



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

Análisis de los cambios morfológicos-celulares en respuesta al estrés en
frío de pitahaya (*Hylocereus undatus*) obtenida por cultivo *in vitro*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

VALERI OSTRIA CABAÑAS

DIRECTORA:

DRA. DULCE MARÍA GALVÁN HERNÁNDEZ

CO-DIRECTOR:

DR. PABLO OCTAVIO AGUILAR

COMITÉ TUTORIAL

DR. MARITZA LÓPEZ HERRERA

MA. EN C. MARÍA DEL CARMEN

GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO, 2023.



Mineral de la Reforma, Hgo., a 11 de diciembre de 2023

Número de control: ICBI-D/1925/2023
 Asunto: Autorización de impresión.

**MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
 DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

Con fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio le comunico que el Jurado asignado a la Pasante de la Licenciatura en Biología **Valeri Ostría Cabañas**, quien presenta el trabajo de titulación **“Análisis de los cambios morfológicos-celulares en respuesta al estrés en frío de pitahaya (*Hylocereus undatus*) obtenida por cultivo *in vitro*”**, después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidente Dra. Maritza López Herrera

Secretario: Dr. Pablo Octavio Aguilar

Vocal: Dra. Dulce María Galván Hernández

Suplente: M. en C. María del Carmen González Rodríguez

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
 “Amor, Orden y Progreso”

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval
 Director del ICBI



OAAS/YCC

Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
 Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
 México. C.P. 42184
 Teléfono: 771 71 720 00 ext. 2231 Fax 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx



DEDICATORIA

A mi familia

Por el apoyo incondicional que me brindaron a pesar de las dificultades, en especial a mi madre por enseñarme a ser fuerte y nunca darme por vencida, a mi padre por ser un ejemplo a seguir, a mi hermana por sus consejos y amor; y por traer al mundo a una de las alegrías más grandes de mi vida, a mi hermano menor que sigue mis pasos por su alegría y amor.

A mi compañero de vida

Por ser una persona comprensible y apoyar mis metas y sueños incondicionalmente, y acompañarme en mis peores momentos, le dedico este logro con mucho amor.

A mis compañeros de clase y amigos

Por ser partícipes en la mayor aventura de mi vida, amar la biología tanto como yo y siempre mirar adelante.

A mis maestros

Por ser abnegados, por su apoyo, por su paciencia y por plasmar sus conocimientos y experiencias en mí.

Y finalmente, agradezco infinitamente a la persona que hizo posible cumplir este sueño, por su determinación y esfuerzo.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a cada una de las personas que me ayudaron, confiaron y apoyaron para culminar este proyecto de vida.

A mi directora de tesis, Dra. Dulce Ma. Galván Hernández, agradezco su paciencia y apoyo en todo el proceso, así como su optimismo y consejos.

A mi coasesor el Dr. Pablo Octavio Aguilar, agradezco su trabajo, su apoyo y sus aportaciones durante todo el proceso

A mis sinodales agradezco su apoyo, sus consejos y sus aportaciones para la conclusión de este proyecto.

Un reconocimiento especial a mis profesores

Son muchos los docentes que han sido parte de mi camino universitario, y a todos ellos les quiero agradecer por transmitirme los conocimientos y las herramientas necesarias para culminar este proyecto.

A mi compañero de laboratorio

Agradezco tu generosidad, el trabajo en el laboratorio fue más ameno gracias a tu compañía y consejos.

Finalmente, a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de avanzar académicamente. Agradezco especialmente al área de biología por su constante apoyo que me ha permitido finalizar mi carrera profesional.

“No dejemos que el temor al fracaso sea impedimento al conocimiento porque, cada error es la base del aprendizaje”

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
I RESUMEN.....	1
II INTRODUCCIÓN.....	2
III. ANTECEDENTES.....	4
3.1. Aspectos ecológicos de <i>Hylocereus undatus</i>	4
3.1.1. Distribución geográfica.....	8
3.1.2. Producción nacional.....	9
3.1.3. Requerimientos edafoclimáticos.....	10
3.1.4. Plagas y enfermedades.....	10
3.1.5. Propagación.....	11
3.2. Mecanismos generales a condiciones de estrés en plantas.....	11
3.2.1. Respuestas moleculares y celulares al estrés inducido por frío.....	11
3.2.2. Recuperación al frío.....	12
3.2.3. Cuantificación del estrés por bajas temperaturas.....	13
3.2.4. Mecanismos relacionados con el estrés por frío en el género pitahaya.....	14
3.3. Propagación de especies vegetales por cultivo <i>in vitro</i>	15
3.3.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Hylocereus undatus</i>	17
3.3.2 Organogénesis.....	18
3.3.3. Hormonas vegetales.....	18
3.3.4 Hormonas utilizadas en <i>Hylocereus sp.</i>	19
IV. JUSTIFICACIÓN.....	21
V. OBJETIVOS.....	22
5.1 General.....	22
5.2 Específicos:.....	22

VI. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1 Obtención de semillas	23
6.2 Prueba de viabilidad.....	23
6.3 Pruebas de germinación <i>ex vitro</i>	23
6.4 Método de desinfección de semillas para la propagación <i>in vitro</i>	24
6.5 Preparación del medio de cultivo para la propagación <i>in vitro</i>	25
6.6 Subcultivo de plántulas en medio MS con fitorreguladores	25
6.7 Etapa de aclimatación	25
6.8 Inducción de estrés por frío en plántulas	26
6.9 Preparación de muestras celulares	26
6.10 Evaluación de las membranas.....	26
6.11 Análisis estadísticos.....	27
VII. RESULTADOS.....	28
7.1 Viabilidad y pruebas de germinación	28
7.2 Germinación <i>ex vitro</i>	28
7.3 Técnica de desinfección <i>in vitro</i>	29
7.4 Germinación <i>in vitro</i>	30
7.5 Tratamientos hormonales.....	31
7.6 Evaluación celular.....	34
XI. CONCLUSIONES	45
X. BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras morfológicas de la flor de <i>Hylocereus undatus</i> (Tomado de Cerén, 2020).....	5
Figura 2. Morfología del fruto y semilla. (A), fruto de pitahaya. (B), fruto seccionado de tipo baya. (C), semilla con testa reticulada. (D), semilla recubierta de sustancia mucilaginosa. (E), semilla en germinación (Foto: Ostría-Cabañas V)	6
Figura 3. Ilustración científica de <i>Hylocereus undatus</i> (Tomado de Britton y Rose, 1920). 8	
Figura 4. Distribución geográfica del género <i>Hylocereus</i> en México marcado en color café. Tomado de CONABIO, 2014.....	9
Figura 5. La vía de respuesta <i>ICE-CBF-COR</i> al estrés por frío que inicia en la membrana plasmática para inducir tolerancia al frío (Tomado de Hwarari <i>et al.</i> , 2022).....	15
Figura 6. Viabilidad de semillas. La figura A. muestra un embrión completamente coloreado bajo los criterios de viabilidad, las figuras B, C y D muestran los embriones que no fueron considerados viables (no teñidos, parcialmente teñidos y coloraciones tenues). 28	
Figura 7. Germinación de semillas a partir de la cuarta semana de cultivo en camas de algodón.	29
Figura 8. Semillas parcialmente germinadas y no germinadas (no se consideraron para el porcentaje de germinación).	29
Figura 9. Germinación <i>in vitro</i> , se aprecia la contaminación observada desde la primera semana	30
Figura 10. Tratamientos hormonales para inducir organogénesis en plántulas de pitahaya.	32
Figura 11. Registro semanal del promedio en altura, brotes y raíces de los cuatro tratamientos hormonales y el control.	32
Figura 12. Células vistas al microscopio enfoque 40x, (A), (B) y (C) son células en medio normal durante 12 horas a temperatura ambiente (TA), 10°C y 7°C	35
Figura 13. Células vistas al microscopio enfoque 40x (A1), (B1) y (C1) son células sometidas a medio hipertónico durante 12 horas a temperatura ambiente (TA), 10°C y 7°C.	36

Figura 14. Células vistas al microscopio enfoque 40x, (A1), (B1) y (C1) son células sometidas a medio hipertónico durante 24 horas a (TA), 10°C y 7°C 36

Figura 15. Células vistas al microscopio enfoque 40x, (A), (B) y (C) son células en medio normal hipertónico durante 24 horas a (TA), 10°C y 7°C..... 36

Figura 16. Células vistas al microscopio enfoque 40x, (A), (B) y (C) son células en medio normal durante 36 horas a (TA), 10°C y 7°C. Las células tanto en medio normal como hipertónico muestran células más grandes 37

Figura 17. Células vistas al microscopio enfoque 40x, (A1), (B1) y (C1) son células sometidas a medio hipertónico durante 36 horas a (TA), 10°C y 7°C. Las células tanto en medio normal como hipertónico muestran células más grandes..... 37

Figura 18. Diferencias en el tamaño de las células antes y después de ser sometidas a un medio hipertónico en distintas temperaturas y tiempos. 38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de viabilidad en un lote de semillas de <i>Hylocereus undatus</i>	28
Tabla 2. Resultados de la germinación semanal <i>ex vitro</i> en semillas de pitahaya.....	29
Tabla 3. Resultados de contaminación a distintas concentraciones de NaOCl y tiempos de exposición.....	30
Tabla 4. Resultados del porcentaje de germinación <i>in vitro</i> en un periodo de cinco semanas.....	31
Tabla 5. Crecimiento apical de pitahaya obtenidos por cultivo <i>in vitro</i> después de cuatro semanas.....	33
Tabla 6. Número de brotes y raíces por tratamientos a diferentes concentraciones de reguladores.	33
Tabla 7. Promedios y DE de las áreas en μm de células sometidas al frío en diferentes tiempos de exposición tanto en agua destilada como en solución hipertónica.....	34
Tabla 8. Comparación entre medias del área celular, resultado de la diferencia entre N y H.	34

I RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló un protocolo de propagación *in vitro* para pitahaya con el objetivo de acelerar su crecimiento y evaluar los cambios morfológico-celulares en brotes como mecanismos de adaptación al frío. Se realizó una prueba de viabilidad con tetrazolio al 0.1 % para verificar la efectividad del lote de semillas. Posteriormente, se evaluó la germinación *ex vitro* en donde se colocaron 25 semillas en algodón con cuatro repeticiones, y la germinación *in vitro* que se realizó en frascos con MS +1 mg/L de carbón activado, con 20 semillas por frasco, cinco repeticiones. Transcurridos 35 días, se registró el porcentaje de germinación. Para asegurar la asepsia de las semillas en los cultivos *in vitro*, se evaluaron cuatro tratamientos de hipoclorito de sodio (NaOCl) a diferentes concentraciones (0.5, 1%) y tiempos (5, 10 min.) más un control. Se realizó un barrido hormonal con ácido indol acético AIA (0.3, 0.5 mg/L) y 6-bencil amino purina BAP (0.5, 1 mg/L) más un control, el cultivo se mantuvo durante 4 semanas. Obtenidas las plantas de pitahaya, 27 de ellas se sometieron a condiciones de estrés por frío (7°C, 10°C y temperatura ambiente), durante 12, 24 y 36 hrs. Se realizaron cortes transversales de los brotes, los cuales se sometieron a cambios osmóticos mediante una solución de agua destilada e hipertónica, se registró el tamaño celular de 100 células por muestra. Como resultado, se obtuvo una viabilidad del 68.95%, la germinación *ex vitro* fue del 60% e *in vitro* 20%. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos de desinfección, ni para los tratamientos hormonales. Las pitahayas pueden tolerar temperaturas de 10°C por 24 hrs o 7°C por 12 horas. En conclusión, se logró la propagación de *Hylocereus undatus* emplear plántulas obtenidas *ex vitro* como fuente de explante para su posterior crecimiento *in vitro* con diferentes reguladores de crecimiento; la medición celular podría ser una técnica sencilla y factible para determinar los efectos del frío, sin embargo, se requiere corroborar con otros métodos.

II INTRODUCCIÓN

La pitahaya (*Hylocereus undatus* Britton y Rose) es una cactácea originaria de regiones tropicales de América distribuida desde México hasta Centroamérica, en donde constituye un recurso genético importante (Montesinos *et al.*, 2015) debido a la demanda de sus frutos en el mercado nacional e internacional y a su vez, porque demanda poca agua, se adapta a diversos tipos de suelo y es una opción en la reconversión de cultivos (García y Quirós, 2010; Osuna *et al.*, 2016).

La forma de propagación puede ser por medio de semillas, en donde se logra mantener la diversidad genética y las características deseables de la pitahaya (Montesinos *et al.*, 2015; Ruiz *et al.*, 2020). Sin embargo, requieren mayor cuidado en cuanto se trasplantan en el terreno definitivo y tardan de cuatro a seis años en llegar a su etapa productiva (Montiel, 2017). Otra forma es a partir de tallos y esquejes, comenzando la producción dos años después de establecerse en campo y alcanzando su mayor producción a los cinco años la cual se mantiene hasta por 20 años más, sin embargo, son susceptibles a enfermedades o daños por condiciones climáticas (Pérez, 2011).

El estrés por frío es uno de los factores de mayor influencia que restringen la producción de pitahaya, sufriendo daños cuando la temperatura es inferior a 4°C. El daño afecta el crecimiento y provoca la caída de las flores, lo que reduce o elimina la producción (Bárceñas y Jiménez, 2010). En plantas tolerantes al frío, cambia su composición lipídica, tanto de la membrana plasmática como de los cloroplastos, de modo que el umbral de temperatura en el que se producen daños en la membrana es menor, es por eso que se han utilizado métodos que ayudan a evaluar la integridad de la membrana frente al estrés por frío como la conductividad eléctrica relativa (REC), o la medición del contenido de malondialdehído (MDA) el cual es un aldehído utilizado como biomarcador, producto de la peroxidación lipídica. Otra variable cuantificable es la prolina total (PRO), dado que la acumulación de esta actúa como lipoprotector de la membrana, (Sarkar *et al.*, 2009), además, la prolina al ser hidrófila, puede estabilizar los procesos metabólicos y coloidales del protoplasto en los tejidos, reduciendo así el punto de congelación y previniendo la deshidratación celular (Gong *et al.*, 2019). Estas técnicas requieren de reactivos y equipos específicos para realizar su cuantificación, sin embargo, la búsqueda de procedimientos

más sencillos para evaluar cambios en la morfología celular ante este tipo de estrés es importante para determinar los rangos de tolerancia en las plantas. Es por esto que surge el interés de analizar los cambios en la membrana mediante variables métricas como indicadores de tolerancia al frío.

Por otro lado, ha incrementado el interés por mejorar el proceso de propagación de diversas especies vegetales, a partir de técnicas como el cultivo *in vitro*, con el fin de obtener plantas libres de patógenos, con características deseables, o con un crecimiento más rápido y uniforme. La regeneración de plantas por vías como la organogénesis tiene mayor aplicación ya que, permite superar las desventajas como la pérdida del germoplasma en especies endémicas y en peligro de extinción, mediante cambios en el medio como: pH, temperatura, humedad, presión osmótica, problemas de calidad fitosanitaria, tiempos y espacios reducidos (Villarreal, 2015) que se producen con la propagación sexual por semillas directamente en el suelo (Ruvalcaba *et al.*, 2010). Además, mediante el uso de hormonas vegetales en cultivos *in vitro*, se producen cambios a nivel celular, modificando los patrones de crecimiento de los vegetales y permitiendo su control (Alcántara *et al.*, 2019), por ejemplo, en pitahaya la combinación de hormonas vegetales de ácido indol acético (AIA) y 6-bencil amino purina (BAP) han permitido incrementar el número de cladodios, así como el desarrollo y crecimiento de raíces y tallos (Zeledón y Arauz, 2020). En este sentido, la propagación *in vitro* se ha convertido en un método alternativo para acelerar el crecimiento de pitahaya a través de semillas, prevenir los problemas fitosanitarios, y para la conservación de la integridad genética de la especie (Montiel *et al.*, 2016; González, 2020).

Por tanto, el desarrollo de un protocolo de propagación en pitahaya brindará las estrategias a seguir para garantizar el éxito en el establecimiento y sobrevivencia del cultivo, así mismo, las plantas obtenidas pueden ser objeto de estudio para diversos campos de la biología, entre los que destacan la evaluación de la tolerancia y adaptación a diferentes tipos de estrés a través de la evaluación de características morfológicas celulares en plantas de pitahaya, lo que brindará conocimiento para su manejo y mejoramiento.

III. ANTECEDENTES

3.1. Aspectos ecológicos de *Hylocereus undatus*.

La pitahaya (*Hylocereus undatus* Britton & Rose) es una cactácea originaria de regiones tropicales de América y se distribuye desde México hasta Centroamérica, en donde constituye un recurso genético importante. Es una planta perenne, epífita, trepadora con forma triangular, carnosa y de tallos verdes articulados, que comúnmente crece sobre árboles o piedras debido a que no puede sostenerse por sí misma (Montesinos *et al.*, 2015). Dentro de las características de la pitahaya encontramos tallos alargados, carnosos y triangulares con segmentos ramificados. Cada segmento tiene tres alas o costillas onduladas con márgenes córneos con 1 a 3 espinas, a veces sin espinas. Las raíces aéreas crecen desde la base del tallo y proporcionan a la planta un ancla (Hai *et al.*, 2021; Gunasena *et al.*, 2010).

Las flores son hermafroditas, actinomorfas y se insertan directamente sobre los tallos, tienen forma tubular y son grandes (de 20 a 40 cm de longitud); abren una vez durante la noche, aparecen en general solitarias y presentan un perianto heteroclamídeo (Figura 1). El verticilo sexual masculino lo integran numerosos estambres dispuestos en espiral que producen granos de polen tricolpados. El ovario del gineceo es ínfero con numerosos carpelos soldados y uniloculares. Las yemas florales emergen de las areolas de crecimiento del año anterior, siendo una por areola, la cual queda en común después de la floración. Entre los agentes polinizadores se encuentran los murciélagos, las mariposas nocturnas y diversas especies de abejas nativas y europeas. El fruto es una baya globosa o subglobosa dehiscente (Figura 2), mide en promedio de 8 a 15 cm de largo y de 6 a 10 cm de diámetro, su pericarpelo es de color rojo (Montesinos *et al.*, 2015).

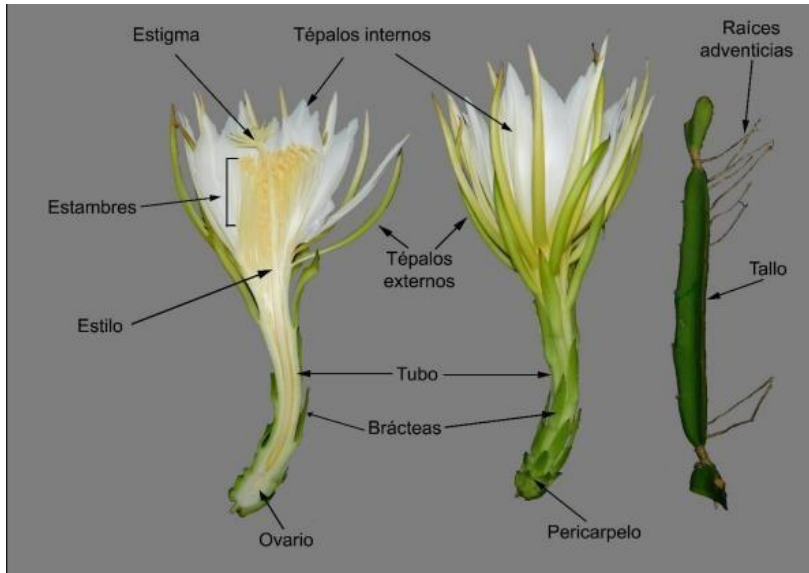


Figura 1. Estructuras morfológicas de la flor de *Hylocereus undatus* (Tomado de Cerén, 2020).

Las semillas sexuales o verdaderas se encuentran distribuidas de forma abundante en la pulpa del fruto, recubiertas por una sustancia mucilaginosa. Poseen una testa reticulada de color negro brillante, lisa y delicada con un funículo largo el cual se une a la semilla con la pared interna del fruto (Figura 2 y 3). Normalmente presentan buena germinación. Su número cromosómico es $n = 11$, la planta es diploide ($2n = 2x = 22$) (Zúñiga, 2016).

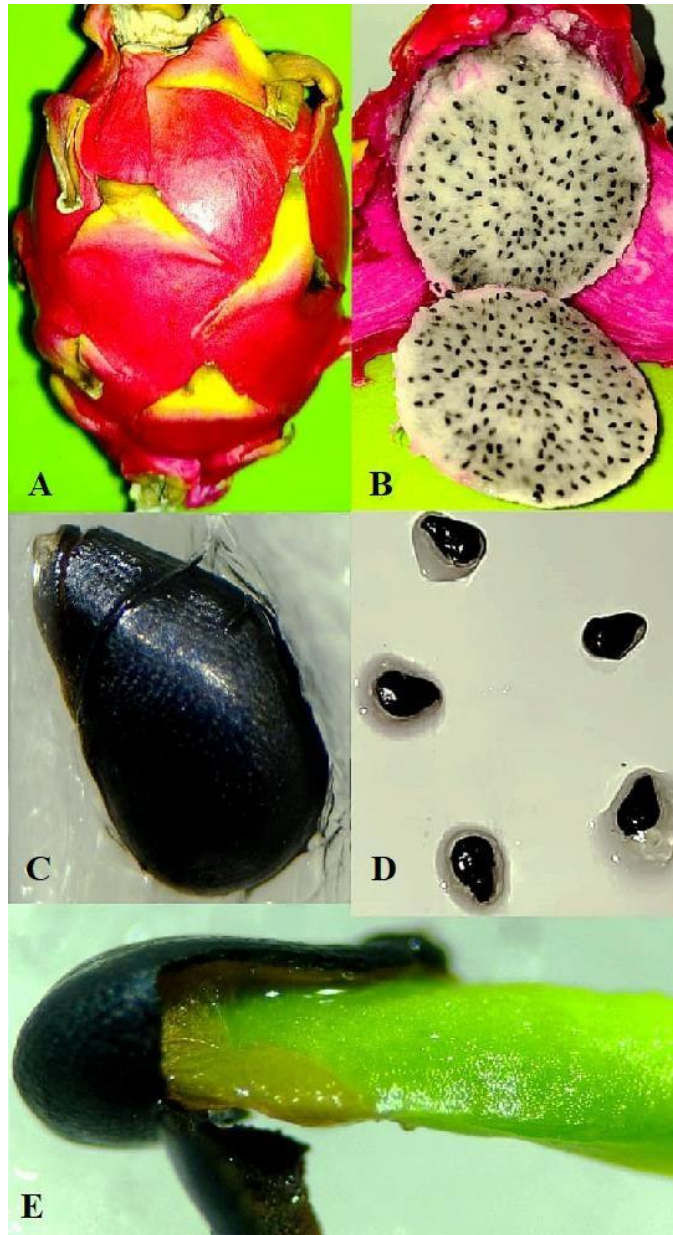


Figura 2. Morfología del fruto y semilla. (A), fruto de pitahaya. (B), fruto seccionado de tipo baya. (C), semilla con testa reticulada. (D), semilla recubierta de sustancia mucilaginosa. (E), semilla en germinación (Foto: Ostría-Cabañas V).

Por ser una cactácea, la pitahaya muestra características fisiológicas y morfológicas adaptadas a condiciones áridas y semiáridas, como sistemas radicales muy grandes con gran desarrollo horizontal para evitar su pérdida por transpiración y responden rápidamente a la presencia de humedad formando raíces absorbentes tan sólo unas horas después de que ha llovido con el propósito de aprovechar al máximo dicha humedad. Sin embargo, esta raíz es muy sensible a encharcamientos constantes y muy duraderos, los cuales provocan

su putrefacción (Morales, 2017). Otras estrategias son: el desarrollo de órganos aéreos con cutículas reducidas o gruesas, bajo número de estomas por unidad de superficie presentes en el tallo, una vía fotosintética, denominada la vía del metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) con el que *H. undatus* tiende a presentar su máxima tasa de intercambio de CO₂ al finalizar la noche, tallos con una cutícula gruesa y cerosa que limitan la pérdida de agua, entre otros (Zeledón y Arauz, 2020).

Las pitahayas tienen dos tipos de raíces: las primarias que se encuentran en el suelo y las secundarias o adventicias, que se desarrollan fuera del suelo. Las raíces adventicias, se generan cuando la planta sufre de estrés hídrico, sus funciones son fijar y sostener las plantas a su tutor, absorber sustancias nutritivas y agua del ambiente (Montiel, 2017).

México es un importante sitio de distribución de la diversidad genética del género *Hylocereus*, se conocen agrupamientos que indican la existencia de variabilidad genética de pitahaya en nueve estados de la República Mexicana: Oaxaca, Puebla, Veracruz, Guanajuato, México, Distrito Federal, San Luis Potosí, Hidalgo y Tabasco (Solano, 2005). Dentro de la diversidad de *Hylocereus undatus* encontramos que el género cuenta con 16 subespecies reconocidas, de las cuales se ha documentado que presentan gran polimorfismo en el ADN (Montesinos *et al.*, 2015).



Figura 3. Ilustración científica de *Hylocereus undatus* (Tomado de Britton y Rose, 1920).

3.1.1. Distribución geográfica

En México las especies del género *Hylocereus* se desarrollan hacia el centro y sureste del país en bosque tropical perennifolio, entre los 15° 16' y 25° 3' N, 89° 27' y 107° 25' O. Su distribución natural incluye 21 estados: Campeche, Chiapas, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tlaxcala Veracruz y Yucatán (Figura 4), (Rodríguez, 2002).



Figura 4. Distribución geográfica del género *Hylocereus* en México marcado en color café. Tomado de CONABIO, 2014.

3.1.2. Producción nacional

Aunque las pitahayas se distribuyen en la región centro y sur del territorio nacional, únicamente en algunas zonas existe como cultivo en huertos familiares, y en áreas aún más reducidas se está desarrollando su producción en plantaciones especializadas. Hay plantas silvestres en toda la porción sur del país, pero la producción comercial de frutas sólo ocurre en los estados de Yucatán, Puebla, Campeche, Quintana Roo y Tabasco.

En México, Puebla es el único estado que exporta su producción de pitahaya, en buena medida porque en sus tres zonas productoras (la Cañada, el Valle de Tehuacán y la Mixteca) la ocurrencia de la producción es escalonada, de manera que garantiza disponibilidad continua de fruta en todo el periodo de cosecha. Sin embargo, su producción proviene de huertos familiares, presenta gran dispersión, es escaso el manejo técnico y está sujeta a fluctuaciones climáticas que hacen que la producción varíe considerablemente año tras año (Rodríguez, 2002).

3.1.3. Requerimientos edafoclimáticos

Temperatura: La pitahaya prefiere climas cálidos subhúmedos. No obstante, también se desarrolla adecuadamente en climas secos. No toleran temperaturas extremas por debajo de 15 o 7 °C. También, las temperaturas superiores a 30 °C reducen su eficiencia fotosintética y por encima de los 35 °C pueden sufrir quemaduras, sobre todo si se exponen al sol durante periodos largos (Hernández *et al.*, 2018).

Demanda hídrica: Prosperan desde el nivel del mar hasta 1850 m, requieren precipitaciones de 650 a 1500 mm anuales. Las pitahayas florecen en verano durante el periodo de lluvias y pueden ocurrir entre cuatro y siete ciclos de floración en un periodo de 8 meses. Existen antecedentes de que en cultivos a más de 1900 msnm los frutos suelen ser de menor calidad en el sabor (insípidos), su desarrollo y maduración es más tardío (Bárceñas y Jiménez, 2010).

Suelo: Se trata de una planta que, debido a su rusticidad, se adapta a suelos secos, pobres y pedregosos. No obstante, prefieren suelos franco-arenosos, húmedos, con buen drenaje por su sensibilidad al encharcamiento, ricos en materia orgánica y pH ligeramente ácido (5.5-6.5) (Llerena, 2020).

3.1.4. Plagas y enfermedades

El rendimiento del fruto de pitahaya se ve disminuido debido a microorganismos como hongos, virus y bacterias, así como a la infestación de insectos durante el período posterior a la cosecha. Lo mencionado puede generar una pérdida económica hasta del 44% (Verona *et al.*, 2020). Se reconocen 17 géneros y 25 especies de fitopatógenos que afectan a la pitahaya entre las que se encuentran el chancro (*Neoscytalidium dimidiatum*), la enfermedad viral (virus de cactus aún no identificado), la antracnosis (especies de *Colletotrichum*) y pudrición de frutos y tallos (*Bipolaris cactivora*) (Ruíz *et al.*, 2020).

3.1.5. Propagación

En la pitahaya, la principal forma de propagación es vegetativa (a partir de tallos, esquejes o cladodios) y con ayuda de injertos. Las pitahayas también se reproducen por medio de semillas, pero es un procedimiento difícil y tardado (Montesinos *et al.*, 2015). Las semillas son importantes para mantener la variabilidad genética de la especie; exhiben características deseables que pueden usarse para la selección de genotipos asociados con el rendimiento, la apariencia externa, el color de la pulpa y la adaptación a diferentes condiciones climáticas (Ruiz *et al.*, 2020).

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 (Pérez, 2011).

3.2. Mecanismos generales a condiciones de estrés en plantas

El estrés abiótico se refiere a los factores ambientales que alteran los procesos fisiológicos y metabólicos de las plantas. Se considera la causa central de la pérdida de más del 50 % de los principales cultivos de interés agrícola en el mundo, así como de la reducción del crecimiento, desarrollo y rendimiento vegetal (Méndez y Vallejo, 2019).

A lo largo de la evolución, las plantas al ser organismos sésiles, han desarrollado diversas adaptaciones fisiológicas que les permiten sobrevivir a los diferentes tipos de estrés, mediante respuestas reguladoras que reestablezcan la homeostasis celular o actúen para reducir los efectos nocivos (Vega, 2022).

3.2.1. Respuestas moleculares y celulares al estrés inducido por frío

Las plantas han desarrollado mecanismos para percibir señales externas y expresar respuestas adaptativas a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico y molecular. El estrés abiótico está mediado por diversas reacciones bioquímicas y procesos fisiológicos controlados por mecanismos moleculares de naturaleza multigénica. Dichos mecanismos

son críticos para la supervivencia de las especies en condiciones ambientales extremas como: sequía, salinidad o frío (García *et al.*, 2013).

Los efectos de las bajas temperaturas en las plantas incluyen cambios en la bioquímica y biofísica de las membranas, en la síntesis proteica, modificaciones conformacionales de enzimas, en la ultraestructura de mitocondrias y cloroplastos, en los metabolismos fotosintético y respiratorio, además de disminución del crecimiento y alteraciones en el desarrollo (Alonzo, 2015).

La respuesta de la planta inicia en la membrana, donde existen receptores de las señales provocadas por alteraciones del medio. Esta señal genera segundos mensajeros tales como: especies reactivas de oxígeno (ROS), calcio e inositol-fosfatos, los cuales modifican la condición intracelular. Diferentes proteínas (que actúan como sensores) detectan el nivel de calcio e inician diversas cascadas de señalización que activan o desactivan factores de transcripción (FT) que a su vez controlan la expresión de determinados grupos de genes (Bustamante, 2018). La fuga de iones, el contenido de MDA y la acumulación de H₂O₂ y O₂ se usan comúnmente para evaluar la gravedad del daño de los lípidos de la membrana en condiciones de estrés (Hu *et al.*, 2022).

Una alta tolerancia al estrés por frío, se ha relacionado con el incremento de prolina y la actividad de enzimas que permiten eliminar especies reactivas derivadas del oxígeno. En plantas tolerantes, para mantener la turgencia y el proceso metabólico original, diversas sustancias orgánicas e inorgánicas, como sal inorgánica, prolina, betaína, azúcares solubles y proteínas solubles, se acumulan en las células vegetales a través de la regulación osmótica, lo que conduce a un aumento en la concentración del líquido celular y una disminución del potencial osmótico (Zhang *et al.*, 2019).

3.2.2. Recuperación al frío

Otro factor por considerar en la etiología del daño por frío es la capacidad de las plantas para recuperarse después de la exposición a bajas temperaturas, y determinar el punto donde la recuperación se vuelve imposible. Como ocurre con otros factores, la recuperación del daño por frío depende de la especie y probablemente esté relacionada con la sensibilidad inherente de cada planta (Romero, 2016).

Por ejemplo, muchas plantas tienen meristemos subterráneos, protegidos de las bajas temperaturas del aire, que les permiten reiniciar el crecimiento cuando cesa el período de frío. De todas formas, la mayor parte de las especies que sobreviven a muy bajas temperaturas, lo hacen porque toleran la formación de hielo dentro de ellas. Por ejemplo, en herbáceas adaptadas a climas fríos y árboles de bosques boreales, se forma hielo en los espacios intercelulares ocasionando una intensa deshidratación en las células y quedando en estado de inactividad metabólica, algunas plantas salen de este letargo cuando sube la temperatura y comienzan a hidratarse. En ningún caso, las células pueden sobrevivir a la formación de hielo dentro de ellas (Lallana,1997).

Otro factor que determina el potencial de recuperación de la planta tras la helada es su estado sanitario previo a la exposición. Si las plantas estaban bajo estrés por daños de herbicidas, exceso de humedad en el suelo o por alguna enfermedad, así como a bajas temperaturas, las posibilidades de recuperación son inferiores. De igual forma, si las condiciones tras la helada no son adecuadas, la recuperación puede ser lenta. No obstante, incluso en el caso de que el punto de crecimiento parezca sano inmediatamente después de la helada, algunas plantas todavía pueden morir, debido a la continua exposición de un clima frío tras la helada, lo que puede retrasar la aparición de los síntomas y sucumbir a los otros factores descritos arriba (inanición y/o enfermedades). Por lo tanto, es mejor esperar hasta tres o cuatro días después de la helada para hacer una valoración del potencial de recuperación. Los daños pueden ser muy aparentes justo después de la helada, pero a menudo las plantas se recuperan si el punto de crecimiento no está dañado (Carter y Wiersma, 2000).

3.2.3. Cuantificación del estrés por bajas temperaturas

No existe una forma universal de caracterizar el grado de estrés térmico que sufre una planta. Sin embargo, dado que una de las principales dianas del estrés por frío son las membranas biológicas, una forma de cuantificar el grado de daño es por la medición de la liberación de iones mediante conductividad eléctrica. Otra forma es a través de la estimación de algún indicador de daño como la pérdida de clorofila, necrosis, o muerte de la planta (Tambussi, 2004).

3.2.4. Mecanismos relacionados con el estrés por frío en el género pitahaya

Hylocereus spp. es sensible a bajas temperaturas, sufriendo daños por frío cuando la temperatura es inferior a 4°C. Los síntomas se presentan como lesiones redondeadas que se expanden a lo largo de los tallos. Sin embargo, suelen ser más sensibles a las bajas temperaturas cuando la planta se encuentra en crecimiento vegetativo o desarrollo floral. Este daño afecta el crecimiento y provoca la caída de las flores, lo que reduce o elimina la producción de ese año si se presenta alguna helada (Bárcenas, 2010). El umbral mínimo que la mayoría de los cultivares de pitahaya pueden tolerar es de 0 °C. Cuando la temperatura es inferior a 5°C, puede provocar que la pitahaya se congele. También se pueden congelar brotes, ramas jóvenes e incluso algunas ramas maduras. Cuando la temperatura es inferior a -2 °C y ésta se mantiene por más de 12 h, la planta sufre lesiones graves, así mismo, cuando la temperatura es inferior a -4 °C, las plantas mueren (Gong *et al.*, 2019).

Cuando la pitahaya se encuentra bajo estrés por frío, aumenta la conductividad eléctrica relativa (REC), lo que incrementa la permeabilidad de la membrana. Por otro lado, el contenido de malondialdehído (MDA) inhibe la actividad de las enzimas protectoras de las células y acelera el proceso de peroxidación de los lípidos de la membrana, por esta razón se considera un índice fisiológico y bioquímico que indica la reducción del contenido de antioxidantes bajo esta condición de estrés. Otra de las variables cuantificables es la cantidad de prolina total (PRO), dado que las variedades con fuerte resistencia al frío tienden a acumular más prolina. La prolina es altamente hidrófila y puede estabilizar los procesos metabólicos y coloidales del protoplasto en los tejidos, reduciendo el punto de congelación y previniendo la deshidratación celular. Se ha demostrado que el contenido de PRO de la pitahaya de pulpa blanca es más alto con respecto al de pulpa roja (Gong *et al.*, 2019).

Hasta la fecha, se conoce que algunas variantes portadoras de los genes asociados al estrés (incluidos miR396b-GRF y HuCAT3), mejoran la tolerancia al frío, la sequía y el estrés salino en pitahaya. Así mismo, se demostró que el gen GmNAC20 puede regular la tolerancia al estrés por frío mediante la activación de la vía Crepeat binding factor (CBF-COR). La vía de señalización ICE-CBF-COR (Figura 5) corresponde a una serie de

mecanismos bioquímicos y fisiológicos regulados por factores de transcripción y proteínas que participan en la adaptación al frío. Los receptores de frío localizados en la membrana plasmática de la planta perciben el estímulo al descenso de temperatura. Al instante, se desencadena una progresión de reacciones celulares y acciones reguladoras de numerosos factores de transcripción. Así mismo, está regulado por las respuestas hormonales de jasmonatos (JA), etileno, brasinosteroides (BR), giberelina (GA), auxina y ácido salicílico (SA) mejoran directamente la expresión de *CBF* mediante la activación de varios factores de transcripción (FT) los cuales controlan procesos bioquímicos vitales en la cascada durante el descenso de la temperatura (Hwarari *et al.*, 2022).

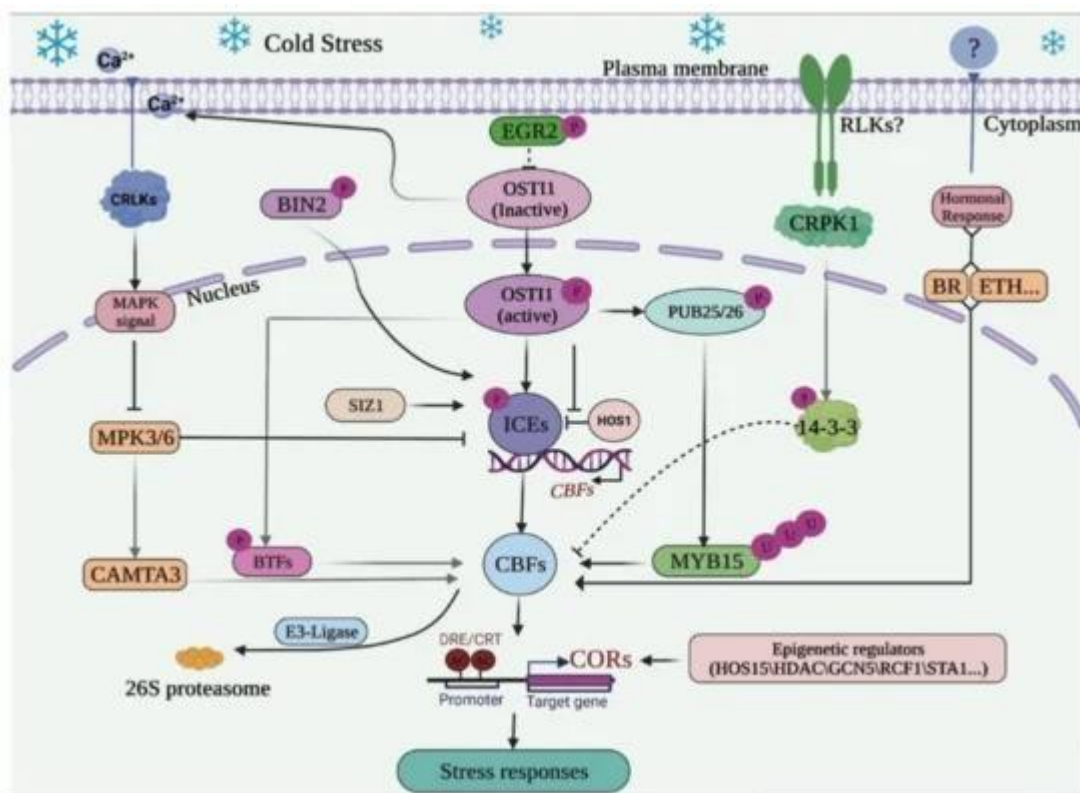


Figura 5. La vía de respuesta *ICE-CBF-COR* al estrés por frío que inicia en la membrana plasmática para inducir tolerancia al frío (Tomado de Hwarari *et al.*, 2022).

3.3. Propagación de especies vegetales por cultivo *in vitro*

La propagación *in vitro* es un método alternativo en condiciones de laboratorio para prevenir los problemas fitosanitarios y para la conservación de la integridad genética de

especies vegetales, tomando en consideración aquellos factores que se puedan mantener

controlados (González, 2020). Las técnicas de propagación *in vitro* ofrecen ventajas como la obtención de material vegetal representativo de la variabilidad genética; siendo esta técnica un método que permite obtener una gran cantidad de plántulas a corto tiempo y en espacios reducidos (Montiel *et al.*, 2016).

Para el establecimiento del cultivo de tejidos vegetales, existen cuatro etapas que consisten en:

Etapa 0- Preparación del material vegetal. Incide directamente sobre la calidad del mismo y su respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explante. Los factores que influyen sobre la calidad del explante son: el tipo de órgano, la edad ontogénica y fisiológica, la estación en la cual se colecta el material vegetal, el tamaño y el estado sanitario general de la planta donante (Olmos *et al.*, 2015). En esta etapa se eligen plantas que estén sanas, vigorosas y libres de deficiencias o enfermedades por hongos o virus, para poder obtener inóculos de buena calidad (Varela, 2018).

Etapa I - Establecimiento de un cultivo aséptico. El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y asepticos, donde los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes. Los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, ya sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas, tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor, como el cambium en las plantas leñosas. La desinfección superficial incluye varios pasos: el lavado de los explantes con agua corriente, el empleo de etanol al 70% por 1 minuto, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio (0.5 a 1.5% de cloro activo) con unas gotas de tensoactivos para favorecer su penetración y actividad. Posteriormente, los explantes deben ser enjuagados al menos tres veces con aguadestilada estéril (Olmos *et al.*, 2015). Para la esterilización del instrumental y medios de cultivo, se usa una autoclave operada con vapor de baja presión, a temperatura de 121°C (250°F) durante 15 minutos (Varela, 2018).

Etapa II - Multiplicación. En esta etapa, el propósito es obtener el mayor número deseado de plantas, para esto, la aplicación de balances hormonales en medios de cultivo estimulará la formación de nuevas estructuras que originen plantas nuevas, proceso conocido como organogénesis (Olmos *et al.*, 2015).

Etapa III - Enraizamiento. Las plántulas y brotes obtenidos en la etapa II son pequeñas, carentes de raíces y no son capaces de soportar el crecimiento por si solas, por lo que es necesario que los brotes crezcan en tamaño antes de inducir la formación de la raíz, en especial usando auxinas. Los brotes a ocupar deben estar en buenas condiciones, sin presentar vitrificación alguna, ya que interfiere con el proceso de formación de raíces (Varela, 2018).

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

3.3.1 Cultivo *in vitro* de *Hylocereus undatus*

En el cultivo *in vitro* de pitahaya se pueden utilizar diferentes tipos de explantes, el trabajo realizado por Pérez (2011) demostró que, en el caso de cactáceas, las semillas son una buena fuente de explante, ya que estas son mejor alternativa que las aréolas para obtener tejidos en condiciones asépticas, evitar el daño en el tejido y obtener más de una sola planta. A partir de los tallos de 1 a 2 cm, se puede estimular la proliferación de brotes adventicios, con la finalidad de obtener una organogénesis directa. Así mismo, la multiplicación de pitahaya también se puede llevar a cabo a partir de segmentos de cladodios apicales, centrales y basales, areolas, entre otros (Zeledón y Arauz, 2020; Drewy Asimi, 2022), o a partir de organogénesis indirecta con explantes como cotiledones, hipocótilos, epicótilos y raíces (Infante, 1992; Pelah *et al.*, 2002). Sin embargo, la organogénesis *in vitro* depende de la aplicación exógena de hormonas como auxinas, citoquininas o kinetinas a diferentes concentraciones o de la combinación de estas, y de la habilidad del tejido para responder a los estímulos hormonales. Cuando se utiliza una alta proporción de auxina-citoquinina en el medio, normalmente induce la formación de raíces, mientras que una baja proporción promueve la formación de brotes (López, 2010). A partir de dos meses la supervivencia promedio de las plantas transferidas a sustrato es del 90 al

98% (Pelah, 2002; Montiel, 2016) y después de 6 meses pueden ser trasplantadas a campo, lo que implica la mitad del tiempo que tardaría en crecer de manera tradicional (Feria *et al.*, 2012).

3.3.2 Organogénesis

La organogénesis es una de las vías morfogénicas en la cual se diferencian meristemas a partir de las células o tejidos cultivados. Cuando se produce un meristemo apical su desarrollo da lugar a una planta. La regeneración es directa cuando los tallos o embriones se producen directamente a partir de los tejidos de partida, y es indirecta cuando la regeneración de tallos o embriones se produce tras un crecimiento desorganizado del tejido que denominamos callo (Gisbert, 2010). El tipo de vía organogénica dependerá del tipo de órgano vegetal que se quiera obtener. Según el tipo de explante, la formación de brotes puede iniciarse a partir de yemas apicales y axilares (meristemas preexistentes), a partir de meristemas adventicios que se originan en brotes, hojas, escamas de bulbos, tallos florales o cotiledones (organogénesis directa), o a partir de callos que se desarrollan en las superficies cortadas de los explantes (organogénesis indirecta) (Iliev *et al.*, 2010).

3.3.3. Hormonas vegetales

Una hormona vegetal o fitohormona es un compuesto producido internamente por una planta, ejerce su función en muy bajas concentraciones y cuyo principal efecto se produce a nivel celular, cambiando los patrones de crecimiento de los vegetales y permitiendo su control. Los reguladores de crecimiento pueden ser clasificados según su estructura molecular, su actividad a nivel vegetal, sus efectos inhibitorios o estimulantes, entre otras clasificaciones (Steven *et al.*, 2019).

Las auxinas, el ácido abscísico, las citoquininas, el etileno y las giberelinas se reconocen comúnmente como las cinco clases principales de hormonas vegetales naturales. Las auxinas, citoquininas y las interacciones auxina-citoquinina generalmente se consideran las más importantes para regular el crecimiento y el desarrollo organizado en cultivos de tejidos y órganos vegetales (Gaspar *et al.*, 1996).

Auxinas: Son un tipo de fitohormonas especializadas en diferentes procesos a nivel vegetal. Los principales puntos de acción se encuentran a nivel celular, donde tienen la capacidad de dirigir e intervenir en los procesos de división, elongación y diferenciación celular. Dentro de las auxinas más conocidas a nivel vegetal se encuentra el ácido 3-indolacético (AIA) que es la principal auxina producida de manera natural, aunque también se conocen otro tipo de auxinas que son producidas de manera sintética como el ácido indolbutírico (IBA), el ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D) y el ácido α -naftale-n-acético (NAA) (Steven *et al.*, 2019).

Citoquininas: Esta hormona vegetal controla todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, incluida la función de los meristemos, el desarrollo vascular, las respuestas al estrés y la senescencia.

Las citoquininas son necesarias para la división celular en los tejidos meristemáticos, mientras que las auxinas promueven la formación, el crecimiento y la diferenciación de órganos. Las citoquininas y las auxinas a menudo trabajan juntas en múltiples órganos, tejidos y células. Aunque originalmente se consideró que estas dos hormonas eran antagonistas, estudios recientes también han revelado sus interacciones sinérgicas (Lee *et al.*, 2019).

3.3.4 Hormonas utilizadas en *Hylocereus sp.*

En el estudio de micropropagación de pitahaya amarilla (*Hylocereus undatus*) realizado por Zeledón y Arauz (2020) muestran como diferentes combinaciones de la citoquinina 6-BAP y la auxina AIA resultan en diferencias significativas en cuanto a la longitud (1.48 cm) y número de cladodios (en promedio 9.35) con la concentración de 1 mg/L⁻¹ de 6-BAP con 1 mg/L⁻¹ de AIA. Un resultado semejante presentó Ruíz (2019) mediante la siembra de diferentes segmentos de cladodios a dos concentraciones de BAP y cuatro de sacarosa, donde la combinación de 1 mg/L BAP y 30 g/L de sacarosa permitió obtener mayor número de brotes y raíces en *Hylocereus sp.*

Zambrano *et al.* (2015), realizó una evaluación de reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *Hylocereus megalanthus* donde seleccionaron segmentos nodales de aproximadamente 1 cm que presentaban un brote. La siembra se realizó en medio (MS)

complementado con diferentes concentraciones y combinaciones de las citoquininas 6- BAP y Kinetina (Kin), junto con la auxina AIA. El mejor tratamiento para obtener mayor número de brotes fue el de 1 mg/L de BAP con una media de 5.30 brotes, en cuanto a la elongación de los tallos, el tratamiento que mostró mejores resultados fue el de 0.5 mg/L de BAP, el cual presentó una media de 20.88 mm.

IV. JUSTIFICACIÓN

Debido a su amplia adaptación a sitios áridos y semiáridos, *Hylocereus undatus* es una cactácea con potencial económico, alimenticio y de conservación para México. Sin embargo, su cultivo presenta problemáticas fisiológicas y fitosanitarias que afectan su lento crecimiento; sumado a esto, la baja temperatura es el principal factor de estrés ambiental que limita el desarrollo de la siembra de pitahaya, incluso en regiones subtropicales, por lo que los cultivos de pitahaya pueden verse afectados debido a temperaturas por debajo de 5°C.

Por tal motivo, es necesario implementar protocolos de cultivo *in vitro* que permitan facilitar la propagación de especies de pitahaya con una mejor calidad y resistentes a plagas o enfermedades; así como abundar en el conocimiento sobre su respuesta de adaptación frente al estrés abiótico producido por frío, una de las principales causas de pérdida en los cultivos que traen consecuencias económicas y de limitación en la distribución de la especie.

Actualmente, para esta especie existe un número limitado de trabajos de investigación sobre protocolos para la multiplicación *in vitro* y estudios de los mecanismos fisiológicos en respuesta a su adaptación al frío. Por ello, es importante ampliar la información sobre la aplicación de métodos biotecnológicos para la propagación e identificación de los mecanismos celulares que permiten la tolerancia al frío en *Hylocereus undatus*. Esto permitirá obtener variedades con características favorables a diferentes condiciones climáticas y edáficas, con nuevas perspectivas ambientales que podrían dar pie para lograr extender las zonas de cultivo e incrementar su producción en México.

V. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar la respuesta morfológica-celular de pitahaya (*Hylocereus undatus*) en respuesta al estrés por frío en plantas obtenidas mediante técnicas de cultivo *in vitro*, para contribuir al estudio de los mecanismos de respuesta y tolerancia a bajas temperaturas.

5.2 Específicos:

- Evaluar la viabilidad de un lote de semillas de *Hylocereus undatus* mediante la prueba de tetrazolio para verificar la calidad de la fuente de explante.
- Comparar el porcentaje de germinación en semillas de pitahaya mediante métodos de propagación *ex situ* e *in situ* para establecer las condiciones de almácigo.
- Establecer un método de desinfección de semillas mediante el contraste de diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de exposición para garantizar la asepsia de los cultivos *in vitro* de pitahaya.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de AIA y de BAP para el desarrollo organogénico directo de los tejidos.
- Evaluar la respuesta al estrés por frío mediante el cálculo de las diferencias del tamaño celular en brotes de pitahaya ante diferentes condiciones de temperatura y tiempo de exposición, con el fin de establecer un método sencillo para evaluar este tipo de estrés.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de semillas

Las semillas se obtuvieron de un distribuidor de semillas (Huerto Aspí) ubicado en la Ciudad de México, se almacenaron en refrigeración a 10° C hasta su uso.

6.2 Prueba de viabilidad

Las semillas se sumergieron en agua a 20°C durante 24 hrs., posteriormente se secaron y se separaron en 4 lotes de 25 semillas cada uno. A cada semilla se les realizó una incisión transversal con una aguja de disección y se colocaron en una solución de tetrazolio al 0.1% por 24 hrs a 30°C (ISTA, 2016); posteriormente, se lavaron con abundante agua destilada y se retiró la testa. Se evaluó la viabilidad del embrión con la ayuda de un microscopio estereoscópico basados en los siguientes parámetros (Bautista, 2012): semillas vivas, cuando el embrión se tiñe completamente de rojo; y semillas muertas, cuando el embrión presenta coloración (el embrión no se tiñe de rojo, pero se tiñen otras partes).

El porcentaje de semillas viables se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Semillas viables (\%)} = (\text{Número de semillas viables} / \text{Número de semillas}) \times 100$$

6.3 Pruebas de germinación *ex vitro*

Se evaluó la germinación *ex vitro* del lote de semillas de pitahaya con base al método establecido por ISTA (2016). Se utilizaron cuatro lotes de 25 semillas las cuales se colocaron sobre cajas Petri con algodón humedecido con agua destilada, posteriormente las semillas se organizaron en hileras dejando un espacio de 2-3 cm. Finalmente, las semillas se colocaron en incubación a 30 °C por un periodo de 35 días, al concluir este periodo, se registró el porcentaje de germinación (número de semillas germinadas de cada lote) con la siguiente fórmula:

$$\text{Semillas germinadas (\%)} = (\text{Número de semillas germinadas} / \text{Número de semillas}) \times 100$$

6.4 Método de desinfección de semillas para la propagación *in vitro*

Para la prueba de germinación en cultivo *in vitro*, primero se evaluaron cuatro tratamientos de desinfección de acuerdo con lo propuesto por Feria *et al.* (2012) y Montiel *et al.* (2016) para el género *Hylocereus*. Se colocaron 20 semillas en sobres de papel filtro asegurados con grapas, posteriormente se lavaron en 50 ml de agua destilada más tres gotas de detergente líquido; dentro de la campana de flujo laminar se tomó el sobre y se colocó en un vaso de precipitado con 50 ml de alcohol etílico al 15% durante un minuto en agitación constante. Posteriormente, las semillas se sometieron a diferentes concentraciones de NaOCl y tiempos de exposición (0.5 y 1%, en 5 y 10 minutos, más un control) a cada tratamiento se agregó 3 gotas de Tween 80. Posterior al tiempo de exposición y dentro de la campana de flujo laminar, las semillas se colocaron en 50 ml de una solución estéril de microdyn por 15 minutos en agitación constante. Finalmente se realizaron 3 enjuagues de 1 minuto cada uno con agua destilada estéril. Como control se utilizaron semillas que no fueron sometidas al agente desinfectante. Se sembraron cuatro semillas por frasco, cada frasco correspondía a una unidad experimental, cada tratamiento tuvo cinco repeticiones. Los frascos contenían medio MS al 50% de sales. Para evaluar el tratamiento de desinfección con mayor efectividad, el registro del porcentaje de germinación y contaminación se realizó a los siete días después la siembra.

Después de haber evaluado el método de desinfección, se repitió el procedimiento para evaluar la germinación del lote de semillas, el registro de la germinación se realizó posterior a los 35 días de la siembra. El cálculo del porcentaje de germinación se registró mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Semillas germinadas (\%)} = (\text{Número de semillas germinadas} / \text{Número de semillas}) \times 100$$

El rompimiento de la testa se tomó como criterio para determinar si una semilla germinó, así mismo, la presencia de un sistema radicular desarrollado, raíz primaria y raíces seminales, hipocótilo con buen desarrollo sin daños en el tejido, plúmula con buen crecimiento y desarrollo de cotiledones.

De las plántulas germinadas en ambas condiciones, se seleccionaron aquellas que alcanzaron un tamaño mayor a 1 cm, estas se utilizaron para las pruebas con tratamientos hormonales e inducción del crecimiento. En el caso de las plántulas germinadas *ex vitro*, estas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5% durante 15 minutos, posteriormente se sembraron en frascos con medio MS 100% con carbón activado a una temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ con la finalidad de adaptarlas a las condiciones *in vitro*.

6.5 Preparación del medio de cultivo para la propagación *in vitro*

Para las diferentes pruebas *in vitro* se utilizó medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) al 50% de sus sales, adicionado con 30 g/L de sacarosa y 1 g/L de carbón activado, se ajustó el pH a 5.7-5.8 y se solidificó con 8 g/L de agar, posteriormente se vertieron 25 ml de medio en cada frasco y se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos.

6.6 Subcultivo de plántulas en medio MS con fitorreguladores

Se seleccionaron plántulas con un tamaño entre 1 a 3 cm. Dentro de la campana de flujo laminar se separaron las hojas primarias y raíz del resto de la estructura vegetativa con un bisturí estéril. Posteriormente se realizó la siembra en medio MS 50% adicionado con los fitorreguladores. Los tratamientos evaluados fueron: Tratamiento 1 (BAP 0.5 mg/L - AIA 0.3 mg/L), Tratamiento 2 (BAP 0.5 mg/L - AIA 0.5 mg/L), Tratamiento 3 (BAP 1 mg/L - AIA 0.3 mg/L), Tratamiento 4 (BAP 1 mg/L - AIA 0.5 mg/L), más un control sin reguladores de crecimiento. La incubación se realizó en un periodo de 28 días en un área climatizada con una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad (16/8). Se registró semanalmente el incremento en altura (mm), número de brotes y número de raíces.

6.7 Etapa de aclimatación

Después de 4 semanas en la cámara de incubación las plántulas se trasplantaron en charolas con tierra de humus y fueron llevadas al invernadero. Se mantuvieron tapadas para evitar la pérdida de humedad, a las 2 semanas se les retiró la tapa. Se regaron 1 vez por semana. Posteriormente se realizaron 4 aplicaciones con giberelinas en una concentración de 50 mg/L, cada 15 días.

6.8 Inducción de estrés por frío en plántulas

Se seleccionaron 27 plántulas sobrevivientes de la etapa de aclimatación, se dividieron en categorías respecto a su tamaño en pequeñas (4-6 cm), medianas (7-11 cm) y grandes (12-17 cm), posteriormente se formaron tres grupos con tres ejemplares de cada categoría para tener en total 9 plantas por condición de temperatura. Estas se colocaron a temperaturas de 7°C, 10°C y temperatura ambiente durante 12, 24 y 48 horas.

6.9 Preparación de muestras celulares

Posterior al tiempo de exposición al frío, se cortó un brote de cada plántula, de este se obtuvieron cuatro cortes transversales los cuales se colocaron sobre portaobjetos, dos cortes se colocaron en agua destilada durante 5 minutos, y otros dos fueron sometidos a solución hipertónica (hidróxido de sodio 5 M) durante 5 minutos, con la finalidad de conocer si existía entrada o salida de solutos debido a la perturbación del equilibrio iónico. Posteriormente ambos tratamientos fueron fijados con ácido acético: alcohol etílico en proporción 1:3 durante 5 minutos, se extendieron sobre un portaobjetos y se aplicó colorante azul de metileno durante 5 minutos, las cuales se fijaron con calor, se colocó un cubreobjetos y se quitó el excedente con etanol al 70%. Las preparaciones se observaron al microscopio óptico en un enfoque de 40x.

6.10 Evaluación de las membranas

Se midieron 25 células por preparación con la ayuda de un micrómetro para dar un total de 100 células por muestras (50 células de agua destilada y 50 en solución hipertónica). Para calcular el área de la célula se multiplicó el valor del largo por el ancho cada célula. Después, se obtuvo la diferencia de las áreas entre las condiciones de preparación de las muestras (agua destilada y solución hipertónica) para conocer la reducción celular, finalmente se obtuvo el promedio y la desviación estándar para cada tratamiento.

6.11 Análisis estadísticos

Germinación: Para determinar si existían diferencias significativas entre las dos condiciones de propagación (*ex vitro* e *in vitro*), se realizó un remuestreo bootstrapp con 1000 pasos al interior de cada tratamiento, el promedio y desviación estándar resultante para cada condición fue comparado con una prueba de t-Student.

Tratamientos hormonales: Para determinar que tratamiento hormonal permite un mayor crecimiento de los explantes en cm, se realizaron remuestreos Bootstrap de 100 pasos con los datos de crecimiento por tratamiento de forma semanal (4 semanas); por iteración se calculó la tasa de crecimiento con su respectivo intervalo de confianza. Si los valores entre rangos son excluyentes, entonces, los tratamientos resultan distintos. Finalmente, para determinar diferencias en cuanto al crecimiento de brotes y raíces por semana, se realizó un PERMANOVA de una vía con distancias de Jaccard entre tratamientos, considerando a las semanas como réplicas.

Estrés en frío: Se realizó un ANOVA factorial para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos, se tomó a la temperatura y el tiempo de exposición como factores. Finalmente, se utilizó una prueba de Tukey para determinar cuál de los tratamientos explica las diferencias registradas.

VII. RESULTADOS

7.1 Viabilidad y pruebas de germinación

Se registró la viabilidad de 96 semillas de *H. undatus*. Una vez obtenido el número de embriones teñidos de rojo (Figura 6), se sacó el porcentaje por repetición y se obtuvo el promedio de las cuatro repeticiones, obteniendo un 68.95% de viabilidad (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de viabilidad en un lote de semillas de *Hylocereus undatus*.

	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4
Total, de semillas	24	24	24	24
# Semillas viables	20	18	18	11
% Semillas viables	80%	75%	75%	45.8%
Promedio de viabilidad				68.95%



Figura 6. Viabilidad de semillas. La figura A. muestra un embrión completamente coloreado bajo los criterios de viabilidad, las figuras B, C y D muestran los embriones que no fueron considerados viables (no teñidos, parcialmente teñidos y coloraciones tenues).

7.2 Germinación *ex vitro*

Con respecto a la germinación *ex vitro*, posterior a un periodo de cinco semanas desde el inicio del cultivo, se obtuvo un porcentaje del 60% (Figura 7 y 8), el inicio de la germinación se presentó a partir de la segunda semana con un 9% (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de la germinación semanal *ex vitro* en semillas de pitahaya.

SEMANA	PORCENTAJE DE GERMINACIÓN
1	0%
2	9%
3	15%
4	56%
5	60%
Promedio de germinación	60%



Figura 7. Germinación de semillas a partir de la cuarta semana de cultivo en camas de algodón.



Figura 8. Semillas parcialmente germinadas y no germinadas (no se consideraron para el porcentaje de germinación).

7.3 Técnica de desinfección *in vitro*

El protocolo utilizado en este trabajo fue parcialmente efectivo para el establecimiento y germinación de las semillas *in vitro*. La presencia de contaminación bacteriana fue persistente desde la primera semana con una evidente disminución de la germinación

(Figura 9), aunque se observó que, una vez establecida la plántula, éstas no se veían afectadas en su crecimiento dentro del cultivo.

A mayor concentración de NaOCl y tiempo de exposición al agente desinfectante, se puede reducir la contaminación por bacterias hasta un 30% (Tabla 3), sin embargo, esto afecta la germinación de las semillas; en cambio, a menor concentración y tiempo de exposición (0.5%, 5 minutos), la contaminación aumenta el doble (60%). No se logró eliminar al agente patógeno en los cultivos *in vitro*.



Figura 9. Germinación *in vitro*, se aprecia la contaminación observada desde la primera semana.

Tabla 3. Resultados de contaminación a distintas concentraciones de NaOCl y tiempos de exposición.

Semanas	Tratamientos de desinfección				
	Control	0.5% 5 min	0.5% 10 min	1% 5 min	1% 10 min
1 semana	5	0	4	4	3
2 semana	0	0	2	2	0
3 semana	0	1	0	0	1
4 semana	3	8	4	2	2
5 semana	0	3	0	0	0
Porcentaje	40%	60%	50%	40%	30%

7.4 Germinación *in vitro*

En lo que respecta a la germinación *in vitro*, se obtuvo el 28.7 ± 13.4 % de germinación al término de cinco semanas. Así mismo, esta germinación se registró en cada tratamiento de las pruebas de desinfección, donde podemos observar que la concentración de NaOCl al

0.5 y 1% por 5 minutos nos permite obtener mayor germinación (20%) comparado con los otros tratamientos (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados del porcentaje de germinación *in vitro* en un periodo de cinco semanas.

Semana	No. de semillas germinadas en los tratamientos de desinfección				
	Control	0.5% 5min	0.5% 10 min	1% 5 min	1% 10 min
1	1	3	1	2	2
2	5	0	0	0	1
3	2	1	0	2	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
Total	8	4	1	4	3
Porcentaje	40%	20%	5%	20%	15%

La prueba de contraste de medias (T-Student) evidenció diferencias significativas entre los promedios de los porcentajes de germinación ($t= 10.09$, 7 , $p= 2.01^{-05}$) para ambas condiciones (*ex vitro* e *in vitro*). Esto nos permite entender el efecto del almacenamiento de las semillas y su influencia en el proceso de germinación, dado que las semillas germinadas *ex vitro* fueron sembradas antes que las semillas *in vitro*.

7.5 Tratamientos hormonales

Con respecto a la tasa de crecimiento, se determinó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control, sin embargo, el tratamiento 3 (BAP 1 mg/L + 0.3 mg/L AIA) mostró mayor crecimiento (1.148 cm), seguido del tratamiento 1 (BAP 0.5 mg/L + 0.3 mg/L AIA; 1.132 cm) y el tratamiento 2 (BAP 0.5 mg/L + 0.5 mg/L AIA 1.106 cm) (Figura 10), el tratamiento 4 tuvo valores menores al control (Figura 11).



Figura 10. Tratamientos hormonales para inducir organogénesis en plántulas de pitahaya.

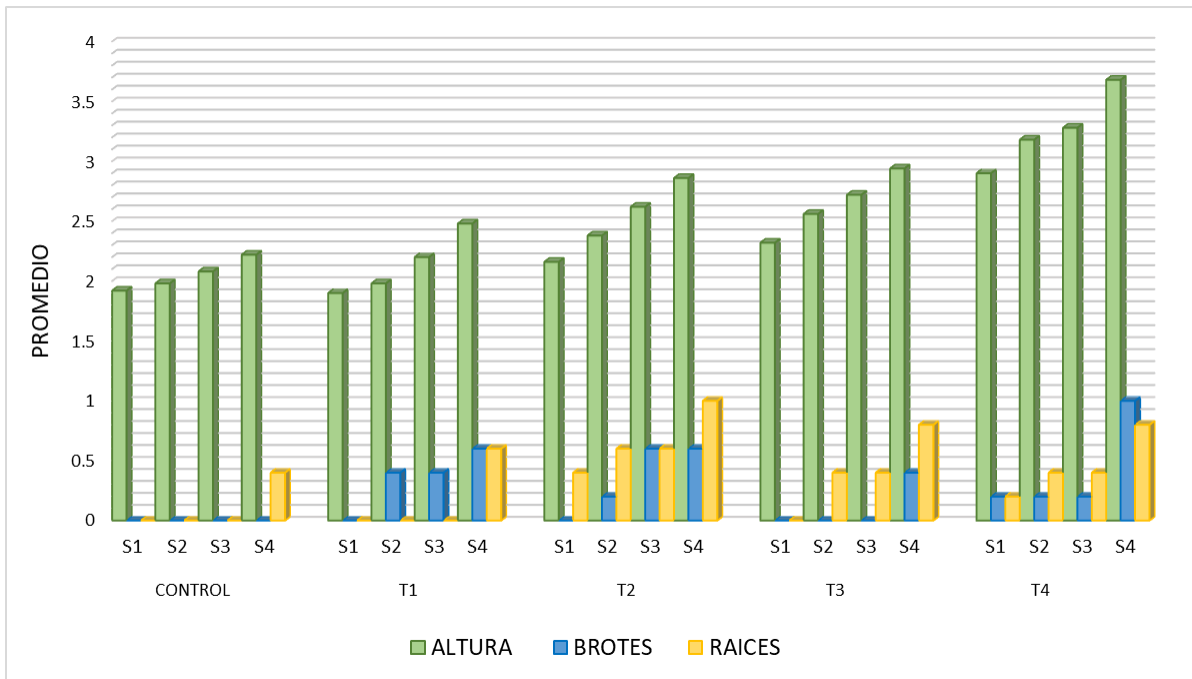


Figura 11. Registro semanal del promedio en altura, brotes y raíces de los cuatro tratamientos hormonales y el control.

En lo que respecta al crecimiento de las plántulas, podemos observar que el tratamiento 4, T4: BAP 1 mg/L - AIA 0.5 mg/L permitió un crecimiento apical de 0.62 cm (Tabla 5) (Figura 11, color verde) y un mayor crecimiento de brotes (Tabla 6), (Figura 11, color azul); en cambio, para raíces el mejor tratamiento fue el tratamiento 2, T2: BAP 0.5 mg/L – AIA 0.5 mg/L mostrando mayor crecimiento a la cuarta semana (Tabla 6), (Figura 11,

color amarillo), un resultado similar se observó en el número de brotes, que fue mayor a la cuarta semana con el tratamiento T4. Para el caso del control, podemos ver que el crecimiento es menor, con aparición de raíces a la cuarta semana y sin la aparición de brotes.

Tabla 5. Crecimiento apical de pitahaya obtenidos por cultivo *in vitro* después de cuatro semanas.

Tratamientos	Altura inicial (cm)	Altura final (cm)	Promedio y DE de la diferencia entre altura inicial-final (cm)
CONTROL	1.6	2.14	0.54±0.21
BAP 0.5 mg/L-AIA 0.3 mg/L	1.88	2.4	0.52±0.40
BAP 0.5 mg/L -AIA 0.5 mg/L	2.4	2.9	0.46±0.31
BAP 1 mg/L -AIA 0.3 mg/L	2.1	2.86	0.54±0.32
BAP 1 mg/L -AIA 0.5 mg/L	2.86	3.48	0.62±0.33

Para el caso de brotes y raíces, no hubo diferencias significativas entre tratamientos, el promedio por tratamiento se presenta en la tabla 6. El tratamiento 4 y 2 tuvieron mayor número de brotes y raíces, respectivamente.

Tabla 6. Número de brotes y raíces por tratamientos a diferentes concentraciones de reguladores.

Tratamiento	Concentraciones de reguladores	Numero de brotes	Numero de raíces
1	BAP 0.5 mg/L + AIA 0.3 mg/L	0.6 + 0.55 ^a	0.6 + 0.55 ^a
2	BAP 0.5 mg/L + AIA 0.5 mg/L	0.6 + 0.89 ^a	1 + 0.0 ^a
3	BAP 1 mg/L + AIA 0.3 mg/L	0.4 + 0.55 ^a	0.8 + 0.45 ^a
4	BAP 1 mg/L + AIA 0.5 mg/L	1 ± 1.73 ^a	0.8 ± 0.45 ^a
Control	Sin reguladores	0 ^a	0.4 + 0.55 ^a

7.6 Evaluación celular

Se registro el promedio del área celular provenientes de brotes expuestos a diferentes temperaturas durante 12, 24 y 36 horas (Tabla 7).

Tabla 7. Promedios y DE de las áreas en μm de células sometidas al frio en diferentes tiempos de exposición tanto en agua destilada (N) como en solución hipertónica (H).

	12 hrs		24 hrs		36 hrs	
Temp.	N	H	N	H	N	H
TA	7.36 ± 2.89	2.4 ± 1.31	6.58 ± 4.12	2.54 ± 1.32	7.99 ± 5.07	2.34 ± 1.11
10 °C	6.72 ± 3.05	3.01 ± 1.41	7 ± 2.69	4.16 ± 3.07	6.54 ± 3.71	2.6 ± 1.39
7 °C	6.08 ± 2.29	3.75 ± 1.66	7.43 ± 2.65	2.78 ± 1.22	9.94 ± 4.90	3.22 ± 2.22

N: tratamiento agua destilada y H: tratamiento en solución hipertónica

Como podemos observar en la tabla 7, a temperatura ambiente (TA), el tratamiento N (agua destilada) mostró un incremento del volumen celular hasta de $7.99 \pm 5.07 \mu\text{m}$ en un tiempo de 36 hrs, en cambio, el tratamiento H (solución hipertónica) disminuyó su área hasta $2.34 \pm 1.11 \mu\text{m}$ en el mismo periodo de tiempo. Por otro lado, a temperatura de 10°C, el tratamiento N mantuvo un incremento entre 6.54 a $7 \mu\text{m}$ en un periodo de 12-36 hrs, y para el tratamiento H existió una reducción, principalmente a las 36 hrs ($2.6 \pm 1.39 \mu\text{m}$). Finalmente, a 7°C se puede observar que hubo un incremento en el área de la célula hasta de $9.94 \pm 4.90 \mu\text{m}$ en el tratamiento N a 36 hrs, así mismo se observó incremento en el tratamiento H a esta temperatura en un menor tiempo de exposición (12 hrs).

Tabla 8. Comparación entre medias del área celular, resultado de la diferencia entre N y H.

Temperatura	Diferencia en la reducción en μm^*
TA 12 hrs.	4.96 ^{bd}
TA 24 hrs.	3.28 ^{cd}
TA 36 hrs.	5.64 ^d
10° 12 hrs.	3.69 ^c
10° 24 hrs.	2.83 ^b
10° 36 hrs.	3.93 ^{cd}
7° 12 hrs.	2.32 ^b
7° 24 hrs.	4.65 ^{cd}
7° 36 hrs	6.72 ^a

**Medias con la misma letra no son significativamente diferentes*

Podemos observar en la Tabla 8 que, a temperatura ambiente, no existen diferencias significativas en la reducción del volumen entre las células sometidas al tratamiento con agua destilada y solución hipertónica durante los tres tiempos de exposición. Para el caso de los tratamientos a bajas temperaturas, se observa que a las 12 hrs para 10°C (Figura 12), el diámetro celular se redujo 3.69 micras, y a 7°C a las 24 hrs, el diámetro se redujo 2.32 micras, lo que nos indica que disminuyó la permeabilidad de la membrana, dado que existió una menor entrada y salida de líquidos. Transcurridas 24 hrs (Figura 12) a temperatura 10°C, podemos observar que la reducción en el diámetro celular también estuvo por debajo del control con un promedio de 2.83 μm ; y para 7°C a las 24 hrs, el diámetro se redujo 4.65 μm en promedio, lo que se acerca al control. Finalmente, después de 36 hrs podemos observar que para 10°C hubo una diferencia de 3.93 μm y nuevamente se acercó al valor promedio del control, sin embargo, para 7°C el promedio de la reducción del diámetro celular fue mayor 6.72 μm .

A partir de esta información se puede observar que a mayor tiempo de exposición existe mayor diferencia entre las áreas, sin embargo, existen puntos intermedios donde el cambio de tamaño celular es mínimo, como es el caso de 10° 24 horas y 7° 12 horas, por lo que, son significativamente diferentes del resto, pero similares entre sí (Tabla 8), y que la temperatura de 7° durante 36 hrs demostró ser crítica para las células, debido a que incrementó en mayor medida el área de las células ocasionando daños irreversibles.

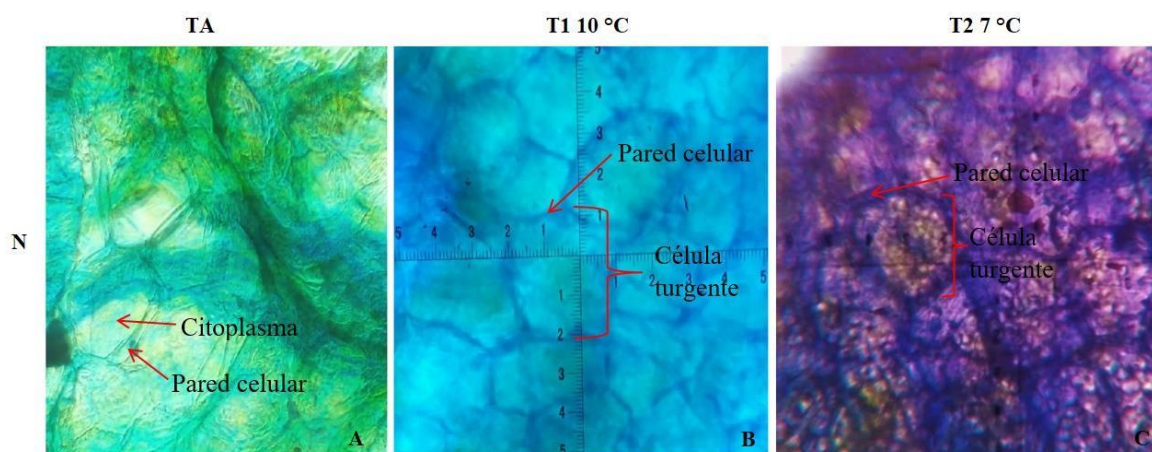


Figura 12. Células vistas al microscopio enfoque 40x, (A), (B) y (C) son células en tratamiento con agua destilada durante 12 horas a temperatura ambiente (TA), 10°C y 7°C.

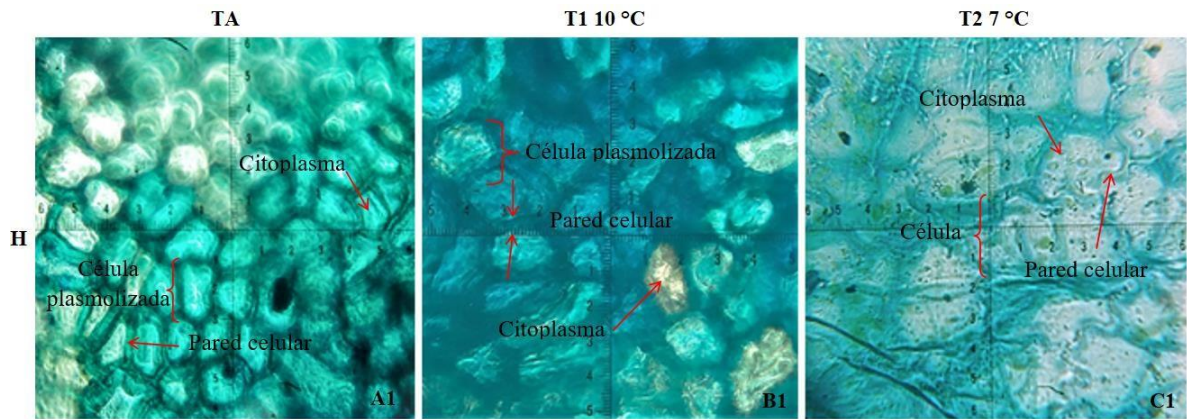


Figura 13. Células vistas al microscopio enfoque 40x (A1), (B1) y (C1) son células sometidas a medio hipertónico durante 12 horas a TA, 10°C y 7°C.

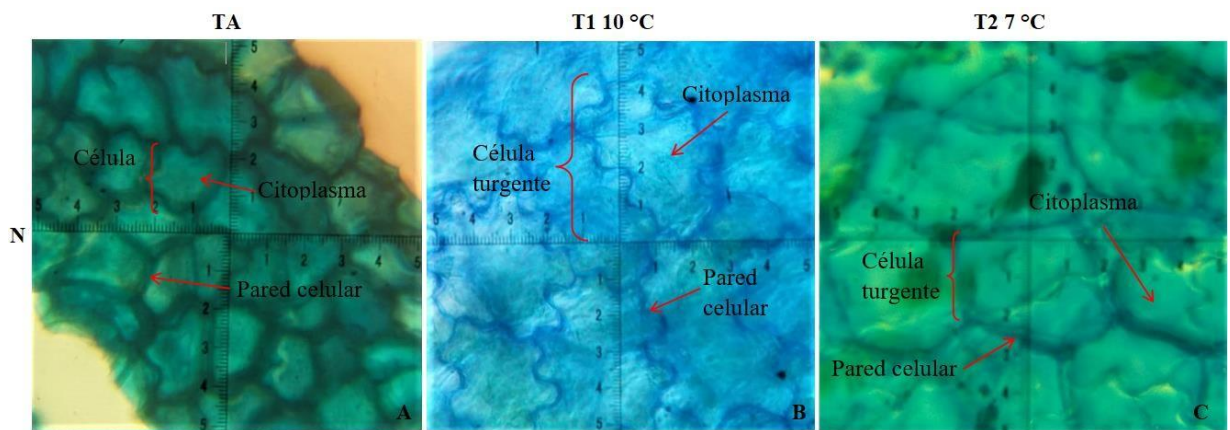


Figura 14. Células vistas al microscopio enfoque 40x, (A), (B) y (C) son células sometidas a tratamiento con agua destilada durante 24 horas a TA, 10°C y 7°C.

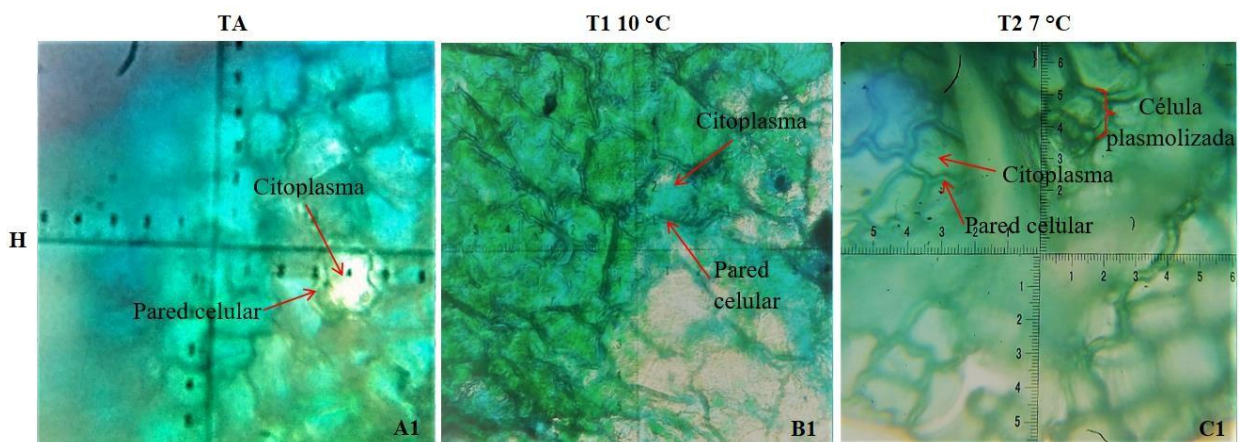


Figura 15. Células vistas al microscopio enfoque 40x, (A1), (B1) y (C1) son células en tratamiento con solución hipertónica durante 24 horas a TA, 10°C y 7°C.

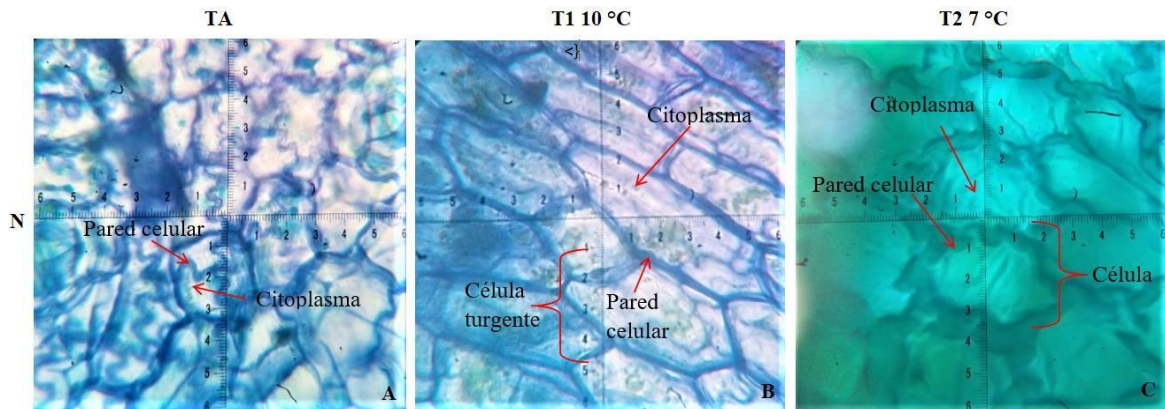


Figura 16. Células vistas al microscopio enfoque 40x, (A), (B) y (C) son células en tratamiento con agua destilada durante 36 horas a (TA), 10°C y 7°C. Se observa que las células tanto en medio con agua destilada y medio hipertónico con más grandes.

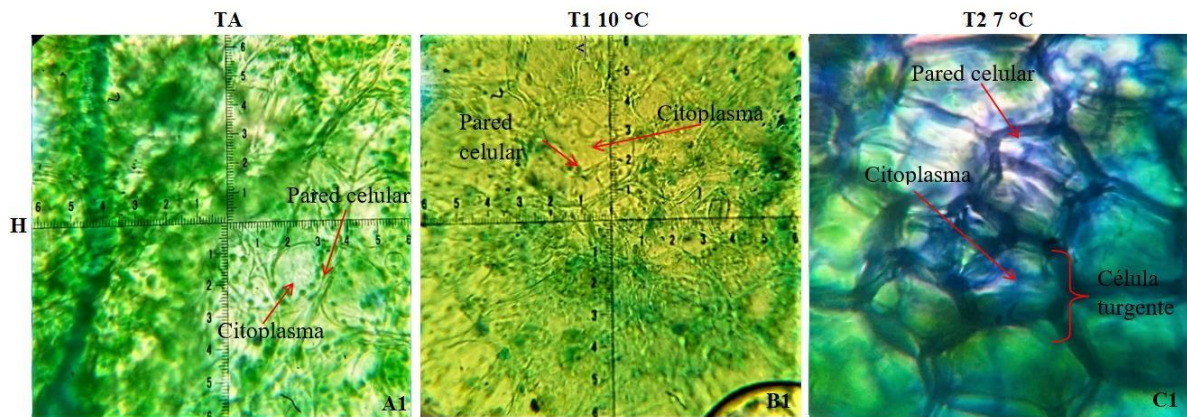


Figura 17. Células vistas al microscopio enfoque 40x, (A1), (B1) y (C1) son células sometidas a medio hipertónico durante 36 horas a (TA), 10°C y 7°C. Las células tanto en medio con agua destilada como hipertónico muestran células más grandes.

En la Figura 18 se puede observar que el tratamiento de 7°C a 12 hrs y 10°C durante 24 hrs difieren significativamente del resto de los tratamientos por lo que se deduce que el área de las células muestra una menor reducción en tamaño a la temperatura en tales temperaturas.

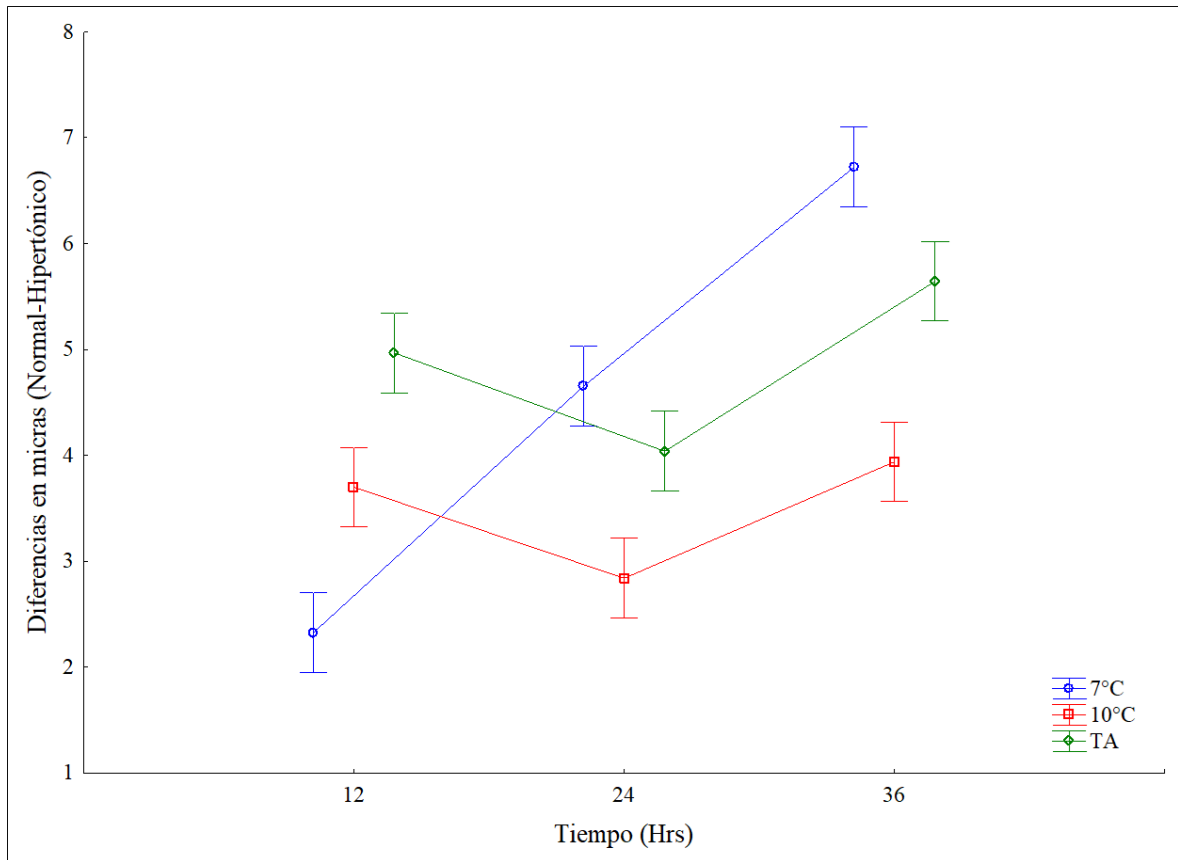


Figura 18. Diferencias en el tamaño de las células antes y después de ser sometidas a un medio hipertónico en distintas temperaturas y tiempos.

VIII. DISCUSIÓN

Se obtuvo un porcentaje de viabilidad del 68.98% a partir de la exposición de las semillas de *H. undatus* a una solución de tetrazolio al 0.1% durante 18 hrs. a una temperatura de 30°C. Este resultado es similar al obtenido por González (2013) quién registró valores entre 68% - 75%, indicando que los porcentajes más bajos estaban asociados con mayor tiempo de almacenamiento de las semillas. Así mismo, otros autores relacionan la viabilidad de las semillas con sus características morfológicas (Cisneros *et al.*, 2020), y al corto tiempo de almacenamiento posterior al tiempo de cosecha (Dahanayake y Ranawake, 2012), lo cual garantiza obtener valores superiores de viabilidad a los presentados en este trabajo.

La prueba de germinación mostró un porcentaje del 60% transcurridos 35 días a una temperatura de 30°C, iniciando en la segunda semana con un promedio del 9% y con el mayor porcentaje en la quinta semana. Este resultado es bajo en comparación con Mállap *et al.* (2022), donde obtuvieron un porcentaje del 98% a los 30 días, esto relacionado con el uso de semillas frescas con alta viabilidad. En otro estudio realizado por Suárez (2011), también se registraron valores superiores al 70%, con una germinación mínima del 21.7 % en ausencia de luz, esta diferencia está relacionada con el tiempo de extracción de la semilla del fruto, ya que aquellas extraídas inmediatamente presentaban mayor germinación (75.7%), además, la germinación disminuye un 7.2% para el lote almacenado durante 30 días, por tanto, los valores bajos de germinación pueden estar asociados al tiempo de extracción y almacenaje de la semilla. Con respecto a González (2013), la germinación de las semillas envejecidas es menor que la observada en semillas jóvenes o recién obtenidas, esto indica que las semillas son ortodoxas. Diferentes autores (González, 2013; Montesinos *et al.*, 2015; Montiel *et al.*, 2016) indican que la germinación de la especie *Hylocereus undatus* inicia en el día dos y termina en el día nueve, presentando el mayor número de semillas germinadas entre el día cuatro y cinco a partir de la siembra, lo cual no se apreció en este trabajo.

La germinación *in vitro* tuvo un promedio del 28.7 ± 13.4 %, dando inicio en la primera semana y con el mayor porcentaje en la cuarta, sin embargo, se observó contaminación bacteriana desde la primera semana con una evidente disminución de la germinación. Las bacterias son uno de los contaminantes *in vitro* más comunes y ocasionan serios

problemas, porque pueden ser sistemáticos, así como difíciles de detectar y eliminar. Estos microorganismos escapan a los efectos de los esterilizantes superficiales y pueden ser inter o intracelulares (Hernández y González, 2010). Por lo que, existió una estrecha relación entre la contaminación con la disminución de la germinación, puesto que algunos autores han descrito tasas de contaminación microbiana del 6% con un porcentaje de germinación del 70% (Montiel, 2016).

Otro factor que también reduce la germinación *in vitro* es el tiempo de exposición a los agentes desinfectantes. Muchas de estas técnicas de desinfección tienden a afectar en forma adversa a las semillas, lo que deteriora su vigor y calidad (Mizuho, 2008). La obtención de un cultivo aséptico es fundamental para la propagación exitosa de una especie y se logra a partir de diferentes técnicas de desinfección evitando la contaminación microbiana del explante, sin embargo, algunos tejidos presentan mayor problema ya que contienen microorganismos dentro del tejido y en el caso de semillas, el incremento en la exposición y concentración a agentes desinfectantes pueden ocasionar una disminución en el porcentaje de germinación (Dodds y Lorin, 1986).

El uso de sustancias químicas es desventajoso causando probablemente fitotoxicidad en las semillas, dependiendo de los tipos de agentes y de la dosificación. Por ejemplo, el hipoclorito genera gas cloro que es tóxico para organismos y produce el deterioro en la velocidad de germinación de las semillas o perturbación fisiológica en las plántulas, y en el caso de cactáceas, se ha demostrado que la concentración del hipoclorito de sodio y el tipo de desinfección disminuye la contaminación, pero así mismo la germinación de las semillas. A partir de lo anterior, se podría decir que los métodos convencionales para la desinfección de las semillas involucran algunos inconvenientes y no son necesariamente satisfactorios como medio para prevenir la aparición de microorganismos patógenos en el cultivo *in vitro*. (Rodríguez *et al.*, 2015; Mizuho, 2008). Por lo cual algunos autores recomiendan utilizar técnicas de desinfección menos invasivas para las semillas de pitahaya a base de calor húmedo (Morales, 2000).

En la evaluación celular, el tratamiento a temperatura ambiente se utilizó como un indicador de la permeabilidad de la membrana en condiciones normales, en este estudio se observó que no hubo diferencias significativas en la reducción del diámetro celular para los tres tiempos evaluados (Tabla 8). La membrana celular se caracteriza por permitir el paso libre de agua

y sustancias de bajo peso molecular a través de un fenómeno de osmosis y tienden a hincharse con el incremento de agua en el medio, ocasionando que la pared celular se debilite y/o el caso contrario, si la concentración de solutos excede la del interior, se produce un flujo neto hacia el exterior, lo que hace que la membrana plasmática se aleje de la pared celular, un proceso conocido como plasmólisis (Murray, 2006; Pérez, 2017). En función de esto, en este trabajo se logró observar tanto cambios en el volumen celular para tratamientos con agua destilada, como una disminución en el tamaño de las células en medio hipertónico a diferentes temperaturas y tiempos de exposición.

Para el caso de los tratamientos sometidos a bajas temperaturas se observó que hay una incidencia en la reducción celular de 12 a 36 hrs de exposición, siendo mayor a la temperatura de 7°C durante 36 hrs (6.72 μm). El estrés por frío puede causar daños en la membrana celular como: pérdida de la funcionalidad de las proteínas, de la turgencia y de la energía metabólica, así como, salida de electrolitos, que puede producir la muerte celular (Gavilanes *et al.*, 2020), lo cual es un efecto que podríamos estar observando a bajas temperaturas. Se piensa que la pérdida de dobles enlaces u otros cambios en la composición de la membrana, así como la peroxidación de esta son determinantes de la disminución de la fluidez que altera la permeabilidad de la membrana ya que existe una correlación entre el transporte de la membrana y la fluidez de los lípidos (Alonso *et al.*, 1997).

A pesar de los estudios del daño por frío en la membrana celular aún se desconoce su causa o naturaleza, o los eventos primarios que lo desencadenan, pero una de la teoría más aceptada se fundamenta en las transiciones de fase de los lípidos de membrana provocados por la temperatura y del efecto directo en las enzimas que produce síntomas como marchitez, clorosis y senescencia acelerada (Gavilanes *et al.*, 2020). Sin embargo, en pitahaya se observó que a temperaturas de 7° y 10°C durante periodos de 12 y 24 hrs existió un cambio en el tamaño celular menos evidente, lo que posiblemente se deba a que esta planta es tolerante al frío a través de mecanismos como la acumulación de diversas sustancias orgánicas e inorgánicas, como sal inorgánica, prolina, betaína, azúcares solubles y proteínas solubles que mantienen la turgencia y el proceso metabólico original, lo que conduce a un aumento en la concentración del líquido celular y una disminución del potencial osmótico (Zhang *et al.*, 2019).

Otros de los hallazgos relacionados a la tolerancia al frío es el grado de insaturación y la longitud de las cadenas acílicas de los lípidos membranales que contribuyen a modular la fluidez; las plantas sensibles al frío usualmente tienen una mayor proporción de ácidos grasos saturados y, por lo tanto, la temperatura de transición de estado líquido-ordenado a gel es mayor. Esto obstaculiza termodinámicamente que los lípidos adopten una configuración que favorezca una mayor fluidez. Por otro lado, las plantas resistentes a frío tienen mayor abundancia de insaturaciones y una temperatura de transición más baja, dando los efectos opuestos y alcanzando una mayor fluidez a una temperatura menor (Gavilanes *et al.*, 2020). En este caso, por el tipo de prueba realizada para este trabajo, se observó que las células de pitahaya a bajas temperaturas durante un tiempo prolongado de exposición (36 hrs) presentan diferencias significativas con respecto al diámetro celular, probablemente esto ocurra por un daño en la membrana causando la entrada abrupta de agua. La fluidez de la membrana ha sido de los principales mecanismos estudiados como una vía de señalización de estrés ambiental por bajas temperaturas o frío, considerando a la membrana plasmática como el receptor inicial de la respuesta al estrés, lo que implicaría que no se requiere necesariamente de un receptor proteico, sino que las alteraciones en la fluidez, debidas a la abundancia y saturación de los lípidos membranales, son las encargadas de comenzar la señalización. Por lo que, la membrana plasmática, mediante alteraciones físicas que repercuten en la fluidez, fungiría como termómetro biológico y como receptor al frío (Gavilanes *et al.*, 2020). Considerando así mismo que esta primera señal origina también cambios en el citoesqueleto, en el aumento de entrada de Ca^{2+} a la célula y cambios en la actividad de ciertas proteínas quinasas, que en última instancia resultan en la transcripción de genes inducidos por estrés y que mejoran la tolerancia al frío (Preston y Sandve, 2013).

Debido que la membrana celular es uno de los mecanismos iniciales de respuesta al frío, en este trabajo se evaluó la permeabilidad de pitahaya para saber si existía un cambio ante esta fuente de estrés. Como se pudo observar, a temperaturas de 10° y 7° a un tiempo de 24 y 12 hrs., son significativamente diferentes al control y a mayores tiempos de exposición, lo que implicaría que se podría evaluar la integridad de la membrana celular como indicador de respuesta al estrés abiótico en conjunto con otros biomarcadores como REC, MDA y PRO para descartar la intervención de factores ambientales no considerados en

esta evaluación. Así mismo, se considera evaluar otros factores como el uso de NaOH como solución hipertónica, el control de la luz durante el enfriamiento y el movimiento osmótico de agua a través de la bicapa lipídica, el cual no fue suficiente para explicar la cantidad de flujo que atraviesa la membrana. Por otro lado, las acuaporinas, si bien no regulan la dirección del transporte de agua ya que este siempre será a favor del potencial hídrico, si pueden intensificar el flujo. Así, el estado hídrico de plasmólisis o turgencia se consigue por movimientos de flujo de masas a través de acuaporinas, más que de ósmosiso difusión y la mayoría de las plantas tienen la habilidad de aumentar el potencial soluto desus células para promover el flujo de agua hacia dentro de las mismas, y así mantener la turgencia (Pérez, 2017).

Por lo que, para determinar esta prueba como eficaz sería interesante sumar evaluaciones moleculares para identificar los genes responsables de tolerancia al frío, así como pruebas fisiológicas para conocer que otros mecanismos se ven alterados por el frío dentro de la planta y demostrar si en la especie de pitahaya existe una adaptación en la membrana celular que le permite mantener el equilibrio osmótico. Por ejemplo, en el arroz, la sobreexpresión de los genes responsables de la tolerancia al frío trae consigo un considerable incremento en la tolerancia al mismo en la etapa de plántula, mejorando la supervivencia, incrementando en algunos casos la producción de osmolitos compatibles como prolina y brindando mayor estabilidad de la membrana celular (Hu *et al.*, 2008). En líneas genéticas de trigo transgénico que sobreexpresan BLT101 (BLT101ox) bajo estrés por frío, pierden menos agua, mostrando menores niveles de expresión de los genes inducidos por hormonas (como auxinas y citoquininas) (Zhang *et al.*, 2019). Para otros tipos de estrés, también se han evidenciado cambios en la pared celular que permiten tolerar los cambios de temperatura. Por ejemplo, en tabaco *Nicotiana tabacum*, para estrés salino se documentaron alteraciones físicas y bioquímicas que podrían explicar cómo las células adaptadas disminuyen la capacidad de la pared para expandirse a pesar de la desviación de carbono utilizado para el ajuste osmótico, lejos de la síntesis de polisacáridos de la pared celular, se mostró empíricamente que las paredes de las células adaptadas con NaCl son mucho más débiles que las de las células no adaptadas (Iraki *et al.*, 1989), algo similar a lo ocurrido con pitahaya en donde a cierto tiempo de explosión y determinada temperatura, la membrana celular presentó menor crecimiento y reducción.

Con base a estudios recientes sobre el mecanismo de detección de temperatura a partir de la fluidez de la membrana, se ha logrado mejorar la tolerancia al frío en plantas como *Arabidopsis thaliana*, la colza, el guisante y una bromelia (*Nidularium minutum*). Esto se ha interpretado como un aumento de la resistencia mecánica de las paredes celulares frente a la deformación durante la cristalización del hielo extracelular (Takahashi *et al.*, 2019).

El estudio de la tolerancia a estreses abióticos en plantas se ha vuelto un tema de interés para la biotecnología agroalimentaria por la capacidad de ampliar las áreas de distribución de los cultivos bajo condiciones ambientales consideradas adversas, donde se pueda hacer la selección de individuos con mayores posibilidades de adaptación, sin embargo, sigue siendo desconocido el mecanismo de la tolerancia en muchos campos debido a que implica la interacción de más áreas de investigación como lo es la fisiología vegetal y la transcriptómica. Por la relativa novedad de esta última área, las investigaciones tienden a ser transversales con diversos campos, lo que su alcance ayuda a abrir futuras líneas de investigación en las que se recomienda realizar pruebas de manera más precisa mediante la utilización de cámaras climáticas controladas, identificación y caracterización de genes y/o transcritos involucrados a la tolerancia al frío, el uso de otros parámetros morfológicos y fisiológicos, tomando en cuenta factores como la tasa de enfriamiento, la duración del enfriamiento y la tolerancia al frío de las plantas.

XI. CONCLUSIONES

1. Las semillas de pitahaya presentaron una viabilidad del 68.95%, esto indica que tienen periodos cortos de latencia por lo que, los tiempos prolongados de almacenamiento pueden reducir su viabilidad.
2. El cultivo *ex vitro* permite una mayor germinación de las semillas de *Hylocereus undatus* (hasta de un 60%) sin embargo, para una mayor supervivencia de las plántulas se recomienda cultivar por técnicas *in vitro*.
3. El uso de NaOCl en concentraciones de 0.5-1% y tiempos de 5 y 10 minutos no lograron controlar el agente patógeno (bacterias) en los cultivos *in vitro* de este estudio, por lo que se requiere probar otros reactivos que sustituyan la función de los agentes desinfectantes probados de manera que no afecten la germinación en pitahaya.
4. Se demostró que la combinación de hormonas vegetales como AIA + BAP en concentraciones de 0.5+0.5 mg/L y 0.5+1 mg/L aceleran el crecimiento del explante en un rango entre 0.46 ± 0.31 y 0.62 ± 0.33 cm respectivamente, de igual manera permiten la aparición de brotes y raíces en el cultivo *in vitro* de pitahaya; es importante explorar sobre las condiciones y tiempo de incubación para tener resultados definitivos para la micropropagación de la especie.
5. La planta de pitahaya es capaz de tolerar temperaturas de 10° hasta 24 horas o temperaturas de 7° durante 12 horas, pero a menor temperatura o mayor exposición, la planta sufrirá daños graves, ocasionando muerte celular. Se sugiere continuar evaluando los efectos por estrés en frío en la fisiología celular de pitahaya para conocer los mecanismos de tolerancia a estrés abiótico en esta especie.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara, J., Acero, J., Alcántara, J. y Sánchez, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32): 109-129.
- Alonso, A., Queiroz, C. y Magalhães, A. (1997). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*, 1323(1): 75-84.
- Alonzo, M. (2015). Estrés por baja temperaturas (segunda parte). *Boletín técnico agrícola*. 21:4. https://www.iuf.edu.ar/media/uploads/boletines/boletin_1430136516.pdf
- Bautista, A. (2012). Manual de ensayos de semillas forestales recopilación de información. Secretaría de Medio Ambiente. Recuperado de https://www.sema.gob.mx/descargas/manuales/manual_BG.pdf
- Bárceñas, P. y Jiménez, V. (2010). Pitayas y Pitahayas (*Stenocereus* spp. e *Hylocereus* spp.), recursos agrícolas en el Valle de Tehuacán Puebla. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*, 10: 101-120.
- Britton, N. y Rose, J. (1920). The Cactaceae: descriptions and illustrations of plants of the cactus family. *Biodiversity Heritage Library*. p.197 [p.https://www.biodiversitylibrary.org/page/32089118](https://www.biodiversitylibrary.org/page/32089118).
- Bustamante, A. (2018). Caracterización de mecanismos implicados en la regulación de la respuesta a estrés por frío en plantas. (Tesis de Doctorado). Universidad Politécnica de Valencia. pp. 7-27.
- Carter, P. y Wiersma, D. (2000). Daños por Heladas tardías en Maíz. *Conocimientos Agrícolas*, 10(14): 1-4.
- Cerén, J. (2020). Distribución, etnobotánica y cultivo de pitahaya (*Selenicereus*, *Hylocereae*, Cactaceae) en El Salvador. (Tesis Maestría). Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México. 109 p.
- Cisneros, A., Pérez, O. y Bonilla, C. (2020). Evaluación de la viabilidad en semillas de Pinus tropicales Morelet con diferente tiempo de almacenamiento. *Avances*, 22 (1): 97-109.
- Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2014). Cactus y biznagas (Cactaceae). Recuperado de <http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/granfamilia/plantas/magnoliayMarg/cactaceas.html>. (Consultado 19 de junio de 2022).
- Dahanayake, N. y Ranawake, A. (2012). Regeneration of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) plant lets from leaf and stem explants. *Tropical Agricultural Research and Extension*, 14 (4): 85 -89.
- Iliev, I., Gajdosova, A., Libiakova y Mohan, S. (2010). Plant micropropagation. *Plant Cell Culture: Essential Methods*. Loughborough, UK. Wiley-Blackwell. pp. 7.
- Drew, R. y Azimi, M. (2002). Micropopagation of red pitaya (*Hylocereous undatus*). *ISHS Acta Horticulturae*, 575(7): 93-98.

- Dodds, H. y Lorin, W. (1986). Experiments in plant tissue culture. Second Edition. Cambridge University Press. London, England.
- Feria, M., Rojas, D., Chávez, M., Reyna, M., Quiala, E., Solís, J. y Zurita, F. (2012). *In vitro* propagation of *Hylocereus purpusii* Britton & Rose, a Mexican species in danger of extinction. *Biotecnología Vegetal*, 12(2): 77-83.
- García, B. y Quirós, M. (2010). Análisis del comportamiento de mercado de la pitahaya (*Hylocereus undatus*) en Costa Rica. *Tecnología en Marcha*, 23: 14-24.
- García, S., Gómez, F., Trejo, L. y Herrera, E. (2013). Factores de transcripción involucrados en respuestas moleculares de las plantas al estrés osmótico. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(2): 105-115.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. y Thorpe, T. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular Development Biology-Plant*, 32: 272-289. <https://doi.org/10.1007/BF02822700>
- Gavilanes, M., Guadarrama, M. y Franco, A. (2020). Aspectos membranales y transductores de la tolerancia de las plantas a las bajas temperaturas. *Mensaje Bioquímico*, 44: 7-19.
- Gisbert, C. (2010). Morfogénesis: la ruta organogénica versus la ruta embriogénica. ENSAYO, Departamento de Biotecnología, ETSIAMN-Universidad Politécnica de Valencia. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/11526/Microsoft%20Word%20-%20art%20C3%ADculo%20docente%20cgisbert%20sept2010.pdf>
- Gong, Y., Bi, X., Deng, L., Hu, J., Jiang, S., Tan, L., Wang, T. y Luo, X. (2019). Comparative study on cold resistance physiology of red pulp pitaya and white pulp pitaya. *E3S Web of Conferences*, 131(01113). <https://doi.org/10.1051/e3sconf/201913101113>.
- González, G. (2020). Micropropagación *in vitro* de pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* Haw) a partir de tallos seleccionados de siembras comerciales, Limoncito - Santa Elena. (Tesis de Licenciatura). Universidad Agraria del Ecuador, Ecuador. pp. 15-28.
- González, O. (2013). Germinación y longevidad de semillas de genotipos de pitahaya (*Hylocereus* spp) y pitaya (*Stenocereus* spp). (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Chapingo, México. p 56.
- Gunasena, H., Pushpakumara, D. y Kariyawasam, M. (2010). 'Dragon fruit *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose'. En: Pushpakumara, D. K. N. G., Gunasena, H. P. M. y Singh V. P. Underutilized fruit trees in Sri Lanka, edit. World Agroforestry Center. New Delhi, India, Pp. 110–142, ISBN 978-955-9224-33-4
- Hai, T., Linh, T., Huynh, N. y Quintela, P. (2021). Dragon fruit: A review of health benefits and nutrients and its sustainable development under climate changes in Vietnam. *Czech Journal of Food Sciences*, 39(2): 71–94.
- Hernández, M., García, W., Zavala, W., Romero, L., Rojas, E., Rodríguez, A., Gutiérrez, J., Bautista, D. y Reyes, R. (2018). Pitahaya (*Hylocereus undatus*) Plan de manejo

- agroecológico para su cultivo en la región de Halachó-Maxcanú, Yucatán. Recuperado el 10 de noviembre 2021, de file:///C:/Users/4PF72LA_1909/Downloads/pitahaya_plandemanajeagroeco.pdf
- Hernández, Y. y González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4): 58-69
- Hu, H., You, J., Fang, Y., Zhu, X., Qi, Z. y Xiong L. (2008). Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Mol Biol*, 67(1.-2): 169-181.
- Hu, X., Xie, F., Liang, W., Liang, Y., Zhang, Z., Zhao, J., Hu, G., Qin, Y. (2022). HuNAC20 y HuNAC25 two novel NAC genes from pitaya, confer cold tolerance intransgenic *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Science*, 16(23): 2189. <https://doi.org/10.3390/ijms23042189>
- Hwarari, D., Yuanlin, G., Baseer, A., Ali, M., Tian, M., Zhaodong, H., Ye, L., Jinhui, C. y Liming, Y. (2022). ICE-CBF-COR signaling cascade and its regulation in plants responding to cold stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3): 1-20. <https://doi.org/10.3390/ijms23031549>
- Infante, I. (1992). *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitahaya *Mediocractus coccineus* (Salm-Dyck). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31(2):155-159.
- Iraki, N., Bressan, R., Hasegawa, P. y Nicholas C. (1989). Alteration of the physical and chemical structure of the primary cell wall of growth-limited plant cells adapted to osmotic stress. *Plant Physiology*, 91(1): 39-47. <https://doi.org/10.1104/pp.91.1.39>
- ISTA (2016). Reglas Internacionales para el Análisis de las Semillas. Capítulo 5 y 6. pp. 1-26.
- Jiménez, G. (1998). Cultivo de ápices y meristemas en: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología (Ed.) Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba, pp. 45-46.
- Lallana, V. 1997. Fisiología en condiciones de estrés. Facultad de Ciencias Agropecuarias-UNER. Recuperado el 27 de junio del 2023 de <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Fisiologiacondicionesdeestres.pdf>
- Lee, Z., Hirakawa, T., Yamaguchi, N. y Ito, T. (2019). The roles of plant hormones and their interactions with regulatory genes in determining meristem activity. *International Journal of Molecular Science*, 20(16): 1-19. <https://doi.org/10.3390/ijms20164065>.
- Llerena, A. (2020). Agricultura digital en el cultivo de pitahaya. *Latin-American Journal of Computing (LAJC)*. Recuperado el 7 de julio del 2023 de file:///C:/Users/4PF72LA_1909/Downloads/209-Article%20Text-814-1-10-20201124.pdf.

- López, Z. (2010). Organogénesis directa de *NOVO* en *Musa* AAA "Enano Gigante" y "FHIA 23". (Tesis de Maestría). Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, Edo. México. p. 25.
- Mállap, G., Vilca, N., Meléndez, J., Huaman, E. y Oliva, M. (2022). Multiplicación *in vitro* de pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) a partir de plántulas obtenidas *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 33(1): 1-13.
- Méndez, C. y Vallejo, M. (2019). Mecanismos de respuesta al estrés abiótico: hacia una perspectiva de las especies forestales. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 10(56): 33-64.
- Mizuho, K. (2008). Método para el tratamiento de semillas. Recuperado el 22 de julio de 2023 de <https://patentimages.storage.googleapis.com/f8/80/93/3ad43792c955f9/ES2309049T3.pdf>
- Montesinos, J., Rodríguez, L., Ortiz, R., Fonseca, M., Ruíz, G. y Guevara, F. (2015). Pitahaya (*Hylocereus* spp.) un recurso fitogenético con historia y futuro para el trópico seco mexicano. *Cultivos Tropicales*, 36:67-76.
- Montiel, L., Enríquez, J. y Cisneros, A. (2016). Propagación *in vitro* de *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Britton y Rose. *Biotecnología Vegetal*, 16(2): 113–123.
- Montiel, L. (2017). Conservación *in vitro* de pitahaya (*Hylocereus* spp.) mediante el cultivo de mínimo crecimiento. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, Oaxaca. p. 7.
- Morales, M. (2000). Inducción de germinación, crecimiento de plántula y cultivo *in vitro* de pitahaya *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton and Rose. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolas de los Garza, Nuevo León. pp. 32-36.
- Morales, Y. (2017). Desarrollo vegetativo de pitahaya (*Hylocereus* spp.) en respuesta a la aplicación de vermicompost y fertirriego. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional. Jiquilpan de Juárez, Michoacán, México. pp. 3-13.
- Murray, W. (2006). Introducción a la botánica. Pearson educación. ISBN 13: 978-84-8322-698-8.
- Olmos, S., Luciani, G. y Galdeano, E. (2015). Métodos de propagación y conservación de germoplasma. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. INTA. <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/BiotecnologiayMejoramientovegetalII.pdf>
- Osuna, T., Valdez, J., Sañudo, J., Muy-Rangel, M., Hernández, S., Villarreal, M. y Osuna, J. (2016). Fenología reproductiva, rendimiento y calidad del fruto de pitahaya (*Hylocereus andalus* (How.) Britton and Rose) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Agrociencia*, 50 (1):61-78.
- Pelah, D., Kaushik, R., Mizrahi, Y. y Sitrit, Y. (2002). Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71(1):81-84.

- Pérez, F. (2017). Fisiología vegetal. Repositorio.unu.edu.pe Recuperado el 16 de junio del 2023. <http://repositorio.unu.edu.pe/bitstream/handle/UNU/3201/000026080L?sequence=1&isAllowed=y>
- Pérez, J. (2011). Micropropagación de *Hylocereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer e *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton y Rose, y caracterización molecular de brotes mediante RAPDs. (Tesis de Ingeniería). Universidad Autónoma De San Luis Potosí. San Luis Potosí, México. pp. 7-16.
- Preston, J. y Sandve, S. (2013). Adaptation to seasonality and the winter freeze. *Frontiers Plants Science*, 4(167): 1-18.
- Rodríguez, A. (2002). Pitahaya (*Hylocereus undatus*) producción y comercialización en México. CIESTEAM.
- Rodríguez, L., Daquinta, M., Fonet, E., Cantillo, R. y Vásquez, J. (2015). Propagación *in vitro* de *Escobaria cubensis* (britton & rose) hunts. *Ciencia y Sociedad*, 38(2): 345-375
- Romajaro, M. (2016). Tratamientos poscosecha para el control de los daños por frío en frutos climatéricos y no climatéricos. (Tesis de Doctorado). Universidad de Murcia. España. pp. 6-22.
- Ruiz, V., Urcia, A. y Paucar, J. (2020). Pitahaya (*Hylocereus* spp.). Cultivo, características fisicoquímicas, composición nutricional y compuestos bioactivos. *Scientia Agropecuaria*, 11: 439-453.
- Ruvalcaba, D., Rojas, D. y Valencia, A. (2010). Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Agroecosistemas Tropicales y Subtropicales*, 12(1): 139-143.
- Sarkar, D., Bhowmik, P. C. y Shetty, K. (2009). Cold acclimation responses of three cool-season turfgrasses and the role of proline-associated pentose phosphate pathway. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(2): 210-220.
- Steven, J., Alcántara, J., Acero, J., Alcántara, J., Sánchez, M. y Melida, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 17(32): 109-129. <https://doi.org/10.25058/24629448.3639>.
- Solano, L., Porfirio, J., Alvarado, C. y Hernández, R. (2005). Diversidad genética en pitahaya (*Hylocereus undatus* Haworth. Britton y Rose). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28(3): 179-185.
- Suárez, R. (2011). Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt. and Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt and Rose. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional De Colombia, Palmira, Colombia. Pp. 53-167.
- Takahashi, D., Gorka, M., Erban, A., Graf, A., Kopka, J., Zuther, E. y Hinch, D. (2019). Both cold and sub-zero acclimation induce cell wall modification and changes in the extracellular proteome in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, 9(2289): 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38688-3>

- Tambussi, E. (2004). Fotosíntesis, fotoprotección, productividad y estrés abiótico: algunos casos de estudio. (Tesis de Doctorado). Universidad de Barcelona, Barcelona, España. Pp. 9-11
- Varela, F. (2018). Etapas de micropropagación. *Tecno Agro*, (124)7: 1-2. <https://tecnoagro.com.mx/table/2018/no.-124/>
- Vega, I. (2022). Extracto de *Sesuvium portulacastrum* como bioestimulante en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) bajo estrés hídrico. (Tesis de Maestría). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Culiacán, Sinaloa. p 15.
- Verona, A., Urcia, J., y Paucar, L. (2020). Pitahaya (*Hylocereus spp.*): Cultivo, características fisicoquímicas, composición nutricional y compuestos bioactivos. *Scientia Agropecuaria*, 11(3): 439-453. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.16>
- Villarreal, B. (2015). ¿Cómo se forman las nuevas plantas *in vitro*? Morfogénesis *in vitro*. Organogénesis. Embriogénesis somática. Sharry, S., Adema, M. y Abedini, W. Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Pp 92-101.
- Zambrano, C., Ríos, J., Beltrán, D. y Mesa, N. (2015). Evaluación de reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *Hylocereus megalanthus* (pitahaya amarilla). *Revista UMBAGA*, 1(10): 76-87.
- Zeledón, E. y Arauz, B. (2020). Micropropagación de pitahaya amarilla (*Hylocereus undatus*) a partir de semilla botánica. (Tesis de Ingeniería). Universidad Nacional Agraria Facultad de Agronomía, Managua, Nicaragua. pp. 23-42.
- Zhang, H., Dong, J., Zhao, X., Zhang, Y., Ren, J., Xing, L., Jiang, C., Wang, X., Wang, J., Zhao, S. y Yu, H. (2019) Research Progress in Membrane Lipid Metabolism and Molecular Mechanism in Peanut Cold Tolerance. *Front. Plant Sci*, 10 (838): 1-13.
- Zúñiga, C. (2016). Biología floral y estructura vegetativa de la pitahaya (*Hylocereus undatus* Haworth). (Tesis de Maestría). Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, Edo. México. p 13.