



"Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible"

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL**

Trabajo de Graduación

**Estudio de medios de cultivos, explantes, frascos y sustratos
en cladodio de pitahaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose)
cv. Chocoya de Nicaragua en fase de micropropagación**

AUTOR

AUTOR

Br. Luís Enrique Ruíz Obando

ASESOR

Ing. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga

**Managua, Nicaragua
Septiembre, 2009**



"Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible"

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL**

Trabajo de Graduación

**Estudio de medios de cultivos, explantes, frascos y sustratos
en cladodio de pitahaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose)
cv. Chocoya de Nicaragua en fase de micropropagación**

AUTOR

AUTOR

Br. Luís Enrique Ruíz Obando

**Trabajo presentado a la consideración
del honorable tribunal examinador,
para optar al título de
Ingeniero Agrónomo Generalista**

**Managua, Nicaragua
Septiembre, 2009**

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a *Dios*, porque nada en la vida sucede, si no es por su voluntad, quien me ha permitido culminar una de mis metas.

A mi familia con mucho cariño y respeto que día a día me dieron y siguen dando su aporte económico y moral para que la elaboración de este documento.

Br. Luis Enrique Ruíz Obando

AGRADECIMIENTO

A *Dios* por haber permitido llegar hasta este momento.

A esta *Alma Mater* que contribuyó a la construcción del presente documento que ha llenado un vacío de información, cualitativa y cuantitativa para aportar al desarrollo del país.

Al Ing. MSc. Marbell Aguilar Maradiaga y al Ing. MSc. Alvaro Benavides González que invirtieron su tiempo, talento, pasión y su sabiduría para lograr el éxito de este tema de investigación.

De igual manera, al Ing. MSc. Reinaldo Laguna Miranda (q.e.p.d), a la Ing. MSc. Sandra Lovo Jeréz, Ing. Gabriela Ríos Morales, Dr. Francisco Salmerón Miranda, Sra. Xiomara Peña, que de una u otra forma me brindaron su aporte desinteresado para que este trabajo fuese posible.

Con el ánimo de no ofender a aquellos que puedan faltar si menciono nombres de los que su colaboración fue de mucha importancia, prefiero abrazarlos y decirles que no fue en vano su inversión.

Br. Luis Enrique Ruíz Obando

ÍNDICE DE CONTENIDO

| SECCIÓN | PÁGINA |
|--|------------|
| DEDICATORIA | <i>i</i> |
| AGRADECIMIENTOS | <i>ii</i> |
| ÍNDICE DE CUADROS | <i>iv</i> |
| ÍNDICE DE FIGURAS | <i>v</i> |
| RESUMEN | <i>vi</i> |
| ABSTRACT | <i>vii</i> |
| I INTRODUCCIÓN | 1 |
| II OBJETIVO GENERAL | 3 |
| III MATERIALES Y MÉTODOS | 4 |
| 3.1 Localización del experimento. | 4 |
| 3.2 Materiales y equipos. | 4 |
| 3.2.1 Esterilización de materiales y equipo. | |
| 3.3 Fase de multiplicación. | 5 |
| 3.3.1 Efecto de medios de cultivo, consistencia de medios de cultivo y tipo de explantes. | 5 |
| 3.3.2 Efecto en crecimiento de tres tipos de explantes, número de explantes por frasco y volumen del frasco. | 6 |
| 3.4 Fase de enraizamiento. | 7 |
| 3.5 Aclimatización de las vitroplantas. | 8 |
| 3.6 Trasplante a bolsas de polietileno de plantas <i>in vitro</i> después de ocho semanas de aclimatizadas. | 9 |
| 3.7 Diseño experimental y análisis estadístico. | 9 |
| 3.7.1 Fase de multiplicación. | 9 |
| 3.7.2 Fase de enraizamiento. | 10 |
| 3.7.3 Aclimatización de vitroplantas. | 10 |
| 3.7.4 Trasplante a bolsas de polietileno. | 10 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 11 |
| 4.1 Fase de multiplicación: Variantes de medios de cultivo y tipos de explantes | 11 |
| 4.1.1 Número de brotes y número de raíces | 11 |
| 4.2 Fase de multiplicación: Tipos y densidad de explantes por frasco y volumen de frasco | 14 |
| 4.2.1 Número de brotes y longitud de vainas | 14 |
| 4.3 Fase de enraizamiento: Medios de cultivos y consistencia de cultivos | 18 |
| 4.4 Fase de aclimatización: Medios de cultivos y sustratos sólidos. | 20 |
| 4.5 Trasplante de vitroplantas | 24 |
| V. CONCLUSIONES | 27 |
| VI. RECOMENDACIONES | 28 |
| VII. LITERATURA CITADA | 29 |

ÍNDICE DE CUADROS

| CUADRO | | PÁGINA |
|--------|--|--------|
| 1 | Materiales, equipos y reactivos químicos utilizados | 4 |
| 2 | Niveles y factores evaluados en la fase de multiplicación. | 5 |
| 3 | Tipo de explantes, número de explantes por frasco y volúmenes de frascos en el crecimiento y brotación de las vainas. | 6 |
| 4 | Tipo de explantes, número de explantes por frasco y volúmenes de frascos en el crecimiento y brotación de los cladodios. | 7 |
| 5 | Significación estadística en los efectos principales para las variables número de brotes y raíces producidos a las 4 semanas en nueve medios de cultivo y tres tipos de segmentos en cladodio de pitahaya cv. Chocoya. | 11 |
| 6 | Significación estadística en el número de brotes producidos a las 4 semanas en nueve medios de cultivo y tres tipos de segmentos en cladodio de pitahaya cv. Chocoya. | 12 |
| 7 | Significación estadística en los efectos principales para las variables número de brotes de pitahaya cv. Chocoya. | 15 |
| 8 | Número de brotes producidos a las 4 semanas en tres tipos de explantes, dos tipos de frascos y tres tipos de explantes en cladodio de pitahaya cv. Chocoya. | 16 |
| 9 | Significación estadística en factores evaluados y categorización en la longitud de vaina y el número de raíces en la fase de enraizamiento. | 18 |
| 10 | Significación estadística en la longitud de vaina y número de raíces producidas a las 4 semanas en diferentes medios de cultivos y dos tipos de consistencia en cladodios de pitahaya cv. Chocoya. | 19 |
| 11 | Significación estadística en factores evaluados y categorización en la longitud de vainas. | 20 |
| 12 | Significación estadística en factores evaluados y categorización en el número de raíz. | 21 |
| 13 | Significación estadística en factores evaluados y categorización en el porcentaje de sobrevivencia. | 22 |
| 14 | Significación estadística en la longitud de vaina, número de raíces y porcentaje de sobrevivencia de plantas aclimatizadas en sustratos de compost y lombrihumus a las 6 semanas. | 23 |
| 15 | Significación estadística en la longitud de vaina, número y longitud de brotes y número de raíces producidas por los segmentos de vainas apicales, centrales y basales de pitahaya cv. Chocoya a las 8 semanas. | 25 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURA | | PÁGINA |
|--------|--|--------|
| 1 | Partes de cladodio utilizados en la micropropagación de explantes. a) Vaina entera. b) Segmento apical. c) Segmento central. d) Segmento basal | 6 |
| 2 | Frascos para propagación <i>in vitro</i> . a) Frasco de 220 ml. b) Frasco de 430 ml | 7 |
| 3 | Plantas de pitahaya al momento de la siembra en fase de aclimatización | 8 |
| 4 | Fase de aclimatización. (a y b) Plantas de pitahaya listas para el trasplante. c). Segmentos de vainas trasplantadas a bolsas de polietileno | 9 |
| 5 | Crecimiento <i>in vitro</i> de plantas de pitahaya. a) a partir de segmentos apicales. b) Segmentos centrales. c) Segmentos basales | 17 |
| 6 | Plantas de pitahaya en crecimiento en la fase de aclimatización | 24 |
| 7 | Brotes axilares producidos en la fase de trasplante. a) Segmento basal de la vaina. b). Segmento central. c) Segmento apical | 26 |

RESUMEN

Se estudiaron las fases de multiplicación, enraizamiento, aclimatización y el trasplante en el cultivo de pitahaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose) cultivar Chocoya. El ensayo se desarrolló en 4 fases: Fase 1: Multiplicación. 1a) Efecto de 9 medios de cultivo (dosis de BAP y sacarosa) y tipo de explantes (apical, central y basal). 1b) Efecto en crecimiento de tres tipos de explantes (apical, central y basal), número de explantes (5, 6 y 7 explantes/frasco) y volumen del frasco (220 y 430 ml). Fase 2: Enraizamiento. Efecto de 9 medios de cultivo, consistencia de medios de cultivo (líquida y semisólida) con explantes centrales. Fase 3: Aclimatización. Establecimiento de plántulas provenientes de la fase de enraizamiento con dos tipos de sustrato (compost y lombrihumus). Fase 4: Trasplante. Trasplante al campo de plantas provenientes de la fase de aclimatización segmentando el cladodio en 3 partes. Los ensayos fueron establecidos sobre diseños factoriales apropiados, y se utilizó Duncan-Waller ($Pr=0.05$) como criterio de separación de promedios en las variables de cladodios, raíces, sobrevivencia, número de brotes, entre otras. En los medios de cultivo que contenían 1 mg l^{-1} de BAP con 30 ó 40 g/l de sacarosa, resultó mejor el número de brotes emitidos por segmentos apicales de la vaina. En los tratamientos segmento central en frasco de 220 ml y 430 ml y segmento apical en frasco de 430 ml, el número de brotes fue mayor en todos ellos con 5 y 6 tejidos por frasco. El promedio de raíces por cladodio fue de 3.32 en el medio de cultivo que contenía 30g/l de sacarosa, sin adición de AIA y de consistencia sólida. La aclimatización en el sustrato compost el promedio de longitud, número de raíces y el porcentaje de sobrevivencia fue mejor cuando las plantas habían enraizado previamente en un medio de cultivo con 0.5 mg l^{-1} de AIA y 60 g/l de sacarosa y en sustrato de lombrihumus la aclimatización fue mejor con plantas previamente enraizadas en el medio de cultivo con 0.5 mg/l de AIA y 30 g/l de sacarosa. En el trasplante, el segmento apical de la vaina presentó una mayor longitud (14.56 cm), la longitud de los brotes axilares fue superior en los segmentos centrales (2.46 cm). En todos los tratamientos no hubo muerte de los cladodios enraizados.

Palabras claves: *Hylocereus undatus* Britton & Rose, BAP, AIA, micropropagación.

ABSTRACT

The stages of multiplication, rooting, acclimatization and field in the cultivation of pitahaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose) cultivar Chocoya were studied. The study was developed in 4 phases: Phase 1: Multiplication. 1a) effect of 9 culture medium (dose of BAP and sucrose) and type of explants (apical, central and basal). 1b) effect on growth of three types of explants (apical, central and basal), number of explants (5, 6 and 7 explants/container) and volume of the container (220 ml and 430). Phase 2: rooting. Effect of 9 culture medium, consistency of culture medium (liquid and semisolid) with central explants. Phase 3: acclimatization. Establishment of plants from rooting phase with two types of substrate (compost and lombrihumus). Phase 4: Transplantation. The field transplant plants from the acclimatization phase segments cladodes in 3 parts. The treatments were established on appropriate factorial designs, and used Duncan-Waller ($P = 0.05$) as a criterion of separation of variables into averages cladodes roots, survival, number of shoots, among others. In culture medium containing 1 mg/l BAP with 30 or 40 g/l sucrose was better cast the number of shoots per apical segment of the sheath. In the central segment treatments in 220 ml container and 430 ml and apical segment in 430 ml container, the number of shoots was higher in all tissues with 5 and 6 per container. The average of plants forming root for cladodes was 3.32 in the culture medium containing 30 g/l sucrose, no added IAA and firm. In acclimation the average length, number of roots and percentage of survival in the compost substrate were better when the plants had previously rooted in a culture medium with 0.5 mg/l IAA and 60 g/l sucrose and substrate lombrihumus acclimation was previously best plants rooted in the culture medium with 0.5 mg/l IAA and 30 g/l sucrose. In transplanting, the apical segment of the case presented a greater length (14.56 cm), the length of the axillary buds were higher in the central segments (2.46 cm). In all treatments there was no death of rooted cladodes.

Keywords: *Hylocereus undatus* Britton & Rose, BAP, AIA, micropropagation.

I. INTRODUCCIÓN

La pitahaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose) es un cactus perenne que crece silvestre sobre árboles, troncos secos, piedras, muros, etc. (López, 1996). La pitahaya es originaria de América tropical, fue utilizada desde tiempos precolombinos como alimento, tintes y medicinas. El conquistador Gonzalo Fernando de Oviedo fue el primero en hacer una descripción completa de la pitahaya en Nicaragua en el año de 1527 (Bolaños, 1995).

El género *Hylocereus* comprende de 16 a 18 especies distribuidas en México, las Antillas, América Central y al norte de América de Sur. La pitahaya fue descubierta por primera vez en forma silvestre por los conquistadores españoles en México, Colombia, Centroamérica y las Antillas, quienes le dieron el nombre de pitaya que significa fruta escamosa (Sánchez, 1984).

De acuerdo con Sturbbert y Mojica (1997) la demanda mundial de pitahaya es de aproximadamente 120 toneladas métricas por semana. Los principales exportadores del continente americano a nivel internacional son Nicaragua, que comercializa la variedad Roja, y Colombia que exporta principalmente la pitahaya Amarilla, además de pequeños volúmenes de pitahaya Roja. En Nicaragua, los materiales que más se siembran son: Lisa, Orejona, Rosa, Chocoya, Cebra y San Ignacio que son de cáscara y pulpa color rojo (Proyecto CEE-ALA, 1996).

La pitahaya es un cultivo que se reproduce de la forma sexual y asexual, pero la propagación sexual tiene el inconveniente que las descendencias presentan alto grado de heterocigosis y entran en la fase reproductiva después de dos años de siembra, por tal razón se prefiere la reproducción vegetativa a través de estructuras conocidas como cladodios o vainas (Janiek, 1997).

La propagación vegetativa o asexual se utiliza para producir una planta que posea el mismo genotipo que la planta madre y esto es posible porque todas las células de una planta poseen la información necesaria y/o suficiente para reproducir la planta entera.

En diversas plantas cultivadas como clones se ha señalado que después de ciclos de propagación vegetativa se observa un decaimiento en la producción, vinculándose este efecto a procesos de envejecimiento (Hartmann y Kester, 1991).

Las técnicas de cultivo *in vitro* es una alternativa que permite mejorar la calidad genética fisiológica y fitosanitaria de un gran número de especies vegetales. Se sabe que el rejuvenecimiento de los tejidos tiene un gran valor para la micropropagación masiva de plantas, debido a que por lo general se incrementa el rendimiento y el desarrollo de las plantas (Pérez, 1998).

II. OBJETIVOS

Objetivo general:

Contribuir a la micropropagación de pitahaya cv. Chocoya, mediante la evaluación de variables de cladodios, en las fases de multiplicación, enraizamiento, aclimatización y trasplante.

Objetivos específicos:

- 1.** Determinar el efecto de 9 medios de cultivo (sales MS+BAP+sacarosa), y tres tipos de explantes); número de explantes por frasco (5, 6 y 7) y volumen del frasco (220 y 430 ml) en fase de multiplicación.
- 2.** Determinar el efecto de 9 medios de cultivo (sales MS +BAP+sacarosa), consistencia de medios líquido y semisólido con explantes centrales en fase de enraizamiento.
- 3.** Determinar el efecto de 9 medios de cultivo (sales MS +BAP+sacarosa), y dos sustratos (compost y lombrihumus) en fase de aclimatización.
- 4.** Evaluar en el campo las plántulas provenientes de la fase de aclimatización y de explantes apical, central y basal.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del experimento

El experimento se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Programa de Recursos Genéticos Nicaragüense (REGEN) de la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicada en Km 12 ½ carretera norte, geográficamente a 12° 08' latitud Norte y 86° 10' longitud Oeste con una altitud de 56 msnm en el departamento de Managua.

3.2 Materiales y equipos

Los Materiales, Equipos y Reactivos que se utilizaron para la ejecución de esta investigación se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Materiales, equipos y reactivos químicos utilizados

| Equipos | Materiales | Ingredientes químicos |
|---------------------------|--|--|
| Horno | Beaker (500 y 1000 ml) Erlenmeyer (1000 ml) | Ácido clorhídrico (HCl), |
| Mechero Bunsen | Papel aluminio | Alcohol (70 %) |
| Autoclave | Cinta adhesiva transparente | Hipoclorito de sodio (NaClO ₃), |
| Balanza analítica | | Ácido indol- 3 -acético (AIA) |
| Cámara de flujo laminar | Marcadores | Bencil aminopurina (BAP) |
| Freezer (4°C) | Pipetas (10 y 20 ml) | Macro y micronutrientes del medio básico de cultivo Murashige y Skoog (1962) |
| Agitador electromagnético | Pinzas (18 cm) Escalpelos N° 4 Cuchillas N° 11 | Agar |
| pHmetro | Placas petri de vidrio Cuchillos | Sacarosa Agua destilada |

3.2.1 Esterilización de materiales y equipos

En la limpieza de la cristalería (frascos de vidrio) se utilizó hipoclorito de sodio (NaClO₃) a una concentración del 1% durante 24 horas, posteriormente se procedió a realizar un enjuague con agua y detergente. Una vez finalizado el enjuague los frascos se colocaron de forma invertida durante 2 horas para el escurrimiento del agua. Los platos petri, pinzas y escalpelos se esterilizaron en el horno a temperaturas de 180 °C durante 1 hora. El área de trabajo de la cámara de flujo laminar se desinfectó con alcohol al 90% y luego se expuso a luz ultravioleta durante 30 minutos, antes de proceder a la siembra de los diferentes experimentos.

3.3 Fase de multiplicación

El objetivo de la fase de multiplicación es la producción y aumento del coeficiente de multiplicación. Para ello se induce a la proliferación de brotes axilares que son separados en condiciones estériles y cultivados nuevamente en medios frescos (Jiménez, 1995). En la fase de multiplicación se desarrollaron 2 experimentos.

3.3.1 Efecto de medios de cultivo y tipo de explantes

Se estudió la respuesta a la multiplicación *in vitro* de tres segmentos del cladodio o vaina formados en la fase de establecimiento. Se seleccionaron vainas con tamaño aproximado de 2.5 a 3 cm, con la hoja del bisturí cada vaina se dividió en tres segmentos (apical, central y basal). Los segmentos se inocularon en nueve variantes de medios de cultivo con adición de dos concentraciones de BAP y cuatro de sacarosa (Cuadro 2). Se sembraron 5 explantes por cada frasco de 220 ml y a cada uno se les adicionaron 20 ml de medio de cultivo en estado semi-sólido. Posteriormente fueron trasladados al cuarto de crecimiento en condiciones de luz natural con período de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad y temperatura de 27 a 28 °C.

Cuadro 2. Niveles y factores evaluados en la fase de multiplicación.

| Medios de cultivo | | Segmento de la vaina |
|-------------------|----------------|----------------------|
| BAP (mg/l) | Sacarosa (g/l) | |
| 0.0 | 30 | Apical |
| 1.0 | 30 | Central |
| 1.0 | 40 | Basal |
| 1.0 | 50 | |
| 1.0 | 60 | |
| 2.0 | 30 | |
| 2.0 | 40 | |
| 2.0 | 50 | |
| 2.0 | 60 | |

MS= Murashige Skoog (1962) BAP= Bencil Amino Purina

A través de los medios de cultivos y los tres segmentos de cladodios, se realizó un arreglo factorial para conformar 18 tratamientos. Las variables medidas fueron el número de brotes y número de raíces.

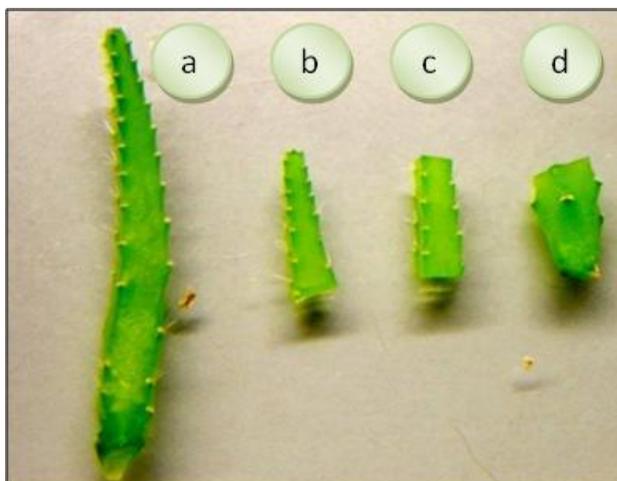


Figura 1. Partes de cladodio utilizados en la micropropagación de explantes. a) vaina entera. b) segmento apical. c) segmento central. d) segmento basal.

3.3.2 Número de explantes por frasco y volumen del frasco

Se estudió la respuesta en crecimiento y brotación de tres tipos de explantes de la vaina (apical, central y basal), se sembraron en frascos con volúmenes de 220 y 430 ml en número de 5, 6 y 7 explantes por frasco. Para el experimento se utilizó el mejor medio de cultivo obtenido en el experimento 1, que contenía las sales MS con 1 mg/l BAP y 30 g/l de sacarosa.

Cuadro 3. Tipo de explantes, número de explantes por frasco y volumen de frasco en el crecimiento y brotación de las vainas.

| Tipos de explantes | Número de explantes por frasco | Volumen de los frascos |
|--------------------|--------------------------------|------------------------|
| Apical | 5 explantes | 220 ml |
| Central | 6 explantes | 430 ml |
| Basal | 7 explantes | |

A través de los tipos y números de explantes, y volumen de frascos. Se realizó un arreglo factorial para conformar 18 tratamientos. Las variables medidas fueron el número de brotes y longitud de vainas.



Figura 2. Frascos para propagación *in vitro*. a) Frasco de 220 ml. b) Frasco de 430 ml.

3.4 Fase de enraizamiento

El propósito de la fase de enraizamiento es obtener plantas que desarrollen un sistema radicular que le permita una alta adaptabilidad en condiciones ambientales. El experimento se estableció con brotes axilares producidos en la fase de multiplicación, los que fueron sembraron en frascos de vidrio con volumen de 220 ml. Se evaluó la respuesta de los brotes axilares a nueve variantes de medios de cultivo que se les adicionaron dos concentraciones de AIA (0.5 y 1.0 mg/l) y cuatro concentraciones de sacarosa (30, 40, 50 y 60 g/l) y dos consistencias de medios de cultivo (semi-sólida y líquida). Las variantes de medios de cultivo se prepararon en base a las propuestas de Caldera y López (2002) en el cultivo de plátano (*Musa AAB* cv. Enano).

Cuadro 4. Tipo de explantes, número de explantes por frasco y volúmenes de frascos en el crecimiento y brotación de los cladodios.

| Medios de cultivo | | Consistencia |
|-------------------|----------------|--------------|
| BAP (mg/l) | Sacarosa (g/l) | |
| 1.0 | 30 | Líquida |
| 1.0 | 40 | Semisólida |
| 1.0 | 50 | |
| 1.0 | 60 | |
| 2.0 | 30 | |
| 2.0 | 40 | |
| 2.0 | 50 | |
| 2.0 | 60 | |

MS= Murashige Skoog (1962) BAP= Bencil amino purina

A través de los medios de cultivos y consistencia de cladodios, se realizó un arreglo factorial para conformar 16 tratamientos. Las variables medidas fueron la longitud de vainas y número de raíces.

3.5 Fase de aclimatización

El experimento se realizó con el objetivo de evaluar el comportamiento de las plantas *in vitro* en base a su crecimiento y sobrevivencia en la fase de aclimatización. En el estudio las plantas se evaluaron únicamente de acuerdo a su crecimiento previo en las nueve variantes de medio de cultivo y no por consistencia del medio de cultivo utilizada durante la fase de enraizamiento. Las plantas enraizadas se extrajeron de los frascos y se lavaron con agua para eliminar los restos de agar y de los medios de cultivo. Posteriormente se establecieron en sustratos de compost y lombrihumus, distribuidos en bandejas de polietileno de color negro con dimensiones de 30 x 45 cm de 60 orificios con dimensiones de 4.45 cm x 4.78 cm (Figura 3). Las plantas crecieron bajo condiciones de sombra con cubierta de sarán (70 %). Se suministró un riego diario y se aplicó fertilización líquida con la formulación 20-20-20 (NPK) más elementos menores en dosis de 2 g/l una vez a la semana. Las plantas permanecieron en estas condiciones durante ocho semanas. Se midió el longitud de vainas, número de raíces y sobrevivencia.



Figura 3. Plantas de pitahaya al momento de la siembra en fase de aclimatización.

3.6 Trasplante a bolsas de polietileno de plantas *in vitro* después de ocho semanas de aclimatizadas

Después de la evaluación de la fase de aclimatización, a diferentes plántulas a los cladodios o vainas se les practicaron tres tipos de cortes (corte apical, basal y central), que posteriormente se trasplantaron a bolsas de polietileno color negras con medidas de 6*8 cm, como sustrato se utilizó un suelo franco-arenoso (Figura 4). A ocho semanas de trasplantadas se evaluaron las variables longitud de vaina número de brotes y longitud de brotes y número de raíces. Se midió la longitud de vainas, número de brotes, longitud de brotes y número de raíces.



Figura 4. Fase de aclimatización. (a y b) Plantas de pitahaya listas para el trasplante. c). Segmentos de vainas trasplantadas a bolsas de polietileno.

3.7 Diseño experimental y análisis estadístico

3.7.1 Fase de multiplicación

En esta fase, se evaluó la respuesta de los tejidos a los factores variantes de medios de cultivo y tipo de explante. Se empleó un Diseño Completos al Azar (DCA). Se utilizaron 5 frascos por tratamiento y un número de cinco explantes por frasco, constituyéndose unidades experimentales de 25 plantas por variante de medio de cultivo. La información fue manejada en bases de datos utilizando Excel, y el procedimiento estadístico se realizó a través del SAS versión 9.1. Para el análisis estadístico primero se realizó el análisis de varianza (ANDEVA) y para definir los mejores tratamientos se empleó la prueba de arreglos múltiples de Waller-Duncan ($\alpha = 0.05\%$).

En el segundo experimento se estudió la respuesta de 3 tipos de explantes, el número de explantes por frasco (5, 6 y 7) y 2 volúmenes de los frascos (220 y 430 ml). Similar al experimento del numeral 3.7.1, se utilizó el mismo diseño experimental y con el mismo arreglo factorial y el análisis estadístico. En los dos experimentos a las cuatro semanas se evaluaron las variables número de brotes por vaina y número de raíces.

3.7.2 Fase de enraizamiento

En la fase de enraizamiento los datos se estructuraron en un modelo estadístico DCA en arreglo bifactorial (medios de cultivos y consistencia de los medios de cultivo). Se utilizaron cinco réplicas por cada tratamiento, con un número de 25 observaciones por tratamiento de cada factor en estudio. A las cuatro semanas se evaluaron las variables número de raíces, longitud de vaina y número de brotes. Se realizó un ANDEVA y para definir el mejor tratamiento se utilizó la prueba de medias de Duncan y Waller ($\alpha=0.05$).

3.7.3 Aclimatización de vitroplantas

Las plantas se sembraron en dos sustratos compost y lombrihumus. A las 6 semanas de aclimatizadas se evaluaron 12 plantas por cada tratamiento. Para la variable no paramétrica sobrevivencia se elaboró una tabla de porcentajes. En el caso de las variables longitud de vaina y número de brotes se utilizó un DCA con arreglo bifactorial. A los datos de estas dos variables se les efectuó el correspondiente análisis de ANDEVA y la prueba de medias de Duncan y Waller ($\alpha=0.05$).

3.7.4 Trasplante a bolsas de polietileno

En la fase de trasplante se evaluaron 75 plantas con la siguiente conformación: 25 plantas regeneradas a partir de la parte apical de la vaina, 25 plantas regeneradas de la porción central y 25 de la porción basal de la vaina. Para las variables longitud de vaina y número de brotes y de raíces se utilizó un diseño BCA con arreglo unifactorial. A los datos de las dos variables se les efectuó el correspondiente análisis de ANDEVA y la prueba de medias de Duncan y Waller ($\alpha=0.05$). La evaluación del experimento se realizó a las ocho semanas de trasplantados los tejidos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Fase de multiplicación: Variantes de medios de cultivo y tipos de explantes

Durante la fase de multiplicación se evaluaron variantes de medios de cultivo, tipos y densidad de explantes por frasco, así como el volumen de frasco.

4.1.1 Número de brotes y número de raíces

El número de brotes en la fase de multiplicación se diferenció significativamente ($Pr < 0.001$) en los tipos de yema y el medio utilizado. Asimismo, la interacción fue significativa, por lo que el comportamiento de los brotes de yema estuvo en dependencia del medio empleado.

Cuadro 5. Significación estadística en los efectos principales para las variables número de brotes y raíces producidos a las 4 semanas en nueve medios de cultivo y tres tipos de segmentos en cladodio de pitahaya cultivar Chocoya.

| Factores | | Número de brotes | Número de raíces |
|-------------------------|-----------------------|------------------|------------------|
| Tipos de yema | | | |
| | Apical | 4.59 a | 0.43 a |
| | Central | 4.14 b | 0.20 b |
| | Basal | 3.36 c | 0.17 b |
| Medio de cultivo | | | |
| BAP (mg/l) | Sacarosa (g/l) | | |
| 0.0 | 30 | 6.11 a | 0.03 b |
| 1.0 | 30 | 4.95 b | 0.08 b |
| 1.0 | 40 | 4.91 b | 0.12 b |
| 1.0 | 50 | 4.53 bc | 0.12 b |
| 1.0 | 60 | 3.96 cd | 0.24 b |
| 2.0 | 30 | 3.83 cd | 0.27 b |
| 2.0 | 40 | 3.63 d | 0.15 b |
| 2.0 | 50 | 3.59 d | 0.17 b |
| 2.0 | 60 | 0.91 e | 1.15 a |
| Yema | | ** | ** |
| Medio | | ** | ** |
| Yema*Medio | | ** | ** |
| Media | | 4.03 | 0.27 |
| R ² | | 0.75 | 0.71 |
| CV | | 25.37 | 34.06 |

Promedios con letras semejantes no difieren estadísticamente entre sí, según Duncan y Waller ($\alpha = 0.05$). NS= No Significativo, *=Significativo ($\alpha = 0.05$), **= Significativo ($\alpha = 0.01$).

Sobresalen el medio 0.0-30 con 6 brotes, seguido de los medios 1.0-30 y 1.0-50, con más de 4 brotes. Se puede observar en el Cuadro 6, que en los medios donde se obtuvo el mayor número de brotes se apreciaron los menores valores promedios en número de raíces. Los promedios obtenidos en el tipo de yema se diferenciaron estadísticamente mediante la prueba Duncan y Waller ($Pr=0.05$), en donde los mejores resultados se obtuvieron en las yemas apicales (4.59 brotes) y los menores valores en las yemas basales (3.36 brotes).

En cuanto a los tratamientos, no se presentaron diferencias estadísticas significativas ($Pr>0.05$) en el número de brotes emitidos por segmentos apicales de cladodios que permanecieron en las variantes medios de cultivo que contenían 1 mg/l de BAP con 30 ó 40 g/l de sacarosa y en el medio con 2 mg/l de BAP y 50g/l de sacarosa. Igual comportamiento estadístico se observó en la brotación de segmentos centrales en el medio con 1 mg/l de BAP y 30g/l de sacarosa. Los tres tipos de tejidos la brotación se favoreció en el medio de cultivo que contenía 1 mg/l de BAP y 30g/l de sacarosa.

Cuadro 6. Significación estadística en el número de brotes producidos a las 4 semanas en nueve medios de cultivo y tres tipos de segmentos en cladodio de pitahaya cultivar Chocoya.

| Medios de cultivo | | Tipo de segmento | | |
|-------------------|----------------|------------------|-------------|-------------|
| BAP (mg/l) | Sacarosa (g/l) | apical | central | basal |
| 0.0 | 30 | 0.28 k | 1.12 k | 1.32 k |
| 1.0 | 30 | 6.60 ab | 6.96 a | 4.64 defgh |
| 1.0 | 40 | 6.43 abc | 4.52 efghi | 3.76 efghij |
| 1.0 | 50 | 4.16 efghij | 4.56 defghi | 3.16 ij |
| 1.0 | 60 | 5.12 cdef | 3.44 hij | 2.92 j |
| 2.0 | 30 | 5.04 cdefg | 5.40 bcde | 4.28 efghij |
| 2.0 | 40 | 3.36 hij | 4.04 efghij | 3.36 hij |
| 2.0 | 50 | 5.96 abcd | 3.68 ghij | 3.96 fghij |
| 2.0 | 60 | 4.44 efghi | 3.56 hij | 2.88 j |

Promedios con letras semejantes no difieren estadísticamente entre sí según Duncan y Waller ($\alpha = 0.05$).

También se observó que en los segmentos basales las brotaciones fueron menores con adiciones de 1 y 2 mg/l de BAP, cuando se agregaron 60 g/l de sacarosa. Los resultados se presentan en el Cuadro 6. El comportamiento de la brotación es posible producto de interacción entre las concentraciones de BAP, sacarosa y el segmento de tejido que se tome de la vaina.

La mínima respuesta a la brotación presentada en los tres explantes tomados de las vainas, pudo deberse al efecto que produjo la carencia de fitohormonas y de sacarosa al medio de cultivo. Se conoce que la sacarosa es un componente muy importante en cualquier medio de nutritivo, porque es esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, ya que el crecimiento tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis o incluso en la oscuridad. La concentración de sacarosa depende de mucho del tipo y edad del material vegetal. Generalmente el crecimiento y desarrollo aumentan con la concentración de sacarosa, hasta que alcanza un óptimo, disminuyendo después con muy altas concentraciones (Pierik, 1990).

Todos los tejidos de plantas cultivadas *in vitro* producen dióxido de carbono durante la respiración sobre la cual depende su metabolismo y crecimiento. El dióxido de carbono (CO₂) es tomado en cantidades significativas por actividad fotosintética de células y tejidos. El sustrato primario para la respiración de la mayoría de tejidos de plantas cultivadas es el carbohidrato adicionado al medio a través de la sacarosa usualmente (George, 1993). En el Cuadro 6, se observan los resultados.

También de acuerdo a la tendencia de la brotación en los tres segmentos, se puede afirmar que además del efecto de los constituyentes que caractericen a las variantes de medios de cultivo, existe otro factor que facilita o reduce la brotación axilar como es la porción de la vaina de donde se extrajo el explante. En las porciones o segmentos apicales y centrales respondieron mejor a la brotación en relación a los segmentos basales, debido posiblemente a que en la base de la vaina se produce mayor acumulación de auxina incrementándose el efecto de dominancia apical.

Villalobos *et al.*, (1991) en estudios de micropropagación de tuna (*Opuntia amyoclaea*) en la que se realizaron cortes longitudinales de los cladodios, atribuyen la brotación axilar a la eliminación de la dominancia apical por el estímulo del BAP sobre el crecimiento de las yemas.

Los resultados del estudio tienen relación al fenómeno fisiológico de la dominancia apical que está presente al momento de seleccionar la fuente de los explantes en la fase de establecimiento, así cuando se toman de plantas jóvenes o de zonas de crecimiento activo tuvieron un mejor crecimiento *in vitro* que aquellos tomados de yemas en reposo. Mientras más joven y menos diferenciado sea el tejido que se va a implantar, mejor será la respuesta *in vitro* (George, 1993).

El número de raíces fue inferior a uno, y no se observó efecto significativo ($Pr > 0.05$) en los factores (interacciones) estudiados. Al parecer los tejidos fueron influenciados principalmente por el efecto del BAP más que por el efecto de la sacarosa, debido a que esta hormona a determinadas concentraciones favorece la brotación axilar e inhibe los procesos de formación de raíces, como lo reporta George (1993).

4.2 Fase de multiplicación: Tipos y densidad de explantes por frasco y volumen de frasco

4.2.1 Número de brotes y longitud de vainas

El número de brotes fue significativamente por el tipo de yema ($Pr = 0.05$), y los más altos número de brotes se reportaron en las yemas centrales. Asimismo, el mayor volumen de frasco obtuvo los mejores valores en número de brotes. Por otro lado, los mayores valores en número de brotes se contabilizaron en los frascos que presentaron los mayores números de explantes (Cuadro 7).

No se detectó significación estadísticas ($Pr > 0.05$) en el Yema*Volumen y Yema*No. exp/frasco; no así en la interacción Volumen* No. exp/frasco, y la interacción triple.

Cuadro 7. Significación estadística en los efectos principales para las variables número de brotes de pitahaya cultivar Chocoya.

| Factores | Número de brotes |
|-----------------------------|-------------------------|
| Tipos de yema | |
| Apical | 3.88 b |
| Central | 4.83 a |
| Basal | 3.55 c |
| Volumen de frasco | |
| 430 ml | 4.38 a |
| 220 ml | 3.80 b |
| No. explantes/frasco | |
| 7 exp/frasco | 4.35 a |
| 6 exp/frasco | 4.22 a |
| 5 exp/frasco | 3.69 b |
| Yema | ** |
| Volumen | ** |
| No. exp/frasco | ** |
| Yema*Volumen | NS |
| Yema*No. exp/frasco | NS |
| Volumen* No. exp/frasco | ** |
| Media | 4.09 |
| R ² | 0.70 |
| CV | 19.04 |

Promedios con letras semejantes no difieren estadísticamente entre sí, según Duncan y Waller ($\alpha = 0.05$). NS= No Significativo, *=Significativo ($\alpha = 0.05$), **= Significativo ($\alpha = 0.01$).

En el número de brotes por segmento de vaina, se obtuvieron los mejores resultados estadísticos en los tratamientos conformados por las combinaciones tejido central, frasco de 220 ml con 5 y 6 explante por frasco; tejido central, frasco de 430 ml con 5, 6 y 7 explante por frasco y el tratamiento tejido apical, frasco de 430 ml y con 5 y 6 explante por frasco. La menor respuesta estadística se presentó en los tratamientos tejido basal, frasco de 220 ml y 5 explante por frasco y tejido apical, frasco de 430 ml y 5 explant por frasco.

En el Cuadro 8, se observa que hubo una tendencia a favorecer la brotación axilar cuando se emplearon tejidos tomados de la parte central de la vaina y en número de 6 ó 7 tejidos implantados por frascos de 430 ml. Con explantes de porciones apicales y centrales la respuesta a la brotación fue mayor cuando se inocularon 5 ó 6 explantes por frasco de 220 ml.

En la variable longitud de vaina, no se registraron diferencias estadísticas ($Pr > 0.05$), y en la interacción conformada por tipo de explante, tamaño de frasco y número de plantas por frasco; no así en el número de brotes que la interacción resultó altamente significativa ($Pr=0.01$).

Evert y Holt (1975); citados por George (1993), observaron que normalmente el crecimiento *in vitro* en frascos grandes es mejor cuando contiene muchos brotes, porque juntos ayudan a mantener una adecuada humedad relativa. Juárez y Zamora (2008), encontraron que explantes del cultivar de piña MD-2 implantados en frascos de 430 ml, la respuesta al ahijamiento dependió de la cantidad de plantas por frasco, debido posiblemente porque disponen de una mayor cantidad de oxígeno, nutrientes y de reguladores de crecimiento para lograr un buen crecimiento vegetativo de las vitroplantas.

Dalton y Dale (1981), encontraron que después de tres meses esquejes de raigrás anual (*Lolium multiflorum*) inoculados en frascos de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo producen tres veces más brotes en comparación con esquejes que se implantaron en frascos con capacidad de 30 ml con adición de 10 ml de medio o que en frascos de 60 ml. con suministros de 15 ml de medio de cultivo semi-sólido.

Cuadro 8. Número de brotes producidos a las 4 semanas en tres tipos de explantes, dos tipos de frascos y tres tipos de explantes en cladodio de pitahaya cultivar Chocoya.

| Tipos de explantes | Volumen de frasco (ml) | Explante/frasco | | |
|--------------------|------------------------|-----------------|-----------|----------|
| | | 5 | 6 | 7 |
| Apical | 220 | 3.56 cd | 4.00 bcd | 3.63 cd |
| Apical | 430 | 4.43 abcd | 4.30 abcd | 4.23 bcd |
| Central | 220 | 4.43 abcd | 4.30 abcd | 4.23 bcd |
| Central | 430 | 4.76 abc | 5.40 ab | 5.86 a |
| Basal | 220 | 3.10 d | 3.46 cd | 3.46 cd |
| Basal | 430 | 3.36 cd | 3.76 cd | 4.16 bcd |

Promedios con letras semejantes no difieren estadísticamente entre sí según Duncan y Waller ($\alpha = 0.05$).

De acuerdo con Bateson, *et al.*, (1987) la forma del frasco tiene influencia en la difusión gaseosa, afirmando que en frascos de igual volumen, el crecimiento es rápido cuando la distancia de difusión es pequeña, pero la tasa disminuye si el largo del frasco se incrementa en relación al diámetro.

El número de raíces fue reducido y aunque no se presentaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos. Cabe destacar que no se observó producción de raíces en los tratamientos con seis segmentos apicales en frascos de 220 ml; con 5 ó 7 segmentos apicales en frascos 440 ml y en la interacción conformada por segmentos basales en número de 6 ó 7 por frasco de 440 ml. Los resultados se presentan en el Cuadro 6. La reducida producción de raíces se debe posiblemente al efecto inhibitorio que ejerce el BAP (Figura 5).

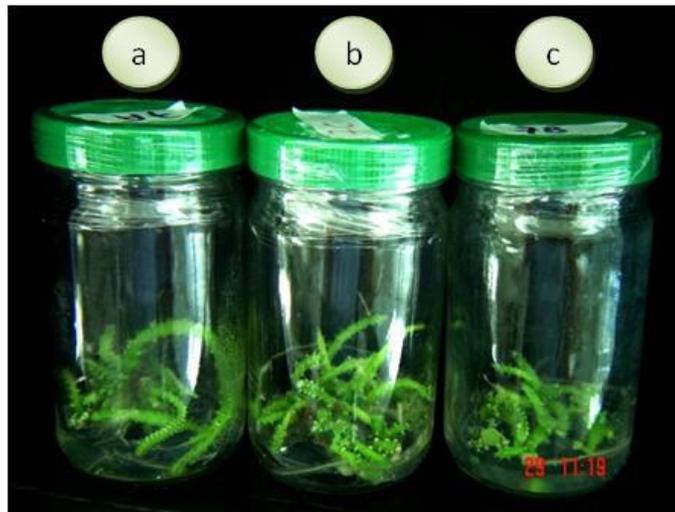


Figura 5. Crecimiento *in vitro* de plantas de pitahaya. a) a partir de segmentos apicales. b) Segmentos centrales. c) Segmentos basales.

4.3 Fase de enraizamiento: Medios de cultivos y consistencia de cultivos

En la mayoría de los medios de cultivo para el enraizamiento se recomienda elevar la concentración de sacarosa para lograr un crecimiento vigoroso de las raíces, además que es mayor la sobrevivencia de las plantas al ser sembradas en la fase de aclimatización, porque se adaptan mejor para soportar el stress hídrico motivado por las condiciones de mayor presión osmótica donde se desarrollan, unido a una mejor constitución morfológica de la planta (Jiménez, 1998).

Se observó efecto significativo ($Pr=0.05$), en los Medios de cultivos, así como en la interacción ($Pr=0.01$) en las variables estudiadas.

Cuadro 9. Significación estadística en factores evaluados y categorización en la longitud de vaina y el número de raíces en la fase de enraizamiento.

| Factores | | Longitud de vaina | Número de raíces |
|--------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|
| Consistencia | | | |
| | Líquido | 3.65 a | 1.92 a |
| | Sólido | 3.50 a | 2.03 a |
| Medios de cultivo | | | |
| BAP (mg/l) | Sacarosa (g/l) | | |
| 0.0 | 30 | 3.96 a | 2.64 a |
| 0.5 | 40 | 3.84 a | 2.04 bc |
| 0.5 | 60 | 3.62 ab | 2.02 bc |
| 1.0 | 40 | 3.60 ab | 1.84 bc |
| 0.5 | 50 | 3.54 ab | 2.18 b |
| 1.0 | 50 | 3.50 ab | 1.94 bc |
| 1.0 | 60 | 3.50 ab | 1.80 bc |
| 1.0 | 30 | 3.32 b | 1.58 c |
| 0.5 | 30 | 3.30 b | 1.76 bc |
| | Media | 3.58 | 1.98 |
| | R ² | 0.53 | 0.57 |
| | CV | 13.32 | 24.68 |
| | Consistencia | NS | NS |
| | Medio | ** | ** |
| | Consistencia*Medio | ** | ** |

Promedios con letras semejantes no difieren estadísticamente entre sí, según Duncan y Waller ($\alpha = 0.05$).
NS= No Significativo, *=Significativo ($\alpha = 0.05$), **= Significativo ($\alpha = 0.01$).

A las cuatro semanas de establecidos los explantes se determinó que el promedio de longitud de vaina fue mayor en los medios de cultivo de consistencia líquida que contenían las sales MS con la adición únicamente de 30 g/l de sacarosa y de consistencia semi-sólida con 0.5 mg/l de AIA y 40g/l de sacarosa, resultando un promedio similar de 4.12 cm en ambos tratamientos. En el 77.77% de los tratamientos, los cladodios presentaron un rango de longitud entre 3.32 y 384 cm, únicamente en dos de los tratamientos (22.2%) se registró menor longitud de vaina, con promedios en el rango de 2.76 a 2.92 cm.

Cuadro 10. Significación estadística en la longitud de vaina y número de raíces producidas a las 4 semanas en diferentes medios de cultivos y dos tipos de consistencia en cladodios de pitahaya cultivar Chocoya.

| Medios de cultivo | | Longitud de vaina | | Número de raíces | |
|-------------------|----------------|-------------------|----------|------------------|---------|
| BAP (mg/l) | Sacarosa (g/l) | Líquido | Sólido | Líquido | Sólido |
| 0.0 | 30 | 4.12 a | 3.80 ab | 1.96 bc | 3.32 a |
| 0.5 | 30 | 3.84 ab | 2.76 d | 1.68 bc | 1.84 bc |
| 0.5 | 40 | 3.56 ab | 4.12 a | 2.16 b | 1.92 bc |
| 0.5 | 50 | 3.32 bcd | 3.76 ab | 2.08 cb | 2.28 b |
| 0.5 | 60 | 3.52 abc | 3.72 ab | 1.88 bc | 2.16 b |
| 1.0 | 30 | 3.72 ab | 2.92 cd | 1.48 c | 1.68 bc |
| 1.0 | 40 | 3.76 ab | 3.44 bc | 2.24 b | 1.44 c |
| 1.0 | 50 | 3.32 bcd | 3.68 ab | 1.92 bc | 1.96 bc |
| 1.0 | 60 | 3.68 ab | 3.32 bcd | 1.92 bc | 1.68 bc |

Promedios con letras semejantes no difieren estadísticamente entre sí según Duncan y Waller ($\alpha = 0.05$).

En el tratamiento que contenía 30 g/l de sacarosa, sin adición de AIA y de consistencia sólida, se presentó el mayor promedio de raíces por cladodio (3.32), estadísticamente superior a los demás tratamientos. El 83.33% de los tratamientos presentaron un rango de producción de raíces por cladodio entre 1.68 y 2.28. En el tratamiento sales MS consistencia líquida con 1 mg/l AIA y 30 g sacarosa y el tratamiento sales MS, consistencia sólida con 1 mg/l AIA y 40 g sacarosa, se presentaron los menores promedios de raíces con promedios respectivos de 1.48 y 1.44 (Cuadro 10).

Estos resultados evidencian que no hubo una tendencia definida en la respuesta al crecimiento de los cladodios por efecto de las adiciones de AIA, de sacarosa y la consistencia de los medios de cultivo. Villalobos *et al*, (1991) lograron el enraizamiento de brotes de *Opuntia* spp. y *Agave* sp, en un medio de cultivo que contenía las sales MS al 50% con 0.5 mg/l de AIB y sacarosa 2 ó 3%.

4.4 Fase de aclimatización: Medios de cultivos y sustratos sólidos

Durante el cultivo *in vitro* las plantas crecen bajo un ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos, especialmente sacarosa. Estas condiciones provocan cambios en la morfología y fisiología de las plantas, que las hacen diferir de las que crecen en invernaderos o en el campo (Agramonte *et al.*, 1998).

Se observó efecto significativo ($Pr=0.05$), en el Humus (Lombrihumus) en la longitud de vainas. La interacción fue significativa ($Pr=0.01$) en la longitud de vainas (Cuadro 11).

Cuadro 11. Significación estadística en factores evaluados y categorización en la longitud de vainas.

| Factores | | Compost | | Humus | |
|--------------------------|-----------------------|---------|----|-------|------|
| Consistencia | | | | | |
| Líquido | | 3.57 | a | 3.23 | b |
| Sólido | | 3.32 | a | 4.49 | a |
| Medios de cultivo | | | | | |
| BAP (mg/l) | Sacarosa (g/l) | | | | |
| 0.5 | 60 | 5.88 | a | 3.29 | abcd |
| 0.0 | 30 | 3.96 | b | 4.61 | abc |
| 1.0 | 50 | 3.91 | b | 4.25 | abcd |
| 0.5 | 40 | 3.58 | bc | 5.03 | a |
| 1.0 | 40 | 3.20 | bc | 2.66 | cd |
| 0.5 | 30 | 2.93 | bc | 5.18 | a |
| 0.5 | 50 | 2.91 | bc | 4.18 | abcd |
| 1.0 | 60 | 2.54 | bc | 3.06 | bcd |
| 1.0 | 30 | 2.08 | c | 2.51 | d |
| Media | | 3.44 | | 0.08 | |
| R ² | | 0.76 | | 0.45 | |
| CV | | 39.75 | | 41.19 | |
| Consistencia | | NS | | NS | |
| Medio | | ** | | NS | |
| Consistencia*Medio | | NS | | * | |

Promedios con letras semejantes no difieren estadísticamente entre sí, según Duncan y Waller ($\alpha = 0.05$). NS= No Significativo, *=Significativo ($\alpha = 0.05$), **= Significativo ($\alpha = 0.01$).

El promedio de longitud en las plantas fue mejor cuando éstas se sembraron en un sustrato de compost y que previamente habían enraizado en un medio de cultivo que se le adicionaron 0.5 mg/l de AIA y 60 g/l de sacarosa. En este tratamiento se alcanzó el promedio de 5.87 cm que resultó estadísticamente superior a los promedios obtenidos con plantas que crecieron en el sustrato lombrihumus y antes enraizadas en medios de cultivo que contenían 1 mg/l de AIA con 30, 40 y 60 g/l de sacarosa y también resultó superior a los promedios alcanzados con plantas aclimatizadas en un sustrato compost y enraizadas previamente en los medios de cultivo con 0.5 mg/l de AIA más 30 ó 50 g/l de sacarosa y con 1 mg/l de AIA con 30 ó 40 g/l (Cuadro 11).

Se observó efecto significativo (Pr=0.05) en el compost para los factores evaluados; así como la interacción (Pr=0.01). Los valores promedios en el número de raíz también fueron significativos en el medio y la interacción (Cuadro 12), pero no se detectaron diferencias en el sustrato lombrihumus para la consistencia.

Cuadro 12. Significación estadística en factores evaluados y categorización en el número de raíz.

| Factores | | Compost | Lombrihumus |
|--------------------------|-----------------------|----------|-------------|
| Consistencia | | | |
| | Líquido | 1.57 a | 1.59 a |
| | Sólido | 1.14 b | 1.47 a |
| Medios de cultivo | | | |
| BAP (mg/l) | Sacarosa (g/l) | | |
| 0.5 | 60 | 2.51 a | 3.29 abad |
| 0.0 | 30 | 1.66 b | 4.61 abc |
| 1.0 | 50 | 1.59 bc | 4.25 abcd |
| 0.5 | 40 | 1.25 bcd | 4.17 abcd |
| 1.0 | 40 | 1.21 bcd | 5.03 ab |
| 0.5 | 30 | 1.20 bcd | 5.18 a |
| 0.5 | 50 | 1.00 bcd | 2.66 cd |
| 1.0 | 60 | 0.91 cd | 3.06 bcd |
| 1.0 | 30 | 0.83 d | 2.51 d |
| | Media | 1.35 | 1.53 |
| | R ² | 0.76 | 0.62 |
| | CV | 34.28 | 20.42 |
| | Consistencia | ** | NS |
| | Medio | ** | * |
| | Consistencia*Medio | * | * |

Promedios con letras semejantes no difieren estadísticamente entre sí, según Duncan y Waller ($\alpha = 0.05$). NS= No Significativo, *=Significativo ($\alpha = 0.05$), **= Significativo ($\alpha = 0.01$).

También en las variables longitud de vaina y número de raíces las plantas enraizadas en un medio con 1 mg/l de AIA y 30 g/l de sacarosa y aclimatizadas en el sustrato de compost, se presentaron los menores resultados estadísticos con promedios respectivos de 2.07 cm y 0.82.

El comportamiento de los sustratos no fue significativo en la consistencia ($Pr > 0.05$) en el porcentaje de sobrevivencia; así como la interacción ($Pr = 0.01$). Los valores promedios de supervivencia fue significativos en el medio, no así en la interacción (Cuadro 13).

Cuadro 13. Significación estadística en factores evaluados y categorización en el porcentaje de sobrevivencia.

| Factores | | Compost | Lombrihumus |
|--------------------------|-----------------------|----------|-------------|
| Consistencia | | | |
| Sólido | | 72.22 a | 70.37 a |
| Líquido | | 64.82 a | 70.47 a |
| Medios de cultivo | | | |
| BAP (mg/l) | Sacarosa (g/l) | | |
| 1.0 | 40 | 100.00 a | 62.50 b |
| 0.0 | 30 | 75.00 ab | 95.84 a |
| 0.5 | 60 | 75.00 ab | 75.00 ab |
| 1.0 | 60 | 75.00 ab | 80.96 ab |
| 1.0 | 50 | 70.84 b | 75.00 ab |
| 0.5 | 50 | 58.34 b | 50.00 b |
| 0.5 | 40 | 58.33 b | 66.66 ab |
| 0.5 | 30 | 54.16 b | 66.66 ab |
| 1.0 | 30 | 50.00 b | 62.50 b |
| Media | | 68.52 | 70.42 |
| R ² | | 0.75 | 0.74 |
| CV | | 38.03 | 37.76 |
| Consistencia | | NS | NS |
| Medio | | * | * |
| Consistencia*Medio | | NS | NS |

Promedios con letras semejantes no difieren estadísticamente entre sí, según Duncan y Waller ($\alpha = 0.05$). NS= No Significativo, *=Significativo ($\alpha = 0.05$), **= Significativo ($\alpha = 0.01$).

En las variables longitud de vaina y número de raíces los mejores promedios se obtuvieron con plantas que fueron enraizadas en los siguientes medios de cultivo: Sales de MS con 30 g/l de sacarosa: 0.5 mg/l de AIA con 30, 40 y 60 g/l de sacarosa y el medio que se le adicionó 1 mg/l de AIA con 50 g/l de sacarosa.

Únicamente en la combinación 0.5 mg/l de AIA y 60 g/l de sacarosa las plantas se adaptaron mejor en el sustrato de compost llegando a ser la mejor variante con sobrevivencia de las plantas; en cambio, las otras combinaciones de AIA y sacarosa se adaptaron mejor en el sustrato lombrihumus.

Jiménez (1995), reporta que en caña de azúcar las plantas procedentes de los medios de cultivos con las mayores concentraciones de sacarosa presentaron una mayor sobrevivencia *in vitro* y al ser sembradas en la fase de aclimatización, obteniendo los mejores resultados en el medio de cultivo que suministró 4% de sacarosa.

Cuadro 14. Significación estadística en la longitud de vaina, número de raíces y porcentaje de sobrevivencia de plantas aclimatizadas en sustratos de compost y lombrihumus a las 6 semanas.

| Medios de cultivo | | Longitud de vaina | | Número de raíces | | Sobrevivencia (%) | |
|-------------------|----------------|-------------------|----------|------------------|----------|-------------------|----------|
| BAP (mg/l) | Sacarosa (g/l) | Lombri-humus | Compost | Lombri-humus | Compost | Lombri-humus | Compost |
| 0.0 | 30 | 0.61 abc | 3.96 abc | 1.75 abc | 1.66 abc | 75.00 ab | 75.00 ab |
| 0.5 | 30 | 5.17 ab | 2.9 bc | 2.16 ab | 1.20 bc | 95.8 ab | 75.00 a |
| 0.5 | 40 | 5.02 ab | 3.57 abc | 1.67 abc | 1.21 bc | 75.00 ab | 70.84 ab |
| 0.5 | 50 | 4.17 abc | 2.91 bc | 1.55 abc | 1.25 bc | 66.66 ab | 58.33 ab |
| 0.5 | 60 | 3.28 abc | 5.87 a | 1.21 bc | 2.51 a | 62.50 ab | 100.00 a |
| 1.0 | 30 | 2.51 bc | 2.07 c | 0.98 bc | 0.82 c | 66.66 ab | 54.16 ab |
| 1.0 | 40 | 2.66 bc | 3.20 abc | 1.17 bc | 1.00 bc | 50.00 b | 58.34 ab |
| 1.0 | 50 | 4.25 abc | 3.91 abc | 1.67 abc | 1.58 abc | 80.96 ab | 75.00 ab |
| 1.0 | 60 | 3.06 bc | 2.90 bc | 1.63 abc | 1.04 bc | 62.50 ab | 57.14 ab |

Promedios con letras semejantes no difieren estadísticamente entre sí según Duncan y Waller ($\alpha = 0.05$).

De acuerdo a lo observado en las variables longitud de vaina y número de raíces, parece indicar que la no adición de AIA en la fase de enraizamiento no influyó de forma determinante en la adaptación de las plantas en relación a las plantas que habían enraizado en medios de cultivo que contenía AIA y sacarosa; pero sí se determinó que hay una tendencia a favorecer la adaptación cuando el sustrato empleado fue el lombrihumus, con la excepción de los tratamientos que conformaron la interacción de plantas enraizadas en la variante de medio de cultivo con 0.5 mg/l de AIA y 60 g/l de sacarosa y aclimatizadas en el sustrato compost.

En el tratamiento que conformado por la interacción de la variante de medio de cultivo con adición de 0.5 mg/l de AIA con 30 g/l de sacarosa y el sustrato de lombrihumus la sobrevivencia fue del 95%. Con estos resultados se puede afirmar que la respuesta de las plantas en la fase de aclimatización estará en dependencia de la concentración de AIA y de sacarosa que se adicionen al medio de cultivo en la fase de enraizamiento y en la fase de aclimatización del sustrato. De los resultados obtenidos se confirmó que el mejor medio de cultivo en la fase de enraizamiento no necesariamente será determinante para lograr mejores resultados en la fase de aclimatización.



Figura 6. Plantas de pitahaya en crecimiento en la fase de aclimatización.

4.5 Trasplante de vitroplantas

Las variables evaluadas en la fase de trasplante en los tres tipos de explantes, resultaron significativas ($\alpha = 0.05$) para este factor (Cuadro 15).

El segmento apical de la vaina presentó una mayor longitud con promedio de 14.56 cm, superando estadísticamente a las longitudes obtenidas en los segmentos centrales y basales, con promedios respectivos de 10 cm. También en el número de raíces los segmentos apicales (7.80) fueron significativamente superiores al promedio de raíces que emitieron los segmentos centrales y basales con promedios respectivos de 6.56 y 6.48.

Se produjo brotación axilar en los tres tipos de segmentos de vaina sujetos a estudio durante la fase de trasplante. El comportamiento estadístico de los promedios de brotes axilares fue similar con segmentos basales y centrales con promedios respectivos de 1.04 y 0.88, mientras que la menor respuesta se obtuvo con el segmento apical con promedio de 0.40 brotes.

La longitud de los brotes axilares fue significativamente superior en los segmentos centrales con promedio de 2.46 cm en relación a los promedios obtenidos con los segmentos basales y apicales con longitudes respectivas de 1.16 y 0.64 cm. Los resultados se aprecian en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Significación estadística en la longitud de vaina, número y longitud de brotes y número de raíces producidas por los segmentos de vainas apicales, centrales y basales de pitahaya cultivar Chocoya a las 8 semanas.

| Tipo de explante | Longitud de vaina (cm) | Número de brotes | Longitud de brotes (cm) | Número de raíces |
|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| Apical | 14.56 a | 0.40 b | 0.64 b | 7.80 a |
| Central | 10.00 b | 0.88 a | 2.46 a | 6.56 b |
| Basal | 10.00 b | 1.04 a | 1.16 b | 6.48 b |

Promedios con letras semejantes no difieren estadísticamente entre sí según Duncan y Waller ($\alpha = 0.05$).

Un elemento que permite la reducción de los costos de la planta producida *in vitro*, es que en el presente estudio se demostró que finalizada la fase de aclimatización, es posible obtener dos plantas adicionales a través del corte de la vaina en tres segmentos.

Después de evaluar el crecimiento de los tres tipos de segmentos de vaina, se comprobó que la sobrevivencia de los tejidos fue del 100 %, aún cuando se establecieron sobre un sustrato de suelo franco-arenoso (Figura 7).

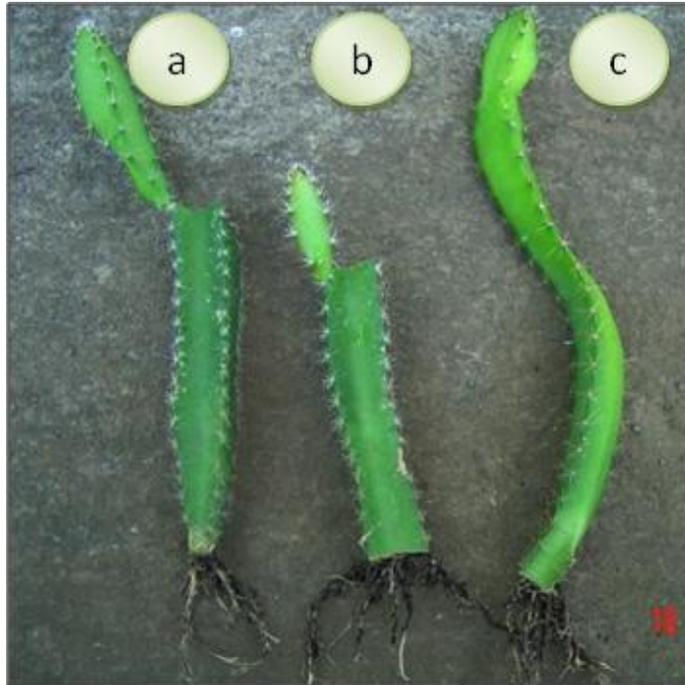


Figura 7. Brotes axilares producidos en la fase de trasplante. a) Segmento basal de la vaina. b). Segmento central. c). Segmento apical.

El rápido crecimiento observado en las plantas pitahaya reproducida *in vitro*, representa una alternativa que facilitaría no solo la reproducción de materiales genéticos promisorios, sino que también se posibilita la conservación de la variabilidad genética que se encuentra en Nicaragua. Este crecimiento confirma una vez más el efecto del rejuvenecimiento que se produce en los tejidos reproducidos *in vitro*, que resultan muy similares a la respuesta de la pitahaya cuando se reproduce de forma convencional por medio de vainas.

V. CONCLUSIONES

- 1.** Los segmentos apicales y centrales, la utilización de BAP y los menores niveles de sacarosa, favorecieron significativamente el número de brotes emitidos por segmentos. De igual manera, el número de brotes fue significativo en los frascos de mayor volumen, siendo mayor a medida que aumentó el número de explantes en la fase de multiplicación.
- 2.** En la fase de enraizamiento, la longitud de vaina fue mayor en los medios de cultivo de bajo nivel de AIA y Sacarosa. Asimismo, el número de raíces fue favorecido con el menor nivel de sacarosa, pero sin AIA.
- 3.** Las plántulas provenientes de la fase de aclimatización, el mayor nivel de sacarosa y el menor nivel de AIA favoreció el número brote, sobrevivencia y longitud de cladodio; y no se obtuvo efecto significativo en los sustratos evaluados.
- 4.** El segmento apical de la vaina y el número de raíces presentaron los mejores valores en la fase de trasplante.

VI. RECOMENDACIONES

- 1.** En la fase de multiplicación utilizar un medio de cultivo que contenga 1 mg/l de BAP con 30 ó 40 g/l de sacarosa y utilizar frascos de 440 ml con 5 ó 6 tejidos por frasco.
- 2.** En la fase de enraizamiento utilizar las sales MS con 30 g/l de sacarosa si la consistencia del medio de cultivo es líquida y adicionar a las sales de MS 0.5 mg/l de de AIA con 40 g/l de sacarosa si es de consistencia sólida.
- 3.** Para obtener mejores resultados en la fase aclimatización se debe tomar en cuenta el sustrato y los componentes del medio de cultivo 0.5 mg de AIA y 60 g/l de sacarosa en la fase de enraizamiento.
- 4.** A las seis semanas de aclimatizados las plantas, las vainas se pueden dividir en tres segmentos (apical, central y basal), y de estos utilizar los segmentos apicales.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agramonte D.; F. Jiménez y R. Dita, 1998.** Propagación y Mejora Genética de plantas por biotecnología. En: Aclimatización. (Ed.) Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba, pp 193-206.
- Bateson J., M. Grout, B. Wand, S. Lane, 1987.** The influence of container dimensions on the multiplication rate of regenerating plant cell cultures. In: Ducaté *et al.* (Eds.), pp 275-277.
- Bolaños, R. 1995.** Pithaya amarilla (*Hylocereus triangularis* L.). Financiera Nicaragüense de Inversiones. 24 p.
- Caldera L. A y A. López, 2002.** Mejoramiento de la eficiencia de la propagación *in vitro* de plátano (*Musa* AAB cv. Enano). Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. 41p.
- Dalton S., J. & P. J. Dale, 1981.** Induced tillering of *Lolium multiflorum in vitro*. Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.1. 57-64
- George, E.F., 1993.** Plant propagation by tissue culture. Part 1. The Technology. Exegetics Ltd., Edington, England. 574 p.
- George E. F. & P. D. Sherrington. 1984.** Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories Exegetics Limited, Edington, Wilts, England. 118 -210.
- Hartmann H., y D. kester. 1991.** Propagación de plantas: Principios y prácticas. Ed. Continental, VI impresión. México: pp 220-235.
- Janick, J. 1997.** Cacti as Crops. In: Horticultural Review 18:290-319.

- Jiménez G. E. 1998.** Cultivo de ápices y meristemas en: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología (Ed.) Perez Ponce. Santa Clara, Cuba, pp. 45-46.
- Jiménez G. E. 1995.** Propagación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Tesis doctoral. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de las Villas, Cuba. 99 p.
- López H. 1996.** Guía tecnológica número 6. Cultivo de la pitahaya. INTA. Managua, Nicaragua. 25 p.
- Pérez J. N. 1998.** En: Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. (Ed.). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Cuba, pp 83 – 295.
- Pierik R. L. 1990.** Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. (Ed.). Mundi-Prensa, Madrid, España. 326 p
- Proyecto CEE-ALA 86/30. UE-PNDR. 1996.** Segundo encuentro nacional sobre el cultivo de pitahaya. Universidad Nacional Agraria, Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria, Asociación de productores y Exportadores no Tradicionales. Managua, Nicaragua. 1 p.
- Sánchez, 1994.** Memoria del simposio realizado por el departamento de producción agrícola y animal de la división de ciencias biológicas y de la salud de la AUM-Xochimilco, México. 28 p.
- Stubbert T., C. Mójica. 1997.** Revista FOR EXPORT. Mercado de la pitahaya. APPEN, Managua, Nicaragua 46 p.
- Villalobos V. M., J. M. Mejía, y H. A. Escobar. 1991.** Micropropagación de *opuntias* y *agaves*. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones (Eds.). Roca. W y Mroginski, Calí, Colombia: pp 643 - 662.