiodo de 16/8, controladas.

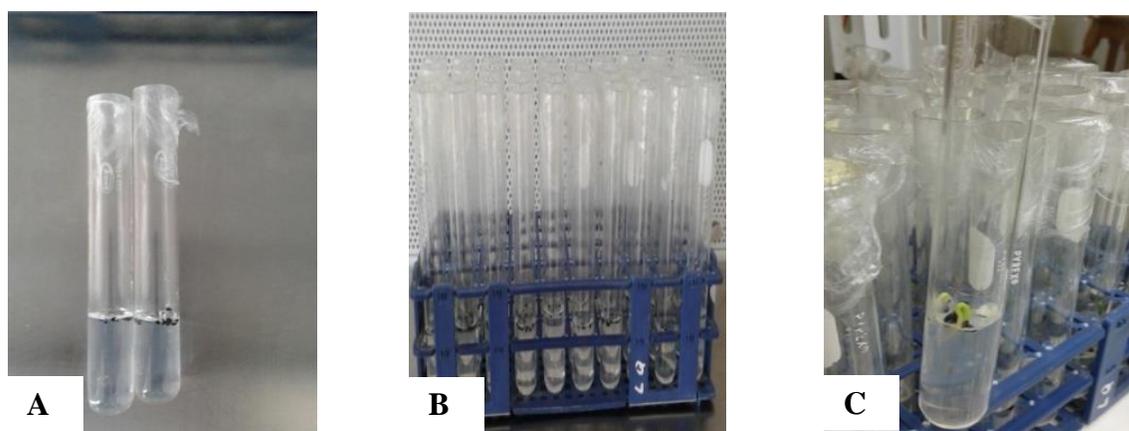


Figura 3. Siembra de semillas en tubos: A) siembra de 5 semillas por tubo. B) total de 200 semillas sembradas. C) germinación de semillas

Variables analizadas estadísticamente

- **Porcentaje de contaminación**

Se evaluó el porcentaje de semillas contaminadas por bacterias y hongos, las evaluaciones se realizaron diariamente durante 15 días después de la siembra de los dos genotipos de pitahaya.

- **Número de días a la germinación**

Para registrar el porcentaje de semillas germinadas, estas se colocaron a temperatura de 25 ± 2 °C, con la presencia de luz 16/8 de oscuridad, por un periodo de 15 días, el cálculo se realizó basado en la siguiente ecuación:

$$\%G = \frac{N^{\circ} \text{ Semillas germinadas}}{N^{\circ} \text{ Semillas sembradas}} \times 100$$

Como criterio de germinación fisiológica se consideró la emisión de la radícula (Manzano, 2008), y además se evaluó plantas con características morfológicas normales, entre ellas hojas cotiledonares normales consideradas dentro de ambos genotipos.

7.3.2. Inducción a la callogénesis a partir de explantes

Luego de 25 días de germinadas las semillas de ambos materiales (figura 3 C) se procedió a retirar las plántulas de los tubos con pinzas estéril en la cámara de flujo laminar para colocarlas sobre el papel kraft estéril (figura 4 A y B), de cada plántula emergida se procedió a separar y cortar las hojas cotiledonares del talluelo (figura 4 C), para este procedimiento se utilizaron 150 plantas por cada especie en estudio, logrando obtener un total de 300 explantes por material, luego se procedió a colocar por caja petri 5 explantes en medio Murashige y Skoog (MS) el cual contenía las diferentes combinaciones hormonales (figura 4 D), una vez realizada la siembra se procedió a sellar las cajas con cinta parafilm antes de sacar de la cámara de flujo laminar y a etiquetar cada material, con el genotipo de pitahaya, tratamiento y fecha de siembra.

Luego se colocaron en el cuarto de medio de cultivo, sobre las estanterías con una temperatura 24 ± 2 y 70% de humedad relativa, en condiciones de oscuridad por el lapso de tiempo de 20 días.

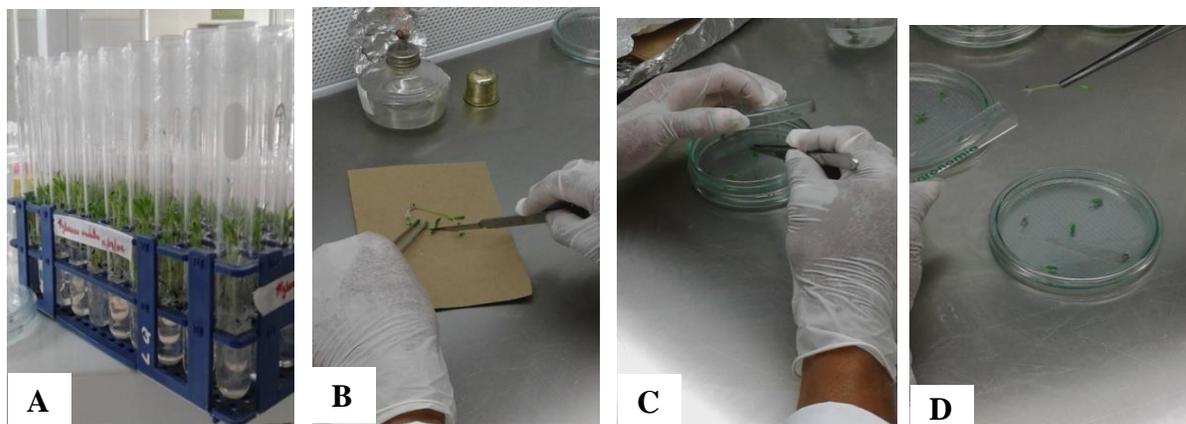


Figura 4. Inducción a la callogénesis a partir de explantes: A) plántulas con 25 días de germinación. B) separación de las hojas cotiledonares del talluelo. C) siembra de explantes en combinaciones hormonales. D) explantes sembrados en caja de petri.

Variables analizadas estadísticamente

- Numero de explantes con callos

Se evaluó la presencia/ausencia de callos a los diez, veinte, treinta, cuarenta, cincuenta, sesenta y 70 días después de la siembra de los tratamientos, en cada una de las evaluaciones realizadas, se contabilizó el número de explantes con presencia de callos y en donde se originaron estos.

- Color y consistencia de callo (friable o no friable)

En esta variable se registraron datos cuando empezó a observarse la formación de los callos es decir desde los 20 días hasta los cuarenta días, procediéndose a registrar el color y la consistencia del mismo por explante, como referencia de estos se tomaron los principios de las investigaciones de, (Pelah, Kaushik, y otros 2002; citados por Perea 2010 123) al trabajar con hojas cotiledones e hipocotilo de pitahaya amarilla, con concentraciones de TDZ de 100, 200, 440mM, observaron formación de callos color verdes amarillentos organogénicos en la base proximal de los cotiledones.

- Numero de explantes con raíces.

La presencia de raíz se empezó a evaluar desde los 10días hasta los treintaicinco días en cada material, procediéndose a contar por explantes la presencia o ausencia de raíces.

- Numero de brotes.

El número de brotes se evaluó desde los 20hasta los 60 días de establecido el en sayo *in vitro*, contándose el número de explantes con presencia de los mismos.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Porcentaje de contaminación

En el establecimiento *in vitro* de los genotipos *Hylocereus megalanthus* e *Hylocereus undatus*, no se presentaron problemas de contaminación, con la metodología utilizada para el proceso de desinfección ni por hongos ni bacterias en el medio utilizado (Murashige & Skoog, 1962), esta respuesta favorable de cero porcentaje de contaminación la podemos corroborar con lo mencionado por (Dodds y Lorin 1986; citados por Pérez 2011 35), quienes reportan que una de las etapas esenciales para la micropropagación de cualquier especie es la obtención del cultivo aséptico, lo cual se logra implementando diferentes métodos y técnicas para eliminar todo patógeno del explante. Aunque existe gran cantidad de protocolos establecidos por diversos investigadores para la desinfección de semillas y explantes en cactáceas, estos varían de acuerdo a la especie y al tipo de explante, sin embargo han resultado eficientes en el control de hongos y bacterias (Gómez 2004; citado por Pérez 2011 35).

8.2. Número de días a la germinación

El porcentaje de germinación de semillas frescas para *Hylocereus megalanthus*, fue de 95% a los 9 días de sembradas las semillas, mientras que *H. undatus* exhibió un 98% luego de 7 días de la siembra, (figura 6.), resultados que reflejan, que las semillas de cactáceas tienen buena viabilidad por los altos porcentajes de germinación mostrados en esta investigación, más aún cuando la siembra se la realiza en el mismo día de extraerlas de la pulpa que las recubre. Los altos porcentajes mostrados anteriormente podrían estar relacionados con lo reportado por (Padilla y Encina 2003; citados por Suárez 2011 102), quienes mencionan que, la demanda mineral y hormonal durante los procesos de germinación en condiciones *in vitro* depende de la especie la cual probablemente está relacionada con la cantidad de reservas en las semillas.

Porcentaje de germinación de semillas de *H. megalantus* y *H. undatus*

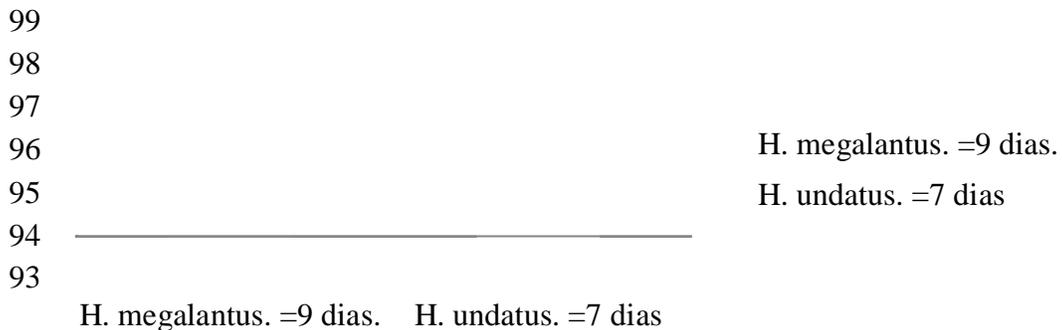


Figura 6. Porcentaje de germinación de semillas de los genotipos sembrados

8.3. Número de explantes con callos

El análisis de varianza, muestra diferencias estadísticas significativas debidas a la especie, a las dosis hormonales utilizadas y a la interacción entre estos dos factores (Anexo 2). La prueba de comparación de medias, indica que los tratamientos con mayor presencia de callos fueron los tratamientos P1M3 y P1M4 (2.4-D1.5mg + BAP 0.5mg; 2.4-D1.5mg + KIN 0.3mg), para la pitahaya amarilla (figura 7 A.), mientras que para la pitahaya roja (figura 7 B.) el tratamiento con mejor respuesta fue P2M3 (2.4-D1.5mg + BAP 0.5mg) (Anexo 3). A pesar que los medios antes mencionados presentaron los mejores promedios en cuanto a presencia de callos, estos no fueron viables en la regeneración de brotes, mientras que los callos formados en los tratamientos P1M1 y P1M2 en la pitahaya amarilla, presentaron poder de regeneración en brotes, (figura 7 C).

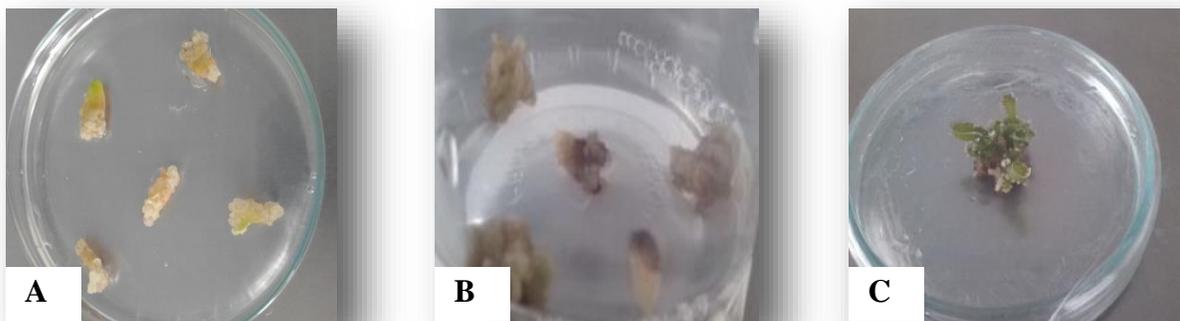


Figura 7. Presencia de callos a partir de explantes: A) callos presentes en *H. megalantus*. B) callos presentes en *H. undatus*. C) brotes a partir de callos.

8.4. Color y consistencia del callo (friable o no friable)

Los callos obtenidos de pitahaya amarilla se clasificaron por su color (friables) y por su consistencia (compactos), los primeros con varias categorías (blanco y oxidados) (figura 8 A) y los compactos con o sin pigmentación de clorofila (figura 8 B), estos callos en un lapso de tiempo de aproximadamente 60-70 días, presentaron formación de brotes (figura 8 C) a partir de callos preexistentes debido a la aplicación de hormonas exógenas en el medio de cultivo. Es por ello que los datos obtenidos para *H. megalanthus* muestran que en el tratamiento P1M1 el 24% de explantes no formaron callos, el 6,67% presentaron clorofila y su consistencia fue semicompacta, además el 69,33% fueron callos de coloración blanca y compactos, mientras que el tratamiento P1M2 la inducción a callos estuvo marcada en el 61.33%, el restante de explantes (38,67%) no mostraron sensibilidad a la formación de callos.

Cabe resaltar que el tratamiento P1M3 el 100% de explantes formaron callos (figura 8 D) de los cuales 80% no presentaron clorofila, los mismos que tenían consistencia degradada (figura 8 E), a diferencia del 20% restante que presentaron clorofila, aunque su consistencia seguía siendo la misma (figura 8 F). En el tratamiento P1M4 el 100% formaron callos, en su totalidad no presentaron clorofila, y su consistencia era degradada. Esta respuesta estaría asociada a las concentraciones del Acido 2,4-D Diclorofenoxiacético en los tratamientos P1M3 y P1M4 (2,4-D 1.5mg + BAP 0.5mg; 2,4-D 1.5mg + KIN 0.3mg), con base a lo reportado por (Bhau 1999; citado por Celi 2011 19), quien menciona que el Acido 2,4-D Diclorofenoxiacético es un herbicida que actúa como auxina y favorece la formación de callos en tejidos vegetales, y ha sido utilizado en algunas especies de cactáceas, con distintas concentraciones o combinado con otros reguladores de crecimiento.

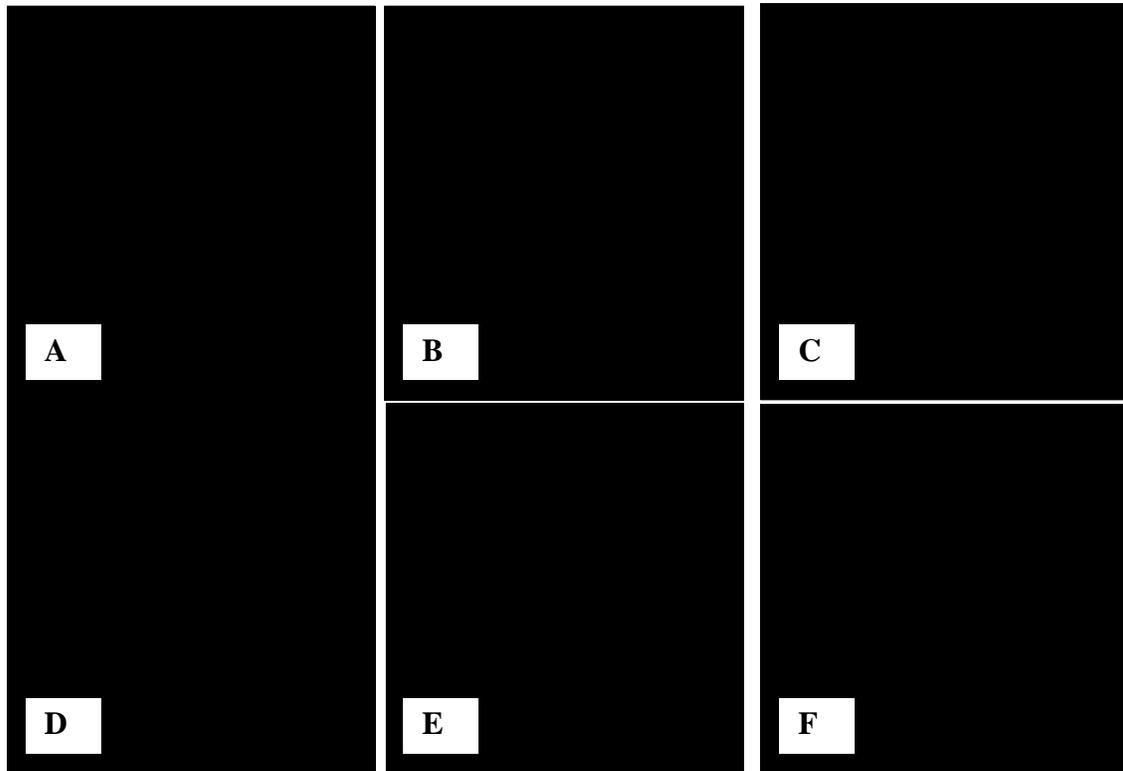


Figura 8. Categorización de los callos de pitahaya amarilla (*H. megalanthus*) en los tratamientos M1, M2, M3 y M4: A) Callos compactos blancos. B) Callo con presencia de cloroplastos C) Inducción de brotes a partir de callos D) formaciones de callos E) Callos de Consistencia degradada F) callos con presencia de clorofila.

Los callos obtenidos de *H. undatus* también se caracterizaron por su color (friables) y por su consistencia, los primeros con tres categorías (café, blanco, oxidado) y por su consistencia (compacta, semicompacto, degradada con y sin pigmentación). En los datos obtenidos en esta variable, en el tratamiento P2M1 el 100% de los explantes no presentaron callos (figura 9 A), en el tratamiento P2M2 el 13,33% de explantes formaron callos de consistencia compacta y con presencia de clorofila, mientras que el 86.66% restante se observaron oxidados callos, en el tratamiento P2M3 y P2M4 el 30% de callos se observaron oxidados (figura 9 B), el 40% fueron de color blanco, (figura 9 C) el 20% presentaron clorofila y el 10% restante presentaron coloración café (figura 9 D). Según (Perea 2003; Lagos, Criollo, y otros 2009; citados por Suárez 2011 120), la adición al medio de cultivo de auxinas, sumado a la capacidad endógena que tienen las plantas de sintetizarlas, estimula la formación de callos.

Pelah, Kaushik, y otros (2002); citado por Suárez (2011 120) encontró que en pitahaya amarilla los callos formados a partir de medios enriquecidos con ANA se caracterizaron por la falta de desarrollo y su posterior muerte. Los datos obtenidos en esta investigación en los tratamientos P2M1 y P2M2 enriquecidos con ANA, KIN y BAP coinciden con los de (Pelah, Kaushik, y otros 2002; citado por Suárez 2011 120) presentaron la muerte posteriores de callos. Los tratamientos P2M3 y P2M4 enriquecidos con 2.4-D, Diclorofenoxiacético, presentaron callos pocos desarrollados que posteriormente presentaron muerte. Según Marulanda y otros (2010); citados por Suárez (2011 122), los callos que presentan zonas con desarrollo de clorofila forman embriones a partir de las estructuras verdes en varias especies de Bamboo, por lo cual constituye un potencial para evaluar embriogénesis somática en pitahaya.

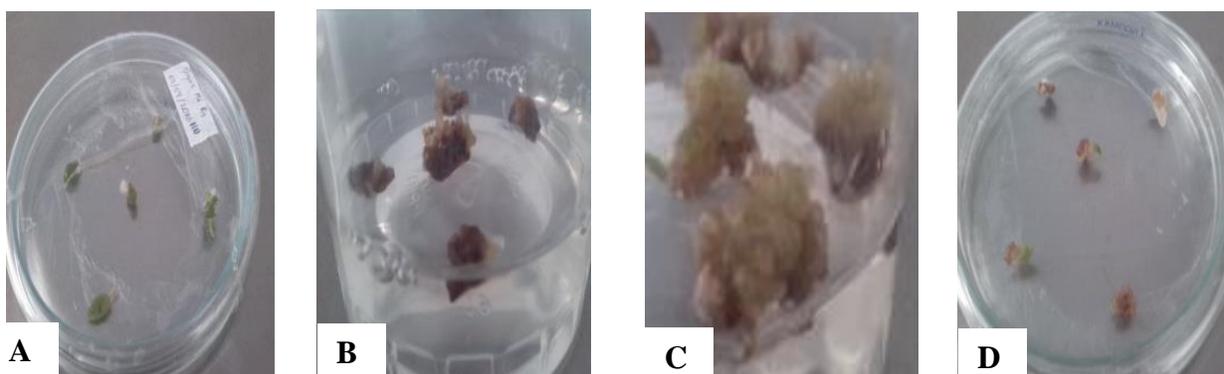


Figura 9. Categorización de los callos de pitahaya roja (*H. undatus*) en los medios M1, M2, M3 y M4: A) explantes sin presencia de callos. B) callos oxidados. C) callos semicompactos blancos. D) callo con coloración café.

Por su parte los callos oxidados, son indicadores del estrés celular y como moléculas señalizadores de diferentes vías y procesos metabólicos (germinación, mitosis, elongación celular, senescencia, muerte celular, lignificación de tejidos, formación de elementos cribosos del floema y xilema regulación de las expresiones genéticas asociadas a estrés abiótico y biótico y sistemas de defensas contra patógenos) estas sustancias se han reportado asociadas al incremento en la producción de embriones somáticos en explantes de coníferas, de *Vitis* spp y *Paulownia* spp (Azofeita 2009 156).

No obstante, el Acido 2.4-D Diclorofenoxiacetico ha demostrado ser muy eficiente en la generación de callos en ambos materiales evaluados, es excelente para lograr formar callos mas no así en la regeneración de los mismos en estas combinaciones hormonales probadas aquí. En pitahaya amarilla y roja no se observó regeneración en la proliferación de callos, en cuanto a la coloración, ni a la regeneración de plantas *in vitro* brotes, lo que hace suponer que, por ser considerado un herbicida, desorganiza la masa de células que se encuentran formando los tejidos y le es muy difícil para que esta se vuelva a reorganizar y pueda originar nuevos brotes a partir de los callos preexistentes.

8.5. Número de explantes con raíces.

En esta variable el análisis de varianza, presentó diferencias estadísticas significativas debidas a la especie, a los medios utilizados y a la interacción entre estos dos factores (Anexo 4). La prueba de comparación de medias, indica que el tratamiento con mayor presencia de raíces fue el P1M2 en pitahaya amarilla y P2M2 en pitahaya roja (figura 10 A y B Anexo 5) mientras que los tratamientos P1/P2M3 y P1/P2M4 no presentaron raíces en ambos genotipos (figura 10 C), lo que probablemente se deba a la aplicación del Ácido 2.4- D Diclorofenoxiacetico ya que se ha comprobado que es excelente para la formación de callos mas no así para la regeneración de nuevos órganos en tejidos en este ensayo, la respuesta estaría que al ser considerado un herbicida, inhibe las rutas metabólicas dentro de los tejido en la producción citocininas.

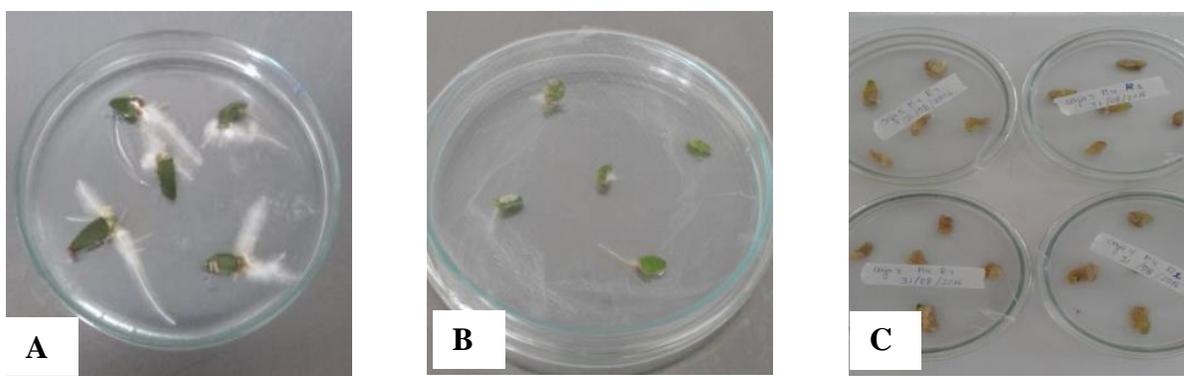


Figura 10. Presencia de raíces en los tratamientos estudiados: A) raíces en explantes de *H. megalanthus*. B) raíces en explantes de *H. undatus*. C) explantes sin presencia de raíces.

La rizogénesis es uno de los factores influyentes en los problemas de regulación hormonal y en particular por el papel de las auxinas en la organogénesis (Margara 1988; citada por Suárez 2011 148). En los trabajos realizados de Huang (2002); Drew y Azimi (2002); Pelah, Kaushik, y otros (2000); Zhao, Zhang, y otros (2005); citados por Suárez (2011 119) lograron el enraizamiento en brotes en una fase adicional, empleando como agente enraizador el Ácido Indolbutirico (IBA), en este ensayo se logró la inducción de raíces adventicias a partir de los explantes en la base de las hojas, mas no en brotes.

8.6. Número de explantes con brotes

En esta variable el análisis de varianza, no presentó diferencias estadísticas significativas debidas a la especie, mientras que se presenta diferencias significativas en relación a los medios y a la interacción entre estos factores (Anexo6). La prueba de comparación de medias, refleja la no significancia entre los tratamientos P1/P2-M1 Y P1/P2-M2 para ambos genotipos (Anexo 7).

Además cabe mencionar que en el material de *H. undatus* se presentó una organogénesis directa (generación de brotes sin la presencia de callos pre existentes) como se puede observar en la (figura 30-31.), mientras que para *H. megalanthus* se dio la presencia de una organogénesis indirecta a partir de la formación de callos (callos pre existentes). Lo que indica que el genotipo de pitahaya roja es más sensible a la inducción de brotes de una manera directa (organogénesis directa) con estas combinaciones hormonales ensayadas.



Figura 11. Presencia de brotes en genotipos de pitahaya: A y B) organogénesis directa en *H. undatus*. C) organogénesis indirecta en *H. megalanthus*

9. CONCLUSIONES

- En la fase de establecimiento de semillas *in vitro* la técnica empleada para la obtención y desinfección de las semillas de los genotipos estudiados fue exitosa.
- De acuerdo con los resultados obtenidos por el análisis estadístico en la variable número de explantes con callos, los tratamientos P1M3 y P1M4 de la especie *H. megalanthus* tuvieron mayor respuesta de sensibilidad a la aplicación de hormonas exógenas y por ende a la formación de callos.
- La prueba de comparación de medias para la variable número de explantes con raíces mostró que el tratamiento P1M2 y P2M2 presentó mayor número de raíces en ambos genotipos.
- Las mejores concentraciones de auxinas y citoquininas estuvieron dadas en el tratamiento P1M4 y P2M4 (2,4-D 1.5mg + KIN 0.3mg), siendo la mejor combinación hormonal para la generación de callos en genotipos de materiales *H. megalanthus* e *H. undatus*

10. RECOMENDACIONES

- Utilizar la metodología de desinfección empleada en esta investigación, por el ahorro económico que presenta al no necesitar de fungicidas para eliminar riesgos de contaminación por hongos y bacterias.
- Evaluar en cantidades más bajas las combinaciones hormonales del Acido 2.4-D Diclorofenoxiacético, con el mismo número de días los explantes.
- Evaluar las mismas combinaciones hormonales pero con un mayor número de días tomando como referencia hojas cotiledonares de 40 días.
- Evaluar los callos obtenidos en medios enriquecidos con Acido 2.4-D Diclorofenoxiacético, en diferentes medios de diferenciación de citoquininas.

11. BIBLIOGRAFÍA

Alka, S. "Harvesting of economically important edible exotic plant species series 20: *Asparagus officinalis*, *Hylocereus undatus*, *Persia Americana* and *Steviare baudiana* ." *MFP News*. 2003:20-21.

Araujo, J; Medina, O. 2008. En: Suárez, Roció. "Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt and Rose" Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia. 2011: 280.

Ávalos, Rebeca. "Cultivo y Propagación *in vitro* de cactáceas de los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus* ." *Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Aguas caliente. México* 2010:103.

ASOPITAHAYA (Asociación de Productores de Pitahaya del Ecuador) en "Análisis sectorial de la Pitahaya." 2016. PROECUADOR (Instituto de Promoción de Exportaciones e Investigaciones) 2016:12.

Azofeifa, Álvaro. "Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro* Revisión bibliográfica." *Agronomía Mesoamericana*. 2009:153-175.

Acuña, C. 2004. En: Jácome, J; Páez, Tatiana; Romero, Pedro; Reyes, Cristian. "Establecimiento, inducción y evaluación a callogénesis *in vitro* de meristemas apicales de árboles jóvenes de Romerillo (*Podocarpus oleifolius*) como futura estrategia de conservación de la especie en el Distrito Metropolitano de Quito. " *Departamento de Ciencias de La Vida, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, ESPE*. 2012:12.

BCE (Banco Central del Ecuador). “Registro de exportaciones de Pitahaya hacia otros países” 2015.

Bauer, R. 2003. En: Pérez, Jacobo. “Micropropagación de *Hylocereus megalanthus* (K. Schum. Ex Vaupel) Ralf Bauer e *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton y Rose, Y Caracterización molecular de brotes mediante RAPDs.” *Tesis de Grado. Universidad autónoma San Luis de Potosí. México.* 2011: 85.

Barthlott, W; Hunt, D. 1993. En: Pérez, Jacobo. “Micropropagación de *Hylocereus megalanthus* (K. Schum. Ex Vaupel) Ralf Bauer e *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton y Rose, Y Caracterización molecular de brotes mediante RAPDs.” *Tesis de Grado. Universidad autónoma San Luis de Potosí. México.* 2011: 85.

Becerra, L. 1987. En: Perea, Margarita; Tirado, Andrea; Micán, Yolima., Fischer, Gerhard; Rodríguez, Jairo. “*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran (Cactaceae).” *Frutas indd.* 2010:105-135.

Bastos, D; Pio, R; Scarpore, J; Libardi, M; Almeida, L; Galuchi, T; Bakker, S. “Propagation of red pitaya (*Hylocereus undatus*) bycuttings.” *Ciencia y Tecnología.* 2006:1106-1109.

Britton, L; Rose, N. 1963. En: Pérez, Jacobo. “Micropropagación de *Hylocereus megalanthus* (K. Schum. Ex Vaupel) Ralf Bauer e *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton y Rose, Y Caracterización molecular de brotes mediante

RAPDs.” *Tesis de Grado. Universidad autónoma San Luis de Potosí. México. 2011: 85.*

Bhau, B. 1999. En: Celi, Silvia. “Estudios morfológicos *in vitro* de cladodios de *Hylocereus ocamponis* BRITTON & ROSE. *Tesis Ing, Gestión Ambiental, Universidad Particular de Loja, 2011:50.*

Cáliz De Dios, H; Castillo, R. 2008. En: Pérez, Jacobo. “Micropropagación de *Hylocereus megalanthus* (K. Schum. Ex Vaupel) Ralf Bauer e *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton y Rose, Y Caracterización molecular de brotes mediante RAPDs.” *Tesis de Grado. Universidad autónoma San Luis de Potosí. México. 2011: 85.*

Caetano, Creuci. 2010. “Identificación de los recursos genéticos y fitoquímicos de pitahaya amarilla en Colombia.” *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural MADR, Asofrocol y UNAL Palmira, Colombia. 2010:51.*

Caetano, Creuci. 2010. En: Suárez, Roció. “Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt and Rose” *Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia. 2011: 280.*

Caetano, Diego; Escobar, Roosevelt; Caetano, Creuci; Vaca, Juan. “Estandarización de un protocolo de regeneración en pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran).” *Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, Facultad de Ciencias Agropecuarias. 2014:31-41.*

Corres, A. 2009. En: Aguilar Gabriela. “Evaluación de tres enraizantes y dos tamaños de cladodios en la propagación asexual de pitahaya amarilla *Cereus triangularis*

(L.) Haw., en Yantzaza. (tesis). *Ing. Agr. Loja. Universidad Nacional de Loja. Carrera de Ingeniería Agronómica. Ecuador. 2015:116.*

Colmas, J. 1971. En: Celi, Silvia. “Estudios morfológicos *in vitro* de cladodios de *Hylocereus ocamponis* BRITTON & ROSE. *Tesis Ing, Gestión Ambiental, Universidad Particular de Loja, 2011:50.*

Celi, Silvia. “Estudios morfológicos *in vitro* de cladodios de *Hylocereus ocamponis* BRITTON & ROSE. *Tesis Ing, Gestión Ambiental, Universidad Particular de Loja, 2011:50.*

Drew, R; Azimi, M. 2002. En: Perea, Margarita; Tirado, Andrea; Micán, Yolima; Fischer, Gerhard; Rodríguez, Jairo. “*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran (Cactaceae).” *Frutas indd. 2010:105-135.*

Drew, R; Azimi, M. 2002. En: Suárez, Roció. “Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt and Rose” *Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia. 2011: 280.*

Dodds, J; Lorin, R; 1986. En: Pérez, Jacobo. “Micropropagacion de *Hylocereus megalanthus* (K. SCHUM. EX VAUPEL) RALF BAUER E *Hylocereus undatus* (HAWORTH) BRITTON Y ROSE, y caracterización molecular de brotes mediante RAPDs.” *Universidad Autonoma San Luis de Potosí Facultad de Agronomía. 2011:85.*

Ecuador. “Reglamento de Becas para los y las Estudiantes de la Universidad Técnica de Manabí.” *Honorable Consejo Universitario. 2012 a:* Capítulo I Art.*2.

Estrada, A; Martínez, J; Torres, M; Chablé, F. “*In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntialanigera*Salm-Dyck and effects of sprayed GA3 after transplantation to *ex vitro* conditions.” *Scientia Horticulturae*. 2008:378-385.

Erazo, J; Parra, J; 2012; Suárez, Roció. 2011. En: Aguilar Gabriela. “Evaluación de tres enraizantes y dos tamaños de cladodios en la propagación asexual de pitahaya amarilla *Cereus triangularis*(L.) Haw., en Yantzaza. (tesis). Ing. Agr. Loja. Universidad Nacional de Loja. Carrera de Ingeniería Agronómica. Ecuador. 2015:116.

Esquivel, P. 2004. En: Suárez, Roció. “Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereusmegalanthus* (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja *Hylocereuspolyrhizus* (Haw.) Britt and Rose” Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia. 2011: 280.

Freire, M. 2003. “Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Instituto de Biotecnología de Plantas.” Universidad central “Marta Abreu” de las villas. Cuba. *Biotecnología vegetal* 2003:195-209.

Gómez, J. 2004. En: Pérez, Jacobo. “Micropropagacion de *Hylocereus megalanthus* (K. SCHUM. EX VAUPEL) RALF BAUER E *Hylocereus undatus* (HAWORTH) BRITTON Y ROSE, y caracterización molecular de brotes mediante RAPDs.” Universidad Autónoma San Luis de Potosí Facultad de Agronomía.2011:85.

Gunasena, H; Pushpakumara, D; Kariyagusam, M. 2007. En: Suárez, Roció. “Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt and Rose” Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia. 2011: 280.

Hubstenberger. J; Clayton, P;Phillips, G. “Micropropagation of cacti (Cactaceae).” *High-Tech and Micropropagation IV. Springer-Verlag, Berlín y Heidelberg.* 1992:49-68.

Hunt, D.2006. En: Pérez, Jacobo. “Micropropagación de *Hylocereus megalanthus* (K. Schum. Ex Vaupel) Ralf Bauer e *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton y Rose, Y Caracterización molecular de brotes mediante RAPDs.” *Tesis de Grado. Universidad autónoma San Luis de Potosí. México.* 2011: 85.

Huang, Q. 2011. En: Aguilar Gabriela. “Evaluación de tres enraizantes y dos tamaños de cladodios en la propagación asexual de pitahaya amarilla *Cereus triangularis* (L.) Haw., en Yantzaza. (tesis). Ing. Agr. Loja. Universidad Nacional de Loja. Carrera de Ingeniería Agronómica. Ecuador. 2015:116.

Huang, Q. 2002. En: Aguilar Gabriela. “Evaluación de tres enraizantes y dos tamaños de cladodios en la propagación asexual de pitahaya amarilla *Cereus triangularis*(L.) Haw., en Yantzaza. (tesis). Ing. Agr. Loja. Universidad Nacional de Loja. Carrera de Ingeniería Agronómica. Ecuador. 2015:116.

Jácome, J; Páez, Tatiana; Romero, Pedro; Reyes, Cristian. “Establecimiento, inducción y evaluación a callogénesis *in vitro* de meristemas apicales de árboles jóvenes de Romerillo (*Podocarpus oleifolius*) como futura estrategia de

conservación de la especie en el Distrito Metropolitano de Quito.” *Departamento de Ciencias de La Vida, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, ESPE*. 2012:12.

Kolar, Z; Bartek, J; Vyskot, B. 1976. En: Celi, Silvia. “Estudios morfológicos *in vitro* de cladodios de *Hylocereus ocamponis* BRITTON & ROSE. *Tesis Ing, Gestión Ambiental, Universidad Particular de Loja*, 2011:50.

Kite, L; Klein, J. 1999. En: Suárez, Roció. “Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt and Rose” *Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia*. 2011: 280.

López, H., Miranda, A. “GuiaTecnologica 6. Cultivo de Pitahaya. Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria.” *INTA*. 2002: 40.

Lagos, B; Criollo, E; Paredes, G; Córdoba, F; Andrade, D. 2009. En: Suárez, Roció. “Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt and Rose” *Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia*. 2011: 280.

Lichtenzweig, J; Abbo, S; Nerd, A; Tel-Zur, N; Mizrahi, Y. 2000. En: Suárez, Roció. “Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt and Rose” *Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia*. 2011: 280.

Lichtenzweig, J; Abbo, S; Nerd, A; Tel-Zur, N; Mizrahi, Y. 2000. En: Pérez, Jacobo. “Micropropagación de *Hylocereus megalanthus* (K. Schum. Ex Vaupel) Ralf Bauer e *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton y Rose, Y Caracterización molecular de brotes mediante RAPDs.” *Tesis de Grado. Universidad autónoma San Luis de Potosí. México.* 2011: 85.

Marulanda, M., López, A., Uribe, M., Gutiérrez, L. 2010. En: Suárez, Roció. “Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt and Rose” *Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia.* 2011: 280.

MAGAP (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca). “Producción y comercialización de pitahaya amarilla.” 2016:5.

Margara, J. 1988 En: Suárez, Roció. “Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt and Rose” *Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia.* 2011: 280.

Merten, S. 2003. En: Montesinos, Josefina; Rodríguez, Luis; Ortiz, Rodobaldo; Fonseca, María; Ruíz, Giovanni; Guevara, Francisco. “Pitahaya (*Hylocereus* spp.) un recurso fitogenético con historia y futuro para el trópico seco mexicano.” *Cultivos tropicales INCA.* 2015: 67-76.

Minocha, S; Mehra, P. 1974. En: Celi, Silvia. “Estudios morfológicos *in vitro* de cladodios de *Hylocereus ocamponis* BRITTON & ROSE. *Tesis Ing, Gestión Ambiental, Universidad Particular de Loja,* 2011:50.

Montesinos, Josefina; Rodríguez, Luis; Ortiz, Rodobaldo; Fonseca, María; Ruíz, Giovanni; Guevara, Francisco. “Pitahaya (*Hylocereusspp.*) un recurso fitogenético con historia y futuro para el trópico seco mexicano.” *Cultivos tropicales INCA*. 2015: 67-76.

Molina, D; Váscomez, J; Gonzalez, V. “Produccion y Exportación de la fruta pitahaya hacia el mercado Europeo.” *Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Economía y Negocios. Guayaquil-Ecuador*. 2009: 2.

Morales, M; Treviño, J; Verde, J; Oranday, A; Rivas, C. 2005. En: Perea, Margarita; Tirado, Andrea; Micán, Yolima., Fischer, Gerhard; Rodríguez, Jairo. “*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran (Cactaceae).” *Frutas indd*. 2010:105-135.

Mizrahi, Y; Nerd, A; Sitrit, Y. 2002. En: Pérez, Jacobo. “Micropropagación de *Hylocereusmegalanthus*(K. Schum. Ex Vaupel) Ralf Bauer e *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton y Rose, Y Caracterización molecular de brotes mediante RAPDs.” *Tesis de Grado. Universidad autónoma San Luis de Potosí. México*. 2011:85.

Murashige, T; Skoog, F. “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.” *Physiol. Plant*. 1962:473-497.

Núñez, B. « Matanzas, Cuba. » *Matanzas, Cuba*. 13 de mayo de 2003. Sistemas alternativos de producción agrícola.

<http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/libros/index/assoc/HASH010a.dir/doc.pdf>.

(Ultimo acceso: 1 de septiembre de 2016).

Nitsch, J. 1951. En: Celi, Silvia. “Estudios morfológicos *in vitro* de cladodios de *Hylocereus ocamponis* BRITTON & ROSE. *Tesis Ing, Gestión Ambiental, Universidad Particular de Loja*, 2011:50.

Ordoñez, M. “Propagación *invitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer. (Cactaceae).” *Trabajo de grado Biólogo: Universidad de san Carlos de Guatemala*. 2003: 20.

Ortiz, X; Acevedo, X; Martínez, H. “Característica y estructura de los frutales de exportación, Bogotá, CO.” *Ministerio de Agricultura y desarrollo Rural*. 2002:25.

Orrico, G. 2013. En: Aguilar Gabriela. “Evaluación de tres enraizantes y dos tamaños de cladodios en la propagación asexual de pitahaya amarilla *Cereus triangularis*(L.) Haw., en Yantzaza. (Tesis). Ing. Agr. Loja. Universidad Nacional de Loja. Carrera de Ingeniería Agronómica. Ecuador. 2015:116.

Patiño, R. “Historia y dispersión de los frutales nativos del Neotrópico.” *Publicación CIAT: N°326. Cali, Colombia*. 2002:655.

Padilla, M., Encina, L. 2003. En: Suárez, Roció. “Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt and Rose” Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia. 2011: 280.

Payró de la Cruz, E., Ruiz, V., Cruz, H., Sánchez, D. (1998). En: Perea, Margarita; Tirado, Andrea; Micán, Yolima., Fischer, Gerhard; Rodríguez, Jairo. “*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran (Cactaceae).” *Frutas indd*. 2010:105-135.

Pelah, D., Kaushik, R., Mizrahi, Y. Sitrit, Y. 2002. En: Perea, Margarita; Tirado, Andrea; Micán, Yolima., Fischer, Gerhard; Rodríguez, Jairo. “*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran (Cactaceae).” *Frutas indd.* 2010:105-135.

Pelah, D., Kaushik, R., Mizrahi, Y. Sitrit, Y. 2002. En: Suárez, Roció. “Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt and Rose” Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia. 2011: 280.

Perea, Margarita; Tirado, Andrea; Micán, Yolima., Fischer, Gerhard; Rodríguez, Jairo. “*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran (Cactaceae).” *Frutas indd.* 2010:105-135.

Perea, Margarita. 2003. En: Suárez, Roció. “Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt and Rose” Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia. 2011: 280.

Perez, B; Perez, R; Dávila, F; Villalobos, A. “In Vitro Propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran Desert.” *Hortscience* 2002:693-696.

Pérez, E; Dávila, F; Villalobos, A; Cañedo, O; Lizalde, J; De la Rosa, C; Domínguez, R; Castro, G; Pérez, E. “Técnicas de cultivo de tejidos aplicados a la propagación y conservación de algunas especies forestales de las zonas semiáridas de México.” *Ecología, manejo y conservación de los ecosistemas de montaña en México. Mundi Prensa México, S.A. de C.V. Parte III.* 2008:329-352.

Pérez, Jacobo. "Micropropagación de *Hylocereus megalanthus* (K. Schum. Ex Vaupel) Ralf Bauer e *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton y Rose, Y Caracterización molecular de brotes mediante RAPDs." *Tesis de Grado. Universidad autónoma San Luis de Potosí. México.* 2011: 85.

Pérez, B; Ramírez, M; Núñez, P; Ochoa, A. 2002 En: Ávalos, Rebeca. "Cultivo y Propagación *in vitro* de cactáceas de los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus*. " *Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Aguas caliente. México* 2010:103.

PROECUADOR (Instituto de Promoción de Exportaciones e Investigaciones). "Análisis sectorial pitahaya 2016." *PROECUADOR* 2016:12.

Roca, William; Mroginski, Luis. 1991. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. En: Roca, W. y Mroginski L. A. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Unidad de Investigación en Biotecnología y Unidad de Comunicaciones, Cali, Colombia. p. 969.

Evans, A; Sharp, R; Flick, E. 1981. En; Roca, William; Mroginski, Luis. 1991. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. En: Roca, W. y Mroginski L. A. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Unidad de Investigación en Biotecnología y Unidad de Comunicaciones, Cali, Colombia. p. 969.

Dodds, H; Roberts, W. 1982. En; Roca, William; Mroginski, Luis. 1991. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. En: Roca, W.

y Mroginski L. A. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Unidad de Investigación en Biotecnología y Unidad de Comunicaciones, Cali, Colombia. p. 969.

Roca, William; Mroginski, Luis. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicación. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Unidad de Investigación en Biotecnología y Unidad de Comunicaciones, Cali, Colombia. p. 969.

Roca, William; Mroginski, Luis. 1993. En: Suárez, Roció. “Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt and Rose” Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia. 2011: 280.

Rodríguez, C. En: Suárez, Roció. “Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt and Rose” Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia. 2011: 280.

Rubluo, A; Chávez, V; Martínez, A; Martínez, O. 1993. En: Celi, Silvia. “Estudios morfológicos *in vitro* de cladodios de *Hylocereus ocamponis* BRITTON & ROSE. Tesis Ing, Gestión Ambiental, Universidad Particular de Loja, 2011:50.

Rubluo, A; Reyes, J; Brunner, I; Rodríguez, B; Pimienta, E; Izquierdo, J; Palomino, G. 1996. En: Celi, Silvia. “Estudios morfológicos *in vitro* de cladodios de *Hylocereus ocamponis* BRITTON & ROSE. Tesis Ing, Gestión Ambiental, Universidad Particular de Loja, 2011:50.

Rubiano, M. “Sistemas agroforestales II.” *Universidad Abierta y a Distancia, Bogotá*. 2000:422.

Rubluo, A; Chavez V; Martinez A; Martinez, O. “Strategies for recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture.” *Biol. Conserv.* 1993:163–169.

Rubluo, A; Reyes, J; Brunner, I; Rodríguez, B; Pimienta, E; Izquierdo, J; Palomino, G. “Métodos de propagación biotecnológicos y convencionales en cactáceas para zonas áridas.” *FAO*. 1996:345.

Suárez, Roció. “Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt and Rose” *Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia*. 2011: 280.

Suárez, Roció. 2011. En: Aguilar Gabriela. “Evaluación de tres enraizantes y dos tamaños de cladodios en la propagación asexual de pitahaya amarilla *Cereus triangularis*(L.) Haw., en Yantzaza. (tesis). *Ing. Agr. Loja. Universidad Nacional de Loja. Carrera de Ingenieria Agronómica. Ecuador*. 2015:116.

Tel-Zur, N; Abbo, S; Bar-Zvi, D; Mizrahi, Y. 2010. En: Suárez, Roció. “Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt and Rose” *Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia*. 2011: 280.

Tel-Zur, N; Abbo, S; Bar-Zvi, D; Mizrahi, Y. 2004. En: Pérez, Jacobo. “Micropropagación de *Hylocereus megalanthus* (K. Schum. Ex Vaupel) Ralf Bauer e *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton y Rose, Y Caracterización molecular de brotes mediante RAPDs.” *Tesis de Grado. Universidad autónoma San Luis de Potosí. México.* 2011: 85.

Villalobos, V; Thorpe, T. 1993. Micropropagación, conceptos, metodología y resultados. En: Roca, William y Mroginski, Luis. Ed. Cultivo de tejidos en la Agricultura. Cali, Colombia: Centro internacional de Agricultura Tropical CIAT, Unidad de Investigación en Biotecnología y Unidad de Publicación. 127-141.

Zhao, C., Zhang, G., Huang, Z., Liu, M. 2005. En: Suárez, Roció. “Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt and Rose” *Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia.* 2011: 280.

Anexo 1. Protocolo para la obtención de explantes en la fase de establecimiento

1. Lavar las semillas manualmente sin causar daño para no romperlas en un cedazo fino eliminando el mucilago que las recubre realizar esto por 10 ocasiones aproximadamente 20 minutos con agua corriente.
2. Posteriormente colocarlas en un vaso de precipitación de 500ml adicionar agua y poner un poco de jabón líquido comercial agitar constantemente por 3 minutos y enjuagar por 5 ocasiones con agua corriente.
3. Colocar en vasos de precipitación de 100ml previamente lavados sellar con papel aluminio y llevar a cámara de flujo laminar.
4. Una vez en la cámara de flujo laminar las semillas llevadas se colocaron en frasco de 200ml de vidrio (estéril previamente) para terminar con el proceso de desinfección.
5. Se colocaron en vasos estéril con una solución al 1.1ppm de NaOCl (hipoclorito de sodio con una concentración 5.25%) y gotas de Tween-20, durante 20 minutos, para finalmente enjuagar con agua estéril por 5 ocasiones.
6. Distribuir las semillas en los recipientes que contienen el medio MS, usar papel krat estéril para ir colocando las semillas que se sacan de los frascos. Usar pinzas estériles con alcohol al 95% y flamearlas durante el proceso.
8. Sellar con cinta para film y etiquetar cada uno de los tubos que contengan el MS con las semillas, antes de sacar de la cámara de flujo laminar.
9. Revisar el material sembrado a los 4-8-12 días, y eliminar los recipientes contaminados

Anexo 2. Tabla 1. ANOVA para la variable Número de explantes con callos en pitahaya amarilla y roja.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	39,128 ^a	7	5,590	158,049	,000
Intersección	358,208	1	358,208	10128,415	,000
Variedades	20,277	1	20,277	573,331	,000
Dosis	11,879	3	3,960	111,964	,000
Variedades * Dosis	6,971	3	2,324	65,706	,000
Error	,566	16	,035		
Total	397,902	24			
Total corregida	39,694	23			

a. R cuadrado = ,986 (R cuadrado corregida = ,980)

Anexo 3. Resultados de la prueba de comparación de medias (diferencia mínima significativa) para el número de explantes con callos en pitahaya amarilla y roja

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamientos	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
P2M1	3	1,00 e				
P2M4	3		2,94 d			
P2M2	3		3,59 d	3,59 c		
P2M3	3			4,24 c	4,24 b	
P1M2	3				4,46 b	4,46 a
P1M1	3				4,46 b	4,46 a
P1M3	3					5,10 a
P1M4	3					5,10 a
Sig.		1,000	,011	,012	,809	,013

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,035.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,01.

Anexo 4.

Tabla 2. ANOVA para la variable número de explantes con raíces en pitahaya amarilla y roja.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	72,636 ^a	7	10,377	541,738	,000
Intersección	177,018	1	177,018	9241,750	,000
Variedades	,952	1	,952	49,703	,000
Dosis	70,720	3	23,573	1230,710	,000
Variedades * Dosis	,964	3	,321	16,777	,000
Error	,306	16	,019		
Total	249,960	24			
Total corregida	72,942	23			

a. R cuadrado = ,996 (R cuadrado corregida = ,994)

Anexo 5. Resultados de la prueba de comparación de medias (diferencia mínima significativa) para la variable número de explantes con raíces en pitahaya amarilla y roja.

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamientos	N	Subconjunto		
		1	2	3
P1M3	3	1,00 c		
P1M4	3	1,00 c		
P2M3	3	1,00 c		
P2M4	3	1,00 c		
P2M1	3		3,99 b	
P2M2	3		4,07 b	
P1M1	3			4,72 a
P1M2	3			4,93 a
		1,000	,995	,612

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos. Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,019.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,01.

Anexo 6.

Tabla 3. ANOVA para la variable número de explantes con brotes en pitahaya amarilla y roja.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	3,693 ^a	7	,528	7,012	,001
Intersección	36,113	1	36,113	480,067	,000
Variedades	,493	1	,493	6,555	,021
Dosis	1,503	3	,501	6,660	,004
Variedades * Dosis	1,696	3	,565	7,517	,002
Error	1,204	16	,075		
Total	41,009	24			
Total corregida	4,896	23			

a. R cuadrado = ,754 (R cuadrado corregida = ,647)

Anexo 7. Resultados de la prueba de comparación de medias (diferencia mínima significativa) para la variables número de brotes por explante en pitahaya amarilla y roja

DHS de Tukey ^{a,b}

Tratamientos	N	Subconjunto	
		1	2
P1M1	3	1,00 b	
P1M3	3	1,00 b	
P1M4	3	1,00 b	
P2M3	3	1,00 b	
P2M4	3	1,00 b	
P2M2	3	1,27 b	1,27 a
P1M2	3	1,33 b	1,33 a
P2M1	3		2,20 a
Sig.		,803	,013

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,075.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,01.