



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE AGRONOMÍA



MICROPROPAGACIÓN DE *Hylocereus megalanthus* (K. SCHUM. EX VAUPEL)  
RALF BAUER E *Hylocereus undatus* (HAWORTH) BRITTON Y ROSE, Y  
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BROTES MEDIANTE RAPDs

Por:

Jacobo Pérez Pastrana

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de  
Ingeniero Agrónomo Fitotecnista



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE AGRONOMÍA



MICROPROPAGACIÓN DE *Hylocereus megalanthus* (K. SCHUM. EX VAUPEL)  
RALF BAUER E *Hylocereus undatus* (HAWORTH) BRITTON Y ROSE, Y  
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BROTES MEDIANTE RAPDs

Por:

Jacobo Pérez Pastrana

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de  
Ingeniero Agrónomo Fitotecnista

Asesor:

M. C. Clara Teresa Monreal Vargas

Revisores:

Dr. Ovidio Díaz Gómez

Dr. Ángel Natanael Rojas Velázquez

Asesor externo:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

El trabajo titulado “MICROPROPAGACIÓN DE *Hylocereus megalanthus* (K. SCHUM. EX VAUPEL) RALF BAUER E *Hylocereus undatus* (HAWORTH) BRITTON Y ROSE, Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BROTES MEDIANTE RAPDs” fue realizado por: “Jacobo Pérez Pastrana” como requisito parcial para obtener el título de “Ingeniero Agrónomo Fitotecnista” y fue revisado y aprobado por el suscrito Comité de Tesis.

M. C. Clara Teresa Monreal Vargas  
Asesor

---

Dr. Ovidio Díaz Gómez  
Revisor

---

Dr. Ángel Natanael Rojas Velázquez  
Revisor

---

Ejido Palma de la Cruz, Municipio de Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P. a los 2 días del mes de mayo de 2011.

## **DEDICATORIA**

El que ha desplazado la montaña es el que comenzó por quitar las pequeñas piedras.  
Un viaje de diez mil kilómetros empieza por un solo paso.

Proverbio chino.

A Dios, por darme la vida, a mis padres y a mi hermano, quienes me permitieron que soñara, a mis amigos y familiares, que me acompañan a través de la vida, y a mi novia, por todos los bellos momentos juntos.

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Agronomía y a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por todo lo que me proporcionó para la realización de mi formación profesional.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. por la beca otorgada para la culminación de mi tesis, y permitirme realizarla en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular bajo la co-dirección del Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís y la M.C. Clara T. Monreal Vargas, Profesora-Investigadora de la Facultad de Agronomía de la UASLP.

A la M.C. Clara Teresa Monreal Vargas por su apoyo, motivación y paciencia en la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por la confianza puesta en mí para la realización de este trabajo en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.

Al Dr. Eugenio Pérez Molphe-Balch por sembrar la semilla de la curiosidad al cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

Al Ing. J. Jesús A. Flores R. por la ayuda proporcionada para el análisis estadístico de este trabajo.

Al M.C. José Pablo Lara Ávila por sus consejos y enseñanzas.

A mis compañeros de Laboratorio 1 del IPICYT, por hacer que mi trabajo fuese fácil y mi estancia grata.

Al Dr. Agustín Pérez Centeno, mi padre, por su dedicación para formarme como una persona responsable y de carácter.

A mi mamá, Sara Pastrana Vivas, por ser la mejor consejera, la cual disfruta de todas mis locuras y sueños.

A Dulce I.G. Álvarez López, a Emma Rodríguez Narváez, a Lucía Espinoza Villanueva, a Jalil Saldaña Rodarte y a Orlando Puebla Hernández, por ser los mejores amigos que puedo tener.

## CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
CONTENIDO.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Pitahayas.....	4
Cultivo <i>In Vitro</i> de Plantas y Reguladores de Crecimiento.....	9
Micropropagación.....	12
Micropropagación de Cactáceas.....	13
Variación Somaclonal.....	16
Identificación de Especies con Marcadores Moleculares.....	18
Amplificación del ADN con PCR.....	19
Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados al Azar (RAPDs).....	21
Análisis de Agrupamiento (Cluster).....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Localización del Sitio Experimental.....	25
Material Vegetal.....	25
Reactivos y Medios de Cultivo.....	25
Micropropagación de <i>Hylocereus megalanthus</i> (K. Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer e <i>Hylocereus undatus</i> (Haworth) Britton & Rose.....	25
Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).....	26

Germinación de semillas de las cactáceas para la obtención de los explantes.....	27
Selección del explante.....	27
Tratamientos hormonales para la obtención del mayor número de brotes...	28
Aclimatación.....	29
Caracterización Molecular de Brotes de <i>H. megalanthus</i> e <i>H. undatus</i> Mediante RAPDs.....	29
Extracción de ADN.....	29
Amplificación de fragmentos polimórficos de ADN al azar (RAPDs).....	31
Análisis de los productos de PCR por electroforesis.....	33
Análisis de los RAPDs con dendrograma.....	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
Micropropagación de <i>Hylocereus megalanthus</i> e <i>Hylocereus undatus</i> .....	35
Germinación de las semillas.....	35
Crecimiento y desarrollo de plantas madres.....	36
Proliferación de brotes y obtención de plantas <i>in vitro</i> .....	39
Aclimatación.....	48
Caracterización Molecular de Brotes de <i>H. megalanthus</i> e <i>H. undatus</i> Mediante RAPDs.....	50
Extracciones de ADN.....	53
Amplificación de Fragmentos Polimórficos de ADN al Azar (RAPDs) y su Análisis con Dendrograma.....	51
CONCLUSIONES.....	63
LITERATURA CITADA.....	64

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Color de la cáscara y pulpa de las especies más importantes de pitahayas.....	9
2	Composición nutricional del fruto en un porcentaje de 100 g de pulpa..	9
3	Composición del medio de Murashige y Skoog (MS).....	13
4	Soluciones base para la preparar el medio MS.....	26
5	Solución base de vitaminas para preparar el medio MS.....	26
6	Tratamientos hormonales que se probaron para la obtención del mayor número de brotes de <i>H. megalanthus</i> y <i>H. undatus</i> .....	28
7	Mezcla maestra 1 para la amplificación de fragmentos RAPDs.....	31
8	Mezcla maestra 2 para la amplificación de fragmentos RAPDs.....	31
9	Mezcla maestra 3 para la amplificación de fragmentos RAPDs.....	31
10	Condiciones de reacción PCR1 para la amplificación de RAPDs.....	32
11	Condiciones de reacción PCR2 para la amplificación de RAPDs.....	32
12	Condiciones de reacción PCR3 para la amplificación de RAPDs.....	32
13	Nombre y secuencia de los iniciadores de la serie OPA y OPB utilizados.....	33
14	Respuesta de los explantes de <i>H. megalanthus</i> a los 11 tratamientos utilizados.....	40
15	Respuesta de los explantes de <i>H. undatus</i> a los 11 tratamientos utilizados.....	43
16	Bandas amplificadas, bandas polimórficas, polimorfismo y rango de tamaño (pb) obtenido con los oligos utilizados para la caracterización de 4 cactáceas con RAPDs.....	54



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Morfología característica y partes que se reconocen en el tallo de las pitahayas.....	6
2	Diagrama de las etapas de la técnica de identificación de polimorfismo del ADN por RAPD.....	22
3	Planta madre de la especie <i>H. megalanthus</i> cultivada <i>in vitro</i> a partir de la germinación de semillas en medio MS. A) Desarrollo de 3 semanas después de la germinación, con aproximadamente 2 cm de longitud en el epicótilo. B) Desarrollo de 6 semanas después de la germinación, con aproximadamente 5 cm de longitud del epicótilo, además de dos brotes adventicios y raíces adventicias que crecieron a través de todo el tallo.....	37
4	Plantas madre de la especie <i>H. undatus</i> a partir de la germinación de semillas en medio MS, con un tamaño de 1.5 cm en 4 semanas después de haberlas sembrado. ....	38
5	Diferencia significativa honesta de Tukey del efecto de los 11 tratamientos sobre el número promedio de brotes desarrollados por los explantes de <i>H. megalanthus</i> .....	41
6	Diferencia significativa honesta de Tukey del efecto de los 11 tratamientos sobre el número promedio de brotes desarrollados por los explantes de <i>H. undatus</i> .....	41
7	Respuesta de los explantes de <i>H. megalanthus</i> a los 11 tratamientos después de 8 semanas de desarrollo. A) T1 [MS + 0.5 mg L <sup>-1</sup> ANA + 1 mg L <sup>-1</sup> BA]. B) T2 [MS + 0.05 mg L <sup>-1</sup> ANA+ 1mg L <sup>-1</sup> BA]. C) T3 [MS + 0.5 mg L <sup>-1</sup> AIA + 3.00 mg L <sup>-1</sup> BA]. D) T4 [MS + 1.0 mg L <sup>-1</sup> 2iP]. E) T5 [MS + 3 mg L <sup>-1</sup> 2iP]. F) T6 [MS + 0.5 mg L <sup>-1</sup> TDZ]. G) T7 [MS + 0.1 mg L <sup>-1</sup> 2,4 D + 0.5 mg L <sup>-1</sup> TDZ]. H) T8 [MS + 0.2 mg L <sup>-1</sup> 2,4D + 0.5 mg L <sup>-1</sup> TDZ]. I) T9 [MS + 0.25 mg L <sup>-1</sup> ANA + 1 mg L <sup>-1</sup> BA]. J) T10 [MS + 0.1 mg L <sup>-1</sup> ANA + 1 mg L <sup>-1</sup> BA]. K) T11 [MS sin hormonas (testigo)].....	42
8	Respuesta de los explantes de <i>H. undatus</i> a los 11 tratamientos hormonales después de las 8 semanas de desarrollo A) T1 [MS + 0.5 mg L-1 ANA + 1 mg L-1 BA]. B) T2 [MS + 0.05 mg L-1 ANA+ 1mg L-1 BA]. C) T3 [MS + 0.5 mg L-1 AIA + 3.00 mg L-1 BA]. D) T4 [MS + 1.0 mg L-1 2iP]. E) T5 [MS + 3 mg L-1	

	2iP]. F) T6 [MS + 0.5 mg L <sup>-1</sup> TDZ]. G) T7 [MS + 0.1 mg L <sup>-1</sup> 2,4 D + 0.5 mg L <sup>-1</sup> TDZ]. H) T8 [MS + 0.2 mg L <sup>-1</sup> 2,4D + 0.5 mg L <sup>-1</sup> TDZ]. I) T9 [MS + 0.25 mg L <sup>-1</sup> ANA + 1 mg L <sup>-1</sup> BA]. J) T10 [MS + 0.1 mg L <sup>-1</sup> ANA + 1 mg L <sup>-1</sup> BA]. K) T11 [MS sin hormonas (testigo)].....	44
9	Efecto comparativo de los 11 tratamientos en el desarrollo de brotes a partir de explantes de <i>H. megalanthus</i> y <i>H. undatus</i> .....	45
10	Plantas de <i>H. megalanthus</i> después de 1 mes de aclimatación.....	49
11	Planta de <i>H. megalanthus</i> después de 4 meses de aclimatación y crecimiento bajo malla sombra.....	49
12	Gel de calidad de la extracción de ADN de <i>H. megalanthus</i> con tres protocolos diferentes.....	50
13	Gel de calidad del ADN genómico de cactáceas en estudio.....	51
14	RAPDs obtenidos con 3 diferentes condiciones de reacción de PCR y 3 concentraciones de magnesio, utilizando el iniciador OPA 11 y ADN de brotes de <i>H. megalanthus</i> generados con el tratamiento 3.....	53
15	Caracterización de brotes de <i>H. megalanthus</i> generados con los tratamientos T9, T3, T1 y T11, con RAPDs obtenidos con diferentes iniciadores de la serie OPA y OPB. A) OPA11. B) OPA12. C) OPA16. D) OPA17. E) OPB08. ....	56
16	Patrón de bandas polimórficas amplificadas con los iniciadores OPA12, OPA16 y OPA17 en contraste con OPA15, que diferencian a <i>H. undatus</i> de <i>H. megalanthus</i> , <i>H. sp.</i> y <i>O. streptacantha</i> .....	57
17	Dendrograma de enlace simple generado por la distancia Euclidiana de las bandas polimórficas obtenidas para las cactáceas en estudio y que muestra la relación genética entre <i>H. megalanthus</i> y <i>H. undatus</i> .....	58

## RESUMEN

Las cactáceas *Hylocereus megalanthus* [sin. *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer] e *Hylocereus undatus* (Berger) Britton & Rose son un nuevo cultivo con gran potencial para el desarrollo agrícola y económico en amplias áreas de México y varios países de Centroamérica por sus múltiples usos, además de sus posibilidades de industrialización, productividad, rentabilidad y demanda en los mercados regionales e internacionales. El objetivo de este trabajo fue establecer protocolos para la micropropagación de las especies *H. megalanthus* e *H. undatus*, y la caracterización molecular de los brotes mediante la amplificación de fragmentos polimórficos de ADN al azar (RAPDs). Se obtuvieron explantes a partir de semillas germinadas en medio de Murashige y Skoog (MS). Se utilizaron diferentes reguladores de crecimiento, las auxinas fueron: ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y las citocininas: benciladenina (BA), 6- $\gamma$ - $\gamma$ -dimetilaminopurina (2-ip) y Thidiazuron (TDZ). Con base en estos reguladores se establecieron 11 tratamientos. Para *H. megalanthus* el mejor tratamiento para la generación de brotes fue 0.1mg L<sup>-1</sup> ANA más 1 mg L<sup>-1</sup> BA, y de brotes con raíz 1.0 mg.L<sup>-1</sup> 2iP. En el caso de *H. undatus* el mejor tratamiento para ambos tipos de desarrollo se obtuvo con 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ. Se estableció un protocolo para caracterizar a *H. megalanthus* y *H. undatus* por RAPDs. Se evaluaron 20 iniciadores (10 de la serie OPA y 10 de la serie OPB). Los más adecuados para obtener el mayor número de bandas polimórficas en *H. megalanthus* fueron 4 de la serie OPA (11, 12, 16 y 17) y OPB-08, siendo OPA 12 el mejor para distinguir entre especies y entre individuos de la misma especie, aunque OPA 17 es un buen candidato para distinguir variaciones somaclonales. Para *H. undatus* los iniciadores OPA 12 y 16, fueron los mejores en generar polimorfismos, destacando el OPA 16. El ADN de brotes de *H. megalanthus*, *H. undatus*, *Hylocereus* sp. y *Opuntia streptacantha* fue analizado por medio de RAPDs generados por los iniciadores OPA12 y OPA 16. Con los RAPDs se pudo detectar variabilidad genéticas en *H. megalanthus* y *H. undatus*, y con el patrón de bandas obtenido se distinguieron al menos de *H. sp.* y *Opuntia streptacantha*. También con esta metodología se detectó variabilidad genética en los brotes obtenidos con BA en

combinación con diferentes concentraciones de ANA ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  y  $0.25 \text{ mg L}^{-1}$ ) y con  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA en *H. megalanthus*. Con 16 de los iniciadores evaluados se obtuvieron 244 bandas polimórficas que se analizaron con un dendrograma de enlace simple construido con el programa Statistica V.5 97, basados en la utilización de una matriz binaria generada por el programa Cross Checker y con él se corroboró la variabilidad genética entre los individuos de *H. megalanthus* generados por los tratamientos antes indicados. Una proporción más cercana de auxina/citocinina (tratamientos 3 y 9) generan una relación filogenética más estrecha que proporciones más alejadas como la del tratamiento 1. Además se mostró que *H. megalanthus* y *H. undatus* tienen una relación filogenética pero ésta no es cercana, asimismo *H. undatus* y *H. sp.* tienen una relación genética más próxima entre ellas y *O. streptacantha* es una cactácea alejada filogenéticamente del género *Hylocereus*.

## SUMMARY

The vine cacti *Hylocereus megalanthus* (syn. *Selenicereus megalanthus*) and *Hylocereus undatus* are new crops with a high potential for the agriculture and economic development in the vast areas of México and several Central America countries for its many uses, their chance of industrialization, productivity, potential economic crop, and demand in regional markets and international market. The objective of this work was to develop protocols for micropropagation of the species *H. megalanthus* and *H. undatus*, and molecular characterization of shoots by the random amplified polymorphic DNA (RAPDs). Explants were obtained from seeds germinated in Murashige and Skoog (MS) medium. We used different growth regulators, auxins were naphthaleneacetic acid (NAA), indolyl-3 acetic acid (IAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), and among the cytokinins, 6-benzyladenine (BA), 6- $\gamma$ -dimethylaminopurine (2-ip), and Thidiazuron (TDZ). Based on these growth regulators were established 11 treatments. *H. megalanthus* the best treatment for generation shoots was 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA plus 1 mg L<sup>-1</sup> BA, and rooted shoots with 1.0 mg L<sup>-1</sup> 2iP. In the case of *H. undatus* the best treatment for both types of development was obtained with 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ. We established a protocol to characterize *H. megalanthus* and *H. undatus* by RAPDs. 20 primers were evaluated (10 in the series OPA and 10 in the series OPB). The most suitable for obtaining the highest number of bands polymorphic in *H. megalanthus* were 4 in the series OPA (11, 12, 16 and 17) and OPB-08, being the best OPA 12. *H. undatus* were OPA 12 and 16, and the best bid was 16. Shoots DNA from *H. megalanthus*, *H. undatus*, *Hylocereus* sp. and *Opuntia streptacantha* were analyzed by means the RAPDs generated by primers OPA-12 and OPA16. With RAPDs are we can detect genetic variability in *H. megalanthus* and *H. undatus* and the banding pattern obtained is distinguished at least *H. sp.* and *O. streptacantha*. This methodology also detected genetic variability in the seedlings of *H. megalanthus* obtained with BA in combination with different concentrations of NAA (0.5 mg L<sup>-1</sup> and 0.25 mg L<sup>-1</sup>) and 0.5 mg L<sup>-1</sup> IAA. With 16 of the evaluated primers were obtained 244 polymorphic bands were analyzed with a single link dendrogram constructed with the program Statistica V.5 97, based on the use of a binary matrix generated by the Cross Checker program and it was

corroborated genetic variability among individuals of *H. megalanthus* generated by the treatments mentioned above. Also showed that *H. megalanthus* and *H. undatus* have a phylogenetic relationship but this is not close, also *H. undatus* and *H. sp.* have a closer genetic relationship to *O. streptacantha*.

## INTRODUCCIÓN

Las cactáceas *Hylocereus megalanthus* [(sin. *Selenicereus megalanthus*) (K. Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer] e *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton & Rose, son especies cuyos frutos en las últimas décadas han ganado un lugar en el mercado europeo como nuevos frutos exóticos. Esto representa una promesa para los países en los cuales se desarrollan y motiva a invertir en su cultivo, al ser económicamente rentables, siempre y cuando se cumpla con las normas de calidad establecidas por el mercado internacional (Mizrahi *et al.*, 2002).

La taxonomía botánica de las pitahayas fue revisada por Bauer (2003) y la nomenclatura cambió para algunos géneros y especies, y el nombre actual para *Selenicereus megalanthus* es *Hylocereus megalanthus*, llamada comúnmente pitaya amarilla (pitaya-fruta espinosa). Tiene características morfológicas tanto del género *Hylocereus* como del género *Selenicereus* (Britton y Rose, 1963), además es compatible entre cruza con ciertas especies de *Hylocereus* spp., por esta razón se cree que *H. megalanthus* es producto de una hibridación intergenérica entre especies de *Selenicereus* e *Hylocereus* (Lichtenzveig *et al.*, 2000). Al igual que las especies del género *Hylocereus*, esta planta tiene hábitos trepadores, y por ello requiere un soporte para su cultivo, que puede ser vivo (árboles) o inerte (rejas y postes). Esta especie en particular tolera altas temperaturas más que otras cactáceas trepadoras y produce un fruto espinoso que al madurar es de una tonalidad amarilla y sus espinas son fáciles de desprender, tiene numerosas semillas dentro de la pulpa que son sencillas de digerir al degustar la fruta. Comparándolo con los frutos de otras especies de *Hylocereus*, este fruto es de un tamaño relativamente pequeño con semillas tres veces más grandes, pero su sabor es el más atractivo (Mizrahi *et al.*, 2002).

*Hylocereus undatus* es conocida comúnmente en Latinoamérica como pitahaya roja, pitahaya, fruta escamosa, y Dragon fruit o fruta Dragón en los países orientales, así como en los países en donde se comercializa debido a que las escamas de esta fruta se comparan con las escamas de este animal mitológico. Los principales problemas que tiene este cultivo es que no soporta las temperaturas extremas (Mizrahi y Nerd, 1999), y

no cuenta con un sabor característico. La apariencia del fruto es bastante atractiva por carecer de espinas y por las tonalidades de su cáscara desde rojos hasta rosados al madurar. La clasificación de las pitahayas de esta especie generalmente considera las características de sus frutos, tomando en cuenta el color rojizo de la cáscara y la pulpa blanca (Mizrahi *et al.*, 1997).

El estudio de las características genéticas, indica que *H. megalanthus* se distingue por ser tetraploide ( $2n=4x=44$ ) y autocompatible, a diferencia de *H. undatus* e *H. monacanthus* (sin *H. polyrhizus*) que son diploides ( $2n=2x=22$ ) y en su mayoría autoincompatibles (Centurión, 1999; Lichtenzveig *et al.*, 2000; Grimaldo-Juárez *et al.*, 2001). La poliploidía o alteraciones del número básico de cromosomas se considera uno de los factores determinantes en la evolución de las especies (Swanson, 1958), y puede expresarse en cambios morfológicos. Este puede ser el origen de *H. megalanthus* y la explicación de sus características fenológicas. Sin embargo, en las demás especies de *Hylocereus*, la condición diploide constante permite señalar que las diferencias morfológicas en tallos, flores y frutos no está relacionada con cambios en el nivel de ploidía. Para entender este comportamiento es importante saber que tan emparentados están a nivel molecular *H. megalanthus* y *H. undatus*.

Las pitayas y pitahayas tienen ventajas sobre otros cultivos tradicionales por su metabolismo del tipo ácido de las crasuláceas (CAM, Crassulacean Acid Metabolism) característicos de todas las cactáceas, y por su eficiencia en el uso del agua. (Mizrahi *et al.*, 1997). En zonas limitadas en el recurso agua, cobran importancia como una alternativa de producción y biodiversidad (Benega *et al.*, 2009), y además representan un trascendental recurso genético vegetal nativo de América, con amplia distribución y variación; también son un nuevo cultivo con gran potencial para el desarrollo agrícola y económico de amplias áreas de México y varios países de Centroamérica por sus múltiples usos, posibilidades de industrialización, productividad, rentabilidad y demanda en los mercados regionales y en el mercado internacional (Ortiz, 1999).

Debido al interés económico de las cactáceas de la especie *Hylocereus megalanthus* e *Hylocereus undatus*, y a la actual problemática de la reducción de sus poblaciones nativas, es necesario postular alternativas biotecnológicas para su propagación masiva



libre de enfermedades, como lo es la micropropagación por cultivo de tejidos y determinar si existe variabilidad genética inducida por este método.

## **Objetivos**

El presente trabajo tiene como objetivos:

Objetivo general:

Micropropagación de las especies *Hylocereus megalanthus* e *Hylocereus undatus*, y caracterización molecular de brotes mediante RAPDs.

Objetivos específicos:

1. Seleccionar el mejor tratamiento hormonal para la obtención del mayor número de brotes en el proceso de micropropagación de *Hylocereus megalanthus* e *Hylocereus undatus*.
2. Determinar el oligonucleótido u oligonucleótidos de las series OPA y OPB que permitan caracterizar molecularmente a *H. megalanthus* y *H. undatus*, a través de un patrón con el mayor número de bandas polimórficas.
3. Verificar mediante RAPDs la estabilidad genética de los individuos de *H. megalanthus* y *H. undatus* propagados por cultivo de tejidos.
4. Establecer a través de RAPDs la relación filogenética entre *H. megalanthus* y *H. undatus* con otras cactáceas.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Pitahayas

Las pitahayas (fruta escamosa) y pitayas (fruta espinosa) son nombres comunes que proviene de las Antillas Mayores, del dialecto taino (Rodríguez, 2000), utilizados para nombrar a las plantas que forman parte del orden Cactales, familia Cactaceae, subfamilia Ceroideae (o Cactoideae), tribu Hylocereae, subtribu Hylocereinae y los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus*.

Barthlott y Hunt (1993) 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 pitaya 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).

Desde principios de los años 80s, Colombia es el primer país exportador de la pitaya amarilla. No obstante, su comercialización se limitó por problemas fitosanitarios que propiciaron el abandono de áreas considerables de las plantaciones (Bibliowicz y Hernández, 1998). Sin embargo, por el precio que ha ganado este fruto por su demanda en el mercado internacional, se desarrollan investigaciones que resuelvan la problemática de orden técnico, así como la creación de nuevas técnicas para una producción empresarial con niveles adecuados de calidad y rentabilidad de la fruta.

Israel es el otro país productor y exportador de la pitaya amarilla. Es uno de los primeros países en realizar el cultivo de distintas especies de los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus* para su producción bajo un sistema protegido (malla sombra), regulando su irrigación, fertilización y sombreado, en un clima desértico (Mizrahi y Nerd, 1999; Nerd *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2006). Este sistema es mejor que el tradicional a campo abierto en clima tropical, debido a que se pueden controlar varios factores, entre ellos los

problemas fitosanitarios (hongos y bacterias), y se obtienen frutos más homogéneos y con mayor calidad (Becerra, 1994).

En México, las frutas de las pitahayas todavía son poco conocidas en los grandes centros de consumo, por lo que su importancia ha sido y sigue siendo limitada de manera regional en las zonas productoras. Existen plantas silvestres en los estados de Campeche, Chiapas, Colima, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán; pero producción comercial de pitahaya sólo hay en Yucatán, Puebla, Campeche, Quintana Roo y Tabasco (Ortiz, 1999).

La producción generalmente se obtiene en huertos familiares, en superficies pequeñas, totalmente dispersas, con niveles de productividad sumamente bajos, presentación y calidad muy variables, y severos problemas fitosanitarios. Se estima que en todo el país existen alrededor de 100 hectáreas cultivadas en estas condiciones, de las que se generan aproximadamente 300 toneladas al año, que equivalen a 3 toneladas por hectárea. La mitad de la superficie y del volumen de la producción corresponden a la península de Yucatán. Le siguen en importancia los estados de Tabasco (zona de la Chontalpa), Puebla (zonas de la Cañada, el Valle de Tehuacán y la Mixteca), Oaxaca (zona de la Cañada), y Jalisco (localidades de Autlán y Sayula) (Ortiz, 1999).

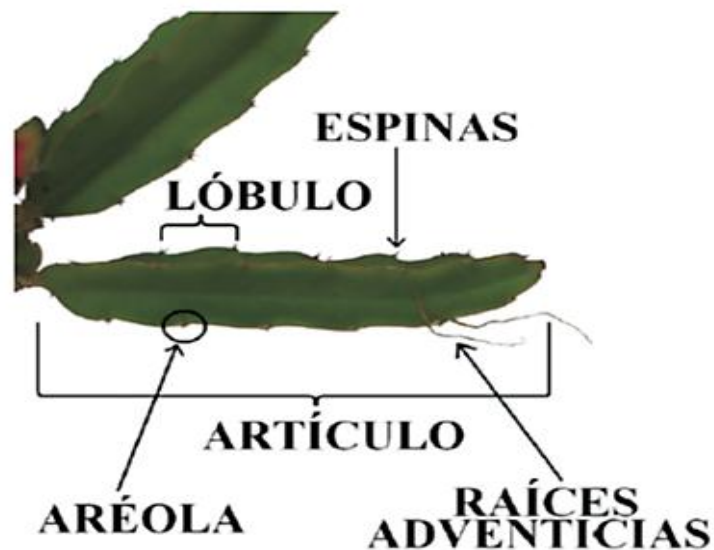
Desde 1984, Mizrahi y Nerd citados por Mizrahi *et al.* (2002), estudian a estas y otras especies de cactáceas para desarrollar una alternativa de agricultura sustentable en áreas agrícolas con características adversas como salinidad elevada y temperatura extremas, características del desierto de Israel, lo cual brinda grandes avances en su conocimiento y manejo.

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). La condición diploide constante permite señalar que las

diferencias morfológicas en los frutos no están relacionadas con cambios en el nivel de ploidia. Grimaldo-Juárez *et al.* (2001), estudiaron cariotipos de varias especies de *Hylocereus* y refieren que la presencia y distribución de dos a tres constricciones secundarias ubicadas en los brazos cortos de cromosomas metacéntricos, en dos o tres pares cromosómicos generan diferencias entre los genotipos de *Hylocereus* spp., este hecho puede explicar la variabilidad morfológica existente.

No obstante, entre las pitahayas hay varias características en común que permite generalizarlas para describirlas botánicamente:

Los tallos o filocladodios son suculentos, algunas están mejor adaptadas a climas secos, la epidermis o capa exterior de los tallos es gruesa, con estomas hundidos, cuentan con tres aristas o costillas, al realizar un corte transversal el tallo tiene una forma de T. Poseen grupos de 2 a 6 espinas de forma cónica dependiendo de la madurez del tallo y de la especie, miden de largo 0.5 a 3.1 mm y 0.5 a 1.5 mm de base, ubicadas en las aréolas redondas y en los bordes, los cuales son ligeramente ondulados; los artículos alcanzan de uno a dos metros de largo (Figura 1) (Cálix de Dios y Castillo, 2008).



**Figura 1.** Morfología característica y partes que se reconocen en el tallo de las pitahayas.

Tienen dos tipos de raíces, una subterránea que absorbe la mayoría de los nutrientes y las secundarias que crecen siguiendo el nivel del suelo, a una profundidad de 5 a 20 cm y abarcan un área de 30 cm de diámetro. Las raíces secundarias permiten que se pegue y sostenga en la corteza de otras plantas o en la superficie de piedras y muros (Cáliz de Dios y Castillo, 2008).

La flor es perfecta, con una simetría bilateral, un sólo lóculo, cámara nectarial, numerosos estambres, brácteas completamente verdes o verdes con orillas rojas, pétalos que pueden ser blancos, amarillos o rosados, y de forma tubular similar a una trompeta. La floración es de hábitos nocturnos, la flor dura un solo día, marchitándose por la mañana. Tiene una longitud de 20 a 37 cm y 20 cm de diámetro en la antesis; el pericarpio es de 3 a 4.1 cm de diámetro y el tubo receptáculo de 2 cm, con ovario en la parte inferior, cubierto con escamas en la parte basal en especies del género *Hylocereus*, y con espinas en la especie *H. megalanthus* (sin. *S. megalanthus*) (Weiss *et al.*, 1994). Las flores nacen en las partes de los tallos más expuestas a la luz solar y en la mayoría de los casos emergen de la porción superior de las aréolas.

El fruto es una baya globosa, que en las especies de *Hylocereus* spp. llega a medir 8 a 15 cm de largo y 6 a 10 cm de diámetro, la cáscara es de color rojo en varios matices o amarillo, contando con brácteas alrededor (Centurión, 1999); a excepción de *H. megalanthus* que tiene cáscara de una tonalidad amarilla, con mamilas en lugar de brácteas, y cuenta con espinas que miden hasta 1.5 cm de largo. El tamaño y peso óptimo para la exportación es de 8 cm de largo por 5 cm de diámetro, y entre 200 y 250 g respectivamente. *H. megalanthus* tiene pulpa dulce en tanto que *H. undatus* no cuenta con un sabor característico al paladar (Becerra, 1986).

Las semillas de estas especies son abundantes y dispersas en la pulpa, de tamaño pequeño en *Hylocereus* y grande en *Selenicereus*, de color café oscuro o negro, y se pueden comer con facilidad, al ser agradables al paladar, aunque no son digeribles por el contenido de aceite (Centurión, 1999).

Cualquier tipo de pitahaya se puede propagar por germinación de semillas y por propagación vegetativa (Gunasena *et al.*, 2007). En la propagación por semilla se realiza una selección de frutos de los cuales se colectan las semillas, se lavan y desinfectan,

quedando listas para que germinen en un ambiente húmedo. Pueden tardar una o dos semanas en germinar, las plántulas se siembran en macetas y al transcurrir 10 meses se pasan al campo. Este método se utiliza para investigaciones en mejoramiento genético, como la hibridación.

En la propagación vegetativa, se utilizan tallos que pueden ser plantados en la plantación definitiva o enraizarse en vivero y pasarlos después al huerto. Esta técnica permite uniformar las nuevas plantaciones, acorta el tiempo de producción y solo se llevan plantas sanas al huerto. La planta madre tiene que estar sana, vigorosa y haber alcanzado la etapa reproductiva, y los esquejes pueden ser tomados después de acabar la etapa reproductiva con una longitud de 30 a 50 cm. Se pueden reproducir por medio de bolsas de plástico, proporcionándoles cierta sombra.

La plántula que proviene de vivero empieza la producción dos años después de establecerse en campo y alcanza la mayor producción a los cinco años, manteniéndose hasta terminar la vida productiva y rentable, la cual puede ser por 20 años. La densidad de población por hectárea es de 800 plantas y se puede renovar con plantas de la misma variedad o utilizar variedades mejoradas (Rodríguez, 2000).

Las pitahayas más estudiadas por su valor comercial se caracterizan por el color de la cáscara y pulpa (Cuadro 1). Estas plantas han despertado interés por sus propiedades preventivas o curativas de enfermedades, en las comunidades de las cuales son nativas y desde nuestros antepasados. Para poder conocer más sobre sus propiedades se han realizado análisis de sus frutos. En el Cuadro 2 se describe la composición nutricional de los frutos de *H. undatus* y *H. megalanthus* (ICBF, 1992). Se asume que *H. undatus* tiene propiedades que actúan en el control del daño oxidativo y en la disminución de la niveles de glucosa en ratones con diabetes (Anand *et al.*, 2010).

**Cuadro 1.** Color de la cáscara y pulpa de las especies más importantes de pitahayas.

Especie	Color de la cáscara	Color de la pulpa
<i>Hylocereus undatus</i>	Rojo	Blanco
<i>Hylocereus undatus</i>	Amarillo	Blanco
<i>Hylocereus polyrhizus</i> (sin. <i>H. monacanthus</i> )	Rojo	Rojo
<i>Hylocereus guatemalensis</i>	Rojo	Morado
<i>Hylocereus megalanthus</i>	Amarillo	Blanco

Fuente: Mizrahi y Nerd (1999); Tel-Zur *et al.* (2004a); Cáliz de Dios y Castillo (2008).

**Cuadro 2.** Composición nutricional del fruto en un porcentaje de 100 g de pulpa.

Composición	<i>Hylocereus undatus</i>	<i>Hylocereus megalanthus</i>
Agua (g)	89.4	85.4
Proteína (g)	0.5	0.4
Grasas (g)	0.1	0.1
Fibra (g)	0.3	0.5
Cenizas (g)	0.5	0.4
Calcio (mg)	6	10
Fósforo (mg)	19	16
Hierro (mg)	0.4	0.3
Niacina (mg)	0.2	0.2
Ácido ascórbico (mg)	25	4
° Brix	11	19

Fuente: ICBF (1992).

### **Cultivo *In Vitro* de Plantas y Reguladores de Crecimiento**

El cultivo *in vitro* de plantas es una técnica dentro de la biotecnología vegetal, que consiste en cultivar y manipular las plantas en condiciones controladas como la temperatura, intensidad y duración de luz, nutrición, textura y pH del medio; a partir del cultivo de protoplastos, células aisladas, callo, embriones, órganos y tejidos; hasta el cultivo de plantas completas. Se puede utilizar para la producción de metabolitos vegetales secundarios de interés farmacéutico o de uso en la industria de alimentos, así como en diversas investigaciones (Augé *et al.*, 1986; Pierik, 1990).

Esta técnica teóricamente permite obtener una propagación masiva de plantas libres de enfermedades haciendo uso en algunos casos desde una célula (micropropagación), y se basa en la teoría de la totipotencialidad elaborada por Schwann y Schleiden en 1838-1839 (Schwann y Schleiden, 1883 citado por Gautheret, 1982). La teoría estipula que cada célula viva, sin importar la especialización, es autosuficiente y capaz de regenerar una planta completa, al poseer un núcleo que tiene la información necesaria para reproducir las características de la planta de la cual proviene (Augé *et al.*, 1986; Pierik, 1990). El primer paso para demostrar esta teoría fue cuando se describió por botánicos la sanación de las plantas bajo la cicatrización de heridas callosas (Gautheret, 1982).

El primer intento de cultivo *in vitro* de plantas fue realizado por el botánico Gottlieb Haberlandt en 1902, aunque no tuvieron total éxito sus investigaciones, permitió tener un enfoque diferente para el estudio y entendimiento de los comportamientos fisiológicos y morfológicos de las plantas (Krikorian y Berquam, 2003). Harberlandt cultivó distintos tipos de células de *Tradescantia*, y para ello utilizó como nutrientes la solución Knop (sacarosa, aspargina y peptina); lo que le permitió obtener células vivas después de 20 a 27 días de cultivadas (Gautheret, 1982).

El segundo gran paso fue el descubrimiento de sustancias con efecto hormonal, denominadas reguladores del crecimiento; la primera aislada fue 3-ácido indol acético en 1885, a partir de investigaciones sobre la descomposición de proteínas. Sus propiedades de división celular fueron descubiertas 31 años después de los experimentos de Harberlandt. La existencia de auxinas fue demostrada por F. W. Went en 1928 interrumpiendo el crecimiento de plántulas de avena seccionando el coleoptilo y reanudándolo cuando se lo volvía a colocar. En 1934 Kögl y Haagen-Smit aislaron de orina una sustancia estimulante del crecimiento de la avena que fue identificada como ácido indol acético, la cual también aislaron como producto natural del maíz tierno (Salisbury y Ross, 1994).

La definición de hormona implica al compuesto orgánico sintetizado por un organismo vivo, que influye en su crecimiento y desarrollo. En las plantas superiores éstas actúan en concentraciones relativamente pequeñas y en un lugar diferente al de su



producción (Pierik, 1990). La actividad de estos compuestos se puede reproducir con compuestos sintéticos similares a los productos naturales.

Al conjunto de las hormonas y productos sintéticos similares se les considera como reguladores de crecimiento, y la distribución de estos compuestos que la planta sintetiza y sus concentraciones, tienen efectos en las células dirigiéndolas a una diferenciación o desdiferenciación (Pierik, 1990). Las diferentes respuestas pueden ser la formación de tejido indiferenciado (callos), de órganos (brotes adventicios o raíces), de embriones somáticos, o la brotación de los meristemos preexistentes (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2008).

Los reguladores comparten algunas características como actuar efectivamente en concentraciones bajas, y su acción es tóxica a concentraciones elevadas. Su funcionamiento está determinado por el equilibrio con los otros reguladores e intervienen en múltiples fenómenos fisiológicos dando como resultado variaciones en el modo de acción. Existen reguladores endógenos y reguladores de síntesis, los primeros son controlados por la maquinaria metabólica celular, los cuales se regulan o eliminan rápidamente y en los segundos, su duración es prolongada dando de esta manera la posibilidad de aplicaciones prácticas (Augé *et al.*, 1986).

Los reguladores se clasifican dependiendo de su acción inhibitoria o estimulante del crecimiento y desarrollo. Se reconocen a las auxinas, citocininas y giberelinas por ejercer una acción estimulante sobre el metabolismo celular (Augé *et al.*, 1986). Aun cuando los resultados del uso de reguladores es variable se tiene como regla general que las auxinas son el grupo que induce la elongación, o en algunos casos la división celular, frecuentemente inducen raíces adventicias e inhiben la formación de tallos adventicios. Las citocininas inducen la división celular y habitualmente tallos adventicios e inhiben la formación de raíces adventicias, lo cual depende de su interacción con las auxinas. Una concentración auxina-citocininas en equilibrio induce la formación de callo, una relación auxina-citocinina donde la concentración de citocinina sea menor produce tallos, y a una relación auxina-citocinina donde la citocinina está en una proporción mayor tiene un efecto de formar raíces adventicias.

## **Micropropagación**

El cultivo *in vitro* es de gran interés por su aplicación en la obtención rápida de especies para reforestación, rescate de especies amenazadas, y conservación *in vitro* de germoplasma valioso. La propagación *in vitro* tiene la particularidad de poder obtener plantas genética y fisiológicamente similares a las plantas madre que fueron seleccionadas por sus características superiores o de interés, además en grandes cantidades en tiempos y espacios reducidos (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2008).

Para iniciar cualquier tipo de cultivo *in vitro*, es muy importante obtener al inóculo o explante libre de microorganismos patógenos endógenos o exógenos (desinfestación), debido a que éstos son un factor que afecta directamente a este proceso (Barba *et al.*, 2001). De igual manera es fundamental trabajar en condiciones asépticas, con medio de cultivo y materiales estériles (Roca y Mroginski, 1991). La elección del explante depende de la especie y el tipo de multiplicación, además se tiene que tener en cuenta la calidad de la planta madre, las condiciones fitosanitarias y fisiológicas, el estado de desarrollo y el tamaño del explante (Barba *et al.*, 2001).

Existen tres vías para la multiplicación *in vitro* de las plantas: organogénesis, embriogénesis somática y propagación por yemas, ápices o meristemos (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

En la organogénesis, se pueden formar raíces o brotes adventicios, los brotes son estructuras muy similares a una yema. Este proceso puede ser inducido por la presencia de citocininas solas o combinadas con auxinas en explantes provenientes de tejidos jóvenes. Cuando hay una fase intermedia de tejido calloso se le denomina organogénesis indirecta.

La embriogénesis somática se describe como la capacidad que tiene cierto tipo de células para formar embriones en determinadas condiciones por medio de un proceso muy similar a la embriogénesis cigótica. Los embriones somáticos tienen la capacidad de germinar y formar nuevas plantas idénticas a la planta madre. La embriogénesis somática puede ser directa o indirecta.

El sistema de propagación por yemas, ápices o meristemos se basa en la formación de nuevos brotes a partir de meristemos preexistentes, al ser los meristemos apicales y

axilares los puntos de crecimiento natural, los cuales se localizan dentro de las yemas. Esta actividad se mantiene estable cuando se realiza el cultivo *in vitro*, por lo que no implica fenómenos de desdiferenciación (tejido calloso) y re-diferenciación celular (organogénesis; producción de órganos a partir de tejido calloso).

El medio de Murashige y Skoog (1962) - MS es el más utilizado en micropropagación, particularmente si el objetivo es regenerar plantas. Existen numerosas variaciones comerciales de este medio y su composición se indica en el Cuadro 3.

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

Compuesto	Concentración en mg L <sup>-1</sup>
Nitrato de amonio (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1,650
Nitrato de potasio (KNO <sub>3</sub> )	1,900
Ácido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	6.2
Cloruro de Calcio (CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O)	440
Cloruro de Cobalto (CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O)	0.025
Sulfato Cúprico (CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O)	0.025
Sulfato de Magnesio (MgCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O)	370
Sulfato de Manganeso Monohidratado (MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O)	16.9
Yoduro de Potasio(KI)	0.83
Fosfato de Potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	70
Molibdato de Sodio Dihidratado (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O)	0.25
Sulfato de Zinc (ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O)	8.6
Sulfato Ferroso (FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O)	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3

### Micropropagación de Cactáceas

Las especies de la familia *Cactaceae* son de especial interés para la humanidad, porque a través de los años les ha encontrado muchos usos como fuentes de alimento, forrajes para el ganado, materiales para la construcción, materia prima para la

elaboración de medicamentos y uso ornamental en jardines e interiores (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Muchas especies están en peligro de extinción y algunas se han ido extinguiendo de su hábitat natural, debido a que en algunas cactáceas la producción de semillas puede tomar varios años, a que ha habido sobreexplotación de las mismas, y a la construcción de nuevas zonas urbanas; reduciendo así las posibilidades de esparcimiento de las especies. Además, la mayoría de las cactáceas tienen una habilidad limitada para poder restablecerse demográficamente en un área perturbada y si llegaran a establecerse su crecimiento natural es bastante lento (Hernández y Godínez, 1994). Gracias a la utilización de herramientas y técnicas biotecnológicas, como la multiplicación *in vitro*, que es una alternativa posible para evitar la extinción, se tiene el potencial para propagar de manera rápida y masiva a las cactáceas. Esta opción es de gran importancia en países como México que cuenta con 73% de endemismo de las especies a nivel genérico posicionándose en primer lugar mundial (Hernández y Godínez, 1994; Retes-Pruneda *et al.*, 2007).

Se tiene conocimiento sobre la aceleración significativa en el crecimiento de estas plantas en condiciones de propagación *in vitro*, lo cual es una ventaja más para la utilización de esta metodología (Malda *et al.*, 1999). En los estudios sobre la micropropagación de las cactáceas, uno de los métodos más utilizados es la generación de brotes a través de la actividad de aréolas, que son las estructuras que contienen las yemas axilares (Retes-Pruneda *et al.*, 2007). La activación de éstas se logra mediante la adición de citocininas al medio de cultivo. En la actualidad hay muchos reguladores de crecimiento con efecto de citocininas, pero las más utilizadas son la 6-bencilaminopurina o benciladenina (BA), la 6 ( $\gamma,\gamma$ -dimetilalilamino) purina o 2-isopenteniladenina (2iP) y la furfurilaminopurina o cinetina (Hubstenberger *et al.*, 1992).

Algunos ejemplos de cactáceas reproducidas con esta tecnología han sido *Astrophytum myriostigma* (Lem), *Mammillaria carmenae* (Lau), *Mammillaria prolifera* (Mill.) Haw y *Trichocereus spachianus* (Lem) (Vyskot y Jara, 1984), *Mammillaria sanangelensis* (Martínez y Rubluo, 1989), *Mediocactus coccineus* Sanchez-Mejorada (Infante, 1992), *Heliocereus elegantissimus* (Britton y Rose) var. *Elegantissimus* (Ortiz-

Montiel y Vargas-Figueroa, 1995), *Mammillaria candida* Salm-Dyck ex K. Schum (Elias-Rocha *et al.*, 1998), *Mammillaria luethyi* G.S. Hinton (Escobedo *et al.*, 2000), *Ferocactus herrerae* G. ORT (Nevarez-Ibarra *et al.*, 2000) y 21 especies de cactáceas mexicanas (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998).

Las investigaciones realizadas se han enfocado a diferentes finalidades, entre ellas se encuentran experimentos que buscan cuál es el mejor tipo de explante para una proliferación *in vitro* entre ápices, tallos y raíces, en medio MS, o sin reguladores de crecimiento (Nevarez-Ibarra *et al.*, 2000). Otro tipo de investigaciones son con fines de conservación y para el mantenimiento de la diversidad genética, donde los explantes iniciales son semillas y así obtener diferentes genotipos; además, es posible lograr más de una sola planta por semilla (Alvarado, 2005).

Benega *et al.* (2009), obtuvieron por primera vez plantas monoploides, haploides y diploides dentro de la familia de las cactáceas con la técnica de cultivo de tejidos, utilizando las anteras de estas especies, con la finalidad de hacer mejoramiento genético, consiguiendo plantas con solo la información de la planta madre, sin la necesidad de la realización de una crucea en donde se comparte la información genética de ambos padres.

Infante (1992), trabajó en la micropropagación de la especie *M. coccineus*, clasificada por Britton y Rose (1963), dentro del grupo de la especie *Selenicereus megalanthus* (actualmente *H. megalanthus*). Utilizó como explante inicial semillas germinándolas en el medio MS. Después de la germinación, el epicótilo o el tallo fue sembrado en el medio MS enriquecido con ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones de 0.05, 0.27 y 0.54  $\mu\text{M}$ , y benciladenina (BA) en concentraciones de 2.2 y 4.4  $\mu\text{M}$ . Después de seis semanas observó que la más alta proliferación se obtuvo en el tratamiento suplementado con 4.4  $\mu\text{M}$  de BA y 0.27  $\mu\text{M}$  de ANA logrando 7.8 brotes.

Mohamed-Yasseen (2002), propuso un procedimiento para la micropropagación de la especie *Hylocereus undatus* con thidiazuron (TDZ) y ácido naftalenacético (ANA). En este proceso utilizó tallos jóvenes como explante inicial, divididos en tres secciones longitudinales (esto fue posible por el tamaño relativamente grande de los tallos) y también probó solo la decapitación de la parte apical. Los resultados obtenidos se analizaron después de cuatro semanas y para los cortes longitudinales obtuvieron la

máxima proliferación *in vitro* de 3.2 brotes con el tratamiento 0.5  $\mu\text{M}$  de TDZ y 0.5  $\mu\text{M}$  de ANA. Sin embargo, los explantes a los que se les realizó el corte apical tuvieron una mejor respuesta y se obtuvieron 8.7 brotes con el mismo tratamiento.

Benega *et al.* (2009), realizaron ginogénesis en plantas trepadoras de los géneros *Selenicereus* e *Hylocereus*, utilizando las hormonas ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y TDZ; y obtuvieron plantas haploides para ambos géneros.

### **Variación Somaclonal**

El comportamiento celular normal es el resultado de una compleja cascada de programas genéticos que son sensibles a la disrupción por estreses bióticos y abióticos. El cultivo *in vitro per se* puede ser muy estresante para las células vegetales e involucra procesos mutagénicos durante el establecimiento del explante, la inducción de callo, la formación de embriones y la regeneración de plantas. Por esta vía es posible obtener variación, de origen nuclear y/o citoplasmática, que podría ser utilizada para el mejoramiento vegetal. Este proceso denominado variación somaclonal por Larkin y Scowcroft (1981), involucra cambios en las plantas regeneradas que son transmitidos a la progenie. Asimismo, cabe citar la ocurrencia *in vitro* de interacciones no específicas que originan cambios en la expresión genética que no generan variación estable y transmisible (no hereditaria), denominados variación epigenética. Algunos autores los consideran dentro de la variación somaclonal mientras que otros sólo incluyen en la misma los cambios estables y heredables (Santos-Díaz y Ochoa-Alejo, 1992). En el cultivo *in vitro* se puede desarrollar variación somaclonal y variación epigenética (Pierik, 1990).

Los mecanismos por los cuales ocurre la variación somaclonal no han sido completamente dilucidados, pero entre sus causas se mencionan alteraciones en el cariotipo, mutaciones puntuales, recombinación somática e intercambio de cromátidas hermanas, rearrreglos génicos somáticos, elementos genéticos transponibles, amplificación y/o metilación del ADN y cambios en el ADN de los organelos. Aunque los caracteres morfológicos (como por ejemplo el hábito de crecimiento, la morfología floral, etc.) son fáciles de evaluar, muchos aspectos de la variación suceden sin

manifestarse en cambios morfológicos evidentes. Una diferencia estructural en un producto génico puede no alterar su actividad biológica lo suficiente como para producir un fenotipo modificado.

Los cambios producidos son generalmente indeseables ya que la idea es mantener clonas con las mismas características de la planta madre, pero la aparición ocasional de caracteres no encontrados en las poblaciones naturales y que representan una ventaja desde el punto de vista agronómico, permite utilizar este fenómeno en programas de mejora vegetal. Se ha utilizado en algunos casos para conferir caracteres deseables a cultivares de importancia económica, entre los que se incluyen resistencia a enfermedades, tolerancia a suelos ácidos y a salinidad. El desarrollo de nuevos cultivares por esta técnica involucra un balance entre la cantidad de variación inducida y el mantenimiento de los caracteres agronómicos del cultivar. Conocer la naturaleza de las variaciones es importante en el mejoramiento de las plantas, debido a que si no se conocen los mecanismos de control se convertirá en una desventaja cuando se pretende la uniformidad de los cultivos (Santos-Díaz y Ochoa-Alejo, 1992).

Las probabilidades de presentarse una variación somaclonal, mutación y una variación epigenética depende del método utilizado en la propagación *in vitro*, la utilización de una quimera como planta madre, el tipo de regulador que se utilice, el tejido con el cual se trabaje, la planta madre, y el número de repicados (son las veces en que un mismo explante es sembrado en un medio de cultivo) (Pierik, 1990).

La comprensión de los mecanismos por los cuales ocurre la variación somaclonal ayudará a entender y definir los procesos celulares de respuesta al estrés y permitirá precisar cómo los mismos actúan en los procesos de evolución (Kaepler *et al.*, 2000). Es evidente que los mecanismos que operan para inducir variación son numerosos y diversos, y probablemente actúan simultáneamente conduciendo a cambios en caracteres cualitativos y cuantitativos. Detectar y analizar los distintos niveles de modificaciones genómicas generadas por cultivo *in vitro* reviste interés desde un punto de vista práctico, ya que podrían ser potentes fuentes de material para seleccionar caracteres de interés y, desde un punto de vista teórico debido a que posibilitarían realizar estudios básicos acerca de la variación y el posible control de la misma. La ocurrencia de variación

somaclonal puede detectarse con marcadores fenotípicos, bioquímicos y moleculares. La correlación de dichos marcadores con caracteres agronómicos es un requisito relevante para su implementación en los programas de mejoramiento (Kaeppler *et al.*, 2000).

### **Identificación de Especies con Marcadores Moleculares**

La identificación de especies y variedades de plantas se ha basado tradicionalmente en la descripción de los caracteres observables (marcadores morfológicos), sin embargo, esta descripción es lenta debido al gran número de caracteres que hay que observar y a la necesidad de hacerlo en condiciones controladas para minimizar la variabilidad natural de éstos. La identificación de cultivares (plantas seleccionadas con características deseables y que al propagarse conserven estas características), se puede realizar con las huellas de ADN, especialmente en genotipos con alta variación genética entre cultivares (ejemplo: entre los cítricos, naranjas con limones) y muy poca dentro del cultivar (ejemplo: diferentes variedades de limones). Tales ejemplos son encontrados en plantas de propagación vegetativa derivados de especies de polinización cruzada como la mayoría de los frutales (Nelson, 1996).

Una serie de técnicas moleculares desarrolladas en los últimos veinte años permiten conocer la información genética que los organismos portan. Funcionan como señalizadores de diferentes regiones del genoma y se los conoce en forma genérica como marcadores moleculares (Cenis, 2000). Estos evidencian variaciones (polimorfismos) en la secuencia del ADN entre dos individuos que modifiquen o no su fenotipo. Son de utilidad en estudios evolutivos y de genética poblacional, manejo de bancos de germoplasma, identificación, protección legal de germoplasma, mapeo, selección asistida por marcadores y clonado de genes. Para que un carácter sea considerado un marcador genético debe mostrar una variación experimentalmente detectable entre los individuos de la población y un modo de herencia predecible según las leyes de Mendel. Esta variación puede ser considerada a diferentes niveles biológicos, desde cambios fenotípicos heredables significativos, hasta la variación de un solo nucleótido. Un marcador ideal debe ser: altamente polimórfico o variable dentro y entre especies, de herencia mendeliana no epistática (sin interacción entre genes), insensible a los efectos



ambientales, codominante, de rápida identificación y simple análisis, y de posible detección en los estadios tempranos del desarrollo de la planta. En los análisis genómicos, se han utilizado varios tipos de marcadores genéticos como isoenzimas, proteínas y marcadores basados en ADN (Cenis, 2000).

Un marcador de ADN es simplemente un punto de referencia en un cromosoma que puede o no corresponder a un gen. Diversas técnicas de biología molecular se encuentran disponibles para detectar variabilidad en la secuencia de ADN. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las enzimas de restricción, la separación electroforética de los fragmentos de ADN, las sondas marcadas y las hibridaciones son algunas de las técnicas que permiten obtener un número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares y cubrir la totalidad del genoma de un organismo (Valadez y Günter, 2000).

Los marcadores moleculares basados en el ADN se clasifican en tres grupos con base en la técnica que se utiliza para su identificación: los de hibridación, los de PCR y los mixtos que combinan PCR o sus productos de ADN con la hibridación. Los marcadores que se utilizan con más frecuencia son los RFLPs (polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción) que pertenecen a los de hibridación, los RAPDs (fragmentos polimórficos amplificados al azar) corresponden a PCR y los AFLPs (polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados) se ubican en los mixtos; de ellos, los RAPDs tienen las ventajas de ser muy fáciles de realizar, analizar y cubrir densamente el genoma (Nuez y Carrillo, 2000).

### **Amplificación del ADN con PCR**

La técnica de PCR fue desarrollada por Mullis y Faloona (1987) para generar una gran cantidad de copias de un fragmento diana de ADN. Esta técnica requiere de la síntesis de fragmentos con secuencias idénticas a las que flanquean al fragmento de ADN que se va a amplificar, llamados oligonucleótidos, iniciadores o cebadores. Varios factores afectan la especificidad del iniciador para la secuencia molde como el tamaño del oligonucleótido, temperatura de alineamiento, concentración de magnesio y la

estructura secundaria de la secuencia del molde y del oligonucleótido (Henson y French, 1993).

El uso de la PCR se incrementó rápidamente con la introducción en 1988 de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq). La enzima de esta bacteria soporta altas temperaturas lo que simplificó enormemente la técnica de PCR, ya que permitió su automatización, realizándose en un aparato llamado termociclador (Henson y French, 1993).

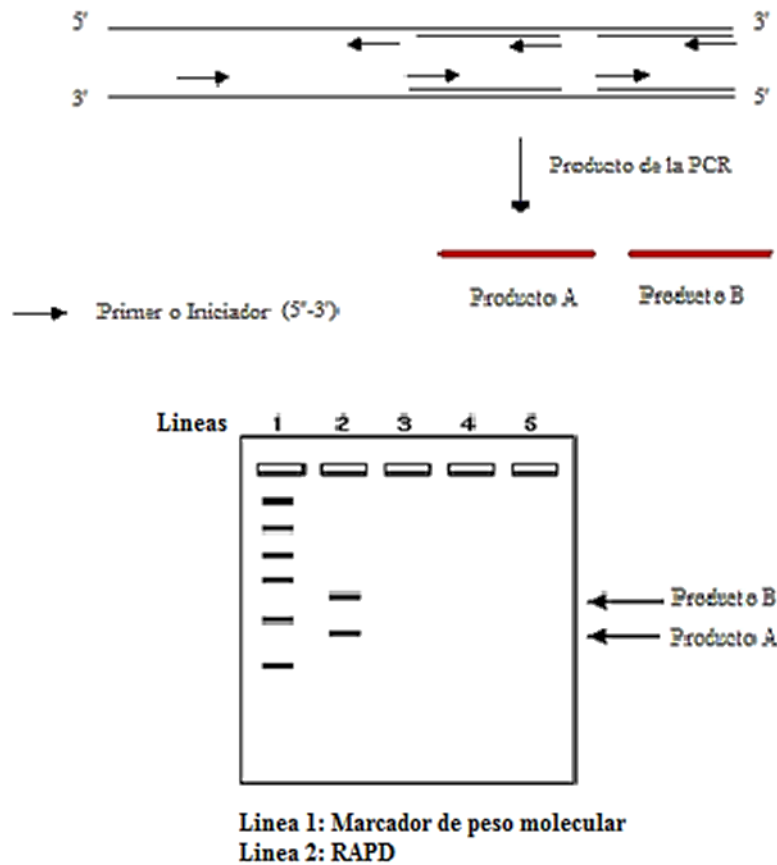
La amplificación del ADN ocurre en un proceso cíclico de 3 pasos modulados por cambios de temperatura: desnaturalización, alineamiento y extensión o polimerización.

En la fase de desnaturalización, el ADN a copiar se somete a temperaturas de 90 a 96 °C con lo que las cadenas se abren. La fase de alineamiento implica la unión de los iniciadores al ADN que se va a copiar por descenso de la temperatura en una gama de 50 a 68 °C (la temperatura es determinada por la longitud y constitución nucleotídica de los iniciadores). Finalmente en la fase de extensión la enzima Taq polimerasa hace uso del ADN molde y de los desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP) y copia la secuencia del ADN a partir de los iniciadores, lo cual genera una nueva cadena de ADN complementaria a la secuencia diana, esta fase se realiza a 72 °C.

Al finalizar cada ciclo se duplica el número de fragmentos de ADN. Un ciclo típico tiene una duración de 2 a 5 min y una reacción completa requiere de 25 a 35 ciclos con los que se puede incrementar el ADN hasta  $10^5$  veces (Powledge, 1999). Cabe señalar que en la mayoría de las reacciones hay dos pasos que no forman parte de los ciclos, un paso inicial de desnaturalización para asegurar que todo el ADN que se utilice como molde esté efectivamente desnaturalizado, y uno final de polimerización que pretende completar todas aquellas copias de ADN que no se hallan extendido completamente (Newton y Graham, 1997; Smeltzer, 1998). Generalmente el ADN amplificado se detecta con luz ultravioleta por tinción con bromuro de etidio después de una electroforesis en gel de agarosa (Rosales, 2002).

### **Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados al Azar (RAPDs)**

La técnica de RAPDs es un método para analizar polimorfismos en ADN basado en la amplificación al azar de segmentos de ADN con un solo iniciador que tiene una secuencia arbitraria de nucleótidos (Williams *et al.*, 1993). Los iniciadores son cortos, su tamaño varía de 9 a 12 nucleótidos y su secuencia hibrida en áreas con suficiente afinidad a secuencias de ADN cromosomal a baja temperatura de alineación, y pueden iniciar una amplificación de regiones del genoma de cualquier organismo. Si dos iniciadores se alinean dentro de pocas kilobases cada uno en orientación adecuada (alineando en cadenas opuestas y extremos 5' cabeza con cabeza), el resultado será un producto de PCR con longitud molecular correspondiente a la distancia entre los dos iniciadores. Cada segmento amplificado deriva de una región que contiene dos segmentos cortos de ADN con alguna homología con el iniciador. Estos segmentos deben estar presentes en cadenas complementarias de ADN y ubicados lo suficientemente cerca para que ocurra la amplificación del ADN (Rafalski y Tingey, 1993). Los productos amplificados se separan en un gel de agarosa por electroforesis y se obtendrá un patrón de bandas característico para la especie (Figura 2) (Olive y Bean, 1999). Las especies, e individuos dentro de una especie pueden revelar regiones con distintas secuencias de nucleótidos (polimorfismos) que los caracterizan y diferencian de otras especies e individuos. Los fragmentos polimórficos entre individuos son definidos por la presencia o ausencia de una banda en particular. Los polimorfismos borrosos pueden ser el resultado de una discriminación pobre de un iniciador entre la alternativa de unirse a un sitio por una diferencia en la secuencia de nucleótidos (Williams *et al.*, 1993). El polimorfismo funciona como marcador genético y puede ser utilizado para la construcción de mapas filogenéticos.



**Figura 2.** Diagrama de las etapas de la técnica de identificación de polimorfismo del ADN por RAPD.

De acuerdo con Tingey y Del Tufo (1993), cada iniciador en promedio dirigirá la amplificación de varios loci discretos en el genoma, permitiendo seleccionar secuencias polimórficas de nucleótidos entre individuos. El número y tamaño de los fragmentos dependerá de la secuencia de nucleótidos del iniciador y la fuente de ADN, resultando en una huella de ese genoma o de la fracción aleatoria del ADN amplificado. El número de bandas puede ser muy alto dada la cantidad de iniciadores disponibles (1200) considerando solamente los de Operon Technologies y el número de bandas producidas por cada uno, sin embargo, también existen iniciadores que no amplifican ninguna banda.

La principal ventaja de los marcadores moleculares del tipo RAPD es que se pueden utilizar para crear un huella digital genómica en especies en las cuales no se conoce la secuencia que se va a amplificar (Williams *et al.*, 1993). Además el protocolo es relativamente rápido y fácil de realizar y solamente se necesitan nanogramos de ADN. El uso de esta técnica para identificación es recomendable cuando la diferencia entre los genomas a comparar es de 1-10%.

La naturaleza dominante de los marcadores de ADN puede ser una desventaja debido a que la identificación de heterocigotos no es posible, aparte de que los resultados pueden sufrir variaciones aun usando termocicladores del mismo fabricante e igual modelo (Williams *et al.*, 1993).

Los RAPDs se han utilizado en la identificación de cultivares y clones de cactáceas. Mondragón-Jacobo (2003), estudió 32 colectas de nopal de la región Centro de México, incluyendo cultivares comerciales y selecciones de nopal de tuna y verdura. Probó 46 iniciadores de diez bases de los cuales seleccionó nueve, asociados con 56 bandas polimórficas y logró agrupar las colectas en once grupos discretos.

García-Zambrano *et al.* (2006), estimaron la diversidad genética de 100 accesiones de nopal que forman el Banco de Germoplasma de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Los 20 marcadores utilizados detectaron la existencia de duplicados simples y múltiples, por ejemplo las accesiones Octubreña T-39, Amarillo 2289 T32 L y Octubreña presentan como duplicado a Cardón Rojo, Fafayucan T-23 y Colorada T6, respectivamente, teniendo estas accesiones la característica de ser usadas para obtener fruta.

Tel-Zur *et al.* (2004b), utilizaron RAPDs para la identificación de clones del género *Hylocereus* y *Selenicereus* y analizaron las bandas polimórficas obtenidas con un dendrograma basado en una matriz de datos con respecto a 173 bandas polimórficas generadas con nueve iniciadores de la serie OPA (8, -9, -10, -11, -12, -15, 16, -17 y -20).

## **Análisis de Agrupamiento (Cluster)**

El análisis de cluster se refiere al conjunto de técnicas estadísticas cuyo propósito es agrupar individuos u objetos con base a sus propias características, de tal manera que los individuos con descripciones similares queden dentro del mismo grupo o cluster. Los clusters resultantes exhibirán una máxima homogeneidad interna (dentro del cluster) y una máxima heterogeneidad externa (entre clusters) (Mohammadi y Prasanna, 2003).

Los métodos de clustering basados en distancias pueden ser divididos en: jerárquicos y no jerárquicos. Los métodos jerárquicos son los más empleados en estudios de diversidad genética, estos métodos reconstruyen la jerarquía completa de los objetos analizados (el llamado "árbol o dendrograma"), sea en orden ascendente o en orden descendente. Los métodos no jerárquicos prevén que el usuario haya definido previamente el número de grupos en los cuales se dividen los objetos analizados. El análisis por dendrogramas requiere:

1. El primer paso es calcular las distancias entre todos los pares de objetos. Esto es lo mismo que asumir que cada objeto constituye un cluster:  $\{C_1, \dots, C_N\}$ .
2. Se buscan los dos clusters más cercanos ( $C_i, C_j$ ), éstos se juntan y constituyen uno solo  $C_{ij}$ .
3. Se repite el paso 2 hasta que no quedan pares de comparación.

Y finalmente, se representan como árboles binarios.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización del Sitio Experimental

El trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular, en el Edificio Alfa del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), ubicado en el municipio de San Luis Potosí, San Luis Potosí.

### Material Vegetal

Para iniciar la propagación, se utilizaron semillas de las especies *Hylocereus megalanthus* procedentes de Canadá (20 semillas de la Empresa Rareseeds), de Suiza (20 semillas de la Empresa Succseed, Valsangsvagen 24 Se- 633 69 Skogstorp, Sweeden) y de Italia (20 semillas de la Empresa Rarefruit). En el caso de *Hylocereus undatus*, las semillas se obtuvieron de una fruta adquirida en un supermercado de San Luis Potosí, procedente del estado de Yucatán.

Se obtuvo una muestra de *Hylocereus* sp. cultivada *in vitro* por donación de la UNAM-FESC y de *Opuntia streptacantha* cultivada *in vivo* en la cámara bioclimática del IPICYT, para comparar los RAPDs de *H. megalanthus* y de *H. undatus* con otras cactáceas.

### Reactivos y Medios de Cultivo

En general, los reactivos que se utilizaron en la preparación de las soluciones son de la marca Sigma-Aldrich y J. T. Baker. El agar para el medio de cultivo de tejidos es Bioxón y los reguladores de crecimiento son de la empresa Phytotechnology.

**Micropropagación de *Hylocereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer e *Hylocereus undatus* (Berger) Britton & Rose**

### Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS)

El medio MS se preparó a partir de las soluciones base concentradas de sales minerales (Cuadro 4), y de las soluciones concentradas de vitaminas (Cuadro 5). Todos los compuestos se disuelven en agua destilada estéril, y las sales minerales se almacenan a 4 °C y las vitaminas a -20 °C.

**Cuadro 4.** Soluciones base para preparar el medio MS.

Solución	Compuesto	Concentración final (mg L <sup>-1</sup> )	Concentración del stock 100X (g L <sup>-1</sup> )
MS I	Nitrato de amonio	1650.0	165
	Nitrato de potasio	1900.0	190
MS II	Sulfato de magnesio	342.5	34.25
	Sulfato de manganeso	16.9	1.69
	Sulfato de zinc	8.6	0.86
	Sulfato de cobre	0.025	0.0025
MS III	Cloruro de calcio	440.0	44.0
	Yoduro de potasio	0.83	0.083
	Cloruro de cobalto	0.025	0.0025
MS IV	Fosfato de potasio monobásico	70.0	7.0
	Ácido bórico	6.2	0.62
	Molibdato de sodio dihidratado	0.25	0.025
MS V	Sulfato ferroso heptahidratado	27.8	2.78
	EDTA dihidratado	37.3	3.73

**Cuadro 5.** Solución base de vitaminas para preparar el medio MS.

Compuesto	Concentración final (mg L <sup>-1</sup> )	Concentración del Stock 1000X (mg mL <sup>-1</sup> )
Mioinositol	100.0	100.0
Tiamina	10.0	10.0
Ácido nicotínico	1.0	1.0
Piridoxina	1.0	1.0



## Germinación de semillas de las cactáceas para obtención de los explantes

Para la obtención de los explantes se realizó el siguiente protocolo:

1. Lavar las semillas 5 veces (3-5 min c/u) con agua corriente con unas gotas de jabón líquido (Dermocleen). Usar agitador magnético (para todo el proceso y no usar una velocidad alta ya que se pueden dañar las semillas).
2. Lavar por 30 s con etanol al 70%.
3. Eliminar rápidamente el etanol y enjuagar 2 veces con agua corriente.
4. Desinfectar con detergente comercial a base de hipoclorito de sodio (concentración 5% p/p y diluido al 15% v/v) por 20 min bajo agitación suave. Llenar el recipiente hasta 1.5 cm antes del borde, tapar bien con papel aluminio y no volver a abrir hasta estar en la campana de flujo laminar.
5. Llevar el vaso de precipitados aun tapado a la campana de flujo laminar. Eliminar el detergente y enjuagar las semillas 3 veces con agua destilada estéril.
6. Distribuir las semillas en los recipientes con el medio MS. Usar pinzas estériles (flameadas).
7. Sellar y etiquetar los recipientes de cultivo.
8. Revisar el material a los 5-7 días y eliminar los recipientes contaminados.

## Selección del explante

Después del proceso de germinación en medio MS sin reguladores de crecimiento, para *H. megalanthus* se realizó la selección de una sola planta que presentó las mejores características fisiológicas *in vitro*. Esta obtuvo después de 8 semanas un tamaño superior a 5 cm, y generó brotes adventicios, lo cual permitió realizar una primera división de los brotes, separándolos de la planta madre al alcanzar un tamaño aproximado de 1.5 a 2 cm, y se establecieron de nuevo en medio MS. Este proceso se repitió hasta obtener una buena cantidad de material vegetal (cuarenta y cuatro explantes), suficiente y homogéneo para evaluar posteriormente todos los tratamientos hormonales y no tener variación genética al comienzo del proceso de micropropagación. Para *H. undatus* se seleccionaron cuarenta y cuatro plantas que *in vitro* hayan obtenido un tamaño de 1 a 2 cm, en cuatro semanas después de su siembra.

## Tratamientos hormonales para la obtención del mayor número de brotes

Se probaron diferentes auxinas, citocininas, concentraciones y combinaciones de éstas, con las cuales se establecieron diez tratamientos hormonales (T1 a T10) y un testigo (T11) que se indican en el Cuadro 6.

Las soluciones concentradas de hormonas se prepararon de la siguiente manera:

Se ensayaron tres auxinas [auxina 1-ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), auxina 2-ácido naftalenacético (ANA) y auxina 3-ácido indol acético (AIA)]. Para preparar un stock de  $1.0 \text{ mg mL}^{-1}$  de las auxinas 1, 2 y 3, se pesaron 100 mg respectivamente y se disolvieron en 1.0 mL de NaOH 1N, se aforó a 100 mL con agua desionizada y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

También se utilizaron tres citocininas [citocinina 1- isopentil-adenina (2iP), citocinina 2-benciladenina (BA) y citocinina 3-feniltidiazol-urea (Thidiazurón-TDZ)]. Para preparar un stock de  $1.0 \text{ mg mL}^{-1}$  de las citocininas 1, 2 y 3, se pesaron 100 mg respectivamente y se disolvieron en 1.0 mL de NaOH 1N, se aforó a 100 mL con agua desionizada y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Cuadro 6.** Tratamientos hormonales que se probaron para la obtención del mayor número de brotes de *H. megalanthus* y *H. undatus*.

Tratamientos (Concentración hormonal final en $\text{mg L}^{-1}$ )	Relación Auxina/Citocinina (Concentración en $\mu\text{M}$ )
<b>T1-</b> MS + $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ANA, $1 \text{ mg L}^{-1}$ BA	Aux 2 [ $2.69 \mu\text{M}$ ] < Cit 2 [ $4.44 \mu\text{M}$ ]
<b>T2-</b> MS + $0.05 \text{ mg L}^{-1}$ ANA, $1 \text{ mg L}^{-1}$ BA	Aux 2 [ $0.27 \mu\text{M}$ ] < Cit 2 [ $4.44 \mu\text{M}$ ]
<b>T3-</b> MS + $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ AIA , $3 \text{ mg L}^{-1}$ BA	Aux 3 [ $2.85 \mu\text{M}$ ] < Cit 2 [ $13.32 \mu\text{M}$ ]
<b>T4-</b> MS + $1 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP	Aux [ $0 \mu\text{M}$ ] < Cit 1 [ $4.92 \mu\text{M}$ ]
<b>T5-</b> MS + $3 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP	Aux [ $0 \mu\text{M}$ ] < Cit 1 [ $14.76 \mu\text{M}$ ]
<b>T6-</b> MS + $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ TDZ	Aux [ $0 \mu\text{M}$ ] < Cit 3 [ $2.27 \mu\text{M}$ ]
<b>T7-</b> MS + $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D, $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ TDZ	Aux 1 [ $0.45 \mu\text{M}$ ] < Cit 3 [ $2.27 \mu\text{M}$ ]
<b>T8-</b> MS + $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D, $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ TDZ	Aux 1 [ $0.9 \mu\text{M}$ ] < Cit 3 [ $2.27 \mu\text{M}$ ]
<b>T9-</b> MS + $0.25 \text{ mg L}^{-1}$ ANA , $1 \text{ mg L}^{-1}$ BA	Aux 2 [ $1.35 \mu\text{M}$ ] < Cit 2 [ $4.44 \mu\text{M}$ ]
<b>T10-</b> MS + $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ANA, $1 \text{ mg L}^{-1}$ BA	Aux 2 [ $0.54 \mu\text{M}$ ] < Cit 2 [ $4.44 \mu\text{M}$ ]
<b>T11-</b> MS sin hormonas (testigo)	Aux [ $0 \mu\text{M}$ ] = Cit [ $0 \mu\text{M}$ ]

Se utilizaron tallos de 2 cm de longitud para *H. megalanthus* y tallos de 1 a 2 cm para *H. undatus*, descartando las raíces, cotiledones y la parte apical de los tallos, para estimular la proliferación de brotes adventicios, con la finalidad de obtener una organogénesis directa. Se realizó un repicado o resiembra a las cuatro semanas.

#### Aclimatación

Se eligieron los brotes de *H. megalanthus* obtenidos con el tratamiento 4 (1.0 mg L<sup>-1</sup> 2iP) y de *H. undatus* con el tratamiento 6 (0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ), porque con ellos desarrollaron raíces y así eliminar la etapa de enraizamiento. Estos fueron separados y trasplantados a macetas con sustrato peat-moss y colocados en una cámara bioclimática con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad; riego de 200 mL cada tercer día; temperaturas de 24°C para día y 18 °C de noche. Las macetas fueron cubiertas con una bolsa de plástico para aclimatar gradualmente a las plantas provenientes de cultivo de tejido. Después de cuatro semanas de aclimatación, se tomaron 30 plantas y se colocaron en una maceta individual con soporte de madera para continuar con su crecimiento y desarrollo al exterior bajo la protección de una malla sombra 70. Las condiciones ambientales fueron las del mes de junio con una temperatura promedio máxima de 28°C y mínima de 14°C, y una precipitación de 2.1 cm<sup>3</sup>. El riego siguió siendo de 200 mL cada tercer día. El mismo número de plantas obtenidas en iguales circunstancias se pusieron a crecer sin la protección de la malla sombra 70.

#### **Caracterización Molecular de Brotes de *H. megalanthus* y *H. undatus* Mediante RAPDs**

##### Extracción de ADN

Para determinar el protocolo adecuado de extracción de ADN para estas cactáceas, se probaron los protocolos de Dellaporta *et al.* (1983) modificado, el de Sánchez-Hernández y Gaytán-Oyarzún (2006), y el De la Cruz *et al.* (1997).

Se extrajo el ADN de los brotes obtenidos de *H. megalanthus* y *H. undatus* con el protocolo modificado de Dellaporta que resultó ser el mejor para estos materiales, en el que se repitió del paso 6 al 9 tres veces, debido a que por ser cactáceas contienen un elevado grado de fibras y polisacáridos que impiden una extracción exitosa de ADN con el protocolo original. El buffer de extracción que se utilizó consistió de: Tris HCl 100 mM pH 8, EDTA 50 mM y NaCl 500 mM. El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. En un tubo Eppendorf congelar 50 mg de tejido en nitrógeno líquido y triturar con pistilo.
2. Adicionar 480  $\mu$ L de buffer de extracción y moler.
3. Añadir 37.5  $\mu$ L de SDS 20% y mezclar.
4. Calentar a 65 °C por 10 min.
5. Enfriar a temperatura ambiente.
6. Agregar 94  $\mu$ L de acetato de potasio 5M y mezclar (precipita proteínas).
7. Colocar en hielo por 5 min.
8. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min.
9. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
10. Repetir desde el paso 7 dos veces más.
11. Agregar 600  $\mu$ L de cloroformo y mezclar con vortex.
12. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min.
13. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
14. Agregar 8  $\mu$ L de RNAsa, con una concentración final de 4 mg mL<sup>-1</sup>, incubar a 37 °C por 1 h.
15. Añadir 600  $\mu$ L de isopropanol frío y mezclar.
16. Incubar a -20 °C por 30 min o más.
17. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min.
18. Lavar la pastilla con 400  $\mu$ L de etanol al 70%.
19. Centrifugar a 13,000 rpm por 2 min.
20. Eliminar el etanol y secar en termoblock a 50 °C.
21. Resuspender en 50  $\mu$ L de agua Milli Q y almacenar a -20 °C.

### Amplificación de fragmentos polimórficos de ADN al azar (RAPDs)

Para la amplificación de fragmentos RAPD con PCR, primero se probaron tres concentraciones de  $MgCl_2$  y por ello se ensayaron tres mezclas maestras para un volumen de 25  $\mu L$ , cuyos componentes y volumen por reacción se indican en los Cuadros 7, 8 y 9.

#### **Cuadro 7.** Mezcla maestra 1 para la amplificación de fragmentos RAPDs.

Reactivos	Volumen para una reacción (conc.)
Agua bidestilada	16.85 $\mu L$
Mezcla de dNTPs	0.5 $\mu L$ (0.2mM)
Amortiguador ADN Taq polimerasa (10X)	2.5 $\mu L$ (1X)
$MgCl_2$ (25 mM)	1.5 $\mu L$ (1.5mM)
ADN	1.0 $\mu L$ (100 ng)
ADN Taq polimerasa	0.15 $\mu L$ (5U. $\mu L^{-1}$ )
Iniciador	2.5 $\mu L$ (1mM)

#### **Cuadro 8.** Mezcla maestra 2 para la amplificación de fragmentos RAPDs.

Reactivos	Volumen para una reacción (conc.)
Agua bidestilada	16.35 $\mu L$
Mezcla de dNTPs	0.5 $\mu L$ (0.2mM)
Amortiguador ADN Taq polimerasa (10X)	2.5 $\mu L$ (1X)
$MgCl_2$ (25 mM)	2.0 $\mu L$ (2mM)
ADN	1.0 $\mu L$ (100 ng)
ADN Taq polimerasa	0.15 $\mu L$ (5U. $\mu L^{-1}$ )
Iniciador	2.5 $\mu L$ (1mM)

#### **Cuadro 9.** Mezcla maestra 3 para la amplificación de fragmentos RAPDs.

Reactivos	Volumen para una reacción (conc.)
Agua bidestilada	15.85 $\mu L$
Mezcla de dNTPs	0.5 $\mu L$ (0.2mM)
Amortiguador ADN Taq polimerasa (10X)	2.5 $\mu L$ (1X)
$MgCl_2$ (25 mM)	2.5 $\mu L$ (2.5mM)
ADN	1.0 $\mu L$ (100 ng)
ADN Taq polimerasa	0.15 $\mu L$ (5U. $\mu L^{-1}$ )
Iniciador	2.5 $\mu L$ (1mM)

También se ensayaron tres condiciones de reacción (PCR1, PCR2 y PCR3) para la amplificación del ADN, variando temperatura de alineamiento y tiempos, como se indican en los Cuadros 10, 11 y 12. Estas condiciones se utilizaron con las tres mezclas maestras referidas. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador DNA Bio Rad.

**Cuadro 10.** Condiciones de reacción PCR1 para la amplificación de RAPDs.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
4 ciclos		
Desnaturalización inicial	94	1 min
Alineamiento	36	3 min
Extensión	72	3 min
38 ciclos		
Desnaturalización	94	30 s
Alineamiento	36	45 s
Extensión	72	30 s
Extensión final	72	1 min
Almacenamiento	4	

**Cuadro 11.** Condiciones de reacción PCR2 para la amplificación de RAPDs.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	2 min
38 ciclos		
Desnaturalización	94	30 s
Alineamiento	40	30 s
Extensión	72	1 min 30 s
Extensión final	72	1 min 30 s
Almacenamiento	4	

**Cuadro 12.** Condiciones de reacción PCR3 para la amplificación de RAPDs.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	2 min 30 s
43 ciclos		
Desnaturalización	94	30 s
Alineamiento	35	45 s
Extensión	72	1 min 30 s
Extensión final	72	3 min
Almacenamiento	4	

Además se probaron 20 iniciadores constituidos por 10 nucleótidos, 10 de la serie OPA y 10 de la serie OPB sintetizados por Invitrogen (Cuadro 13).

**Cuadro 13.** Nombre y secuencia de los iniciadores de la serie OPA y OPB utilizados.

Nombre del iniciador	Secuencia (5'-3')	Nombre del iniciador	Secuencia (5'-3')
OPA-11	5'-CAATCGCCGT-3'	OPB-01	5'-GTTTCGCTCC-3'
OPA-12	5'-TCGGCGATAG-3'	OPB-02	5'-TGATCCCTGG-3'
OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'	OPB-03	5'-CATCCCCCTG-3'
OPA-14	5'-TCTGTGCTGG-3'	OPB-04	5'-GGACTGGAGT-3'
OPA-15	5'-TTCCGAACCC-3'	OPB-05	5'-TGCGCCCTTC-3'
OPA-16	5'-AGCCAGCGAA-3'	OPB-06	5'-TGCTCTGCCC-3'
OPA-17	5'-GACCGCTTGT-3'	OPB-07	5'-GGTGACGCAG-3'
OPA-18	5'-AGGTGACCGT-3'	OPB-08	5'-GTCCACACGG-3'
OPA-19	5'-CAAACGTCGG-3'	OPB-09	5'-TGGGGGACTC-3'
OPA-20	5'-GTTGCGATCC-3'	OPB-10	5'-CTGCTGGGAC-3'

#### Análisis de los productos de PCR por electroforesis

Los productos de PCR (alícuotas de 9  $\mu$ L) se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1.5% en TAE 1X. Ésta se efectuó en una cámara horizontal aplicando una corriente de 90 V. Se reveló, tiñendo con bromuro de etidio ( $1\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 15 min y exponiendo a la luz ultravioleta en un fotodocumentador de geles UVP EpiChemi Darkroom con cámara digital CCD. Las imágenes se capturaron con el software LabWorks 4.0.0.8 y se analizaron los datos obtenidos. Para identificar el peso molecular de las bandas amplificadas, se utilizó como referencia un marcador de ADN de peso molecular de 1Kb, cuyo tamaño de bandas oscila de 12,216 pares de bases hasta 75 pares de bases.

#### Análisis de los RAPDs con dendrograma

Para establecer la relación entre los individuos de la especie *H. megalanthus* y además con *H. undatus*, *H. sp.* y *O. streptacantha*, se analizó el marcador molecular

RAPD, a través de un dendrograma de enlace simple, construido con el programa Statistica V.5 97, basados en la utilización de una matriz binaria generada por el programa Cross Checker, tomando en cuenta las bandas generadas por los RAPDs, siendo 1 la presencia y 0 la ausencia de la banda. Solo se tomaron los RAPDs que se generaron en todas las poblaciones tratadas, y éstos correspondieron a los de la serie OPA, y para los de la serie OPB se descartaron OPB02, OPB03, OPB05 y OPB09 por que no generaron bandas polimórficas, dando un total de 244 bandas analizadas.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Micropropagación de *Hylocereus megalanthus* e *Hylocereus undatus*

#### Germinación de las semillas

Existe una gran cantidad de protocolos para la desinfección de semillas y explantes de cactáceas cuyos procedimientos establecidos por los diversos investigadores varían de acuerdo a la especie y tipo de explante pero que han resultado eficientes en el control de hongos y bacterias (Gómez, 2004). El protocolo utilizado en este trabajo fue efectivo debido a que en el establecimiento y germinación de las semillas de *H. megalanthus* y *H. undatus in vitro*, no se presentó contaminación por hongos o bacterias en el medio MS, lo cual cumple con lo indicado por Dodds y Lorin (1986), quienes hacen hincapié en que una de las etapas esenciales para la micropropagación de cualquier especie es la obtención del cultivo aséptico, lo que se logra implementando diferentes técnicas para eliminar todo patógeno del explante.

El porcentaje de germinación para *H. megalanthus* (*sin. S megalanthus*) procedente de la Empresa Succseed-Suiza fue de 30% (6 semillas de 20), para las que se adquirieron en Canadá fue de 35% y las de Italia 30%. *H. undatus* exhibió 90% de germinación (90 semillas de 100) para semillas obtenidas de un fruto fresco originario de Yucatán.

El bajo porcentaje de germinación que presentó *H. megalanthus* se pudo deber a la pérdida de viabilidad ocasionada por la edad de la semilla, y dado que su origen es de empresas productoras de semillas, es difícil señalar que la causa fueran las condiciones de conservación inapropiadas. En la adquisición de la semilla de *H. megalanthus* no pudimos obtener información sobre su origen y edad, por lo que existe la posibilidad de que la mayoría hayan perdido su viabilidad por esta causa. En términos generales las semillas de cactus tienen una buena viabilidad durante un año y pueden seguir germinando durante 2 ó 3 años más, pero con un porcentaje de éxito cada vez menor.

Piña (2000), trabajó con semillas de *F. robusta* y demostró que existe una relación entre la pérdida de viabilidad y la longevidad de la semilla. Las semillas de algunas cactáceas pueden ser viables hasta 10 años después y exhibir un porcentaje alto de

germinación, es el caso de *Ferocactus herrerae* y *F. emoryi* (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000). Se asume que otra causa de la baja germinación, es la sensibilidad de las semillas de algunas especies al desinfectante utilizado, ya sea por su actividad química o por el tiempo de exposición prolongado, el cual puede dañar a la semilla (Gómez, 2004).

El porcentaje de germinación de las semillas conseguidas de frutos frescos es variable y en ello puede influir la edad del fruto y el tiempo posterior a la colecta para la extracción de semillas. Esto explica los resultados de Cuellar-Chávez *et al.* (2006) sobre el bajo porcentaje de germinación (12.9%) para *H. undatus* comparado con 90% que se obtuvo en este trabajo y en el de Morales (2000). Otras cactáceas con un comportamiento variable en la germinación de semillas obtenidos de frutos frescos son: *Stenocereus griseus* (Haw.) 15.2%, *S. queretaroensis* (Weber) 84.1% y *S. gummosus* (Engelm) 60% (Cuellar-Chávez *et al.*, 2006). Además de *Coryphantha retusa* (Britton y Rose) 80% (Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010) y *Myrtillocactus geometrizans* (Mart.) 40-80% (Gómez, 2004).

También se confirmó que las semillas de *H. megalanthus* y de *H. undatus* germinan en medio MS sin reguladores de crecimiento como las citocininas, resultados similares se han obtenido con otras cactáceas como *C. retusa* y *S. griseus* (Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010); no obstante, otras especies si las requieren (Cuellar-Chávez *et al.*, 2006; Ojeda-Zacarías *et al.*, 2008).

#### Crecimiento y desarrollo de plantas madres

Aun cuando la germinación de *H. megalanthus* fue relativamente baja, las plantas obtenidas fueron de buena calidad, no se presentó ahorcamiento del tallo, ni malformaciones de algún órgano. Se seleccionó la planta que primero alcanzó un tamaño superior a los 3.3 cm *in vitro* (Figura 3), y con ella se prosiguió a su reproducción en medio MS hasta conseguir la cantidad adecuada. El proceso duró 3 meses y se obtuvieron 44 explantes de 1.5 a 2 cm de longitud.

Para *H. undatus*, solo se separó el número de semillas germinadas que se iban a ocupar para cada tratamiento, en total fueron 44. Estas plantas alcanzaron un tamaño de

1.5 cm en solo 4 semanas después de haberlas sembrado en medio MS (Figura 4), y con ellas se prosiguió a la proliferación con los distintos tratamientos a ensayar.



**Figura 3.** Planta madre de la especie *H. megalanthus* cultivada *in vitro* a partir de semillas germinadas en medio MS. A) Desarrollo de 3 semanas después de la germinación, con aproximadamente 2 cm de longitud en el epicótilo. B) Desarrollo de 6 semanas después de la germinación, con aproximadamente 5 cm de longitud del epicótilo, además de dos brotes adventicios y raíces adventicias que crecieron a través de todo el tallo.

En este trabajo se demostró que las semillas son buena fuente de explante en el caso de cactáceas, y concuerda con los resultados de Armella *et al.* (2000) que en el proceso de propagación *in vitro* de *Stenocereus gricesus* (Goldman), obtuvieron mejores resultados en la formación de brotes vegetativos a partir de plántulas provenientes de semillas que de aréolas de plantas maduras. En el caso de las cactáceas, cuando se dispone de semillas, estas son mejor alternativa que las aréolas para obtener explantes en condiciones asépticas, debido a que el tejido meristemático ubicado debajo de la aréola se puede dañar cuando éstas se obtienen y es más difícil su asepsia (Comparán-Sánchez y Luna-Martínez, 1994).

De las pequeñas plántulas obtenidas se utilizan tejidos como explantes para la formación de callo, brotes o plántulas (Comparán-Sánchez y Luna-Martínez, 1994). Morales (2000), y Dodds y Lorin (1986), recomiendan el empleo de plántulas

germinadas en forma aséptica para la micropropagación, debido principalmente al bajo grado de contaminación del material vegetal empleado.



**Figura 4.** Plantas madre de la especie *H. undatus*, a partir de la germinación de semillas en medio MS, con un tamaño de 1.5 cm en 4 semanas después de haberlas sembrado.

Comparando el crecimiento y desarrollo de las plantas madres de las especies *H. megalanthus* y *H. undatus* después de la germinación (Figura 3 y Figura 4), se observaron diferencias entre ellas; en *H. megalanthus* desde las primeras semanas se empezó a notar que el lóbulo se encuentra hundido, característica de esta especie, los cotiledones son más grandes midiendo 1.5 cm tomando en cuenta ambos, las raíces son bastante ramificadas y gruesas teniendo un color verde. En *H. undatus* las raíces solo provienen del hipocotíleo, son delgadas y poco ramificadas, los cotiledones miden 0.5 cm contando los dos, las espigas se encuentran más cercanas, y la elongación del epicótilo o tallo es más lenta.

El desarrollo de plántulas en el medio básico de MS o adicionado con reguladores de crecimiento es diferente para las diversas especies de cactáceas y depende de sus características genéticas y adaptabilidad a las condiciones del medio. En el caso de *H. undatus*, Morales (2000), no describe el desarrollo de las plántulas obtenidas por germinación de semillas *in vitro*; y Loeza (2002) refiere que obtuvo plantas de esta especie a partir de semillas en medio básico MS y que estas plantas en 4 meses

desarrollaron brotes de 1 cm de longitud pero tampoco describe su desarrollo. Por otro lado, Cuellar-Chávez *et al.* (2006) refieren que las plántulas formadas en medio MS suplementado con BA 2 mg L<sup>-1</sup> y Kinetina (K) 1 mg L<sup>-1</sup> presentaron oxidación, los brotes fueron largos, delgados y cloróticos, sin embargo, al subcultivarlas en medio fresco, estos mostraron recuperación de la morfología normal.

El desarrollo normal de las plántulas de *H. megalanthus* obtenidas a partir de semilla coincide con la única investigación encontrada al respecto, que es la de Benega-García *et al.* (2009), que a diferencia de lo efectuado en este trabajo, ellos lo hacen con embriones obtenidos de anteras y describen que obtuvieron una elevada cantidad de embriones androgénicos de *H. megalanthus* (*sin. S megalanthus*), y el 99% de ellos desarrolló en medio MS plántulas normales, a temperatura de 24 ± 2 °C, alta humedad relativa y un fotoperíodo de 16 h de luz blanca. En contraste, solo se obtuvo de las anteras un embrión androgénico de *H. undatus* y *H. polyrhizus*, debido a que éstas desarrollaron callo y a partir de ellos por doble subcultivo en medio MS no se diferenciaron a plántulas. Este comportamiento puede ser un indicador de una mayor estabilidad celular de *H. megalanthus* a las condiciones ambientales.

#### Proliferación de brotes y obtención de plantas *in vitro*

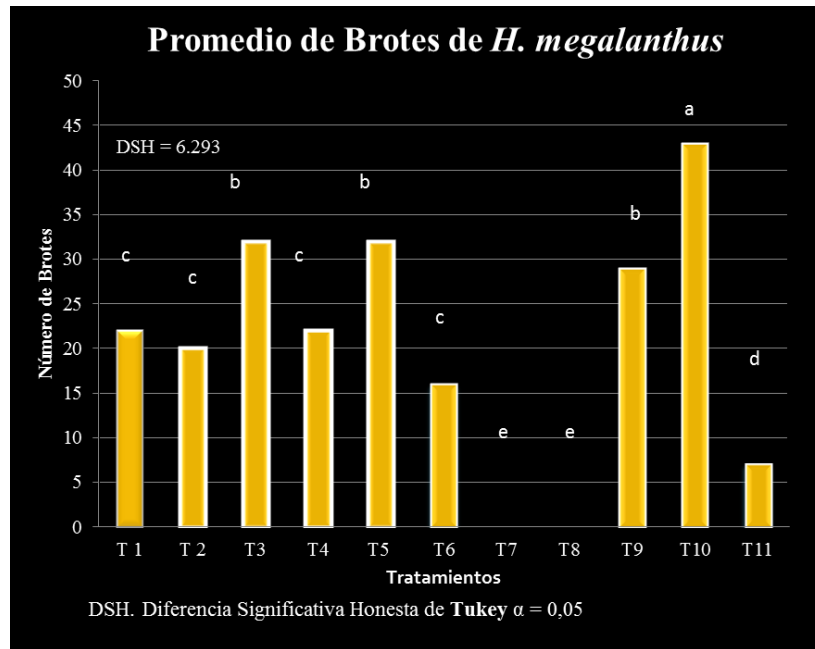
La respuesta a los 10 tratamientos hormonales probados para lograr el mayor número de brotes fue diferente en ambas especies. Una descripción detallada de la respuesta del explante a cada tratamiento para *H. megalanthus* se presenta en el Cuadro 14 y el análisis estadístico con la prueba de Tukey  $\alpha= 0.05$  del número de brotes desarrollados por los explantes, generó los siguientes grupos: a) T10, b) T3, T5 y T9, c) T1, T2, T4 y T6, d) T11 y e) T7 y T8; e indicó que el tratamiento 10 (medio MS adicionado con 0.1 mg L<sup>-1</sup> de ANA y 1 mg L<sup>-1</sup> de BA) fue el mejor para esta especie, obteniendo un promedio de 43 brotes en las cuatro repeticiones (Figura 5).

Para *H. undatus* el promedio del número de brotes generados en los 11 tratamientos y su agrupación con respecto a la prueba de Tukey  $\alpha = 0.05$ , se muestran en la Figura 6. Se generaron 4 grupos: a) T6, b) T1, T5, y T9; c) T1, T9 y T10; d) T2, T3, T4, T7, T8, T9,

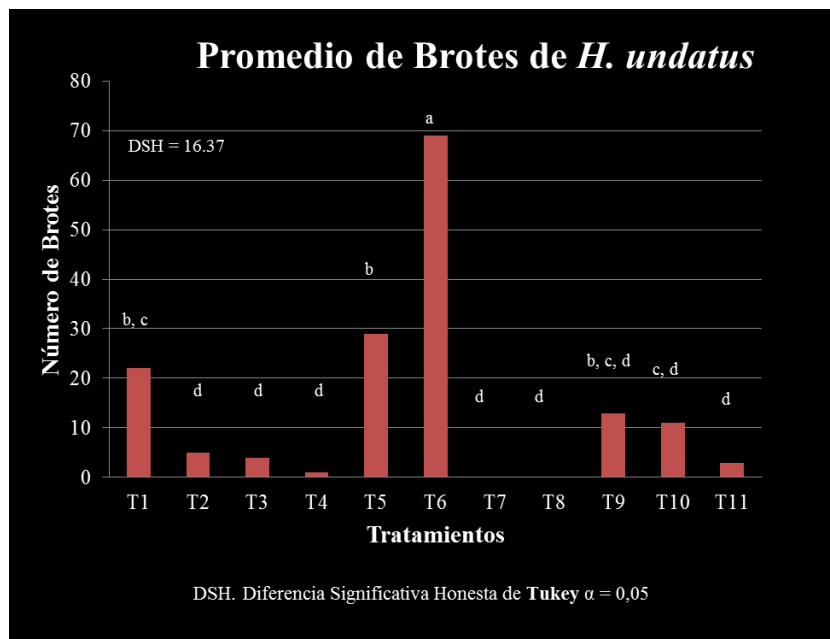
T10 y T11. El mejor tratamiento fue el 6 (medio MS con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de TDZ) y con él se obtuvo en promedio 69 brotes en las cuatro repeticiones.

**Cuadro 14.** Respuesta de los explantes de *H. megalanthus* a los 11 tratamientos utilizados.

Tratamiento	Respuesta
T1	Tejido calloso, 60%. Hubo desarrollo de raíces no mayores a 1 cm de longitud, y un promedio de 22 brotes, la mayoría menores a 1cm.
T2	No hubo tejido calloso, se presentaron raíces adventicias de 1 cm de longitud, con un promedio de 20 brotes, con un tamaño de 1 cm.
T3	El tejido calloso no alcanzó 10%. No se presentaron raíces adventicias, y los brotes obtenidos fueron 32, con un tamaño menor a 0.5 cm en promedio.
T4	No hubo callo, la raíz es gruesa y verde como la de la planta madre, la cantidad de brotes fue menor (22) pero de mayor tamaño (2 cm de longitud en promedio).
T5	La presencia de callo es poca, menos de 5%, casi no se observaron raíces. El promedio de brotes fue de 32, midiendo 1 cm.
T6	Hubo presencia de tejido calloso en 20%, las raíces son gruesas y verdes, midiendo más de 2 cm de longitud. En promedio se obtuvieron 16 brotes, con un tamaño de 1.5 cm.
T7 y T8	En los dos tratamientos se obtuvo un porcentaje de 100% de callo, alcanzando en promedio 4 cm <sup>2</sup> al finalizar los 2 meses.
T9	La presencia del callo va relacionada con la presencia de los brotes localizado en la parte basal de cada brote, con un porcentaje de 40%, las raíces adventicias son muy escasas, con 29 brotes en promedio de 0.5 cm
T10	No hubo callo, tampoco desarrollo de raíces, hubo presencia de brotes de 1 cm de largo, en donde se obtuvo un promedio de 43 brotes.
T11 (Testigo)	No hubo callo, se observó más el desarrollo de raíces adventicias, el crecimiento de los brotes fue casi nulo, se contabilizaron 7 brotes en promedio, los cuales no midieron más de 0.5 cm.

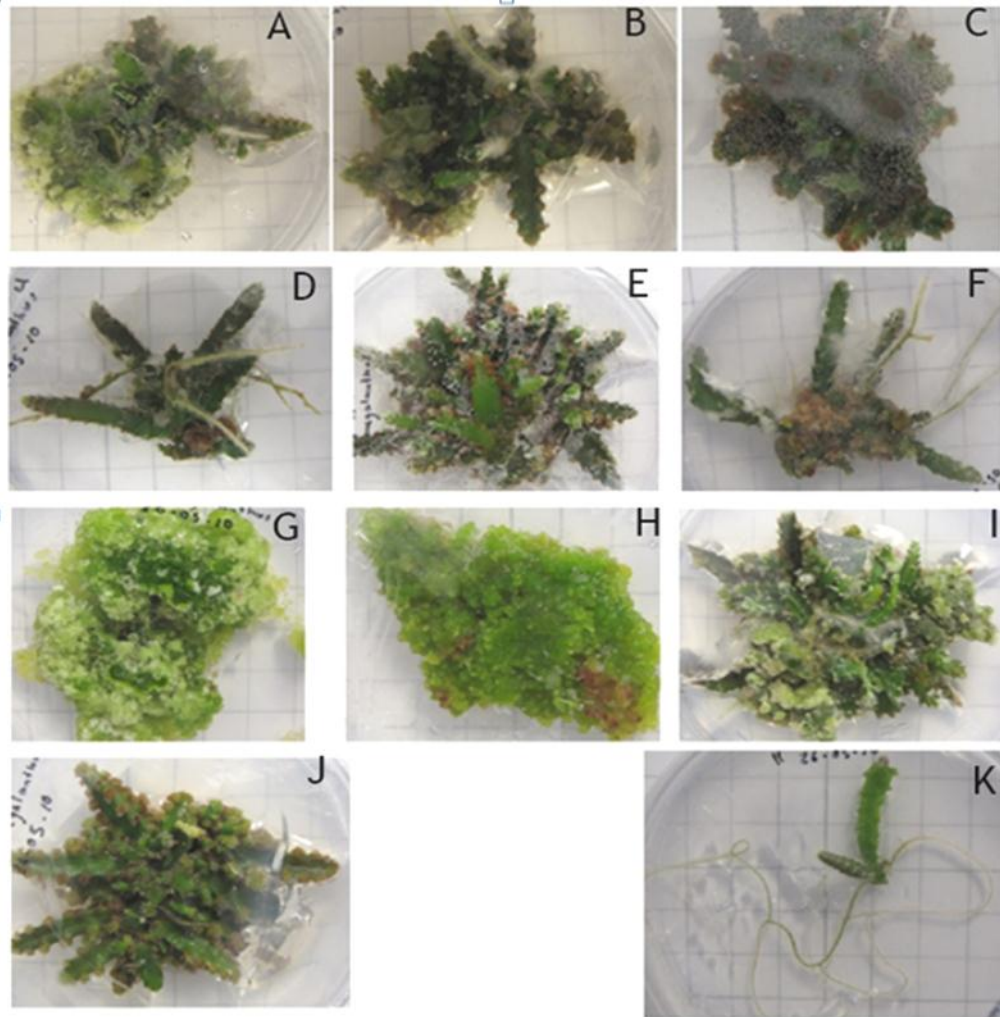


**Figura 5.** Diferencia significativa honesta de Tukey de los 11 tratamientos sobre el número promedio de brotes desarrollados por los explantes de *H. megalanthus*.



**Figura 6.** Diferencia significativa honesta de Tukey del efecto de los 11 tratamientos sobre el número promedio de brotes desarrollados por los explantes de *H. undatus*.

En la Figura 7, se muestra el comportamiento de los explantes con los 11 tratamientos para la especie *H. megalanthus*, tomando en cuenta las cuatro repeticiones al finalizar los dos meses y con una resiembra al mes.



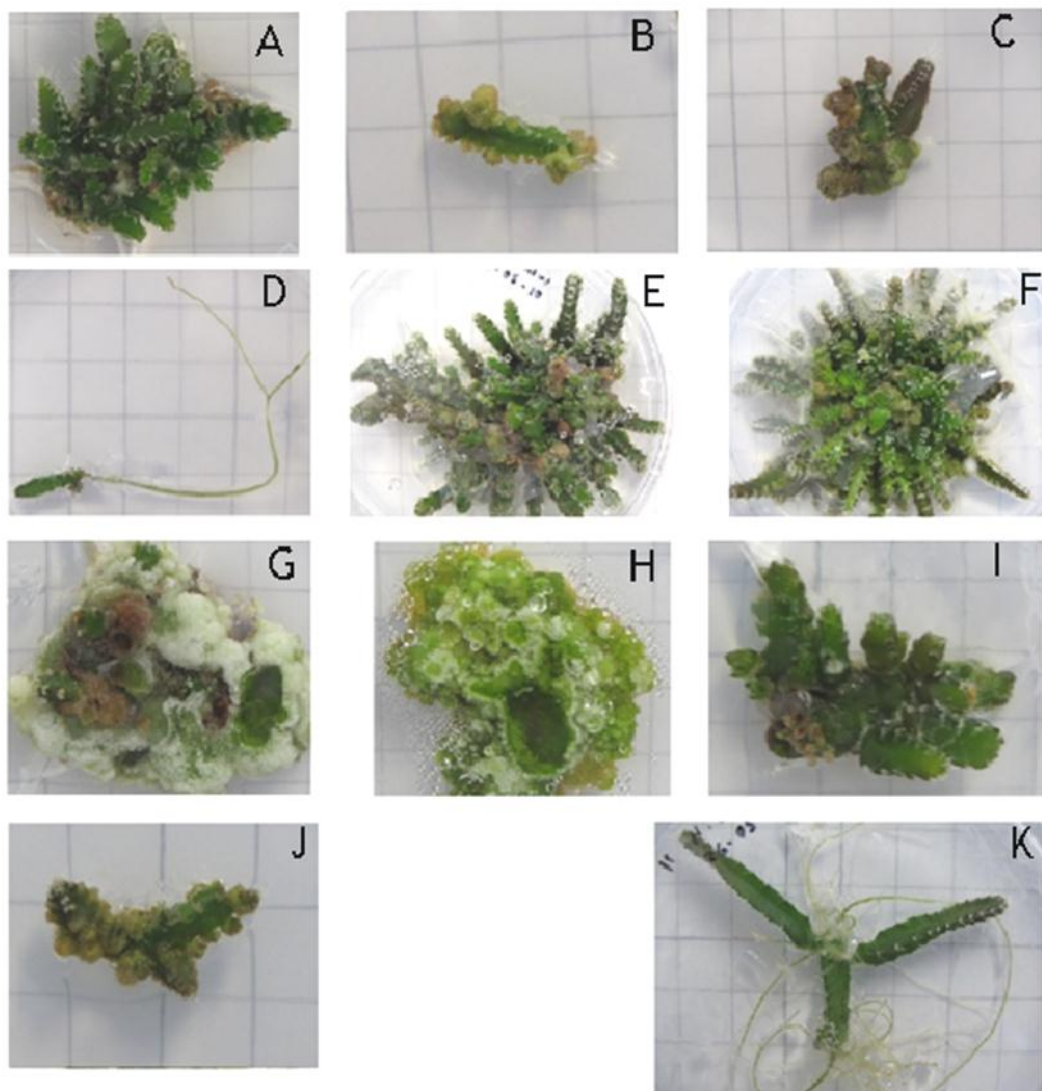
**Figura 7.** Respuesta de los explantes de *H. megalanthus* a los 11 tratamientos después de 8 semanas de desarrollo. A) T1 [MS + 0.5 mg L<sup>-1</sup> ANA + 1 mg L<sup>-1</sup> BA]. B) T2 [MS + 0.05 mg L<sup>-1</sup> ANA + 1 mg L<sup>-1</sup> BA]. C) T3 [MS + 0.5 mg L<sup>-1</sup> AIA + 3.00 mg L<sup>-1</sup> BA]. D) T4 [MS + 1.0 mg L<sup>-1</sup> 2iP]. E) T5 [MS + 3 mg L<sup>-1</sup> 2iP]. F) T6 [MS + 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ]. G) T7 [MS + 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4 D + 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ]. H) T8 [MS + 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2,4D + 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ]. I) T9 [MS + 0.25 mg L<sup>-1</sup> ANA + 1 mg L<sup>-1</sup> BA]. J) T10 [MS + 0.1 mg L<sup>-1</sup> ANA + 1 mg L<sup>-1</sup> BA]. K) T11 [MS sin hormonas (testigo)].



En el Cuadro 15 se expone una descripción detallada de la respuesta de los explantes a cada tratamiento para *H. undatus* y en la Figura 8, se observa el comportamiento de los explantes con los 11 tratamientos, tomando en cuenta las cuatro repeticiones al finalizar los dos meses y con una resiembra al mes.

**Cuadro 15.** Respuesta de los explantes de *H. undatus* a los 11 tratamientos utilizados.

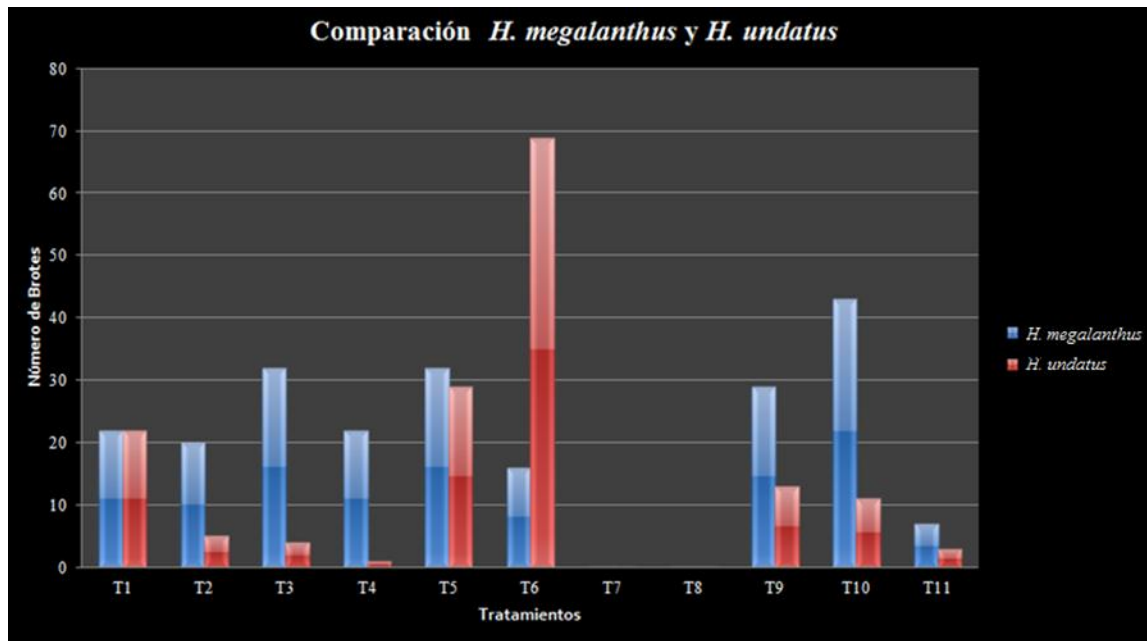
Tratamiento	Respuesta
T1	El porcentaje de tejido calloso fue aproximadamente de 10%, hay poco desarrollo de raíces que no rebasan la longitud de 1 cm, y se obtuvo un promedio de 22 brotes, la mayoría miden 2 cm de longitud.
T2	No se observó el desarrollo de tejido calloso, no se presentaron raíces adventicias de 1 cm de longitud, el promedio de brotes fue de 5, sin embargo estos midieron menos de 0.5 cm.
T3	El tejido calloso no fue visible, no se presentaron raíces adventicias, y los brotes obtenidos fueron 4, midiendo 1 centímetro en promedio.
T4	No hubo callo, la raíz fue gruesa y verde, como en la planta madre, la cantidad de brotes fue nulo contando con 1, y midió 1 cm de longitud.
T5	La presencia de callo fue de 15%, casi no se observaron raíces. El número promedio fue de 29, midiendo 2 cm.
T6	Hubo presencia de tejido calloso de 15%, las raíces midieron más de 3 cm de longitud. En promedio se obtuvieron 69 brotes pero midieron 1.5 cm.
T7 y T8	En los dos tratamientos se obtuvo un porcentaje de 100% de callo, alcanzando en promedio 3.5 cm <sup>2</sup> al finalizar los 2 meses.
T9	No hubo presencia de tejido calloso, las raíces adventicias fueron muy escasas. Se obtuvieron 13 brotes en promedio con una longitud de 1 cm.
T10	No hubo callo, ni desarrollo de raíces, hubo presencia de brotes de menos de 1 cm de largo, con un promedio de 11 brotes.
T11 (Testigo)	No hubo callo, se observó un buen desarrollo de raíces adventicias, se contabilizaron 3 brotes en promedio, los cuales midieron 3 cm.



**Figura 8.** Respuesta de los explantes de *H. undatus* a los 11 tratamientos hormonales después de las 8 semanas de desarrollo. A) T1 [MS + 0.5 mg L<sup>-1</sup> ANA + 1 mg L<sup>-1</sup> BA]. B) T2 [MS + 0.05 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 1mg L<sup>-1</sup> BA]. C) T3 [MS + 0.5 mg L<sup>-1</sup> AIA + 3.00 mg L<sup>-1</sup> BA]. D) T4 [MS + 1.0 mg L<sup>-1</sup> 2iP]. E) T5 [MS + 3 mg L<sup>-1</sup> 2iP]. F) T6 [MS + 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ]. G) T7 [MS + 0.1 mg L<sup>-1</sup> 2,4 D + 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ]. H) T8 [MS + 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2,4D + 0.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ]. I) T9 [MS + 0.25 mg L<sup>-1</sup> ANA + 1 mg L<sup>-1</sup> BA]. J) T10 [MS + 0.1 mg L<sup>-1</sup> ANA + 1 mg L<sup>-1</sup> BA]. K) T11 [MS sin hormonas (testigo)].

En la Figura 9, se observa que los tratamientos 1, 7 y 8 tuvieron una respuesta similar en ambas especies, con T1 se obtuvo el mismo número de brotes, y T7 y T8 generaron

tejido calloso. Con los tratamientos restantes las dos especies se comportaron diferente, en *H. megalanthus* el mejor desarrollo fue modulado por  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA, pero en general el mayor número de brotes lo produjo el explante de *H. undatus* con T6 ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ).



**Figura 9.** Efecto comparativo de los 11 tratamientos en el desarrollo de brotes a partir de explantes de *H. megalanthus* y *H. undatus*.

Se obtuvieron brotes con las combinaciones de reguladores de crecimiento BA/ANA y BA/AIA, así como 2iP y TDZ y el número de brotes obtenidos para *H. megalanthus* y *H. undatus* están dentro de los valores promedio registrados para diferentes especies de cactáceas, que van desde 0 a 128 dependiendo de la hormona empleada y de la especie estudiada (Malda *et al.*, 1999; Pérez Molphe- Balch *et al.*, 1998; Pérez Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002; Rubluo *et al.*, 2002). En los protocolos para la inducción de brotes de diversas cactáceas predomina la combinación de benciladenina con ácido  $\alpha$ -naftalenacético (Gómez, 2004). Esta combinación de reguladores de crecimiento con las concentraciones de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BA y  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA fue la que indujo la máxima formación de brotes para *H. megalanthus* (43). Resultados similares son los de Seeman

*et al.* (2007), quienes obtuvieron con estos mismos reguladores y concentraciones la mejor respuesta para el desarrollo de brotes en *Copiapo hypogaeae* (Ritter), *Mammillaria elongata* (DC), *Opuntia cylindrica* (Juss ex Lam), *O. berteri* (Colla) y *Rhipsalidopsis gaertneri* (Regel); a diferencia del trabajo de Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) que lograron la formación directa de brotes de 21 cactáceas mexicanas con la concentración de 1 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0.01 mg L<sup>-1</sup> ANA. Infante (1992) ensayó seis combinaciones de BA y ANA para micropropagación de *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck) sin. *H. megalanthus* (sin. *S. megalanthus*) y el mejor tratamiento fue 0.1 mg L<sup>-1</sup> BA y 0.05 mg L<sup>-1</sup> de ANA, con el que consiguió un promedio de 8 brotes por repetición, después de 6 semanas. Se observó que con las más bajas concentraciones de ambos reguladores se obtenían la menor cantidad de brotes.

El TDZ y el 2iP son citocininas que se han utilizado con menos frecuencia para inducir brotes en cactáceas, el efecto de estos reguladores de crecimiento está determinado por la especie vegetal y la concentración. Pelah *et al.* (2002), establecieron un protocolo de organogénesis para *H. megalanthus* a partir de cotiledones en medio MS suplementado con TDZ y lograron la mejor formación de brotes a una concentración de 200 µM, aunque no indican el número de brotes. Con este regulador nosotros obtuvimos 16 brotes pero con una concentración mucho menor (2.27 µM).

Cada especie vegetal tiene un comportamiento diferente ante los distintos reguladores de crecimiento dependiendo de la concentración, ya sea solo o combinados. Esto explica que *H. undatus* con la mayoría de los tratamientos formó un número menor de brotes que *H. megalanthus* y el máximo número de brotes (69) se indujeron con TDZ y no con la combinación de BA/ANA. Mohamed-Yassen (2002), estableció un protocolo para micropropagación de *H. undatus* en el que usó como reguladores de crecimiento TDZ 0.5 µM y 0.5 µM de ANA y con ellos a partir de brotes decapitados obtuvo 8.7 brotes. La concentración de TDZ utilizado en nuestro trabajo es mucho mayor (2.27 µM) y ello podría explicar el mayor número de brotes (69) inducidos solo por TDZ, además de que éstos se obtuvieron de una plántula y no de brotes decapitados. Loeza (2002), probó diferentes concentraciones de BA y la combinación BA /ANA para la obtención de brotes de *H. undatus*. El mayor número de brotes los obtuvo con BA (10 mg L<sup>-1</sup>) y

ANA ( $0.01 \text{ mg L}^{-1}$ ) pero los brotes exhibieron vitrificación, y con las concentraciones que utilizamos en este trabajo se obtuvieron resultados similares (9 a 11). Por otro lado, Morales (2000), obtuvo unos cuantos brotes con la combinación de BA ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ )/K ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ). Estos resultados indican que para la inducción de brotes de *H. undatus* es mejor la citocinina TDZ.

Aun cuando uno de los objetivos principales es la obtención de brotes, se pudo observar el crecimiento de raíces en la mayoría de los tratamientos. Sin embargo los brotes generados con el tratamiento 4 que utiliza la citocinina 2iP a una baja concentración, presentan un engrosamiento y elongación de las raíces, y en *H. undatus* logró inhibir por completo el desarrollo de brotes. Pierik (1990) y Pérez Molphe-Balch *et al.* (1999), describen la inhibición de raíces por la utilización de citocininas. Este efecto se puede deber a las características morfológicas de estas plantas que tienen un hábito de ser trepadoras.

Es factible que los tratamientos con los que se puede obtener plantas con el mínimo de cambios genéticos por variación somaclonal son los tratamientos 3 (AIA / BA), 5 (2iP) y 10 (ANA y BA) para *H. megalanthus* y los tratamientos 5 (2iP) y 6 (TDZ) para *H. undatus* al conseguir un alto número de brotes y poca presencia de tejido desorganizado o callo, lo cual favorece a que haya una mayor estabilidad génica. Cabe mencionar que el regulador de crecimiento 2iP es una de las citocininas más económicas en el mercado, y las dos especies reaccionaron de una manera adecuada con el tratamiento 5, esto puede tener un gran valor para futuras investigaciones.

Bastó utilizar el 2,4-D en concentraciones de  $0.1$  y  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  en conjunto con TDZ a  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ , para que en ambas especies se transformara el explante a tejido calloso. Este tejido calloso se desarrolló desde la primera semana y a partir de él se utilizó una porción de 4 semanas de edad como explante, el cual se sembró nuevamente en medio MS y después de una semana se desarrolló uno o dos brotes. Sin embargo el tejido calloso inicial después de 4 meses de establecido en medio MS original no generó ningún brote. Pierik (1990) menciona que la auxina 2,4-D estimula la división celular al igual que las demás auxinas pero que el tejido calloso pierde su capacidad de generar tejidos diferenciados al ser subcultivados o al realizar repicados constantemente. La

auxina 2,4-D fue muy efectiva para ambas especies en la generación de tejido desorganizado en una concentración relativamente baja.

### Aclimatación

Los brotes con raíz de *H. megalanthus* y *H. undatus* que se trasplantaron a macetas con sustrato peat-moss y se colocaron en una cámara bioclimática, desarrollaron plantas que variaron en tamaño y en su mayoría generaron nuevos brotes y nuevas raíces (Figura 10). Este proceso de aclimatación resultó efectivo debido a que se obtuvo 100% de sobrevivencia y no se presentó el “shock” hídrico o de desecación que se presenta durante el primer día de aclimatación, que en algunas especies puede ser superado por la naturaleza suculenta del cuerpo de la plántula (Malda *et al.*, 1999). Las plantas cultivadas posteriormente bajo malla sombra tuvieron un óptimo desarrollo a diferencia de las plantas expuestas a sol directo que murieron al tercer día. Las que crecieron bajo malla sombra, para septiembre engrosaron el tallo a 4 cm a partir de los 10 cm de longitud, y alcanzaron una altura de 38 cm (Figura 11). El porcentaje de aclimatación fuera de la cámara bioclimática, bajo la protección de malla sombra 70, también fue 100%.

Los porcentajes de sobrevivencia de las plántulas generadas *in vitro* para diferentes especies de cactáceas varían de 50 a 100% (Pérez Molphe-Balch y Dávila Figueroa 2002; Pelah *et al.*, 2002). Probablemente estas variaciones se deban a la metodología empleada para la aclimatación, así como a la cantidad de agua que contenga la plántula al inicio del tratamiento, la cual puede variar en función de la especie o del tamaño de las plántulas.

Mencionan, Mizrahi y Nerd (1999) y Nerd *et al.* (2002) que el cultivo protegido con malla sombra es una buena opción para la aclimatación de plantas fuera de la cámara bioclimática y probablemente el sistema óptimo para la producción. Lo cual con los resultados de este trabajo en cactáceas lo pudimos comprobar.



**Figura 10.** Plantas de *H. megalanthus* después de 1 mes de aclimatación.

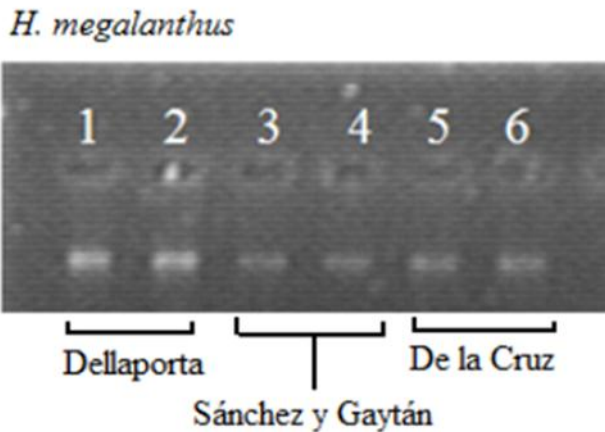


**Figura 11.** Planta de *H. megalanthus* después de 4 meses de aclimatación y creciendo bajo malla sombra.

## Caracterización Molecular de Brotes de *H. megalanthus* y *H. undatus* Mediante RAPDs

### Extracciones de ADN

Con los tres protocolos probados se obtuvo un ADN de buena calidad debido a que no se observó ningún barrido (Figura 12); el barrido se presenta cuando el ADN está degradado. Por lo tanto, cualquiera de los tres protocolos sería adecuado para la realización de RAPDs. Además de la calidad, es importante la cantidad y con el protocolo de Dellaporta modificado se obtuvo en promedio  $99.5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de ADN, y con los otros dos  $75.5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  en promedio, por lo que se optó trabajar con el de Dellaporta modificado para la extracción de ADN de las cactáceas en estudio (Figura 13).

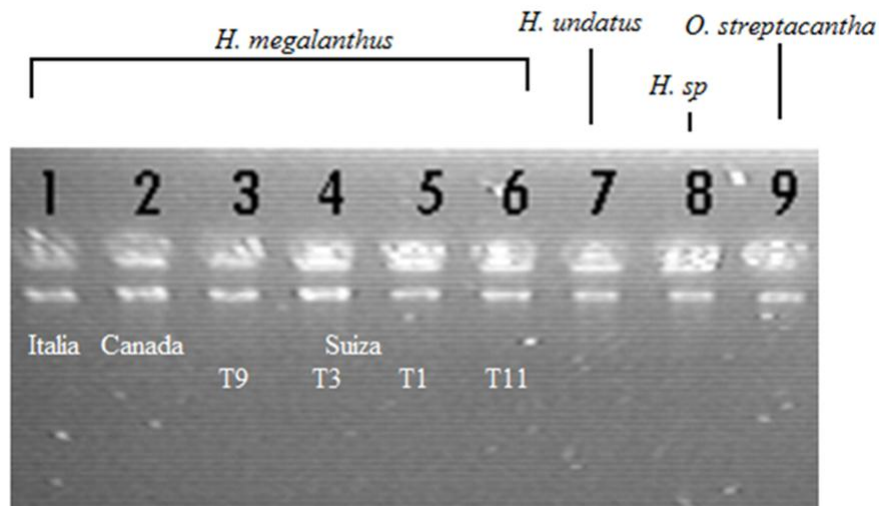


**Figura 12.** Gel de calidad de la extracción de ADN de *H. megalanthus* con tres protocolos diferentes.

Las modificaciones realizadas al método de extracción de Dellaporta, propiciaron que este fuera más eficiente que el De la Cruz *et al.* (1997), Sánchez-Hernández y Gaytán-Oyarzun *et al.* (2006), los cuales se basan en un buffer de extracción con CTAB y PVP para la reducción de la cantidad de polisacáridos. Tel-Zur *et al.* (1999) refieren que el protocolo de De la Cruz *et al.* (1997), específico para la extracción de ADN de cactáceas, y otros métodos que usaron resultaron inadecuados para la extracción de ADN de calidad de *H. megalanthus* (*sin. S. megalanthus*) y *H. undatus*, y por ello



hicieron modificaciones al método original de CTAB (Doyle y Doyle, 1990), con el cual obtuvieron óptimos resultados pero las extracciones las realizaron de raíz.



**Figura 13.** Gel de calidad del ADN genómico de plantas de *Hylocereus* desarrolladas *in vitro* con diferentes tratamientos hormonales.

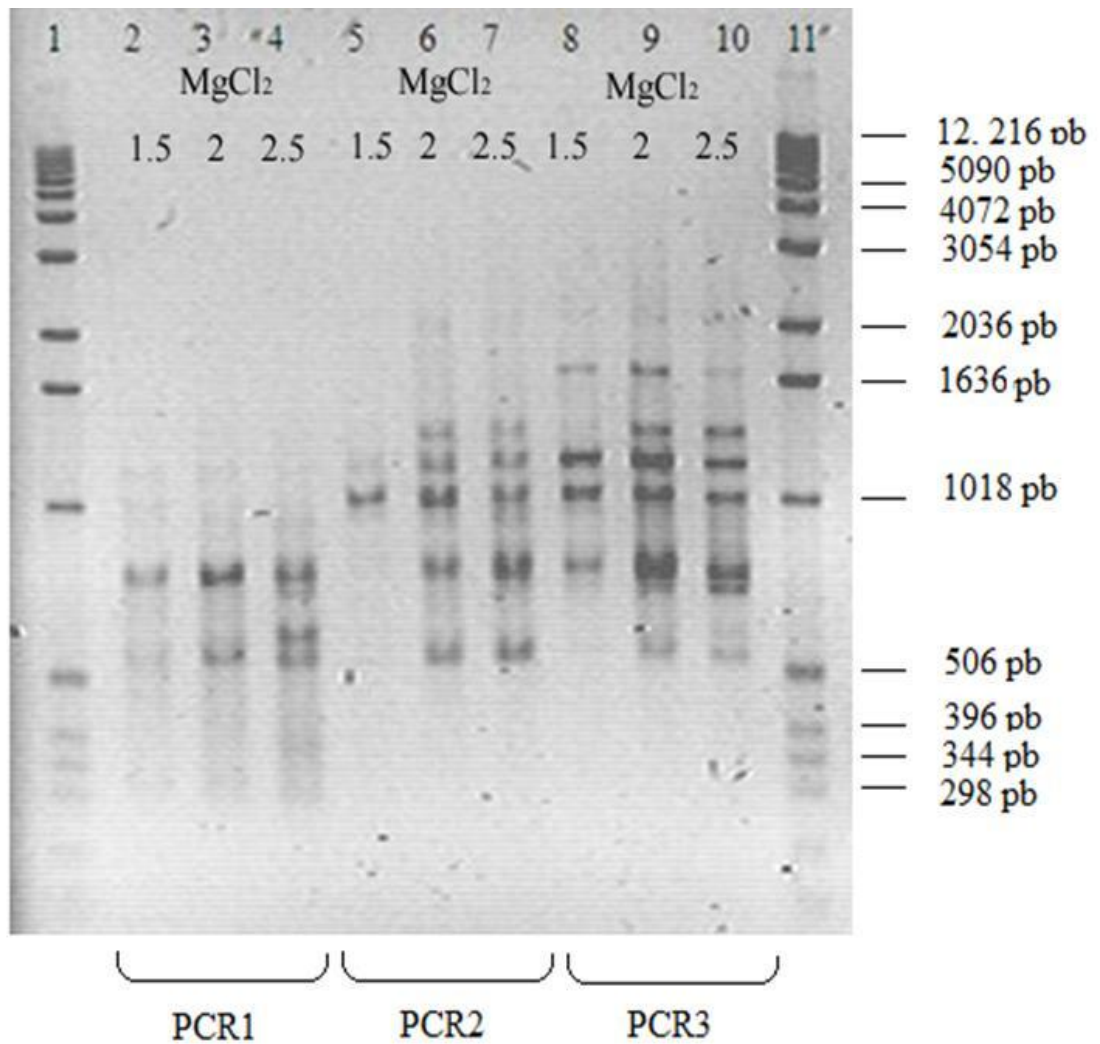
El método modificado de Dellaporta y el de Tel-Zur *et al.* (1999), son muy diferentes y el buffer de extracción del método usado por Tel-Zur contiene una elevada concentración de NaCl y bromuro de cetiltrimetilamonio, sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo indican que el de Dellaporta modificado puede ser mejor al utilizar filocladodios y no raíz, debido a que el contenido de polisacáridos es mayor en tallo que en raíz y éste elimina la mayor cantidad de polisacáridos y se obtiene una solución de ADN con baja viscosidad que no inhibe la actividad de la Taq polimerasa en la PCR como lo mencionan Fang *et al.* (1992).

### **Amplificación de Fragmentos Polimórficos de ADN al Azar (RAPDs) y su Análisis con Dendrograma**

En la Figura 14 se observa el número de bandas obtenidas con las concentraciones 1.5, 2.0 y 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub> combinadas con las condiciones de reacción PCR1, PCR2 y PCR3; utilizando el iniciador OPA 11. Las bandas amplificadas con las tres

concentraciones de  $MgCl_2$  y condiciones de ciclado PCR1 mostraron poca nitidez y menor número de bandas (Carriles 2 a 4), en promedio se observaron 5 bandas y 2 de ellas no se vuelven a repetir cuando la amplificación se realizó con PCR2 y PCR3; por ello estas condiciones se descartaron. Las bandas amplificadas con las tres concentraciones de  $MgCl_2$  y las condiciones PCR2, indicaron que con la menor concentración de  $MgCl_2$  solo se presentaron 2 bandas (carril 5), y con mayor concentración de magnesio se observaron un número considerable de bandas pero no lograron ser lo suficientemente nítidas (carriles 6 y 7) por lo que también se descartaron estas condiciones. La combinación de las tres concentraciones de  $MgCl_2$  con las condiciones de ciclado PCR1 y PCR2, mostró la importancia que tiene el magnesio en la amplificación del ADN. La combinación de las tres concentraciones de  $MgCl_2$  con PCR3, amplificó bandas bastante nítidas, lo cual corroboró el efecto que tiene la temperatura en la fase de desnaturalización del ADN y alineamiento del iniciador para una óptima amplificación, ya que el mejor resultado se vio al usar la menor temperatura de alineamiento ( $35^{\circ}C$ ) (Valadez y Günter, 2000). Considerando el grado de polimorfismo (Carril 10), se optó por las condiciones de PCR3 y la concentración 2.5 mM de  $MgCl_2$  para realizar todos los RAPDs.

En relación a los RAPDs, en el Cuadro 16 se muestra de manera simplificada las bandas obtenidas con los 20 iniciadores que se probaron para la amplificación del ADN y caracterización por RAPDs de 4 cactáceas utilizadas en este trabajo. El número de bandas polimórficas es amplio, obteniendo un total de 276 bandas amplificadas, de las cuales 268 son polimórficas, lo que corresponde a 97%, con una gama de tamaño de 220-3054 pares de bases.



**Figura 14.** RAPDs obtenidos con 3 diferentes condiciones de reacción de PCR y 3 concentraciones de magnesio, utilizando el iniciador OPA 11 y ADN de brotes de *H. megalanthus* generados con el tratamiento 3.

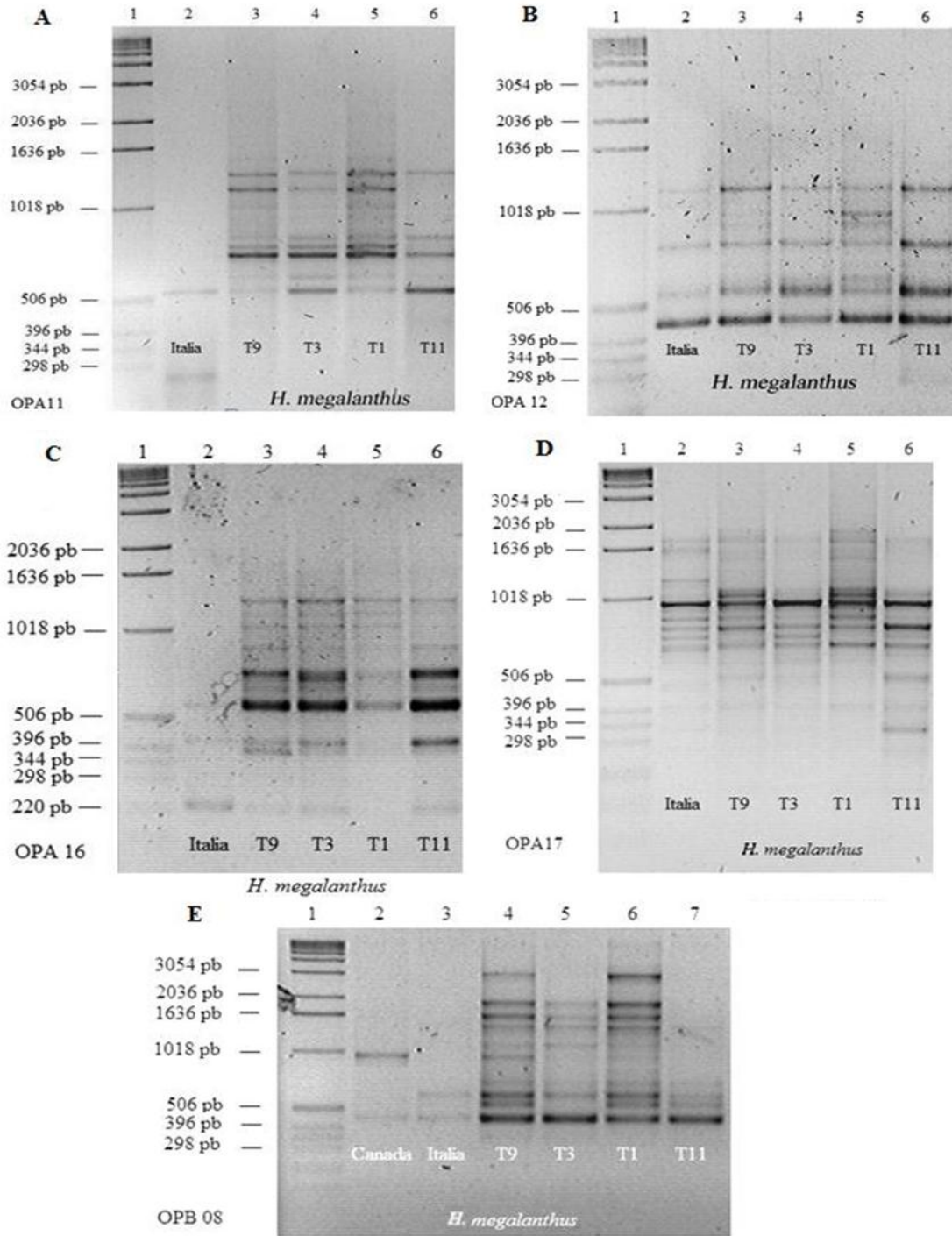
**Cuadro 16.** Bandas amplificadas, bandas polimórficas, polimorfismo y rango de tamaño (pb) obtenido con los iniciadores utilizados para la caracterización de 4 cactáceas con RAPDs.

Nombre del Primer	Secuencia (5'-3')	Bandas Amplificadas	Bandas Polimórficas	Polimorfismo (%)	Rango de Tamaño (pb)
OPA11	5'-CAATCGCCGT-3'	16	16	100	220-3054
OPA12	5'-TCGGCGATAG-3'	18	18	100	250-1636
OPA13	5'-CAGCACCCAC-3'	11	6	55	396-3054
OPA14	5'-TCTGTGCTGG-3'	3	3	100	506-1000
OPA15	5'-TTCCGAACCC-3'	17	17	100	396-3054
OPA16	5'-AGCCAGCGAA-3'	18	18	100	220-2036
OPA17	5'-GACCGCTTGT-3'	18	16	89	220-2036
OPA18	5'-AGGTGACCGT-3'	19	19	100	334-2036
OPA19	5'-CAAACGTCGG-3'	13	12	92	396-2036
OPA20	5'-GTTGCGATCC-3'	18	18	100	344-3054
OPB01	5'-GTTTCGCTCC-3'	17	17	100	396-3054
OPB02	5'-TGATCCCTGG-3'	11	11	100	506-3054
OPB03	5'-CATCCCCCTG-3'	20	20	100	396-2036
OPB04	5'-GGACTGGAGT-3'	5	5	100	506-2036
OPB05	5'-TGCGCCCTTC-3'	11	11	100	506-3054
OPB06	5'-TGCTCTGCCC-3'	13	13	100	506-2036
OPB07	5'-GGTGACGCAG-3'	14	14	100	298-1636
OPB08	5'-GTCCACACGG-3'	16	16	100	344-3054
OPB09	5'-TGGGGGACTC-3'	8	8	100	506-3054
OPB10	5'-CTGCTGGGAC-3'	10	10	100	396-2036
	Total	276	268	97	220-3054

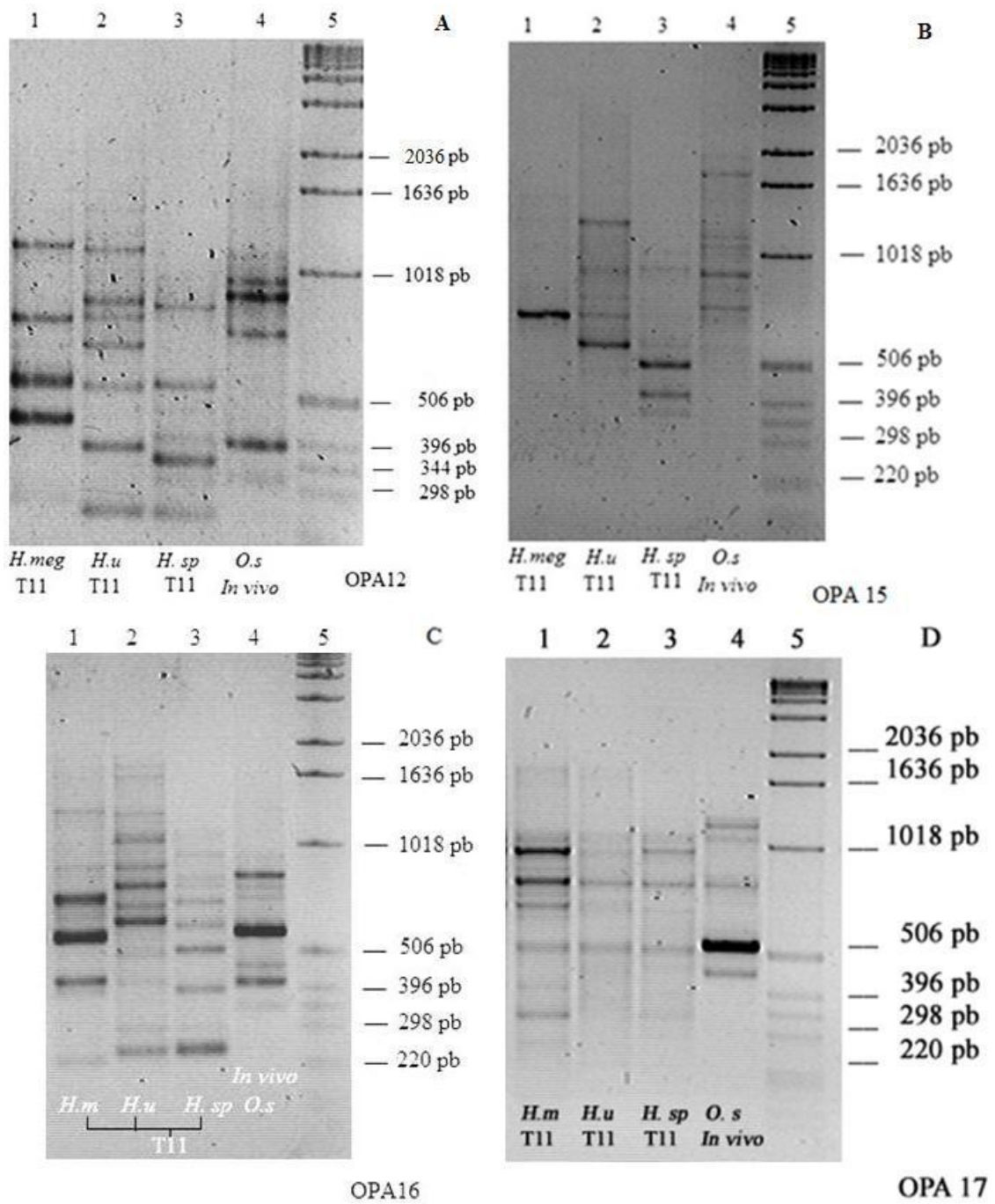
Para la caracterización por RAPDs de *H. megalanthus* se utilizaron los brotes obtenidos con cuatro de los tratamientos probados, tres de ellos fueron al azar, T9, T3, T1 y T11, sin tomar en cuenta los tratamientos hormonales 7 y 8, y el cuarto fue el testigo, esto con la finalidad de poder observar las diferencias, y evaluar la variación provocada por el uso de reguladores del crecimiento. De los 20 iniciadores evaluados, 8 de la serie OPA (11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19) y 4 de la serie OPB (01, 06, 08 y 10) generaron un número adecuado de bandas polimórficas. Con OPA 11, 12, 16, 17 y OPB 08 se amplificaron más de 10 bandas (Figura 15), por ello se pueden utilizar para determinar una huella genética de los brotes de las plantas obtenidas en los distintos

tratamientos hormonales. Con la utilización del iniciador OPA 12 se logró la amplificación de ocho bandas bien definidas y separadas en los cuatro tratamientos de la especie *H. megalanthus*, de los cuales los tres primeros fueron tratados con reguladores del crecimiento y el último fue el testigo. Para *H. undatus* los iniciadores OPA12 y OPA16 generaron el mayor número de bandas en comparación con otros iniciadores como el OPA15 (Figura 16), además estas fueron las que presentaron mayor polimorfismo con respecto a las demás especies, aunque teóricamente las bandas que amplificaron en las otras poblaciones con el mismo peso molecular podría no tener semejanza alguna al secuenciar las bandas, debido a que esta técnica utiliza la amplificación aleatoria o al azar. Es factible considerar estos iniciadores cuando se pretenda caracterizar esta misma especie. Es importante mencionar que el oligo OPA17 muestra más polimorfismos al analizar los diferentes tratamientos de la misma especie (*H. megalanthus*) (Fig. 15D), y es un oligo interesante para poder identificar posibles variaciones somaclonales, además es un oligo que permite examinar la cercanía de las especies *H. megalanthus* con *H. undatus* y *H. sp.* y lo distante que se muestra *O. streptacantha* de estas especies (Fig. 16D). El análisis de los 244 RAPDs a través de un dendrograma de enlace simple se muestra en la Figura 17 y en él se puede observar 4 grupos distintos, el primero es el grupo externo del trabajo *O. streptacantha*, el segundo el de *H. undatus*, el tercero el de *H. sp.* y el cuarto grupo lo conforman todos los individuos de la especie *H. megalanthus*.

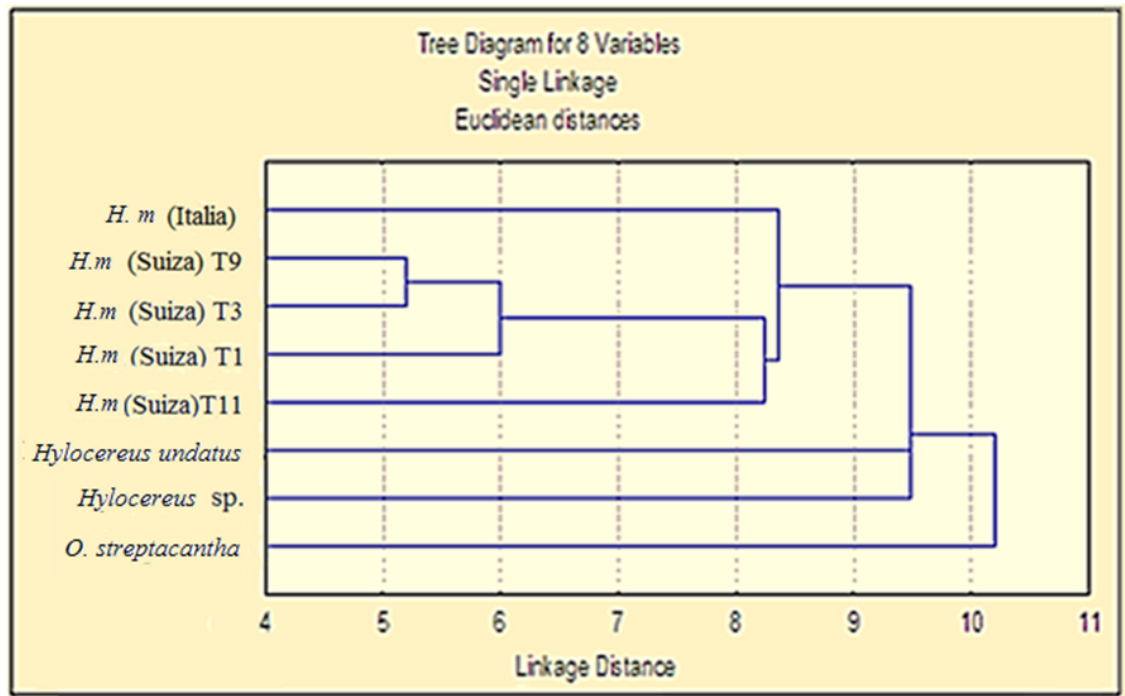
De los 20 iniciadores que se probaron para la caracterización de la variabilidad genética en los individuos de *H. megalanthus*, cinco fueron los que dieron muy buena resolución (cuatro de la serie OPA y uno de OPB) y generaron una huella genética. De éstos iniciadores, OPA 12 fue el mejor para diferenciar entre especies (Fig. 16A) y con él se obtuvo para los brotes desarrollados sin reguladores de crecimiento el mismo patrón de bandas polimórficas que Tel-Zur *et al.* (1999) (datos no mostrados). Ellos establecieron con este iniciador una huella genética que diferencia a *H. megalanthus* de *S. grandiflorus*, y también de *Hylocereus polyrhizus*, *H. purpussi*, así como de *H. sp.* En nuestro trabajo se pudo diferenciar con RAPDs a *H. megalanthus* de *H. undatus*, *H. sp.* y *Opuntia streptacantha*.



**Figura 15.** Caracterización de brotes de *H. megalanthus* generados con los tratamientos T9, T3, T1 y T11, con RAPDs obtenidos con diferentes iniciadores de la serie OPA y OPB. A) OPA11. B) OPA12. C) OPA16. D) OPA17. E) OPB08.



**Figura 16.** Patrón de bandas polimórficas amplificadas con los iniciadores OPA12, OPA16 y OPA17 en contraste con OPA15, que diferencian a *H. undatus* de *H. megalanthus*, *H. sp.* y *O. streptacantha*.



**Figura 17.** Dendrograma de enlace simple generado por la distancia Euclidiana de las bandas polimórficas obtenidas para las cactáceas en estudio y que muestra la relación genética entre *H. megalanthus* y *H. undatus*.

También con RAPDs, Tel-Zur *et al.* (2004b) caracterizaron genéticamente a dos clonas de *H. megalanthus*, una procedente de Ecuador y otra de Colombia, y el dendrograma las ubicó en un mismo grupo con un índice alto similitud genética (0.952) y fuera del grupo de las ocho especies diploides de *Selenicereus*. Concluyeron que esta especie no está estrechamente relacionada con las especies diploides de *Selenicereus*, que es una excepción dentro de este género (antigua clasificación), y que su origen tetraploide es por aloploidia. Nosotros no contábamos con una muestra del género *Selenicereus* pero sería interesante analizarla con el OPA12 para corroborar lo que mencionan Tel-Zur *et al.* (2004b). El dendrograma que construimos con la información de los RAPDs nos indica que los individuos de *H. megalanthus* desarrollados en medio MS sin reguladores de crecimiento, procedentes de semillas obtenidas de Suiza, de Italia y Canadá no tienen una similitud genética tan estrecha (Fig. 15E); desafortunadamente desconocemos el origen geográfico de este material vegetal, lo cual podría ser la causa,



debido a que este es un factor que se considera como un principio de variabilidad. A pesar de que solo comparamos tres tipos de individuos de *H. megalanthus*, nuestros resultados infieren que *H. megalanthus* exhibe variabilidad intraespecífica.

Los patrones RAPD generados con OPA 12, a partir del ADN de brotes de *H. megalanthus*, inducidos con los reguladores de crecimiento ANA/BA y AIA/BA correspondientes a los tratamientos 9, 3 y 1 con relación al testigo (11), así como el dendrograma respectivo, indican variabilidad genética entre los individuos evaluados, que existe mayor similitud entre los tratamiento 9 y 3, y esto correlaciona con la proporción auxina/citocinina más cercana entre los tratamientos 9 y 3 (0.3 y 0.2 respectivamente) en relación al tratamiento uno (0.6), a pesar que el 9 y 3 tengan diferentes auxinas, y ello puede explicar los diferentes patrones RAPD obtenidos. Sánchez-Chiang y Jiménez (2009) refieren que entre los factores que pueden originar variabilidad genética es la composición y estado físico del medio de cultivo que se utiliza en la micropropagación *in vitro*.

En este trabajo no se llevó a cabo el ensayo para establecer si todos los tratamientos originan variación en los brotes inducidos, ni la frecuencia de polimorfismo por cada tratamiento, lo cual es importante y se deberá llevar a cabo en un futuro. No obstante, a que los patrones RAPD fueron diferentes entre T9, T3, T1 y T11, los brotes no expresaron diferencias morfológicas. Existen evidencias de que algunos reguladores de crecimiento como el 2,4-D, ANA y citocininas sintéticas *in vitro*, pueden inducir cambios genéticos del tipo variación somaclonal. En programas de mejoramiento genético, la variación somaclonal puede constituirse en un recurso importante que genera variabilidad. Sin embargo, durante la micropropagación y en bancos de germoplasma *in vitro*, este tipo de variación es indeseable. Esta variabilidad puede o no expresarse en cambios morfológicos y desde el punto de vista de una operación comercial enfocada en la micropropagación de plantas, cuando no hay cambios morfológicos, este tipo de cambios no constituye un problema para su comercialización. Si bien, la utilización de técnicas moleculares ha mostrado ser útil para la detección de variación somaclonal, hay que considerar que puede dejar variantes sin detectar (falsos negativos), o bien, detectar variación que no tiene ninguna consecuencia, al no producir

cambios fenotípicos, y que podría conllevar al descarte prematuro de plantas fenotípicamente idénticas a las originales (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009).

Tel-Zur *et al.* (2004b) confirmaron que con RAPDs se pueden distinguir clonas de las especies que pertenecen a los géneros *Selenicereus* e *Hylocereus*. En nuestro trabajo observamos que se estableció para *H. undatus* el mejor patrón de bandas polimórficas con el iniciador OPA 16 al compararlo contra otras especies. Resultado diferente al de Tel-Zur *et al.* (2004b), que después de ensayar los iniciadores OPA 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 20; obtuvieron el mejor patrón de bandas para diferenciar clonas de *H. undatus* con el iniciador OPA 8 y para clones de *H. megalanthus* fueron OPA 16 y 17. Este último hallazgo concuerda con 2 iniciadores de los 8 que seleccionamos como eficientes para caracterizar a *H. megalanthus* y no podemos argumentar sobre el OPA 8 debido a que no lo utilizamos por no disponer de él en el laboratorio. En esta investigación se probaron las mismas condiciones de amplificación utilizadas por Tel-Zur *et al.* (2004b), nombradas como PCR1, pero con estas no se logró obtener bandas nítidas, probablemente porque usamos diferente termociclador para la amplificación. Legaria *et al.* (2005), evaluaron la variabilidad genética con marcadores RAPD en 50 colectas de *H. undatus* provenientes de nueve estados de México y una colecta de Colombia que se incluyó como testigo. De los veinte iniciadores probados, seleccionaron 15 que mostraron polimorfismo y complejidad en el patrón de bandeo, y a diferencia de lo acontecido en el presente trabajo, referente a que la mejor amplificación fue con las condiciones PCR3, ellos lo lograron con las condiciones correspondientes a PCR2. Esta técnica es simple, efectiva, y permite determinar los polimorfismos en gran cantidad de muestras (Martín *et al.*, 2002). Sin embargo, un inconveniente es que para las distintas especies vegetales, muchas veces es necesario evaluar gran cantidad de iniciadores y diferentes condiciones de PCR antes de encontrar aquellos que son informativos. La desventaja principal es la reproducibilidad de los resultados aún con la misma especie, debido a que puede influir el tipo de polimerasa, el equipo termociclador y las condiciones de electroforesis (Williams *et al.*, 1993).

En el caso de *H. undatus* no se determinó la estabilidad génica de los brotes obtenidos con alguno de los 10 tratamientos ensayados y solo se realizó la caracterización de los

brotos obtenidos con el tratamiento testigo, información que es fundamental en un programa de micropropagación *in vitro*. Existen antecedentes de que en diferentes estados de México, se desarrolla *H. undatus* y con RAPDs se identificaron los individuos colectados en cada estado. En esta especie se detectó gran variabilidad genética y de las colectas analizadas, la mayoría tuvo relación con una muestra de origen colombiano que se usó de referencia. Sin embargo algunos materiales de Hidalgo, San Luis Potosí y el estado de México son diferentes a la colombiana y al resto de las analizadas, lo que sugiere variabilidad genética endémica en nuestro país. Las colectas procedentes de San Luis Potosí integraron la mayoría de los grupos establecido, lo que indica que en este estado existe la mayor variabilidad genética y que es un sitio de dispersión de *H. undatus* (Legaria *et al.*, 2005). Este trabajo indica que a pesar de las limitaciones de los RAPDs, estos fueron sensibles para detectar variabilidad genética en las poblaciones de *H. undatus* en México.

A pesar del número reducido de ejemplares de cactáceas que se utilizaron para establecer la relación genética entre *H. megalanthus* y *H. undatus*, nuestros resultados corroboran lo establecido por la taxonomía botánica (Bauer, 2003; Hunt, 2006) y por la caracterización molecular y genética que realizó Tel-Zur *et al.* (2004a y 2004b), acerca de que *H. megalanthus* y *H. undatus* son plantas que pertenecen a la familia Cactaceae, subtribu Hylocerinae, pero con un parentesco no muy cercano. En el trabajo de Tel-Zur, los RAPDs analizados con dendrograma ubicaron a las clonas de Ecuador y Colombia en una posición intermedia entre el género *Selenicereus* e *Hylocereus* 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* y se encontró 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 y no representan necesariamente una gran distancia genética entre ellas y que es probable que el origen de *H. megalanthus* sea por aloploidía resultante de la hibridación natural entre los diploides *S. grandiflorus* y *H. ocamponis*.

Del dendrograma (Figura 17) también se puede asumir que *H. sp.* y *H. undatus* son genéticamente más cercanas a *H. megalanthus* y *O. streptacantha* se muestra como una especie aislada.

## CONCLUSIONES

Se establecieron protocolos para la micropropagación de la especie *Hylocereus megalanthus* e *Hylocereus undatus*. En el caso de *H. megalanthus*, el mayor número de brotes se obtiene en el medio MS adicionado con 1 mg L<sup>-1</sup> de benciladenina y 0.1 mg L<sup>-1</sup> ácido  $\alpha$ -naftalenacético, y el desarrollo de brotes con raíz en medio MS con 1.0 mg.L<sup>-1</sup> 2iP. Para *H. undatus*, el máximo número de brotes se obtiene en el medio MS con thidiazurón 0.5 mg.L<sup>-1</sup> y se generan brotes con raíz.

El uso del protocolo del marcador molecular RAPDs seleccionado, permite ver variaciones polimórficas al usar diferentes tratamientos hormonales en la especie *H. megalanthus* mediante el uso de 4 oligonucleótidos de la serie OPA (11, 12, 16 y 17) y uno de la serie OPB-08, siendo el mejor para distinguir entre diferentes especies, y entre individuos de la misma especie el OPA 12, y también con potencial para distinguir posibles variaciones somaclonales el OPA17. Para la especie *H. undatus*, OPA 12 y 16, nos permiten observar el mayor polimorfismo, destacando el iniciador OPA 16.

La benciladenina en combinación con diferentes concentraciones de ácido  $\alpha$ -naftalenacético (0.5 mg L<sup>-1</sup> y 0.25 mg L<sup>-1</sup>) y con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol acético puede inducir variabilidad genética en *H. megalanthus*, misma que es detectada con los RAPDs generados con el iniciador OPA 12. Una proporción más cercana de auxina/citocinina (tratamientos 3 y 9) generan una relación filogenética más estrecha que proporciones más alejadas como la del tratamiento 1.

*H. megalanthus* y *H. undatus* tienen una relación filogenética pero ésta no es cercana, sin embargo *H. undatus* y *H. sp.* tienen una relación genética más próxima entre ellas y distante a *H. megalanthus*. *O. streptacantha*, es una cactácea más distante filogenéticamente de las especies de *Hylocereus*.

A pesar de la variabilidad interespecie que se observa en *H. megalanthus* que se obtienen de diferentes tratamientos hormonales, no se observa variabilidad morfológica.

## LITERATURA CITADA

- Alvarado, R. Q. J. 2005. Propagación *in vitro* de *Turbiniacarpus mombergeri* y Adaptación al Suelo de *Turbiniacarpus laud*. San Luis Potosí. Tesis de Grado Maestría. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Ingeniería. p.74.
- Anand, S. K. R. L., Sattar, M. A, Abdullah, N. A., Abdulla, M. H., Salman, I. M., Rathore, H. A., y Johns, E. J. 2010. Effect of dragon fruit extract on oxidative stress and aortic stiffness in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacognosy Research*, Volume 2. p. 31-35.
- Andrade, J., Rengifo, E., Ricalde, M., Simá, J., Cervera, J., y Vargas, G. 2006. Microambientes de luz, crecimiento y fotosíntesis de la pitahaya (*Hylocereus undatus*) en un agrosistema de Yucatán, México. *Agrociencia* 40 (6): 687-697.
- Armella, M. A., Martínez, C. L., Yáñez, L. L., Cabrera, J. M. C., Carmona, A. A., Varela, H. G. y Ramírez, R. G. 2000. El uso de propagación *in vitro* de pitaya como mecanismos económicos para reforestar áreas depauperadas. *In: Resúmenes del Simposio Internacional sobre el Cultivo y Aprovechamiento de la Pitaya (Stenocereus) y la Pitahaya (Hylocereus y Selenicereus)*. Guadalajara, Jalisco.
- Augé, G. R., Beauchesne, G. J., Boocon-Gibod, L., Decurtye, B., y Vitalie, H. 1986. Cultivo *in vitro*. Científica, S.A. de C.V. Ed. México, D.F. p. 4-36.
- Barba, Á. A., Luna, R. B. S., y Romero, A. J. 2001. Micropropagación de Plantas. Trillas Ed. México. p. 17-37.
- Barthlott, W., y Hunt, D. R., 1993. Cactaceae. En: Kubitziki, K. (Ed.), *The Families and the Genera of Vascular Plants*, vol. 2. Springer, Berlin, p. 191-196.
- Bauer, R. 2003. A synopsis of the tribe Hylocereeae F. Buxb. *Cactaceae Systematic Initiatives* 17: 3-63.
- Becerra O.L.A. 1986. El cultivo de la pitahaya. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Bogotá. 19 pp.
- Becerra O. L. A. 1994. El cultivo de la pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). En: Villegas, M. *et al.* (Eds.). *Memorias de la Primera Reunión Internacional y Segunda Nacional sobre Frutales Nativos e Introducidos con Demanda Nacional e Internacional*. Montecillo, México. p. 123-142.
- Benega, R., Schneider, B., y Tel-Zur, N. 2009. Androgenesis in the vine cacti *Selenicereus* and *Hylocereus* (Cactaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 96:191-199.

- Bibliowicz, A., y Hernández, S. M. 1998. Organismos Fungosos Presentes En Las Estructuras Reproductivas De la Pitaya Amarilla. Tesis de Grado Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá, Colombia.
- Bravo-Hollis, H. y Sánchez-Mejorada, H. 1991. Las Cactáceas de México, Vol. III. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Britton, N. L., y Rose. J. N. 1963. Hylocereanae. En: The Cactaceae, Vol. 2, 183–212. Dover, New York, New York, USA.
- Cálix de Dios., H., y Castillo, M. R. 2008. Estudio sobre la pitahaya amarilla de la Península de Yucatán. Trópico Rural. Vol.1, No. 7, 31-35.
- Cenis, J. L. 2000. Nuevas técnicas moleculares para la identificación varietal de plantas. CIDA La Alberca Murcia. [www.terralia.com/revista12/pagina40.htm](http://www.terralia.com/revista12/pagina40.htm).
- Centurión, Y. A. 1999. Caracterización y Conservación de la Pitahaya (*Hylocereus undatus*). Tesis de doctorado. Mérida, Yucatán, Instituto Tecnológico Regional.
- Comparán-Sánchez, S., y Luna-Martínez, J. 1994. Aplicación de la técnica de cultivo in vitro de tejidos para la propagación de las especies *Echinocereus delaeetii* y *Pelecyphora aselliformis*. Memorias del Primer Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. México. D. F. p. 65.
- Cuellar-Chávez, L., Morales, R. E., y Treviño, N. J. F. 2006. La germinación *in vitro* una alternativa para obtener explantes en Cactáceas. Zonas Áridas 10: 129-133.
- De la Cruz, M. R., Ramírez, F. y Hernández, H. 1997. DNA isolation and amplification from cacti. Plant Molecular Biology Reporter 15: 319–325.
- Dellaporta, S.J., Wood, J., y Hicks, J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biololy. Rep. 1:19-21.
- Dodds, H. J. y Lorin, W. R. 1986. Experiments in plant tissue culture. Second Edition. Cambridge University Press. London, England.
- Doyle, J. J., y Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- Elias-Rocha, M.A., Santos-Díaz, M. S., y Arredondo-Gómez. A. 1998. Propagation of *Mammillaria candida* (Cactaceae) by tissue culture technique. Haseltonia 6: 96-101.
- Escobedo, B. L., García. O. H. T., Rojas. M. R., y Ramírez. G. F. 2000. Propagación *in vitro* de *Mammillaria luethyi* G.S. Hinton. Seminarios de Investigación. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coah.

- Fang, G., Hammar, S., y Grumet, R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from genomic DNA. *BioTechniques* 13: 52-54.
- García-Zambrano, E. A., Gutiérrez-Díez, A., Salinas-García, G.E., Cárdenas-Cerda, E., Vázquez-Alvarado, R.E., Zavala-García, F., y Martínez de la Cerda, J. 2006. Clasificación y estimación de la diversidad genética de Nopal *Opuntia* spp. en base a descriptores fenotípicos y marcadores genético moleculares. *Phyton* 75: 125-135.
- Gautheret, R. J. 1982. Proceedings of the 5 th. Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. *Bot. Mag. Tokyo* 96, p. 393-410.
- Gómez, J. J. L. 2004. Reproducción in vitro del garambullo, *Myrtillocactus gometrizans* (Mart.) Console. Tesina de Especialización en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Grimaldo-Juárez, O., García, V.A., Ortiz, C. J., y Ruiz, P. L. 2001. Características cariotípicas de seis genotipos de pitahaya (*Hylocereus* spp.). *Revista Chapingo serie Horticultura*. 7:177-206.
- Gunasena, H. P., Pushpakumara, D. K. N. G., y Kariawasam M. 2007. Dragon fruit. Singh VP editors. *Underutilized Fruit Trees in Sri Lanka*. Volumen I, New Delhi, India: World agroforestry centre ICRAF. pp. 110-140.
- Henson, J. M. y French, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnostic. *Annual Review of Phytopathology*. 31:81-109.
- Hernández, H. M., y Godínez. A. H. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*, México. Instituto de Ecología. A.C. 26: 33-52.
- Hubstenberger. J. F., Clayton. P. W. y Phillips. G. C. 1992. Micropropagation of cacti (*Cactaceae*). Bajaj Y. P. S. Ed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 20. High-Tech and Micropropagation IV. Springer-Verlag, Berlín y Heidelberg. pp.49-68.
- Hunt, D. 2006. *The New Cactus Lexicon*. D H Books. Ed. UK.
- ICBF. 1992. Tabla de composición de Alimentos. 6 th Ed. El cultivo de Pitaya y su posicionamiento en el mercado <http://www.angelfire.com/ia2/ingenieriaagricola/pitaya.htm>.
- Infante, R. 1992. *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocractus coccineus* (Salm-Dyck). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 31: 155-159.



- Kaeppler, S. M., Kaeppler, H. F., y Rhee, Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*. 43: 179–188.
- Krikorian, A. D., y Berquam, D. L. 2003. Plant cell and tissue cultures: the role of Haberlandt. *Plant tissue culture 100 years since gottlieb haberlandt*. Springer Wien New York Ed.. Australia, p, 25-53.
- Larkin, P. J., y Scowcroft, W.R. 1981. Somaclonal variation: A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, October 1981, 60(4): 197-214.
- Legaria, S. J. P., Alvarado, C. M. A., y Gaspar, H. R. 2005. Diversidad genética en pitahaya (*Hylocereus undatus* Haworth. Britton y Rose). *Revista Fitogenética Mexicana*. Chapingo, México. pp. 179-185.
- Lichtenzveig, J., Abbo, S., Nerd, A., Tel-Zur, N., y Mizrahi, Y. 2000. Cytology and mating systems in the climbing cacti *Hylocereus* and *Selenicereus*. *American Journal of Botany* 87(7): 1058–1065.
- Loeza, C. J. M. 2002. Micropropagación *in vitro* de *Hylocereus undatus* (Cactaceae). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. D. F. México.
- Malda, G., Suzán, H., y Backhaus, R. 1999. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae* 81: 71-87.
- Martín, C., Uberhuaga, E., y Pérez, C. 2002. Application of RAPD markers in the characterization of *Chrysanthemum* varieties and the assessment of somaclonal variation. *Euphytica* 127: 247-253.
- Martínez, V. O., y Rubluo, A. 1989. *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez–Mejorada. *HortScience* 64(1): 99-105.
- Mizrahi, Y., Nerd, A., y Nobel, P.S. 1997. Cacti as crops. *Horticultural Reviews* 18:291–320.
- Mizrahi, Y., y Nerd, A. 1999. Climbing and columnar cacti new arid lands fruit crops. En: J. Janick (Ed.), *Perspectives in New Crops and New Uses*. ASHS Press, Alexandria, VA. p. 358–366.
- Mizrahi, Y., Nerd, A., y Sitrit, Y. 2002. New fruits for arid climate. En: Janick, J., y Whipkey, A. (Eds). *Trends in New Crops and New Uses*. ASHS Press. American Society of Horticultural Science, Alexandria, Virginia. p. 378-384.
- Mohamed-Yasseen, Y. 2002. Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton and Rose). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38:427–429.

- Mohammadi, S. A., y Prasanna, B. M. 2003. Review & interpretation: Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop Science*. 43:1235-1248.
- Mondragón-Jacobo, C. 2003. Caracterización molecular mediante RAPDs de una colección de nopal (*Opuntia* spp. Cactaceae) del centro de México, como base del mejoramiento genético. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 9 (1): 97-114.
- Morales, R. M. E. 2000. Inducción de germinación, crecimiento de plántula y cultivo *in vitro* de pitahaya *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton y Rose. Tesis de Maestría Especialidad en Botánica. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. México.
- Mullis, K. B., y Faloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol*. 55: 335-350.
- Murashige, T., y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15:473-497.
- Nerd, A., Tel-Zur, N., y Mizrahi, Y. 2002. Fruit of vine and columnar cacti. En: P.S. Nobel (Ed.), *Cacti: Biology and Uses*. Univ. California Press, Berkeley. p. 185–197.
- Nelson, R. J. 1996. Marker-assisted plant breeding. En: Persley G.J. (Ed.), *Biotechnology and Integrated Pest Management*. CAB international, New York.
- Nevarez-Ibarra, S. M., Sánchez-Mendoza, I. R., Zavala, P. A., y Márquez, S. G. 2000. Germinación y propagación de la biznaga (*Ferocactus herrerae* G. ORT.) en condiciones *in vitro*. En: Simposio Internacional sobre el Cultivo y Aprovechamiento de la Pitaya (*Stenocereus*) y la Pitahaya (*Hylocereus* y *Selenicereus*). Guadalajara, Jalisco.
- Newton, C. R., y Graham, A. 1997. PCR 2nd Ed. Bios scientific publishers. Oxford. U.K. 190 pp.
- Nuez, F., y Carrillo, J. M. 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Ojeda-Zacarías, Ma. del C., Rodríguez-Fuentes, H., y Gutiérrez-Diéz, A. 2008. Micropropagación de cactáceas. Memorias VII Simposium-Taller Producción y aprovechamiento del nopal en el noreste de México. Facultad de Agronomía, UANL. Nuevo León, México.
- Olive, D. M., y Bean, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:1661-1669.
- Ortiz, H. Y. D. 1999. Pitahaya, un nuevo cultivo para México / Pitahaya, a new crop for México. México, D.F., Instituto Politécnico Nacional y editorial Limusa.

- Ortiz-Montiel, J., y Vargas-Figueroa, M. 1995. Propagación *in vitro* de *Heliocereus elegantissimus* (Britton y Rose) variedad *elegantissimus* (cactaceae). Cactáceas y Suculentas de México. Sociedad Mexicana de Cactología 40 (2).
- Pelah, D., Kaushik, R. A., Mizrahi, Y., y Sitrit, Y. 2002. Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 71: 81-84.
- Pérez-Molphe-Balch, E., Dávila, F. C. A., Villalobos, A. E., Cañedo, O. B. O., Lizalde-Viramontes, J. H., de la Rosa, C. M. L., Domínguez, R. M. S., Castro, G. I. A. y Pérez-Reyes, E. M. 2008. 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. Capítulo 16. p 329-352.
- Pérez-Molphe-Balch, E., y Dávila-Figueroa, C. A. 2002. *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Wedermann (Cactaceae). *In vitro Cellular & Developmental Biology*. 38: 73-78.
- Pérez-Molphe-Balch, E., Pérez-Reyes, M. E., Villalobos-Amador, E., Meza-Rangel, E., Morones-Ruiz, L. R., y Lizalde-Viramontes, H. J. 1998. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In vitro Cellular & Developmental Biology*.34: 131-135.
- Pérez-Molphe-Balch, E., Ramírez, M. R., Nuñez, P. H. G., y Ochoa, A. N. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. ISBN 968-6259-62-7.
- Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Department of Horticulture, Agricultural University Wageningen, The Netherlands. p. 29-36.
- Piña, R. H. H. 2000. Ecología reproductiva de *Ferocactus robustus* en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.
- Powledge, T. M. 1999. The polymerase chain reaction. Federation of American Societies for Experimental Biology. (En línea). [www.pcrlinks.com](http://www.pcrlinks.com) (Agosto, 2006).
- Rafalski, A. J., y Tingey, S. V. 1993. Genetic diagnosis in plant breeding; RAPDs, microsatellites and machines. Trends in Genetics. 9: 275-279.
- Retes-Pruneda, J. L., Valadez-Aguilar, M. L., Pérez-Reyes, M. E., y Pérez-Molphe-Balch, E. 2007. Propagación *in vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). Boletín de la Sociedad Botánica de México. 81:9-16.

- Roca, W. M., y Mroginski, L. A. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Ed. Cali, Colombia. p. 1-17.
- Rodríguez, C. A. 2000. Pitahayas. Estado Mundial de su Cultivo y Comercialización. Maxcanú, Yucatán, México, Fundación Yucatán Produce A.C. y Universidad Autónoma Chapingo.
- Rojas-Aréchiga, M., y Vázquez-Yanes, C. 2000. Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Enviroments* 44: 85-104.
- Rosales, I. M. B. 2002. Diagnóstico de enfermedades en plantas: Uso de herramientas moleculares. Unidad de Biotecnología INIA-CRI La Platina. Colombia 14 p.
- Rubluo, A., Marín-Hernández, T., Duval, K., Vargas, A., y Márquez-Guzmán, J. 2002. Auxin induced morphogenetic responses in long-term *in vitro* subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). *Scientia Horticulturae* 95:341-349.
- Ruvalcaba-Ruíz, D., Rojas-Bravo, D., y Valencia-Botín, A. J. 2010. Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton y Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12: 139-143.
- Salisbury, F., y Ross C. 1994. Fisiología Vegetal. Iberoamericana Ed. Mexico.759 pp.
- Sánchez-Chiang, N., y Jiménez, V. M. 2009. Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agronomía Mesoamericana* 20: 135-151.
- Sánchez-Hernández, C., y Gaytán-Oyarzún, J. C. 2006. Two mini-preparation protocols to DNA extraction from plants with polysaccharide and secondary metabolites. *Africa Journal of Biotechnology*, 5:1864-1867.
- Santos-Díaz, M. S., y Ochoa-Alejo. N. 1992. Cultivo de tejidos y variación somoclonal. *Tecnología y Ciencias Agropecuarias*. Vol 1(1): 1-13.
- Seemann, P., Rodríguez, C., y Jara, G. 2007. Cultivo *in vitro* de cactáceas con fines de conservación *ex situ*. *Agro Sur* 35 (2): 24-26.
- Smeltzer, S. J. 1998. PCR in Bioanalysis. Humana Press, Totowa. N. J. 292 pp.
- Swanson, P. C. 1958. Cytology and cytogenetics. Prentice-Hall Inc. New York, USA. p. 448-463.
- Tel-Zur, N., Abbo, S., Bar-Zvi, D., y Mizrahi, Y. 2004a. Genetic relationship among *Hylocereus* and *Selenicereus* vine cacti (Cactaceae): Evidence from hybridization and cytological studies. *Annals of Botany* 94: 527-534.

- Tel-Zur, N., Abbo, S., Bar-Zvi, D., y Mizrahi, Y. 2004b. Clone identification relationship vine cacti from the genera among *Hylocereus* and *Selenicereus* based on RAPD analysis. *Scientia Horticulturae*. 100: 279-289.
- Tel-Zur, N., Abbo, S., Myslabdosky, D., y Mizrahi, Y. 1999. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 249-254.
- Tingey, V. S., y Del Tufo, J. I. 1993. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiology*. 101:349-352.
- Valadez, E., y Günter, K. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). México: Universidad Autónoma de Chapingo/Mundi Prensa.
- Vyskot, B., y Jara. Z. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*. 59: 449-452.
- Weiss, J., Nerd, A., y Mizrahi, Y. 1994. Flowering behavior and pollination requirements in climbing cacti with fruit crop potential. *HortScience* 29 (12): 1487-1492.
- Williams, J. G. K., Rafalski, A. J., y Tingey, S. V. 1993. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as a genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-6535.