



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

Recinto universitario “Rubén Darío”
Facultad de Ciencias e Ingeniería
Departamento de Biología

Seminario de Graduación para optar al título de Licenciadas en Biología

**Fortalecimiento del cultivo de pitahaya (*Hylocereus undatus Britton et Rose*)
mediante la aplicación de Técnica Biotecnológica para la propagación *in vitro*
de la variedad Roja**

Autores: Br. María José Martínez Vargas
Br. Oneyda Carolina Martínez Flores

Tutor: MSc. Gena del Carmen Abarca

Asesor Técnico: MSc. Marbell Aguilar Maradiaga

**Managua, Nicaragua,
Diciembre, 2019.**

CONTENIDO

I.	INTRODUCCION.....	1
II.	ANTECEDENTES	2
III.	JUSTIFICACION	4
IV.	OBJETIVOS.....	5
V.	MARCO TEORICO	6
5.2	Origen.....	7
5.3	Morfología.....	7
5.4	Valor Nutricional.....	8
5.5	Propiedades y beneficios	9
5.6	Variedades o clones de pitahaya producida en Nicaragua	9
5.7	Mercado nacional e internacional	11
5.7.1	Principales productores y exportadores	11
5.7.2	Estándares de calidad demandados por el mercado internacional	11
5.7.3	Antecedentes de la producción de pitahaya en Nicaragua.....	11
5.7.4	Departamentos que se dedican a la producción de pitahaya en Nicaragua.	12
5.8	Definición de cultivo in vitro	13
5.8.1	Fases de Micropropagación Según.....	14
5.9	Aplicaciones prácticas del cultivo in vitro	17
5.10	Métodos para propagar.....	17
5.11	Marco legal.....	18
VI.	Preguntas directrices	19
VII.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	20
7.1	Tipo de estudio.....	20
7.2	Área de estudio	20
7.3	Universo y muestra	20
7.4	Definición y Operacionalización de variables, (MOVI).....	20
1)	Variables independientes:.....	21
2)	Variables dependientes:	21
7.5	Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	23

7.5.1 Materiales y métodos.....	23
7.5.2 Esterilización de cristalería e instrumentos:	23
7.5.3 Medio de cultivo.....	23
7.5.4 Preparación de medios de cultivo.....	24
7.2.1 Preparación de reguladores de crecimiento.....	24
7.6 Procedimientos para la recolección de Datos e información.....	29
7.7 Plan de tabulación y análisis.....	30
VIII. ANÁLISIS Y RESULTADOS	31
IX. CONCLUSIÓN.....	35
X. RECOMENDACIONES.....	36
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	37
XII. ANEXOS.....	41

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 a. Cristalería por tratamiento b. Adhesión de Macro y Micro nutrientes. c. Auxina y citocina. d. Se añadió BAB e. adhesión de AIA al medio. F. Agar g. Distribución del medio a los frascos por cada tratamiento h. Tratamientos listos para esterilizarlos en frascos.....	42
Ilustración 2 Segmento Basal de la vaina y segmento apical	42
Ilustración 3 Aspecto externo e interno del fruto.....	44
Ilustración 4 Resultados comparados por tratamiento A. Numero de brotes B. Numero de raíces C. Elongación	44
Ilustración 5 Siembra de explantes en cámara de flujo laminar	45
Ilustración 6 Autoclave para esterilizar medio de cultivo; Error! Marcador no definido.	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición química de la Pitahaya.....	15
Tabla 2: Departamentos productores de pitahaya en Nicaragua.....	19
Tabla 3: Matriz de Operacionalización de las Variables (MOVI).....	28
Tabla 4: Equipos, Materiales y reactivos.....	29
Tabla 5: Reactivos y cantidad para medio de cultivo.....	30
Tabla 6: Concentraciones de auxinas y citocininas para la fase de multiplicación.....	32
Tabla 7: Concentraciones para la fase de enraizamiento.....	33
Tabla 8: Efecto de los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 en la longitud del brote principal y número de brotes en segmentos apicales y basales de cladodios.....	36
Tabla 9: Efecto de los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 en la longitud del brote principal y número de brotes en segmentos apicales y basales de cladodios.....	38

Dedicatoria

“La base de un desarrollo impetuoso en los años futuros debe fundamentarse en una ciencia cada vez más desarrollada”.

Ernesto “Che “Guevara.

El presente trabajo investigativo está dedicado a nuestros padres, pilares fundamentales en nuestras vidas; sin ellos, jamás hubiésemos podido conseguir lo que hasta este momento hemos logrado. Su tenacidad y lucha insaciable han hecho de ellos el gran ejemplo a seguir y destacar, no solo para nosotros sino también para nuestros familiares en forma general. Agradecemos el apoyo brindado por nuestros docentes.

Sin obviar a la Universidad Nacional Agraria (U.N.A) que nos facilitó las instalaciones para poder llevar a cabo esta investigación en la cual logramos desarrollar nuestras habilidades, capacidad de entendimiento y perseverancia.

María Martínez
Oneyda Martínez

Agradecimientos

Damos gracias a Dios en primer lugar, ya que fue nuestra fuerza de inspiración nos dotó de fortalezas, bendiciones y sabiduría a pesar de los duros retos al que nos correspondió enfrentarnos, pero nos ha permitido cumplir una más de nuestras metas propuestas.

A nuestros padres, porque con su abnegación nos brindaron la confianza, el apoyo, trabajo y sacrificio todos estos años.

A todas las personas que nos han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial, al MSc. Marbell Aguilar Maradiaga, a la MSc. Gena Abarca por compartir sus conocimientos y brindarnos su apoyo a lo largo de este tiempo.

María Martínez
Oneyda Martínez

Resumen

La aplicación del cultivo de tejidos contribuye a la propagación rápida y masiva de especies con importancia económica, y sirve como plataforma básica de las estrategias de producción. El objetivo de esta investigación fue fortalecer el cultivo de pitahaya (*Hylocereus undatus Britton et Rose*) mediante la aplicación de Técnica Biotecnológica para la propagación *in vitro* de la variedad Roja. Se tomaron segmentos apical y basal de los cladodios, estos se establecieron en medio de cultivo MS con AIA (0.25, 0.50, 0.75, 1.00 mg/L) y BAP (0.50, 1.00, 1.50, 2.00 mg/L) combinados para la fase de multiplicación y para la fase de enraizamiento únicamente fue empleada la auxina AIA.

Para cada fase se emplearon cinco tratamientos con cinco repeticiones. Con la porción apical tomada del cladodio respondió mejor en longitud del brote principal cuando se adicionaron 2 mg/l de BAP con una media de 3.80 cm, en la fase de multiplicación, Con adiciones de 0.75 y 1.00 mg/l de AIA se obtuvieron los mejores resultados en las variables número de brotes, número de raíces y longitud de raíces, en la fase de enraizamiento. Los resultados de esta investigación ofrecen dosis específicas de Auxinas y Citocininas que ayudan a un mejor desarrollo para los explantes de pitahaya lo cual contribuirá al establecimiento de plantaciones comerciales y otros estudios a nivel de laboratorio.

Palabras claves: *Cultivo de Tejido, Propagación in vitro, Cladodios, Medio de cultivo.*

I. INTRODUCCION

De cara a un mundo globalizado y cada vez más competitivo, nace la esperanza de alcanzar estándares de calidad en nuestros cultivos hacia mercados extranjeros, donde estos productos sean firmemente acogidos.

La pitahaya (*Hylocereus* spp.) es una planta perenne, originaria de América. Los tallos de esta son suculentos con o sin espinas, tienen la capacidad de desarrollar numerosas raíces adventicias que le ayuden a fijarse de árboles, piedras, tejados o estructuras tutoras.

En Nicaragua, la pitahaya a través del tiempo ha adquirido importancia comercial. En los años 60, crecía de forma silvestre en medio de plantaciones de cultivos como el café y frutales. Fue hasta los años 70 que comenzó su explotación como cultivo no tradicional, en San Juan de la Concepción, Municipio del Departamento de Masaya el cual ha ido incrementando paulatinamente y se estima que el área total sembrada, hasta 2014 superaba las 1040.04 hectáreas.

Desde el punto de vista comercial, es propagada asexualmente mediante cladodios maduros o estacas; sin embargo, no se ha logrado obtener una técnica de propagación que garantice la obtención de plantas con un sistema radical abundantes, uniforme y de buena calidad, repercutiendo en un bajo rendimiento, retardado en la producción, baja producción y corta vida útil de las plantas, así como en la calidad del fruto, incidiendo indirectamente en la demanda y exigencias del mercado internacional.

Las plantas son susceptibles a daños por exceso de humedad y enfermedades, por estas razones es que se hace necesario el empleo de técnicas biotecnológicas. La presente investigación, desarrollada en la Universidad Nacional Agraria (UNA). Tuvo como finalidad encontrar una alternativa eficiente de propagación asexual, que garantice a los productores la formación de nuevas plántulas de gran producción, sin poner en riesgo su producción.

II. ANTECEDENTES

El mayor problema que enfrentan los productores es el uso de tecnologías tradicionales, lo que afecta de manera directa la obtención de buenos rendimientos, tanto en volumen como en calidad de fruta apta para la exportación (González, 2014).

Según, Nunez, (2014) a partir de meristemos axilares (aréolas) cultivados en medio MS (Murashige y Skoog) se estandarizó un protocolo de regeneración *in vitro* vía organogénesis indirecta en pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*). Se ensayaron tres concentraciones de 2,4-D (2.26, 3.26 y 4.26 μM) y 2,4-D suplementado con 6-BAP al 2.21 μM ; y tres concentraciones de TDZ (200, 300 y 400 μM) o TDZ con 6-BAP, para un total de 12 tratamientos. Las condiciones de crecimiento evaluadas incluyeron el uso de luz (fotoperiodo de 16/8) y oscuridad (0/24). El 2,4-D indujo callo, pero la eficiencia en regeneración para la especie fue nula. A su vez, el TDZ o TDZ suplementado con BAP se mostró más eficiente en la inducción de callos compactos, de color verde-morado, con capacidad de regeneración vía organogénesis indirecta. Con el TDZ a 300 μM se observó mayor eficiencia de respuesta, ya que el número de brotes formados por punto de regeneración fue el más alto. Un análisis histológico confirmó la vía de regeneración en *S. megalanthus*, evidenciando estructuras primordiales características de la formación de brotes a partir de callos.

Según Nunez, (2014) a través de su artículo, Estandarización de un protocolo de regeneración en pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* (K. Shum. Ex Vaupel) Moran) afirma que el cultivo de tejido es un método adecuado para la propagación de esta especie, esta técnica consiste en aislar una porción de planta y proporcionar artificialmente las condiciones físicas y químicas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Este método exige la adopción de procedimientos estrictos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación.

Según Montiel, (2016) en una investigación de propagación *in vitro* de *Hylocereus monacanthus* detalla que la aplicación del cultivo de tejidos contribuye a la propagación rápida y masiva de especies con importancia económica, sirve como plataforma básica de las estrategias de producción. El objetivo de este trabajo fue establecer la propagación *in vitro* de *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Britton y Rose. Se germinaron semillas *in vitro*, se tomaron los segmentos apicales que contenían el ápice y las areolas y se establecieron en medio de cultivo MS con BAP (1.0, 2.0 y 4.0 mg l⁻¹) y AIA (0.5 mg l⁻¹) por separado y combinados para la fase de multiplicación. Para el enraizamiento de los brotes se utilizó un medio de cultivo MS con diferentes concentraciones de sales inorgánicas (50, 75 y 100%) y AIB (0.1 mg l⁻¹).

Las plantas obtenidas *in vitro* se plantaron en invernadero para su aclimatización; el porcentaje de germinación de las semillas fue del 70% con 6% de contaminación microbiana. Con 1 mg l⁻¹ de BAP se obtuvieron los mejores resultados para la multiplicación *in vitro* de *H. monacanthus*. Se obtuvo 100% de brotes enraizados en todos los tratamientos y solo se observó diferencia significativa para la longitud de las raíces con la adición de 0.1 mg l⁻¹ de AIB.

III. JUSTIFICACION

La pitahaya se propaga principalmente mediante esquejes, método que es ineficiente, lento y donde las plantas son susceptibles a daños por exceso de humedad y enfermedades, por estas razones es que se hace necesario el empleo de técnicas biotecnológicas que garanticen una mayor homogeneidad con fidelidad clonal y que satisfagan la demanda de material vegetal de plantación.

En el presente estudio investigativo se pretende fortalecer la producción de pitahaya a través de la aplicación de técnicas de propagación *in vitro* ya que estas permiten obtener material vegetal que es representativo de la variabilidad genética, siendo esta técnica un método que permite obtener una gran cantidad de plántulas en corto tiempo, espacio reducido y plantas que cumplan con los estándares de calidad para la exportación.

Los beneficiarios de esta investigación serán los agricultores ya que contarán con material vegetal de calidad en sus productos, de igual manera se beneficiarán los consumidores al encontrar productos de calidad y bajo costo.

IV. OBJETIVOS

General:

Fortalecer el cultivo de pitahaya (*Hylocerus undatus Britton et Rose*) mediante la aplicación de la Técnica Biotecnológica para la propagación *in vitro* de la variedad Roja

Específicos:

1. Definir las mejores concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento en las fases de multiplicación y enraizamiento de pitahaya roja.
2. Evaluar el efecto de las variantes de medio de cultivo en la fase de multiplicación a partir de yemas apical y basal.
3. Identificar la respuesta de las variantes de medio de cultivo en la fase de enraizamiento a partir de yemas apical y basal.

V. MARCO TEORICO

1.1. Taxonomía

El género *Trichoderma* está clasificado taxonómicamente, según Agrios (2002), en las siguientes categorías:

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Subdivisión: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia Hypocreaceae

Género: *Trichoderma*

Especies: *Trichoderma aggressivum*, *Fig.1 Plantación de pitahaya, tomado de sitio web infoagro.com*

Harzianum andinensis, *Trichoderma*

arundinaceum, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma*

aureoviride, *Trichoderma brevicompactum*, *Harzianum cerámica*, *Trichoderma*

citrinoveride, *Trichoderma citrinoveridex*, *Trichoderma crissum*, *Harzianum cremea*,

Harzianum cuneispora, *Trichoderma erinaceum*, *Harzianum estónica*, *Trichoderma*

fasciculatum, *Trichoderma fertile*, *Trichoderma gamsii*, *Trichoderma ghanense*,

Trichoderma hamatum, *Trichoderma harzianum*, *koningii*, *Trichoderma*

koningiopsis, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma minutisporum*, *Harzianum*

neorufa, *Harzianum nigrovirens*, *Trichoderma oblongisporum*, *Trichoderma*

ovalisporum, *Harzianum patella*, *Trichoderma pleurotica*, *Trichoderma.*

polysporum, *Trichoderma pseudokoningii*, *Trichoderma pubescens*, *Trichoderma*

reesei, *Trichoderma saturnisporum*, *Harzianum semiorbis*, *Trichoderma. spirale*,

Harzianum stilbohypoxyli, *Trichoderma strictipile*, *Trichoderma strigosum*,

Trichoderma stromaticum, *H. surrotunda*, *Trichoderma tomentosum*, *Trichoderma*

virens, *Trichoderma viride*, *Trichoderma viridescens* (Samuels et al., 2010).



Fig.1 Plantación de pitahaya, tomado de sitio web infoagro.com

5.2 Origen

La pitahaya *Hylocereus undatus* es originaria de América tropical, siendo México, Centro América y el Caribe, los lugares que presentan el mayor número de especies (CORPOICA, 2013) (SUAREZ, 2011); (MEDINA, 2012); tienen varios hábitos de crecimiento y pueden ser: trepadoras, rupícolas, hemiepífitas y epífitas, que requiere para su adecuada producción de un clima cálido húmedo, aunque también se desarrollan en clima cálido seco, la temperatura óptima oscila entre 18 a 27°C, una humedad relativa de 80%, con precipitaciones comprendidas entre 1300 a 2200 mm anuales. Se adaptan a un amplio rango de altitudes, pero las comprendidas entre 800 a 1,850 msnm son las ideales; además requieren de suelos francos a francos arenosos, bien drenados con un pH entre 5.5- 6.5 (CORPOICA, 2013); (García, 2013)

5.3 Morfología

Según Gonzáles (2014) Existen generalmente dos tipos de pitahaya: amarilla y roja; siendo esta última la que presenta algunas variedades: orejona, lisa, rosa, chocoya y lisa morado. Las pitahayas tienen dos tipos de raíces: las primarias, que se encuentran en el suelo y secundarias que se desarrollan principalmente fuera del suelo.

Posee una flor que es hermafrodita, y mide de 15 a 30 cm de largo; es vistosa, de color blanco o rosado. La pitahaya puede desarrollarse sobre árboles, troncos secos, piedras y muros. La primera cosecha se da a los 18 meses después de la siembra y comienza su producción importante a partir del tercer año afirma. (Gonzáles, 2014)

Las plantas de 3 a 4 años de edad pueden producir alrededor de 220 libras (100 kg) de fruta por año. Asimismo, cada fruta puede llegar a pesar desde 200 gramos

hasta más de 1 kilogramo. Cabe destacar que, la vida de una plantación de pitahaya es de 15 a 20 años.

Su reproducción es por pencas y por semillas. Es una planta de clima tropical muy resistente a las temperaturas elevadas, a la sequía, a las plagas y a las enfermedades. Para el cultivo se prefieren los suelos calcáreos y se desarrolla óptimamente en temperaturas de 18°C a 26°C; precipitación pluvial de 6001,300 m, con alternancia de estación seca y húmeda. (MAGFOR, 2013)

La planta reacciona favorablemente a la intensidad lumínica, lo cual estimula la brotación de yemas florales, esta es una de las razones por las que las plantaciones deben estar en plena exposición solar, si se planta a la sombra, la producción es escasa y de mala calidad. Igualmente, se debe tener en cuenta que, hay dos tipos de poda que deben llevarse a cabo para obtener la máxima producción, salud y calidad de las frutas. La primera consiste en una poda de conformación para guiar el crecimiento de las plantas hasta que alcancen la parte superior del enrejado y se distribuyan luego por él.

Esto implica la eliminación de cualquier tallo lateral a lo largo del tallo principal hasta que llegue al tope del enrejado, y la atadura del tallo principal a los postes del enrejado. Poco después de que las plantas alcanzan la parte superior del enrejado, la parte terminal se debe cortar para inducir ramas laterales, las que deben ser atadas con simetría a los soportes del enrejado. (MAGFOR, 2013)

5.4 Valor Nutricional

Según (González, 2014) La pitahaya es un tesoro desde el punto de vista nutricional, contiene antioxidantes, mucílagos, ácido ascórbico, fenoles. Es rica en Vitamina C, también contiene vitaminas del grupo B, minerales como calcio, fósforo, hierro, tiene alto contenido en agua y posee proteína vegetal y fibra soluble, en la tabla 1 se muestra la composición química. Las semillas, que son comestibles, contienen ácidos grasos beneficiosos, y una de sus propiedades más destacadas es su acción

antiinflamatoria y antioxidante, por todo ello la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda su consumo.

Compuesto	Cantidad	Unidad
Agua	84.4	G
Carbohidratos	13.2	G
Proteínas	0.4	G
Fibra	0.5	G
Calorías	50	Cal
Calcio	10	Mg
Fosforo	16	Mg
Hierro	0.3	Mg
Tiamina	0.03	Mg
Riboflavina	0.04	Mg
Niacina	0.2	Mg
Ácido ascórbico	7	Mg

Tabla 1: Composición química de la Pitahaya Fuente: Martínez & Martínez (2019)

5.5 Propiedades y beneficios

- ✓ Retrasa el envejecimiento celular.
- ✓ Refuerza el sistema inmunológico estimulando la producción de glóbulos blancos, rojos y plaquetas.
- ✓ Posee efecto antiinflamatorio.
- ✓ Nos ayuda a regular el tránsito intestinal, y sus semillas tienen efecto laxante.
- ✓ Nos ayuda a prevenir los cálculos renales.
- ✓ Regula el nivel de azúcar en sangre.

5.6 Variedades o clones de pitahaya producida en Nicaragua

Actualmente son dos variedades comerciales conocidas y apetecidas por su contenido nutricional, sabor y aroma, así como por sus propiedades disfuncionales y medicinales, la variedad roja, de pulpa rosada o roja y sabor insípido; y la amarilla, de pulpa blanca y mejor producción, siendo más comercial debido a su sabor y mayor resistencia al transporte y almacenamiento (INTA, 2012).

Acorde a la Guía Técnica del INTA¹, cuenta con cinco variedades o clones identificados, las cuales se detallan a continuación:

- a. **Rosa:** El tallo es verde claro, succulento y alargado, los frutos son redondos y su cascara es rojo-rosada con brácteas separadas y delgadas.
- b. **Cebra:** El tallo es grueso y de poca longitud, esta variedad presenta en su superficie rayas blancas de aspecto ceniciento, y por eso se le conoce con el nombre de “Cebra”. Se considera una variedad poco afectada por plagas y enfermedades.
- c. **Orejona:** Posee tallos delgados y alargados, de color verde oscuro; su fruto tiene forma ovalada (forma de huevo) y es de cascara de color rojo purpura y presenta un promedio de 37 brácteas, las cuales son alargadas, duras y bastante resistentes al quiebre (quebradura). Es un clon que produce excelentes frutos, bueno para el mercado interno y externo.
- d. **Lisa:** Es una planta de tallo largo y muy delgado, de color verde pálido, el fruto es ovalado y su cascara es de color rojo oscuro con pocas brácteas y gruesas, siendo esta una buena característica ya que resiste el transporte. Este clon es poco resistente a las enfermedades, especialmente a la bacteria (*Erwinia carotova Jones*) que ocasiona grandes daños si no se toman las medidas fitosinatarias de control preventivo.
- e. **Amarilla:** Es planta que tiene tallos succulentos de color verde intenso y espinas de color cremoso en el extremo apical. Su fruto es redondeado, de color amarillo, la parte externa (cuando maduro), pulpa blanca y con numerosas semillas de color negro, con sabor agridulce, con un peso promedio de 400 a 480 gramos.

¹ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

5.7 Mercado nacional e internacional

5.7.1 Principales productores y exportadores

Según Legiscomex.com (2013), a nivel mundial, los países que destacan con mayor producción de pitahaya son Colombia, Nicaragua y México. En cuanto a Nicaragua, se estima un área de aproximadamente 733.23 hectáreas con una producción nacional de 6,160 toneladas. Cabe destacar que, los exportadores de pitahaya en los mercados internacionales son Colombia, Israel, Ecuador, Nicaragua, Tailandia y Vietnam. En tanto México, Guatemala, El Salvador, entre otros, comercializan en los mercados regionales.

5.7.2 Estándares de calidad demandados por el mercado internacional

Entre los estándares mínimos de calidad que debe poseer la pitahaya, en cuanto a características físicas son: estar enteras, sin heridas, de forma ovoide, presentar un aspecto fresco y de consistencia firme, el pedúnculo debe medir de 15 a 20 mm de longitud, deben estar sanas (sin ataques de insectos o enfermedades), estar limpias (sin espinas), exentas de materias extrañas.

Estar libres de humedad externa anormal, exentas de olores y sabores extraños; asimismo, los residuos de plaguicidas deben respetar los límites del Codex Alimentarius (Agencia de Cooperación Internacional de Japón, 2013). Así mismo, deben mantenerse en condiciones ambientales adecuadas y garantizar una temperatura y humedad relativa para preservar su calidad comercial.

5.7.3 Antecedentes de la producción de pitahaya en Nicaragua

Según Monterrey M, (2014), la pitahaya es una fruta usada por nuestros pueblos desde tiempos precolombinos, desde esa época se hace uso de ella en diversas maneras, entre ellas, para la alimentación humana, elaboración de tintes y para fines medicinales.

En Nicaragua el consumo de la pitahaya es tradicional en diversas zonas del país, desde Jalapa hasta Rivas. También a lo interno del país existe una amplia diversidad que habrá que estudiar detenidamente; sin embargo, cabe mencionar que la meseta de los pueblos es una de las zonas más productoras del país. En la década de los años 80's el cultivo comienza a desarrollarse a nivel comercial, estableciéndose áreas más compactas y abriéndose mercado internacional.

La primera experiencia de exportación de pitahaya nicaragüense data de 1989, año en que se exportaron 6005 cajas con destino a Bélgica, Suiza y Francia, con precios entre U\$12.00 y US\$20.50 (CIF) por caja, impactando, de tal forma que se recibieron pedidos en el año 1990 de 1000 cajas lo que correspondería a 60,000 libras. Cabe señalar que, el aumento significativo de las áreas sembradas entre la década de los 80's y 90's se debió al financiamiento de la Unión Europea. No obstante, para el año 1991 el cultivo de pitahaya se frenó, producto de la enfermedad bacteriosis o quema (*Erwiniacarotovora*), calculándose un 44% de pérdida del área sembrada (MAGFOR, 1999) La enfermedad, causó un grave deterioro al cultivo, encontrándose que muchas de ellas sufrieron pérdidas totales al no tomarse medidas de control o prevención por parte de los productores.

5.7.4 Departamentos que se dedican a la producción de pitahaya en Nicaragua.

Se identifican 17 departamentos; Masaya ocupa el primer lugar con 639.79 manzanas; es decir el 62% del total de áreas sembradas, le sigue Managua con 12% de participación, Chinandega, León y Carazo con 3% de participación, respectivamente, en la Tabla. 2 se detallan los departamentos que se dedican a la producción de este producto.

Cultivo de pitahaya por departamento		
Departamento	Área sembrada Mz	%
Masaya	639.79	61.52
Managua	121.98	11.73
Chinandega	36.28	3.49
León	34.11	3.28
Carazo	32.81	3.15
Matagalpa	31.47	3.03
Boaco	29.03	2.79
Granada	26.13	2.51
Chontales	23.06	2.22
RAAS	18.86	1.81
Estelí	14.57	1.40
Madriz	14.28	1.37
Jinotega	4.33	0.42
Rio san Juan	4.29	0.41
Rivas	3.51	0.34
Nueva Segovia	3.3	0.32
RAAN	2.24	0.22
Total país	1040.04	100

Tabla 2 Departamentos productores de pitahaya en Nicaragua. Fuente: (Berrios & Acevedo, 2014)

5.8 Definición de cultivo in vitro

El cultivo de células y tejido *in vitro* (CCTV) involucra diferentes técnicas a partir de diferente material vegetal tales como cloroplasto, células, tejidos, órganos e incluso plantas completas. El cultivo *in vitro* de vegetales se basa en el aislamiento de órganos, tejido y células vegetales y en el ajuste de las condiciones necesarias para la obtención de respuesta fisiológica o morfogénicas a partir de estos explantes. (Hoxtermann, 1997)

El CCTV es una forma de reproducción asexual, la cual se puede realizar gracias al mecanismo de división mitótico de las células vegetales. La división celular mitótica implica una replicación de los cromosomas de las células hijas, por lo que posee un genotipo idéntico al de la célula madre.

El cultivo se incuba bajo condiciones de luz, temperatura y humedad controladas, que junto con las fisicoquímicas y nutricionales conducen al desarrollo del explante

hacia la formación de una masa celular amorfa denominada callo, o hacia la diferenciación en un tejido organizado que producirá órganos o embriones. Los callos obtenidos mediante este procedimiento pueden sub-cultivarse para su mantenimiento o propagación.

Según (Rivas, 2016) Las principales aplicaciones de la técnica de cultivo de células, tejidos y órganos vegetales son en el campo de micropropagación:

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones.

5.8.1 Fases de Micropropagación Según (Castillo, 1992)

i. Fase 0

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

ii. Fase 1

Desinfección del Material Vegetal: Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, entre otros. Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Los contaminantes más comunes

son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia.

A efectos de obtener las condiciones de asepsia, se trabajará en cabinas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal. Estos explantes se introducirán en un tubo de cultivo conteniendo medio de iniciación para poder controlar la sanidad y la viabilidad, luego de realizar la desinfección del material con hipoclorito de sodio (agua clorada comercial), pura o diluido durante un período de 5 a 15 minutos, seguido por 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada.

iii. Fase 2

Introducción del Material *in vitro*: Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se colocan en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro*.

iv. Fase 3

Multiplicación de los Brotes: Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron a la FASE 1 y 2 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas.

El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados.

v. FASE 4

Elección de un medio de enraizamiento de los explantes: Para enraizar los explantes se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.

Los factores que se deben tener presentes para obtener una respuesta adecuada del explante incluye: posición de la planta donadora, edad ontogenética (juvenilidad/madurez) de la planta, estado fisiológico de la misma.

La pitahaya se puede propagar de forma sexual (semillas), asexual (estacas) mediante micropropagación, siendo la propagación por estacas la más recomendada por presentar un mejor enraizamiento (López, 1996).

El cultivo *in vitro* (ver figura 2) consiste en tomar una porción de una planta (ej. El cultivo *in vitro* de vegetales se basa en el aislamiento de órganos, tejidos o células vegetales y en el ajuste de las condiciones necesarias para la obtención de respuestas fisiológicas o morfogénicas a partir de estos explantes (Castillo, 2004)

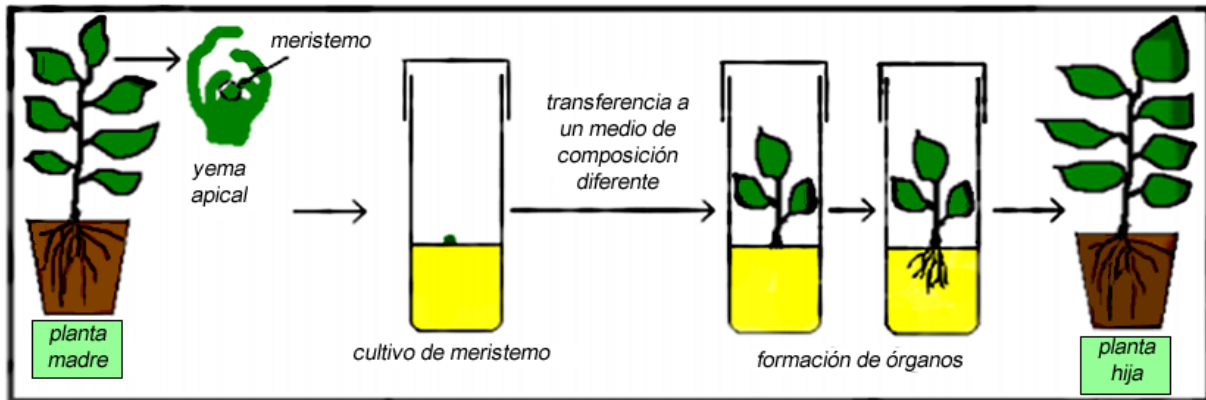


Fig.2 Cultivo de meristemo, a partir de un meristemo aislado, se puede obtener una planta completa.

Fuente: (UNQ, 2006)

5.9 Aplicaciones prácticas del cultivo in vitro

- Propagación vegetativa. Esto es lo más práctico, Dos técnicas:
 - Micropropagación de estaquillas
 - Organogénesis de callos
- Producción de plantas libres de virus mediante dos técnicas:
 - Cultivo de meristemos
 - Micro injerto in vitro

5.10 Métodos para propagar

Según (INTA, 2002) los métodos más comunes para el cultivo en Nicaragua utilizado en la agricultura como medios de propagación son:

- Semillas:** La producción de plantas hortícolas por semilla es una de las más comunes.
- Bulbos:** Se producen por bulbos plantas hortícolas como los ajos y las cebollas.
- Tubérculos:** Se reproducen por tubérculos las patatas o papas, yuca entre otros. Los tubérculos son tallos subterráneos que contienen las reservas de nutrientes de las plantas.

- d. Rizomas: Se reproducen por rizomas la cúrcuma y el jengibre. Los rizomas crecen enterrados paralelos a la superficie del suelo.

5.11 Marco legal

La pitahaya nicaragüense entraría por el medio del certificado fitosanitario otorgado en apego a la regulación 7 CFR 319.56-55 de APHIS² y condicionado a las plagas cuarentenaria. En la actualidad el mercado internacional cada día exige más condiciones de calidad e inocuidad, en lo que recalca la norma técnica para la certificación fitosanitaria de productos agrícolas de exportación frescos y procesados (NTON 11001-01) que al realizar las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en el cultivo de pitahaya se debe producir en condiciones en que el producto final esté libre de riesgos físico, químico y microbiológico, que sean competitivos en el mercado y contribuyan a mejorar los beneficios del productor (powers, 2012).

² Animal and Plant Health Inspection Service (Servicio de Inspección de Sanidad Animal y Vegetal)

VI. Preguntas directrices

1. ¿Cuáles son las mejores concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento en las fases de multiplicación y enraizamiento de pitahaya roja?
2. ¿Cuál es el efecto de las variantes de medio de cultivo en la fase de multiplicación a partir de yemas apical y basal?
3. ¿Cuál es la respuesta de las variantes de medio de cultivo en la fase de enraizamiento a partir de yemas apical y basal?

VII. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1 Tipo de estudio

La investigación por su propósito y carácter es de tipo experimental por que emplea grupos controles para comparar los resultados con el grupo experimental, además de la manipulación rigurosa de las variables (Tamayo, 2006). De acuerdo, al tiempo de ocurrencia de los hechos y registro de la información, el estudio es prospectivo (T, Alvarado, & M, 1996).

7.2 Área de estudio

La investigación se realizó desde el mes de octubre a diciembre, en los laboratorios de cultivo de tejidos, en la Universidad Nacional Agraria (UNA), que está ubicada en el km 12^{1/2} Carretera Norte, geográficamente a 12°08 latitud Norte y 86°10 longitud oeste con una altitud de 56 msnm en el departamento de Managua, dichas instalaciones cuentan con las condiciones necesarias para llevar a cabo la propagación *in vitro* de pitahaya. (Ver mapa de la ubicación en anexo N°1)

7.3 Universo y muestra

Se evaluaron cinco tratamientos con cinco repeticiones en las fases de multiplicación y enraizamiento para la propagación de pitahaya (*Hylocerus*) variedad roja, por lo cual se tomó en cuenta como población a todas las unidades experimentales con una cantidad de 250 plantas por fase (multiplicación y enraizamiento) y un total de 500 plantas para ambas fases, basado en un diseño experimental de bloques completos al azar a nivel de laboratorio.

7.4 Definición y Operacionalización de variables, (MOVI)

7.4. Definición de variable:

Variabes: palabra que define a aquello que este sujeto a algún cambio (Buddies, 2017). Es algo que es cambiante, mutable, por lo tanto, podemos definir.

1) Variables independientes:

Tamayo (1985), define la variable independiente como la causa y condición de las variables dependientes, es decir, son las condiciones manipuladas por el investigador con la finalidad de producir ciertos efectos; en el caso de esta investigación, los factores causales (físicos y cualidades biológicas) serán considerados como nuestra variable independiente.

- Concentración de reguladores de crecimiento AIA y BAP.

2) Variables dependientes:

De igual manera Tamayo (1985), define las variables dependientes como las variables que serán el resultado o consecuencia de la manipulación de la variable independiente la cual es tratada según el criterio del investigador; para sus efectos en esta investigación se tomaran como variables dependientes. Para esta investigación se considerará como variable dependiente el tiempo denotado en días. – m'h

1. Número de brotes
2. Longitud de la vaina
3. Número de plantas con raíces
4. Numero de raíces por plantas
5. Longitud de raíces

7.4.2 Operacionalización de las Variables

Tabla N°3: Matriz de Operacionalización de las Variables (MOVI)

Objetivos Específicos	Variable Conceptual	Sub variables, o Dimensiones	Variable Operativa	Técnicas de Recolección de Datos e Información
<p>Objetivo Específico 1. Definir las mejores concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento en las fases de multiplicación y enraizamiento de pitahaya roja.</p>	Efecto de las concentraciones utilizadas para las fases de multiplicación y enraizamiento.	Días transcurridos para que las plantas se desarrollen.	<p>Duración de los explantes sometidos por cada tratamiento en las dos fases.</p> <p>Tiempo que demora la planta para presentar los primeros brotes.</p>	<p>Reglas (cm)</p> <p>Tablas de secuencia por tratamiento.</p> <p>Fascos contenedores de explantes.</p>
<p>Objetivo Específico 2. Evaluar el efecto de las variantes de medio de cultivo en la fase de multiplicación a partir de yemas apical y basal.</p>	Efecto de las variantes de medio de cultivo en la fase de multiplicación.	<p>Contabilizar el número de brotes por planta.</p> <p>Longitud de la vaina central medida en centímetros.</p>	<p>Número de brotes presentes por cada planta en cada tratamiento.</p> <p>Crecimiento de la vaina central medida en centímetros.</p>	<p>Reglas(cm)</p> <p>Tablas de secuencia por tratamiento.</p> <p>Fascos contenedores de explantes.</p>
<p>Objetivo Específico 3. Identificar la respuesta de las variantes de medio de cultivo en la fase de enraizamiento a partir de yemas apical y basal.</p>	Efecto de las variantes de medio Murashige and Skoog, en cada repetición por tratamiento.	<p>Contabilizar el número de plantas con raíces.</p> <p>Número de raíces por plantas.</p> <p>Longitud de raíces medida en centímetros.</p>	Identificar el tamaño de las raíces de acuerdo a las concentraciones utilizadas por cada tratamiento.	<p>Reglas(cm)</p> <p>Tablas de secuencia por tratamiento.</p> <p>Fascos contenedores de explantes.</p>

7.5 Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos

7.5.1 Materiales y métodos.

Los materiales, Equipos y Reactivos que se utilizaron para la ejecución de esta investigación se presentan en la Tabla 4.

Equipos	Materiales	Reactivos
Autoclave	Beaker (500 y 1000ml)	Ácido clorhídrico (HCl)
Balanza analítica	Papel aluminio.	Alcohol (70%)
Cámara de flujo laminar	Cinta adhesiva transparente.	Hipoclorito de sodio (NaClO ₃)
pHmetro	Marcadores	Ácido indol- 3 –acético (AIA)
Agitador electromagnético	Pipetas (5 y 10 ml)	Bencil aminopurina (BAP)
	Pinzas	Macros y micronutrientes del medio básico de cultivo Murashige y Skoog 81962)
	Escalpelos	Agar
	Chuchillas	
	Placas Petri	
	Frascos de vidrio	

Tabla 4. Equipos, Materiales y reactivos. Fuente: Martínez & Martínez, (2019)

7.5.2 Esterilización de cristalería e instrumentos:

Previo a la realización de los experimentos, se realizó el lavado y esterilización de la cristalería y de los instrumentos necesarios para la manipulación de los tejidos. Los frascos de vidrio se introdujeron en cloro al 2% durante dos horas, posteriormente se lavaron con agua y detergente, este procedimiento se realizó para garantizar la eliminación de microorganismos contaminantes en la cristalería, los instrumentos fueron esterilizados en hornos a temperatura de 170°C durante una hora. El área de trabajo de la cámara de flujo laminar se desinfecto con alcohol al 90% y luego se expuso a luz ultravioleta durante 30 minutos, antes de proceder a la siembra.

7.5.3 Medio de cultivo

Se ha demostrado en muchos cultivos la importancia que juegan los reguladores del crecimiento en la iniciación y la regulación del desarrollo organizado. Skoog y Miller (1957) descubrieron que el desarrollo organizado ocurre como resultado de la interacción cuantitativa entre los reguladores de crecimiento, como auxinas y citoquininas y entre éstos y otros factores. Se sabe que, en la diferenciación, el

balance y la concentración de estas sustancias deben estar relacionadas con el tejido (T.A, 1980). En la Tabla 5. Se detallan los reactivos para la elaboración de medios de cultivo en las fases de multiplicación y enraizamiento.

7.5.4 Preparación de medios de cultivo

Para la elaboración de los medios de cultivo se emplearon los siguientes reactivos que se detallan en la Tabla 5.

Reactivos	Cantidad
Macro-nutrientes	20 ml
Micro-nutrientes	1 ml
KI	3 ml
Calcio	2.9 ml
EDTA	5 ml
Tiamina	10 ml
Inositol	0.1 g
Azúcar	30 g
Agar	2.5 g

Tabla 5. Reactivos y cantidad para medio de cultivo. Fuente: Martínez & Martínez, (2019)

Se utilizó un medio de cultivo que contuviera las sales minerales de Murashige y Skoog 1962, se le agrego tiamina, EDTA, calcio, azúcar, Inositol, y reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones las cuales se detallan en las tablas 6 y 7, se ajustó pH a 5.8, luego se agregó 2.5 g/L, una vez finalizada la mezcla se procedió a agregar 20 ml por cada frasco previamente esterilizado , seguidamente se colocaron dentro de autoclave para ser esterilizado a una temperatura de 121° C durante 20 minutos aproximadamente. (Ver anexo 8)

7.2.1 Preparación de reguladores de crecimiento.

Procedimiento para preparar disoluciones madres

Las disoluciones madres Murashige y Skoog 1962 (MS) contienen macronutrientes, micronutrientes y aditivos orgánicos básicos.

Soluciones Madres	Constituyentes	Cantidad en Medio M&S (g/L)	Diluido (ml)	Configuración Final (mg)	Cantidad a usar por litro (ml) para M&S
1	NH ₄ NO ₃	24.75	300 ml	1650	20 ml
	KNO ₃	28.5		1900	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5.55		370	
	KH ₂ PO ₄	2.55		170	
2	H ₃ BO ₃	0.62	100 ml	6.2	1 ml
	MnSO ₄ ·H ₂ O	21.76		22.3	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.86		8.6	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025		0.25	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025		0.025	
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0025		0.025	
3	KI	0.075	100 ml	0.83	3 ml
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	13.2	100 ml	440	2.9 ml
5	Na ₂ EDTA	1.492	200 ml	37.3	5 ml
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.114		37.3	
6	Tiamina HCl	0.02	200 ml	-	10 ml
7	Myoinositol	100 mg			

Todas las soluciones madres deben sacarse del refrigerador y ponerlas a temperatura ambiente.

*Diluir los constituyentes de la solución madre # 1 en 300 ml de agua.

Las soluciones # 2, # 3 y # 4 en 100 ml de agua

La # 5 y # 6 se cada una se diluyen en 200 ml de agua.

* La solución madre # 5 se prepara así: Se diluye por separado tanto el hierro como el EDTA en beakers. El EDTA se calentará en baño maría y hasta que se haya diluido se mezclará con la solución de hierro y se enraza a 200 ml. El FeSO₄ sobre el EDTA nunca a la inversa.

* El myoinositol (# 7) una vez pesado se agrega directamente al medio de cultivo.

Preparación de otras sustancias de uso en el cultivo de tejidos de plantas

Para prepara algunas disoluciones se utilizan disoluciones más concentradas, por lo que se aplica la siguiente relación.

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

Donde

V_1 = es el volumen requerido de disolución concentrada.

V_2 = es el volumen requerido de disolución a preparar.

C_1 = es la concentración de la disolución concentrada

C_2 = es la concentración de la disolución a preparar.

Prepara 2500 ml de medio de cultivo con una concentración de 2.5 mg/l de BAP.

- Nota: El BAP se prepara a una concentración de 500 mg/l.
- El AIA se prepara a una concentración de 200 mg/l

Solución

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times C_2}{C_1} \quad V_1 = \frac{2500 \text{ ml} \times 2.5 \text{ mg/l}}{500 \text{ mg/l}}$$

C_1

500 mg/l

$V_1 = 12.5 \text{ ml}$

a. Fase de establecimiento

Selección de explantes: Se seleccionaron cladodios de diferente edad fisiológica, en base a su ubicación apical y basal en la planta. Se extrajeron areolas situadas en ambos extremos y en la parte central del cladodio, para comprobar si existía respuesta diferenciada a la brotación de yemas axilares tanto por la procedencia del explante como por las variantes de medio de cultivo.

Desinfección de los explantes: A los cladodios se les eliminó las espinas para facilitar la manipulación de los tejidos durante la desinfección de los mismos; posteriormente se procedió a eliminar el polvo con agua y detergente. Una vez efectuada la limpieza de los cladodios, se realizó la extracción de las areolas provistas de una pequeña porción de tejido. El tamaño de cada tejido fue de aproximadamente 2 cm de largo y 1 cm. de ancho. Luego se realizó un segundo lavado con agua y detergente durante 30 minutos.

Seguidamente se practicó la primera desinfección con hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos, después de los cuales se efectuó tres enjuagues continuos con agua destilada estéril. En la cámara de flujo de laminar se realizó la segunda desinfección con hipoclorito de sodio al 2% por 5 minutos y se eliminaron los residuos con el mismo procedimiento de la primera desinfección. La reducción del tamaño de los tejidos se realizó con la ayuda de escalpelos y pinzas, fijándose el tamaño de los mismos en aproximadamente 1 cm. de largo y 0.5 cm de ancho.

Los explantes se sembraron en frascos de vidrio, finalizada la siembra, se trasladaron a la cámara de crecimiento bajo condiciones ambientales controladas de temperatura de 28°C, intensidad de luz de 2000 lux y 16 horas luz y 8 de oscuridad.

b. Fase de multiplicación.

El objetivo de la fase de multiplicación es la producción y aumento del coeficiente de multiplicación de los cladodios. Para ello se induce a la proliferación de brotes axilares que son separados en condiciones estériles y cultivados nuevamente en medios frescos, a continuación, en la Tabla 6 se detallan las concentraciones de citocininas y auxinas utilizadas para el medio de cultivo en la fase de multiplicación.

Tratamiento	Hormonas			Total, y ²
	6BAP	AIA	Cantidad de frascos	
T1	0 ml	0 ml	5	100 ml
T2	0.1 ml	0.0 ml	5	100 ml
T3	0.2 ml	0.25 ml	5	100 ml
T4	0.3 ml	0.25 ml	5	100 ml
T5	0.4 ml	0.25 ml	5	100 ml

Tabla 6: Concentraciones de auxinas y citocininas para la fase de multiplicación. Fuente: Martínez & Martínez, (2019)

✓ Efecto de medios de cultivo y tipo de explantes

Se estudió la respuesta a la multiplicación *in vitro* de dos segmentos del cladodio o vaina formados en la fase de establecimiento. Se seleccionaron vainas con tamaño aproximado de 2.5 a 3 cm, con el bisturí cada vaina se dividió en dos segmentos (apical y basal) dándoles 1 cm de largo, seguidamente fueron colocadas en los diferentes tratamientos, se sembraron 5 explantes por cada frasco de 220 ml. Posteriormente fueron trasladados al cuarto de crecimiento en condiciones ambientales controladas con período de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y temperatura de 27 a 28°C.

c. Fase de enraizamiento.

El propósito de la fase de enraizamiento es obtener plantas que desarrollen un sistema radicular que le permita una alta adaptabilidad en condiciones ambientales. Cabe recalcar que el experimento se estableció con explantes producidos en la fase de establecimiento.

✓ **Medios de cultivo.**

A partir de plantas formadas en la fase descrita anteriormente, se procedió a la inducción de raíces mediante la adición a los medios de cultivos. A continuación, se presentan en la Tabla 7 los tratamientos correspondientes.

Tratamiento	Hormona AIA	Cantidad de frascos	Total, y ²
T1	0 ml	5	100 ml
T2	0.125 ml	5	100 ml
T3	0.25 ml	5	100 ml
T4	0.375 ml	5	100 ml
T5	0.5 ml	5	100 ml

Tabla 7: Concentraciones para la fase de enraizamiento Fuente: Martínez & Martínez, (2019)

Para la realización de esta fase se realizaron los mismos procedimientos a la fase de multiplicación.

7.6 Procedimientos para la recolección de Datos e información

Fase de multiplicación	Fase de enraizamiento
Datos morfológicos	
Longitud de la vaina central	Longitud de la vaina central
Número de brotes	Número de brotes
	Número de raíces por planta

Fuente: Martínez & Martínez, (2019)

En el estudio de multiplicación se hizo uso de un diseño estadístico bifactorial de Bloques Completos al Azar (BCA) con cinco repeticiones, cada una de ellas conformada por cinco frascos conteniendo 5 explantes, de las cinco repeticiones por cada tratamiento se tomaron 3 frascos al azar dando un total de 15 explantes por tratamiento. Los ensayos se organizaron en dos bloques (BCA) de estructura factorial, con cinco unidades experimentales por cada bloque, cada unidad constituida por un frasco de vidrio de 220 ml. que contenían cinco brotes.

7.7 Plan de tabulación y análisis

✓ **Multiplicación:**

Para el procesamiento estadístico se realizó inicialmente un análisis de varianza y para comprobar si existen diferencias entre los tratamientos se efectuó la prueba de rangos múltiples de Kruskal-Wallis. Las evaluaciones se realizaron a los 15 días en las que se determinó el número de brotes formados y la longitud de la vaina central. Por cada tratamiento y por cada corte apical y basal.

✓ **Enraizamiento:**

En cuanto al diseño y análisis estadístico en la última fase se hizo uso del mismo empleado en la fase de multiplicación. Se evaluaron las siguientes variables:

- a. Número de raíces por planta
- b. Longitud de raíces
- c. Longitud de vaina.

VIII. ANÁLISIS Y RESULTADOS

Dado al corto tiempo para llevar a cabo esta investigación, analistas del laboratorio de cultivo de tejido de la Universidad Nacional Agraria, facilitaron material ya establecido en medios de cultivo, por tal razón a continuación se presentan análisis y resultados únicamente de las fases de multiplicación y enraizamiento.

8.1 Fase de multiplicación

8.1.1 Segmento apical del cladodio

Con la porción apical tomada del cladodio, respondió mejor en longitud del brote principal cuando se adicionaron 2 mg/l de BAP con una media de 3.80 cm, resultando estadísticamente superior al tratamiento testigo y a los tratamientos que contenían 0.50 y 1.00 mg/l de BAP. En número de brotes producidos por segmento apical el tratamiento que contenía 2 mg/l de BAP con media de 9.67 brotes, resultó significativamente superior solamente a los tratamientos testigo y al que se le adicionó la concentración de 0.50 mg/l de BAP con medias respectivas de 0.87 y 0.90 cm. Los resultados se presentan en la Tabla 8.

8.1.2 Segmento basal del cladodio

La longitud del brote principal del segmento apical el tratamiento que contenía 2 mg/l de BAP con media de 1.60 brotes, resultó y superó significativamente únicamente a los tratamientos testigo y al que se le adicionó la concentración de 0.50 mg/l de BAP con medias respectivas de 0.93 y 4.93 brotes.

Con concentraciones de 1, 1.50 y 2.00 mg/l de BAP las medias obtenidas presentaron similar comportamiento estadístico. Los resultados se presentan en la Tabla 8. En anexo 2 se observa el efecto de los tratamientos en los segmentos de cladodios.

Tratamientos	Apical		Basal	
	Longitud (cm)	Número de brotes	Longitud (cm)	Número de brotes
T ₁	1.70 b	0.93 c	0.87 c	1.53 c
T ₂	1.97 b	4.93 bc	0.90 c	4.73 bc
T ₃	2.10 b	7.87 ab	1.17 ab	6.73 ab
T ₄	2.93 ab	8.13 ab	1.20 ab	8.13 a
T ₅	3.80 a	9.67 a	1.60 a	8.27 a

Tabla 8: Efecto de los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 en la longitud del brote principal y número de brotes en segmentos apicales y basales de cladodios. *Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis; Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Fuente: Martínez & Martínez, (2019)

Concentraciones de 1.50 y 2.00 mg/l de BAP con medias respectivas de 8.13 y 8.27 brotes axilares, superaron significativamente a las medias de segmento basal del cladodio que se obtuvieron en el tratamiento testigo y al que contenía 0.50 mg/l de BAP.

La respuesta de los segmentos de cladodio tomados de la parte apical como basal, presentaron similar comportamiento estadístico en las variables evaluadas, longitud del brote principal y el brote basal. Los mejores tratamientos se presentaron en los que se les agregaron mayores concentraciones de BAP, principalmente entre 1.50 y 2.00 mg/l. Esta respuesta tiene su explicación en la eliminación de la dominancia apical que se produce a mayores de BAP, mientras que en el tratamiento testigo los resultados fueron inferiores porque los tejidos ejercen la dominancia apical producto del balance endógeno de auxinas y citocininas.

La dominancia apical es uno de los fenómenos de correlación, en el que la yema apical ejerce la dominancia sobre el crecimiento de las yemas axilares subyacentes. Thimann y Skoog (2005). Taiz y Zeiger (2006), señalan que la dominancia apical se debe fundamentalmente a la acción de dos hormonas: auxinas y citocininas, responsables ambas de la división. Comportamiento similar reporta Obando (2009) con resultado mejor el número de brotes emitidos por segmentos apicales de la vaina que permanecieron en las variantes medios de cultivo que contenían 1 mg/l de BAP con 30 ó 40 g/l de sacarosa y en el medio con 2 mg/l de BAP y 50g/l de

sacarosa. Igual comportamiento estadístico se observó en la brotación de segmentos centrales en el medio con 1 mg/l de BAP y 30g/l de sacarosa. En el promedio de raíces no hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos.

8.2 Fase de enraizamiento

8.2.1 Segmento apical del cladodio

Con adiciones de 0.75 y 1.00 mg/l de AIA se obtuvieron los mejores resultados en las variables número de brotes, número de raíces y longitud de raíces. En el caso del número de brotes, fue evidente el efecto inhibitor del AIA comparado al efecto inductor de la brotación que tiene el BAP. Con el empleo de segmentos apicales cuando se agregaron a los medios de cultivo concentraciones de AIA entre 0.50, 0.75 y 1.00 mg/l se presentaron medias con similar respuesta estadística.

8.2.2 Segmento basal del cladodio

En número de brotes y número de raíces no se presentaron diferencias entre los tratamientos que se les adicionaron 0.50, 0.75 y 1.00 mg/l de AIA. En número de raíces y longitud de raíces el tratamiento testigo presentó medias con igual respuesta estadística que los tratamientos que contenían 0.25 y 0.50 mg/l de AIA. En la Tabla 9 se presentan los resultados. En anexo 5 se observa el efecto de los tratamientos en los segmentos de cladodios.

Tratamientos	Segmento Apical			Segmentos Basal		
	Número de brotes	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)	Número de brotes	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)
T ₁	0.60 c	3.93 c	2.00 b	0.80 c	1.73 b	1.20 c
T ₂	0.80 bc	5.00 bc	2.10 b	1.40 bc	2.20 b	1.43 bc
T ₃	1.27 ab	6.13 ab	2.53 ab	2.13 ab	4.07 ab	1.50 bc
T ₄	1.40 a	8.13 a	2.60 a	2.27 ab	5.40 a	2.07 ab
T ₅	1.67 a	7.15 a	2.87 a	3.40 a	7.73 a	2.30 a

Tabla 9. Efecto de los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 en la longitud del brote principal y número de brotes en segmentos apicales y basales de cladodios. *Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis; Student-Newman-Keuls, p< 0,05). Fuente: Martínez & Martínez, (2019)

De los resultados obtenidos en el experimento de enraizamiento se demostró la efectividad de la auxina AIA en la inducción de raíces en pitahaya, especialmente cuando se agrega al medio de cultivo concentraciones entre 0.75 y 1.00 mg/l. Las auxinas son hormonas; compuestos orgánicos producidos por cualquier tejido en activo crecimiento de las plantas y que en muy bajas concentraciones regulan procesos vegetales e inducen efectos fisiológicos definidos Hartmann & Kester (1987).

El enraizamiento depende además de la presencia de un cierto número de cofactores que en combinación con las auxinas permiten el enraizamiento. Estos cofactores pueden ser compuestos fenólicos y materiales nitrogenados y azúcares producidos en las hojas y de aquí la importancia de éstas en el enraizamiento (Weaver, 1976).

El uso de reguladores de crecimiento es una de las prácticas más comunes para inducir la formación de raíces adventicias, y los más usados son las auxinas, tal como los ácidos indol-3-acético (AIA), naftalenacético (ANA) e indolbutírico (AIB). Hartmann *et al.*, 2002)

La aplicación de reguladores de crecimiento del tipo auxinas es una práctica viable y decisiva para la formación de raíces, debido a que promueve la iniciación de raíces, permite adelantar la iniciación radical, incrementar el número y la calidad de raíces, aumenta la uniformidad y reduce el tiempo para el proceso de enraizamiento (Vargas *et al*, 1999)

IX. CONCLUSIÓN

- a.** Los resultados determinaron que, en fase de multiplicación y enraizamiento las mejores concentraciones fueron T4 y T5 para ambas fases, tomando en cuenta que estas contenían auxinas y citocininas en concentraciones de AIA (1.00ml/L) BAP (2.00ml/L) resaltando que, en fase de enraizamiento, para la variable número de raíces el mejor tratamiento fue T4.

- b.** Las concentraciones del tratamiento T5 AIA (1.00ml/L), BAP (2.00ml/L), influyeron significativamente en la fase de multiplicación, obteniendo los mejores resultados con las siguientes variables: Porción apical del cladodio, Longitud de la vaina central (3.80cm), número de brotes (9.67); Porción basal del cladodio, Longitud de vaina (1.60), numero de brotes (8.27), en comparación a los demás tratamientos T1, T2, T3 y T4.

- c.** Los resultados determinaron que existe relación en los tratamientos T4 y T5 en la fase de enraizamiento, dando como resultado las siguientes variantes por porción apical, Número de brotes (1.67), longitud de raíces (2.87), en cambio para número de raíces el mejor tratamiento fue T4, obteniendo 8.13 de número de raíces. Para la porción basal el mejor tratamiento fue T5 en las tres variantes (3.40, 2.30 y 7.63).

X. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda la técnica biotecnológica para la propagación masiva de plántulas de interés agrícola en Nicaragua.
2. El material vegetal debe de estar en óptimas condiciones para evitar afectaciones morfológicas para el crecimiento y desarrollo.
3. En la fase de multiplicación utilizar un medio de cultivo que contenga 2 mg/l de BAP con 30 g/l de sacarosa/azúcar y utilizar frascos de 100ml con 5 o 6 tejidos por frascos.
4. Para una próxima etapa de esta investigación se recomienda futuros estudios donde se observe el desarrollo de la planta en fase de aclimatización.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Berrios, C. M., & Acevedo, D. A. (Noviembre de 2014). *Comparar los Métodos Químicos de Cloro y Salmuera para la Conservación de la Pitahaya Roja, cultivada en el Municipio de la Concepción Departamento de Masaya en el Segundo Semestre del año 2013*. managua: s.ed.
- Buddies. (2017). *variable in your science fair project*. Obtenido de what are variables: <http://sciencebuddies.org>
- Castillo. (2004). *Propagación de plantas por cultivo in vitro; una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*, INIA. Uruguay.
- Castillo, A. (1992). *Respuesta de dos clones de Pyrus calleryana a distintos medios de cultivo*. septiembre.
- Castillo, A. (2004). *propagación de plantas por cultivo in vitro; una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*, INIA. Uruguay.
- Castillo, A. (2004). *propagación de plantas por cultivo in vitro; una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*, UNIA, Uruguay. Uruguay.
- CORPOICA. (2013). *Tecnología para el manejo de pitahaya amarilla. Selenicereus megalantus*. Colombia .
- Garcia. (2013). *Cultivo de pitahaya*.74p.
- Gonzáles. (2014). *Comparar metodos quimicos de cloro y samuera para la conservacion de la pitahaya roja, cultivada en el municipio de la concepcion*. Masaya, Nicaragua: El nuevo diario.
- Hoxtermann, E. (1997). *Celular"Elemntary Organisms" In vitro. The Early Vision of Gottlieb Habertlandt and its Realization*.
- INTA. (2012). *Programa para e4l mejoramiento economico productivo y social*. Nicaragua.
- INTA, I. (2002). *cultivo de pitahaya, guia tecnologica*. Managua.

- Legiscomex.com. (15 de mayo de 2013). *Legiscomex.com*. Obtenido de Legiscomex.com: <https://www.legiscomex.com>
- López, H. (1996). *Guía tecnológica. cultivo de pitahaya*, Managua, septiembre 1996. 23.
- MAGFOR. (2013). *Guía tecnológica*. Nicaragua.
- MAGFOR, O. (1999). *Curso sobre fitosanidad de la pitahaya 114p*.
- Martínez, O., & Martínez, M. (2019). *Fortalecimiento del cultivo de pitahaya (Hylocerus undatus. Britton et Rose) mediante la aplicación de técnica biotecnológica para la propagación in vitro de la variedad roja*. Managua.
- MEDINA, J. (2012). *Descripción botánica Generalidades de los géneros Selenicereus e Hylocereus. Trabajo de grado Universidad del valle. 97p*.
- Monterrey M., J. (2014). *Historia del cultivo de la pitahaya (HYLOCREREUS UNDATUS) EN LA MECETA DE LOS PUEBLOS, NICARAGUA. I PARTE*. Masaya : proyecto de CATIE/MAG-MIP, Nicaragua.
- Montiel, B. (04 de Junio de 2016). *Biotecnología Vegetal*. Obtenido de Instituto de Biotecnología de las Plantas.: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/516/html>
- Nunez, c. (2014). Estandarización de un protocolo de regeneración de pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* (K.Schum. ex Vaupel) Moran). *Acta agronomica*, 1-15.
- Nunez, D. G. (2014). *standarización de un protocolo de regeneración en pitahaya amarilla (Selenicereus megalanthus (K. Schum. ex Vaupel) Moran)*. colombia: ISSN impreso 0120-2812.
- Penelo, L. (20 de 07 de 2018). pitahaya: propiedades, beneficios y valor nutricional. *LA VANGUARDIA*.

- powers, P. (2012). *plan de trabajo para la exportación de pitahaya a Estados Unidos, Nicaragua.*
- Rivas, C. G. (2016). *Cultivo in vitro de Celulas y Tejido Vegetal. Serie Nutricion Vegetal. Num.59.* . Mexico: Articulos Tecnicos de INTAGRI. 5p.
- SUAREZ, R. (2011). *Evaluacion de metodos de propagacion en pitahaya amarilla Selenicereus megalanthus (Haw).* Colombia.
- T, C., Alvarado, & M, P. (1996). Micropropagación de opuntial y agaves, en el cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. Calí, Colombia: Roca.
- T.A, T. (1980). *Organogenesis in vitro: structural, physiological and biochemical aspects. international review of cytology supplement 11A. Academy press.,* Nueva York.
- Tamayo. (2006). Proceso de investigación científica, Mexico. Limusa.
- UNQ, B. (2006). *programas reguladores-Departamento de Ciencias Sociales.* Obtenido de programas reguladores-Departamento de Ciencias Sociales: <http://sociales.unq.edu.ar>
- Obando L. (2009) Estudio de medios de cultivos, explantes, frascos y sustratos en cladodio de pitahaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose) cv. chocoya de Nicaragua en fase de micropropagación. Tesis, Universidad Nacional Agraria, UNA. P. 25
- Thimann K, Skoog F. 1933. Studies on the growth hormones of plants III. The inhibition of growth substance on bud development. Proceedings of the National Academy of Science of the USA 19:714–716.
- Taiz L., Zeiger E. (2006) Plant Physiology, 4th Ed., Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts.
- Hartmann, H.& Kester, D. 1987. Propagación de plantas: principios y prácticas. Editorial Continental, México. Pp. 760.

Hartmann, H., J. Kester, F. Davies y R. Geneve. 2002. Plant propagation principles and practices. 7th Edition. Prentice Hall. 710 p.

Vargas, G.; Arellano Ostoia, G.; Soto Hernández, R. 1999. Enraizamiento de estaquillas de Icaco (*Chrysobalanus icaco* L.) sometidas a aplicaciones de auxinas. *Bioagro*, 11: 103 – 108.

Weaver, R. 1976. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Editorial Trillas, México. Pp. 622.

INTA, (2012), programa para el mejoramiento económico, productivo y social.

FUNICA, (2010). Historia del cultivo de la pitahaya en la meseta de los pueblos, Nicaragua. I parte. Managua.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Ubicación de Universidad Nacional Agraria (UNA)



Fuente: Obando, (2009)

Anexo 2. Procedimiento para elaboración del medio de cultivo



Ilustración 1 a) Cristalería por tratamiento b) Adhesión de Macro y Micro nutrientes. c) Auxina y citocininas. d. Se añadió BAP e) adhesión de AIA al medio. f) Agar g) Distribución del medio a los frascos por cada tratamiento. h) Tratamientos listos para esterilizarlos en frascos.

Fuente: Martínez & Martínez, (2019)

Anexo N°3. Brotes axilares

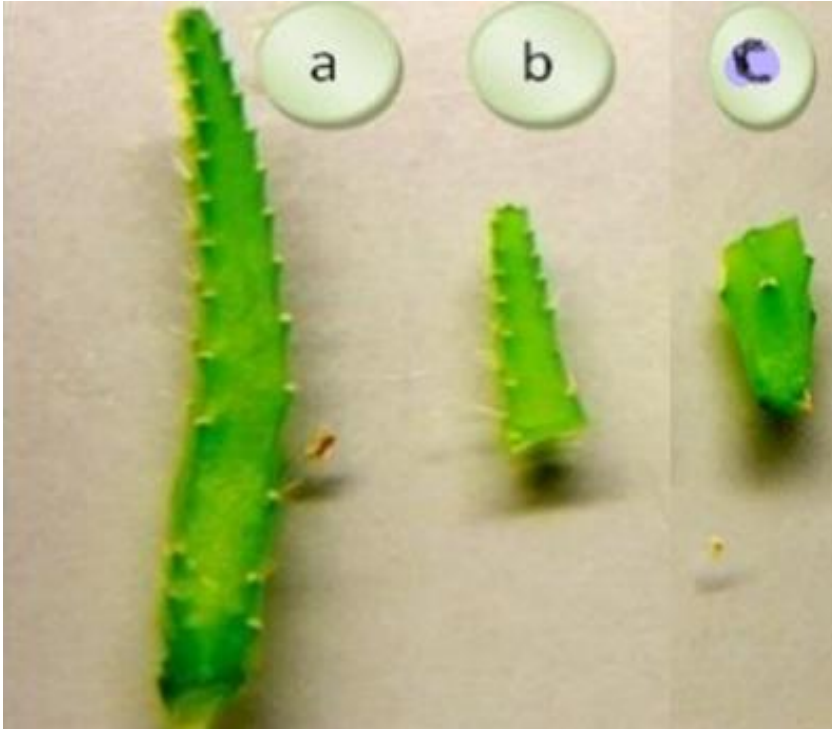
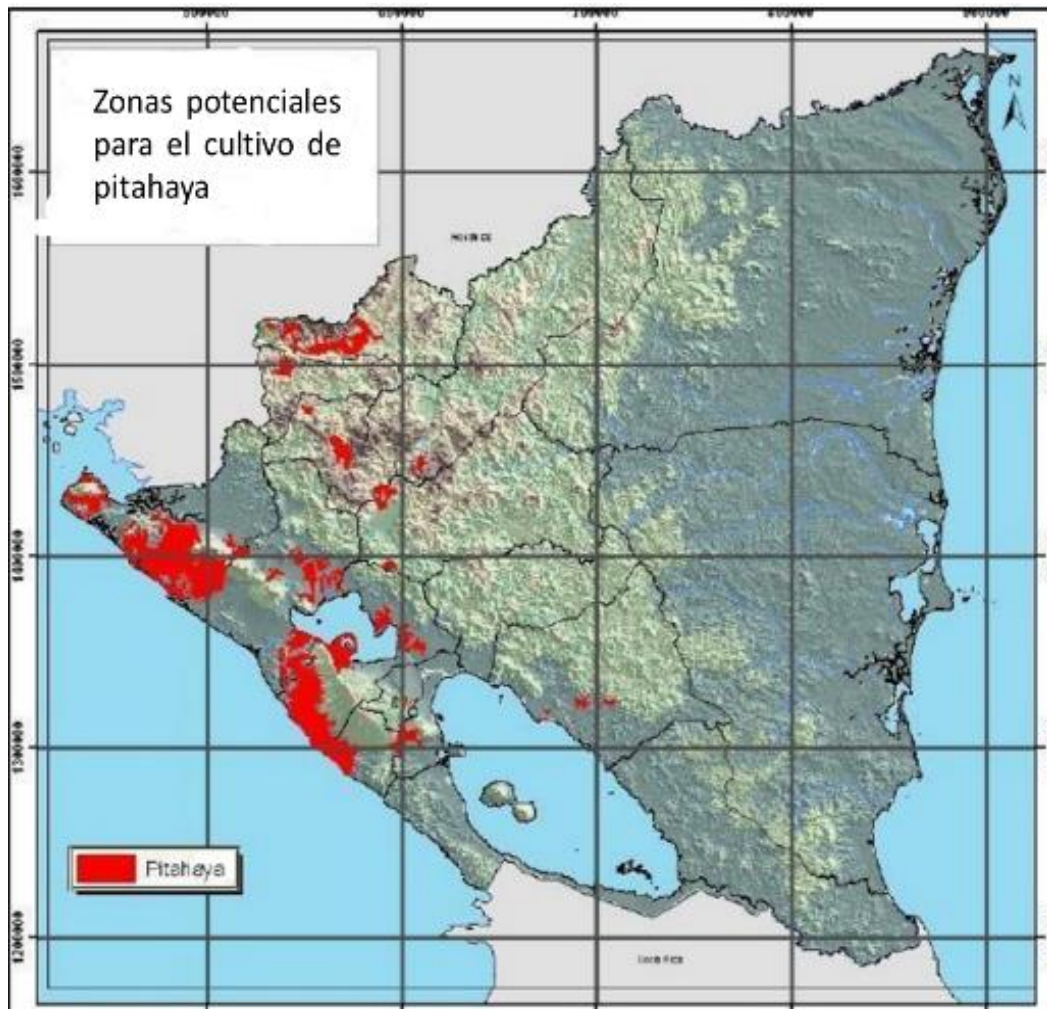


Ilustración 2 Segmento Basal de la vaina y segmento apical

Fuente: Obando, (2009)

Anexo 3. Zonas potenciales para el Cultivo de Pitahaya



Fuente: Berrios & Acevedo, (2014)

Anexo 4. Fruto de pitahaya



Ilustración 3 Aspecto externo e interno del fruto

Fuente: Mendoza, (2003)

Anexo 5: Resultados de tratamientos

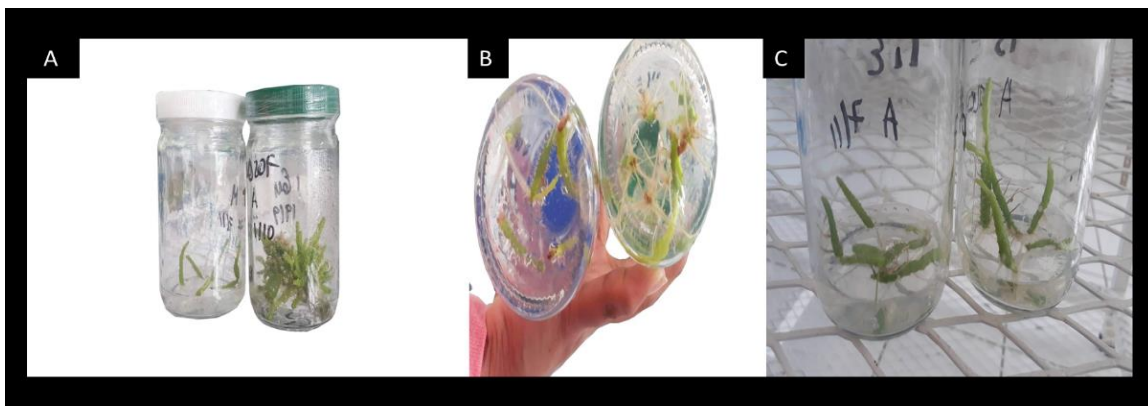


Ilustración 4. Resultados comparados por tratamiento A) Numero de brotes B) Numero de raíces C) Elongación

Fuente: Martínez & Martínez, (2019)

Anexo 6. Cámara de flujo laminar



Ilustración 5 Siembra de explantes en cámara de flujo laminar

Fuente: Martínez & Martínez, (2019)

Anexo 8. Autoclave



Ilustración 6 Autoclave para esterilizar medio de cultivo

Fuente: Samora, (2016)