

CULTIVO *in vitro* DE PITAYO (*Stenocereus stellatus* [Pfeiffer] Riccobono)

Ylvi María Martínez Villegas¹; María Andrade Rodríguez¹; Ángel Villegas Monter²;

Irán Alia Tejacal¹; Oscar Gabriel Villegas Torres¹; Víctor López Martínez

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad Núm. 1001. C. P. 62209. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. MÉXICO.

²Programa de Fruticultura, Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. km 36.5 Carretera México-Texcoco. C. P. 56230, Montecillo, Estado de México. Correo-e: andradem65@hotmail.com (¹Autor para correspondencia)

RESUMEN

El pitayo (*Stenocereus stellatus*) es una cactácea nativa de México, apreciada por sus frutos, los cuales tienen características organolépticas únicas. Su propagación es por esquejes tomados de plantas adultas, generalmente silvestres, causando deforestación de zonas naturales. El objetivo fue definir el tipo y la dosis de citocininas así como la concentración de sacarosa que permita obtener mayor número de plantas de pitayo *in vitro*. Se usaron semillas de frutos maduros de las cuales se obtuvieron plántulas para iniciar el incremento de plantas. Para la multiplicación de brotes se utilizaron plántulas de 2 a 3 cm de altura divididas en secciones de 1 cm, el medio fue MS con 3 % de sacarosa; se evaluaron tres citocininas (kinetina, 6-benciladenina, y 2-isopentiladenina) en cinco concentraciones (2.2, 4.4, 8.8, 17.6 y 35.2 µM). Para el crecimiento de brotes se usó medio MS con sacarosa (1, 2, 3, 4 y 5 %). En la aclimatación se evaluó el efecto de la concentración de sacarosa usada para el crecimiento de los brotes *in vitro*. Se observó que la concentración de 17.6 µM de 6-benciladenina ocasionó formación de brotes en todos los explantes, los cuales tuvieron ocho brotes por explante. Los brotes desarrollaron la mayor altura cuando fueron cultivados en 3 y 4 % de sacarosa. En aclimatación sobrevivieron más del 92 % de las plantas trasplantadas a sustrato.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: Cactaceae, citocininas, cultivo de tejidos, multiplicación de plantas, pitayo.

In vitro CULTURE OF PITAYO (*Stenocereus stellatus* [Pfeiffer] Riccobono)

ABSTRACT

The pitayo (*Stenocereus stellatus*) is a cactus native to Mexico that is prized for its fruits, which have unique organoleptic characteristics. It is propagated by cuttings taken from mature, usually wild plants, causing deforestation of natural areas. The objective of this study was to identify the optimum cytokinin type and dose, plus sucrose concentration, to obtain a greater number of pitayo plants *in vitro*. Seeds from ripe fruits were used to obtain seedlings to initiate plant growth. For shoot multiplication, seedlings measuring 2 to 3 cm in height and divided into 1-cm sections were used. MS medium with 3 % sucrose was used. Three cytokinins (kinetin, 6-benzyladenine, and 2-isopentenyladenine) at five concentrations (2.2, 4.4, 8.8, 17.6 and 35.2 µM) were evaluated. For shoot growth, MS medium with sucrose (1, 2, 3, 4 and 5 %) was used. In plant acclimatization, the effect of the sucrose concentration used for *in vitro* shoot growth was assessed. It was found that the concentration of 17.6 µM 6-benzyladenine caused shoot formation in all explants, with eight shoots per explant. The shoots achieved the greatest height when grown in 3 and 4 % sucrose. Over 92 % of the plants transplanted to substrate survived acclimatization.

ADDITIONAL KEY WORDS: Cactaceae, cytokinins, tissue culture, plant multiplication, pitayo.

INTRODUCCIÓN

El pitayo (*Stenocereus stellatus*) es una especie nativa de México (Bravo-Hollis, 1978); muestra amplia variación morfológica y tiene usos múltiples, principalmente para consumo de fruto, además del aprovechamiento de los tallos para cercas vivas, control de erosión y como combustible (Luna y Aguirre, 2001; Luna *et al.*, 2001). Los frutos generalmente son consumidos como fruta de mesa o para elaborar agua fresca, helado, gelatina, mermelada y licores (Martínez-Cárdenas *et al.*, 2007). La presencia de fenoles en el fruto y su alta actividad antioxidante hacen de este fruto una fuente importante de productos antioxidantes para el humano (Beltrán-Orozco *et al.*, 2009). Esquivel (2004) indica que la cáscara de la pitaya puede ser fuente de colorantes naturales.

La propagación del pitayo se realiza por métodos asexuales, mediante esquejes tomados de plantas adultas, las cuales deben tener las características deseadas por el productor y estar libres de plagas y enfermedades; por lo general, los esquejes son tomados de plantas madres silvestres, causando deforestación de zonas naturales (Mercado y Granados, 2002). Las diversas especies de pitayo se encuentran en forma silvestre desde el norte hasta el sur de México. En la región de la Mixteca Baja, en los estados de Puebla y Oaxaca, se encuentran tres especies de pitayo; la principal es *S. griseus* ("pitayo de mayo"), seguida por *S. stellatus* ("pitaya agria") y *S. pruinosus* ("cuapetla") (Bravo-Hollis, 1978). En forma cultivada se le localiza en dos grandes regiones; la principal se ubica en el centro del país en los estados de Querétaro, Guanajuato, Michoacán y Jalisco; la segunda región productora está en la Mixteca Baja, en los estados de Oaxaca y Puebla (Corrales-García *et al.*, 2003). Godínez-Álvarez *et al.* (2008) y Álvarez-Aguirre y Montaña (1997) identificaron, bajo condiciones naturales, que las plantas de pitayo se reproducen en forma asexual, probablemente debido a la baja germinación de las semillas. Con fines de cultivo comercial se recomienda utilizar tallos de 0.5 m de longitud, que surgen del eje principal, a los cuales se les corta la parte apical y son plantados en posición vertical (López *et al.*, 2000).

Respecto al cultivo *in vitro* de plantas cactáceas, Ault y Blackmon (1987) propagaron *in vitro* *Ferocactus acanthodes* usando explantes apicales provenientes de semillas germinadas *in vitro*; la proliferación de los brotes axilares ocurrió en el medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con 46.5 μM de kinetina y 5.4 μM de ANA.

Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) lograron el establecimiento *in vitro* de *Mammillaria san-angelensis* mediante la germinación de semillas; las plántulas obtenidas se disectaron para usarse como explantes, y la brotación se obtuvo con 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA y 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA. Por su parte, Infante (1992) germinó semillas de *Mediocactus coccineus* en medio MS en condiciones asépticas para su

INTRODUCTION

The pitayo (*Stenocereus stellatus*) is a species native to Mexico (Bravo-Hollis, 1978). It shows wide morphological variation and has multiple uses, mainly for fruit consumption but the shoots are also used for "living fences", erosion control and as fuel (Luna and Aguirre, 2001; Luna *et al.*, 2001). The fruits are usually consumed as table fruit or used to make refreshments, ice cream, jelly, jam and liqueurs (Martínez-Cárdenas *et al.*, 2007). The presence of phenols in the fruit and their high antioxidant activity make this fruit an important source of antioxidant products for humans (Beltrán-Orozco *et al.*, 2009). Esquivel (2004) notes that the pitayo skin can be a source of natural dyes.

Pitayo is propagated by asexual methods using cuttings taken from mature plants which must have the characteristics desired by the producer and be free of pests and disease. The cuttings are usually taken from mature wild plants, causing deforestation of natural areas (Mercado and Granados, 2002). The various species of pitayo are found in the wild from northern to southern Mexico. In the Mixteca Baja region, in the states of Puebla and Oaxaca, there are three species of pitayo: the main one is *S. griseus* ("pitayo de mayo"), followed by *S. stellatus* ("sour pitayo") and *S. pruinosus* ("cuapetla") (Bravo-Hollis, 1978). In cultivated form, it is found in two main regions: the larger one is located in the center of the country in the states of Querétaro, Guanajuato, Michoacán and Jalisco, and the second in the Mixteca Baja, in the states of Oaxaca and Puebla (Corrales-García *et al.*, 2003). Godínez-Álvarez *et al.* (2008) and Álvarez-Aguirre and Montaña (1997) identified, under natural conditions, that pitayo plants reproduce asexually, probably due to poor seed germination. For cash crops, it is recommended to use 0.5 m-long shoots planted in an upright position with the apical part (shoot tip) removed (López *et al.*, 2000).

Regarding the *in vitro* culture of cacti, Ault and Blackmon (1987) propagated *Ferocactus acanthodes* *in vitro* using apical explants from seeds germinated *in vitro*; the proliferation of axillary buds occurred on Murashige and Skoog (1962) medium supplemented with 46.5 μM kinetin and 5.4 μM NAA.

Martínez-Vázquez and Rubluo (1989) achieved *in vitro* establishment of *Mammillaria san-angelensis* by seed germination; the seedlings obtained were dissected for use as explants, and shoot emergence was obtained with 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA. For his part, Infante (1992) germinated *Mediocactus coccineus* seeds on MS medium under aseptic conditions for use as inoculum, and obtained apical buds from the seedlings with the use of 4.4 μM BA and 0.27 μM NAA.

Martínez-Cárdenas *et al.* (2007) planted "pitayo de mayo" *in vitro*, and from epicotyls grown on Murashige and Skoog (1962) medium, alone or with NAA, IAA, NAA-BA or IAA-BA (0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), they obtained from two to four shoots per epicotyl by using two auxins in combination with BA.

utilización como inóculo, y obtuvo brotes de la parte apical de las plántulas con el uso de 4.4 μM de BA y 0.27 μM de ANA.

Martínez-Cárdenas *et al.* (2007) sembraron pitayo de mayo *in vitro*, y a partir de epicótilos cultivados en medio Murashige y Skoog (1962), sólo o con ANA, AIA, ANA-BA o AIA-BA (0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), obtuvieron de dos a cuatro brotes por epicótilo al usar las dos auxinas en combinación con BA. Las plantas generadas en medio con AIA y AIA-BA tuvieron la mejor sobrevivencia y crecimiento en condiciones de suelo en cámara de crecimiento (30 °C y 16 h luz), pero al pasarlas a invernadero todas murieron.

Los productores de pitayo enfrentan dos problemas: el primero es la dificultad de encontrar material vegetativo de la especie con la calidad deseada (libre de plagas y enfermedades y con las características que requiere el productor); el segundo es reunir la cantidad de material vegetativo necesario para establecer la huerta (Mercado y Granados, 2002). Estos problemas podrían solucionarse en parte con la utilización de protocolos de cultivo *in vitro*, ya que con la multiplicación del pitayo mediante esta técnica se tiene la posibilidad de hacer la propagación masiva de la especie con fines comerciales y así cubrir la demanda que existe por parte de los productores al ofrecer plantas, esquejes y material vegetativo de alta calidad y libre de plagas y enfermedades. Con base en lo anterior, el objetivo fue definir el tipo y la dosis de citocininas así como la concentración de sacarosa que permita obtener mayor número de plantas de pitayo *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, en Cuernavaca, Morelos, y en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de la Especialidad de Fruticultura en el Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Estado de México.

Material vegetal

Se colectaron y utilizaron frutos maduros de *Stenocereus stellatus*, provenientes de plantas seleccionadas por no presentar problemas fitosanitarios y por tener características de calidad del fruto deseables por el consumidor (color rojo intenso, dulzura de 17° Brix, baja acidez, etc.). Las semillas fueron extraídas de la siguiente manera: se cortaron los frutos por la mitad, y con una cuchara se extrajo la pulpa con las semillas; ésta se colocó en un colador de malla fina y se puso bajo el chorro de agua de la llave; se realizaron varios lavados hasta eliminar la pulpa por completo (Figuras 1a, 1b, 1c). Las semillas limpias se colocaron sobre papel estraza para su secado a temperatura ambiente; una vez secas, se colocaron en frascos de vidrio con tapa para su uso posterior.

The plants generated on medium with IAA and IAA-BA had the best survival and growth in soil conditions in a growth chamber (30 °C and 16 h light), but when brought to the greenhouse they all died.

Pitayo producers face two problems: the first is the difficulty of finding plant material of the species with the desired quality (free of pests and disease and with the characteristics required by the producer); the second is collecting the amount of plant material needed to establish the garden (Mercado and Granados, 2002). These problems could be solved in part with the use of *in vitro* culture protocols, since the multiplication of pitayo using this technique could enable mass propagation of the species commercially and thus meet the demand that exists on the part of producers to offer plants, cuttings and plant material of high quality and free of pests and disease. Based on the foregoing, the aim of this study was to identify the optimum cytokinin type and dose, plus sucrose concentration, to obtain more pitayo plants *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

The research was carried out at the Plant Biotechnology Laboratory operated by the Universidad Autónoma del Estado de Morelos Biotechnology Research Center in Cuernavaca, Morelos, and at the *in vitro* Culture Laboratory operated by the Colegio de Postgraduados Fruit-Growing Department in Montecillo, State of Mexico.

Plant Material

We collected and used mature *Stenocereus stellatus* fruits from plants selected by virtue of not presenting phytosanitary problems and by having fruit quality characteristics desired by the consumer (bright red, 17 °Brix sweetness, low acidity, etc.). The seeds were extracted as follows: the fruits were cut in half, and using a spoon the pulp was extracted with the seeds. This material was placed in a fine-mesh strainer and put under running tap water; several washes were performed to completely remove the pulp (Figures 1a, 1b, 1c). The clean seeds were placed on brown paper to dry at room temperature. Once dried, they were placed in glass jars with a lid for later use.

Establishment of aseptic culture

To disinfest the seeds, only one treatment was performed that consisted of applying sodium hypochlorite at three sequenced concentrations, adding five drops (0.5 mL) of Tween 20 per 100 mL of disinfectant solution. The first concentration of NaOCl was 1.2 %, in which the seeds were soaked for five minutes and then the solution was removed leaving only the seeds. The second concentration was 0.6 %, applied for 10 minutes. The third concentration was 0.3 % applied for five minutes, after which the seeds were rinsed five times with sterile distilled water, which was done to ensure the asepsis of all seeds. Finally, the seeds were sown.

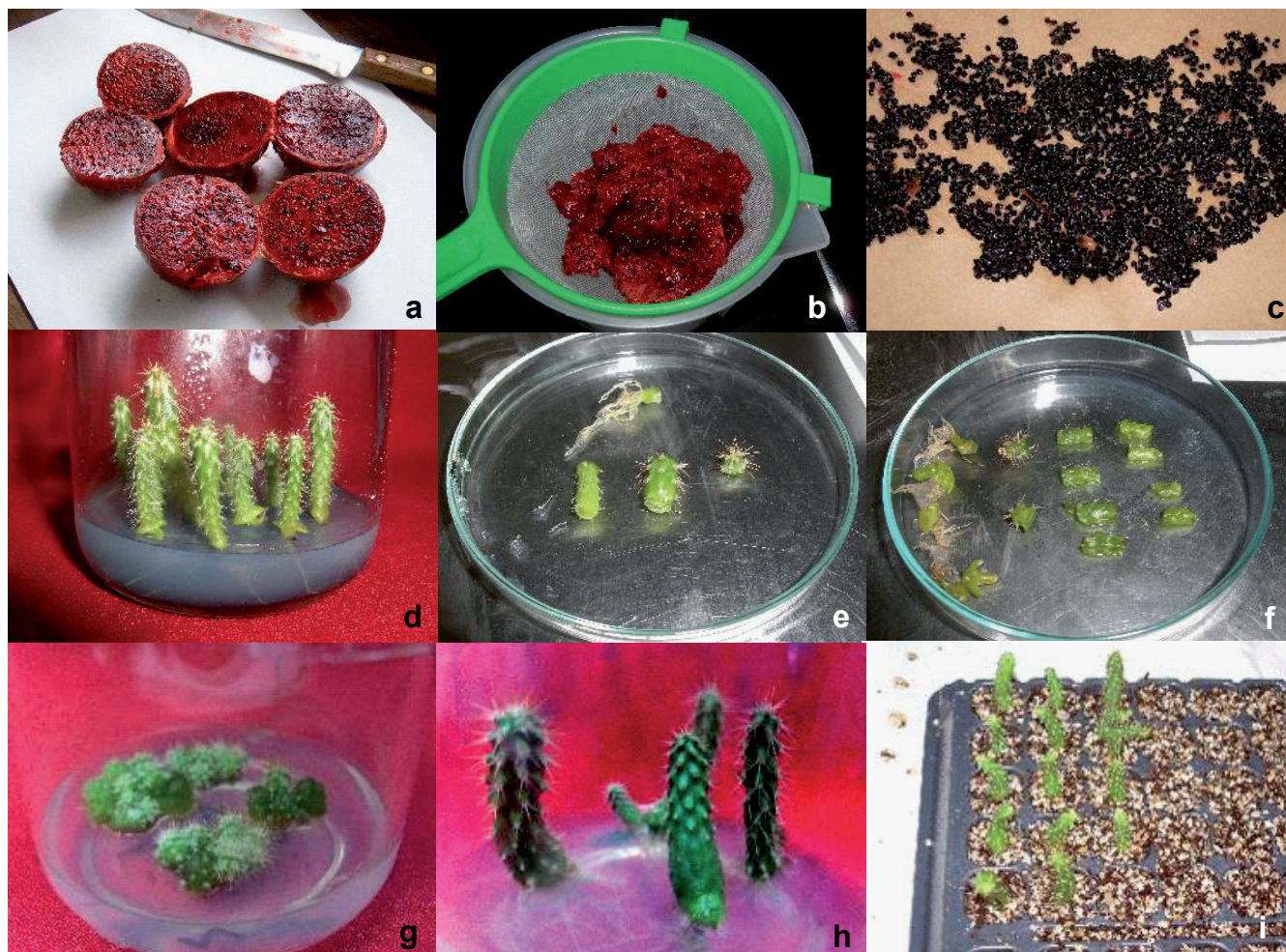


FIGURA 1. Fases del cultivo *in vitro* de pitayo. a, b, c) Proceso de extracción de semillas; d) Plántulas listas para usarse como donadoras de explantes; e, f) Obtención de explantes; g) Formación de brotes a las ocho semanas en medio con 17.6 μM de BA; h) Crecimiento de brotes a las ocho semanas de cultivo en medio con 3 % de sacarosa; i) Plantas aclimatizadas.

FIGURE 1. Phases of *in vitro* culture of pitaya. a, b, c) Seed extraction process; d) Seedlings ready to be used as explant donors; e, f) Obtaining of explants; g) Shoot formation at eight weeks in medium with 17.6 μM BA; h) Shoot growth at eight weeks of culture in medium containing 3 % sucrose; i) Acclimatized plants.

Establecimiento del cultivo aséptico

Para la desinfestación de las semillas se realizó sólo un tratamiento que consistió en aplicar hipoclorito de sodio en tres concentraciones secuenciadas, adicionando cinco gotas (0.5 mL) de Tween 20 por cada 100 mL de solución desinfectante: la primera concentración de NaOCl fue 1.2 %, en la cual las semillas estuvieron sumergidas durante cinco minutos y posteriormente la solución se eliminó dejando sólo las semillas; la segunda concentración fue 0.6 %, aplicada durante 10 minutos; la tercera concentración fue 0.3 % aplicada por cinco minutos; posteriormente se efectuaron cinco enjuagues con agua destilada estéril; lo anterior se hizo para asegurar la asepsia de todas las semillas; finalmente se procedió a la siembra.

El medio de cultivo utilizado fue el MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de mio-inositol,

We used MS (Murashige and Skoog, 1962) culture medium supplemented with 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ myo-inositol, 0.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ thiamine-HCl, 2 % sucrose and 0.65 % agar; the pH was adjusted to 5.7, and 20 mL of medium was used in each culture jar. The medium was sterilized for 20 minutes at 120 °C and 15 lb·in⁻¹ pressure. In the laminar flow hood, 20 seeds were sown per jar, which were placed in an incubation room where they remained for eight weeks. At this stage, no assessment was made of the treatments as only a disinfestation method was used.

The seedlings obtained were used to take the explants. Three experiments were conducted: shoot multiplication, shoot growth and acclimatization, which are described below.

Shoot multiplication

The culture medium used was Murashige and Skoog

0.4 mg·L⁻¹ de tiamina-HCl, 2 % de sacarosa y 0.65 % de agar; el pH se ajustó a 5.7. Se sirvieron volúmenes de 20 ml de medio en cada frasco de cultivo. La esterilización del medio fue durante 20 minutos a 120 °C y 15 lb·pulg⁻² de presión. En la campana de flujo laminar se sembraron 20 semillas por frasco, los cuales fueron colocados en un cuarto de incubación, donde permanecieron durante ocho semanas. En esta fase no se hizo evaluación de tratamientos, ya que sólo se usó un método de desinfección.

Las plántulas obtenidas fueron usadas para tomar los explantes. Se efectuaron tres experimentos: multiplicación de brotes, crecimiento de brotes y aclimatación, mismos que se describen a continuación.

Multiplicación de brotes

El medio de cultivo empleado fue el de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 100 mg·L⁻¹ de mio-inositol, 0.4 mg·L⁻¹ de tiamina-HCl, 2.2 µM de ácido 3-indolbutírico y 3 % de sacarosa; se usó 0.7 % de agar. Se probó el efecto de los tratamientos, los cuales se formaron con las combinaciones de tres tipos de citocinina: kinetina (Kn), 6-benciladenina (BA), y 2-isopentiladenina (2-iP), las tres de la marca Sigma®, con cinco concentraciones (2.2, 4.4, 8.8, 17.6 y 35.2 µM). El pH se ajustó a 5.7 y se sirvieron volúmenes de 20 ml en cada frasco de cultivo; el medio fue esterilizado durante 20 minutos a 120 °C y 15 lb·pulg⁻² de presión.

Como explantes se utilizaron plántulas de 2 a 3 cm de altura (Figura 1d); se sacaron del frasco de cultivo y se les eliminó la raíz y el ápice del brote; se hicieron cortes transversales para obtener secciones de 1 cm de largo, mismas que fueron cortadas longitudinalmente, obteniendo secciones de medio tallo (Figuras 1e y 1f); de cada plántula se obtuvieron de cuatro a seis explantes que fueron establecidos en los frascos de cultivo. Los frascos con los explantes fueron colocados en un cuarto de incubación, en donde permanecieron durante ocho semanas. Las condiciones de incubación fueron las siguientes: temperatura de 25 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 h luz con intensidad luminosa de 29 µE·m⁻²·s⁻¹.

El experimento fue conducido en un diseño experimental completamente al azar para estudiar 15 tratamientos, obtenidos de la combinación de tres tipos de citocinina (Kn, BA y 2-iP) y cinco concentraciones de cada una de ellas (2.2, 4.4, 8.8, 17.6 y 35.2 µM): se establecieron tres repeticiones por tratamiento y cuatro explantes por unidad experimental.

Se evaluaron las variables días a inicio de brotación (se contaron los días transcurridos desde el establecimiento del experimento hasta la aparición de brotes). A las ocho semanas de iniciado el experimento, en cada unidad experimental se registró: número de explantes con brotes,

(1962), supplemented with 100 mg·L⁻¹ myo-inositol, 0.4 mg·L⁻¹ thiamine-HCl, 2.2 µM indole-3-butyric acid and 3 % sucrose, plus 7 % agar. We tested the effect of the treatments, which were formed with combinations of three types of cytokinin: kinetin (Kn), 6-benzyladenine (BA), and 2-isopentenyladenine (2-iP), all Sigma® brand, with five concentrations (2.2, 4.4, 8.8, 17.6 and 35.2 µM). The pH was adjusted to 5.7 and 20-ml volumes were used in each culture jar; the medium was sterilized for 20 minutes at 120 °C and 15 lb in⁻² pressure.

Seedlings of 2 to 3 cm in height were used as explants (Figure 1d). They were taken out of the culture jar and the root and shoot apex were removed from them. Cross cuts were made to obtain 1 cm-long sections, which were, in turn, cut longitudinally to obtain half-stem sections (Figures 1e and 1f). Four to six explants were obtained from each seedling and established in culture jars, which were placed in an incubation room where they remained for eight weeks. Incubation conditions were as follows: temperature of 25 ± 2 °C, with a photoperiod of 16 h light with light intensity of 29 µE·m⁻²·s⁻¹.

The experiment was conducted in a completely randomized experimental design to study 15 treatments, obtained from the combination of three types of cytokinin (Kn, BA and 2-iP) and five concentrations of each of them (2.2, 4.4, 8.8, 17.6 and 35.2 µM).

Three replicates were established per treatment and four explants per experimental unit.

The variable days to the onset of shoot emergence was assessed (days from the establishment of the experiment until shoot appearance were counted). At eight weeks into the experiment, the following were recorded in each experimental unit: number of explants with shoots (the percentage of explants that formed shoots was calculated by dividing explants with shoots by total explants multiplied by 100; number of shoots per explants (the number of shoots formed on each explant was counted); shoot size, which was measured with graph paper placed under a sterile petri dish.

The data obtained in percentage were transformed using the formula: $Y = \arcsine \sqrt{x/100}$. With the data, an analysis of variance and Tukey's comparison of means test ($P \leq 0.05$) were performed using SAS statistical software (SAS, 1998).

Shoot growth

The culture medium used was Murashige and Skoog (1962), supplemented with 100 mg·L⁻¹ myo-inositol, 0.4 mg·L⁻¹ thiamine-HCl, 0.01 mg·L⁻¹ BA and five sucrose concentrations (1, 2, 3, 4 and 5 %); 0.7 % agar was used as a gelling agent, and the pH was adjusted to 5.7. Volumes of 20 mL were used per culture jar and the medium was sterilized for 20 minutes at 120 °C and 15 lb in⁻² pressure.

The shoots generated in each of the explants in

se calculó el porcentaje de explantes que formaron brotes dividiendo explantes con brotes entre explantes totales multiplicado por 100; número de brotes por explante, se contó el número de brotes formados en cada explante; tamaño de brotes, se midió con papel milimétrico el cual fue colocado debajo de una caja de petri esterilizada.

Los datos obtenidos en porcentaje fueron transformados mediante la fórmula: $Y = \arccos(\sqrt{x}/100)$. Con los datos se hicieron análisis de varianza y pruebas de comparación de medias por el método de Tukey ($P \leq 0.05$), con el programa estadístico SAS (SAS, 1998).

Crecimiento de brotes

El medio de cultivo utilizado fue el de Murashige y Skoog (1962), suplementado con $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de mio-inositol, $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de tiamina-HCl, $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BA y cinco concentraciones de sacarosa (1, 2, 3, 4 y 5 %). Se usó 0.7 % de agar como agente gelificante; el pH se ajustó a 5.7. Se sirvieron volúmenes de 20 mL por frasco de cultivo y el medio se esterilizó durante 20 minutos a 120°C y $15 \text{ lb} \cdot \text{pulg}^{-2}$ de presión.

Los brotes generados en cada uno de los explantes del experimento referido anteriormente, se cortaron desde la base y fueron establecidos en el medio de cultivo para promover su crecimiento. Se colocaron cuatro brotes por frasco de cultivo, posteriormente fueron colocados en un cuarto de incubación, donde permanecieron durante ocho semanas. Las condiciones de incubación fueron $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, fotoperiodo de 16 h luz con intensidad luminosa de $29 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Se usó un diseño experimental completamente al azar para estudiar cinco tratamientos de sacarosa (1, 2, 3, 4 y 5 %); se establecieron 10 repeticiones por tratamiento; la unidad experimental fue un frasco con cuatro brotes cada uno.

Ocho semanas después del establecimiento del experimento se evaluó la altura y el diámetro de los brotes, usando un vernier digital. Se hicieron análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$), con el programa estadístico SAS (SAS, 1998).

Acclimatación

Todas las plantas obtenidas del experimento anterior se sacaron de los frascos de cultivo, se lavaron con agua de la llave hasta eliminar por completo el medio de cultivo en las raíces y se establecieron en charolas de 200 cavidades que contenían una mezcla de sustrato preparado a base de tepojal (sustrato de origen mineral) y peat-moss (1:1), mojado a capacidad de campo.

El trasplante se hizo considerando el tratamiento de sacarosa en el cual estuvieron en el experimento anterior. Las plantas se cubrieron con domo transparente durante

the above-mentioned experiment were cut at the base and established in the culture medium to promote their growth. Four shoots were placed in each culture jar, which were then placed in an incubation room where they remained for eight weeks. The incubation conditions were $25 \pm 2^\circ\text{C}$ temperature, 16 h light photoperiod and light intensity of $29 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

A completely randomized experimental design was used to study five sucrose treatments (1, 2, 3, 4 and 5 %); ten replicates were established per treatment, and the experimental unit was a jar with four shoots in it.

Eight weeks after the establishment of the experiment, shoot height and diameter were measured using a digital vernier caliper. An analysis of variance and Tukey's comparison of means test (Tukey, $P \leq 0.05$) were carried out using SAS statistical software (SAS, 1998).

Acclimatization

All plants obtained from the previous experiment were removed from the culture jars, washed with tap water to completely remove the culture medium in the roots and established in 200-cavity trays containing a substrate mixture prepared from a tepojal base (mineral-origin substrate) and peat-moss (1:1), wet to field capacity.

The transplant was done considering the sucrose treatment which the plants were subjected to in the previous experiment. The plants were covered with a clear dome for a week to promote their acclimatization as the dome generates an environment of relatively high humidity. Afterwards, the dome was removed and irrigation applied. The subsequent irrigations were applied once a week or every time the substrate was found with 65 % available moisture. One week after removing the dome, the plants were irrigated with fertilizer (Peter's 20-20-20), applying 1 g per liter of water.

A completely randomized experimental design was used to study the effect of five sucrose concentrations (1, 2, 3, 4 and 5 %) used in the previous experiment to promote plant growth. There were 10 replicates per treatment, and the experimental unit consisted of four plants each.

Four weeks into the experiment, we evaluated the survival rate, a variable that was transformed using the formula $Y = \arcsin(\sqrt{x}/100)$ in order to perform the analysis of variance and Tukey's comparison of means test ($P < 0.05$) with SAS statistical software (SAS, 1998).

RESULTS AND DISCUSSION

Establishment of aseptic culture

Seed asepsis was 80 %, and germination occurred between 8 and 12 days after planting, obtaining 24 % germination. The low germination percentage obtained could be explained by the action of some latency mechanism since the mucilage that protects the seeds, which likely holds

una semana para favorecer su aclimatación, ya que el domo permite que se genere un ambiente de humedad relativa alta; transcurrido este tiempo, se retiró el domo y se aplicó riego. Los riegos posteriores se aplicaron una vez por semana o bien cada vez que el sustrato se encontraba con un 65 % de humedad aprovechable. Una semana después de retirar el domo, se regó con fertilizante (peter's 20-20-20), aplicando 1 g por litro de agua.

Se usó un diseño experimental completamente al azar para estudiar el efecto de cinco tratamientos de sacarosa (1, 2, 3, 4 y 5 %) usados en el experimento anterior para promover el crecimiento de las plantas. Se tuvieron 10 repeticiones por tratamiento; la unidad experimental consistió de cuatro plantas cada una.

Cuatro semanas después de iniciado el experimento, se evaluó el porcentaje de sobrevivencia, variable que fue transformada mediante la fórmula: $Y = \arccos(\sqrt{x}/100)$, para proceder a hacer el análisis de varianza y prueba de comparación de medias por el método de (Tukey $P \leq 0.05$), con el programa estadístico SAS (SAS, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento del cultivo aséptico

La asepsia de las semillas fue de 80 %; la germinación ocurrió entre los 8 y 12 días después de la siembra, obteniendo 24 % de germinación. El bajo porcentaje de germinación obtenido podría explicarse por la acción de algún mecanismo de latencia, pues no se había eliminado el mucílago que protege a las semillas, en el cual muy probablemente existen inhibidores de la germinación. En estudios anteriores, se ha observado que la eliminación del mucílago de las semillas permite obtener germinación del 100 % (datos no publicados).

Multiplicación de brotes

En la mayoría de los explantes, la brotación se apreció como pequeñas protuberancias en las areolas presentes en las secciones de tallos; los brotes comenzaron a observarse a partir de los 11 días del establecimiento del experimento.

El inicio de brotación fue afectado de manera significativa por los tratamientos aplicados para la multiplicación de brotes ($P \leq 0.05$), de tal manera que los explantes cultivados en el medio con 2.2 μM de BA, 2.2, 17.6 y 35.2 μM de 2-iP tardaron más tiempo en iniciar la formación de brotes (16 y 18 días) en comparación con aquéllos que fueron cultivados en el medio con 4.4, 8.8, 17.6 μM de BA y 8.8 μM de 2-iP que tardaron 11 y 12 días en mostrar brotación (Cuadro 1). Después de cuatro semanas, los explantes cultivados en los diferentes tratamientos hormonales mostraron clara diferenciación

germination inhibitors, had not been removed. Previous studies have shown that removal of seed mucilage allows for 100 % germination (unpublished data).

Shoot multiplication

In most of the explants, shoot emergence was seen as small protuberances on the areolas present in the stem sections; the shoots began to appear at 11 days into the experiment.

The onset of shoot emergence was significantly affected by the treatments applied for shoot multiplication ($P \leq 0.05$), as the explants cultured in medium with 2.2 μM BA, 2.2, 17.6 and 35.2 μM 2-iP took longer to initiate shoot formation (16 and 18 days) compared with those grown in medium with 4.4, 8.8, 17.6 μM BA and 8.8 μM 2-iP that took 11 and 12 days to show shoot emergence (Table 1). After four weeks, explants cultured in different hormonal treatments showed clear differentiation of shoots, some of which already showed the presence of spines (Figure 1g).

With regard to the explants with shoots, the hormonal treatments had no effect. All explants (100 %) formed shoots in ten of the fifteen treatments, among which were the five media containing BA. Although there were no statistical differences, the culture media that induced the least shoot emergence in the explants were those supplemented with 2.2 and 4.4 μM kinetin and 2.2 μM 2-iP (Table 1).

In terms of shoots per explant, the effect of the cytokinin treatments was significant ($P \leq 0.05$). The culture media which recorded the greatest number of shoots (5.2 to 8) were those containing 17.6 and 35.2 μM BA, and 17.6 μM 2-iP. By contrast, the lowest number of shoots per explant was obtained when grown in any of the concentrations of Kn, 2.2, 4.4 μM BA, 2.2, 4.4 and 8.8 μM 2-iP. The shoot results per explant concur with those obtained by Martínez-Vázquez and Rubluo (1989), Infante (1992) and Mohamed-Yansseen (1995), who obtained the highest shoot formation percentages by using BA and 2-iP in combination with low auxin levels for different species of cacti. Unlike the results obtained in this study, Ault and Blackmon (1987), Ortiz-Montiel and Alcántara (1997) report the highest shoot emergence percentages by using kinetin for *Ferocactus acanthoides* and *Lophophora williamsii*, respectively.

Clayton *et al.* (1990) mention that the use of cytokinins for cactus propagation has been largely handled at different concentration ranges, as well as in various combinations, and that the morphogenic response depends on biological factors (species, explant type and size, explant age, level of endogenous hormone concentration, life style, etc.) and environmental factors (composition of culture medium, number of subcultures, growth regulator type and concentration, incubation time and conditions). Similarly, Chávez *et al.* (2001) indicate that the required cytokinin and auxin levels must be tested experimentally for each species; in this respect, George and Sherrington (1984) note that cytokinin/auxin combinations are often used in the multipli-

de brotes, algunos de los cuales ya mostraban presencia de espinas (Figura 1g).

Con respecto a los explantes con brotes, no hubo efecto de los tratamientos hormonales. Todos los explantes (100 %) formaron brotes en diez de los quince tratamientos, dentro de los cuales estuvieron los cinco medios que contenían BA. Aunque sin diferencias estadísticas, los medios de cultivo que indujeron menos brotación en los explantes fueron aquéllos suplementados con 2.2 y 4.4 μM de kinetina y 2.2 μM de 2-iP (Cuadro 1).

En cuanto a brotes por explante, el efecto de los tratamientos con citocininas fue significativo ($P \leq 0.05$). Los medios de cultivo en los que se registró mayor número de brotes (5.2 a 8) fueron los que contenían 17.6 y 35.2 μM de BA, así como el 17.6 μM de 2-iP. En contraste, la menor cantidad de brotes por explante se obtuvo cuando fueron cultivados en cualquiera de las concentraciones de Kn, 2.2, 4.4 μM de BA, 2.2, 4.4 y 8.8 μM de 2-iP. Los resultados de brotes por explante concuerdan con lo obtenido por Martínez-Vázquez y Rubluo (1989), Infante (1992) y Mohamed-Yansseen (1995), quienes obtuvieron los porcentajes mayores de formación de brotes al utilizar BA y 2-iP en combinación con bajos niveles de auxinas para diferentes especies de cactáceas. A diferencia de lo obtenido en esta investigación, Ault y Blackmon (1987), Ortiz-Montiel y Alcántara (1997) reportan los mejores porcentajes de brotación al utilizar kinetina para *Ferocactus*

cation stage, although in some cases it may be better to use cytokinins alone. With regard to shoot height, cytokinin treatments had a significant effect $P \leq 0.05$. The tallest shoots (5.5 mm) were obtained with 4.4 μM 2-iP; by contrast, the shortest shoots were formed in culture medium with 8.8 and 35.2 μM Kn, and were statistically equal to those of 35.2 μM BA, 2.2 and 35.2 μM 2-iP (Table 1). It is likely that the results were affected by the close relationship that exists between the number of shoots generated and their height, because if an explant produces fewer shoots it is almost certain that they will be of better quality (greater height, diameter and thickness) in comparison with an explant that uses a greater amount of energy and nutrients to form a greater number of shoots, although these are smaller; this is what happened when 4.4 μM 2-iP was used, as it obtained the greatest height, but only generated 1.5 shoots per explant.

Shoot growth

Shoot height was significantly affected ($P \leq 0.05$) by sucrose concentration. Plants grown in medium with 3 % sucrose showed greater height, followed by those grown with 4 % carbohydrate (Figure 1h); the concentrations that led to lesser shoot growth were 5 and 2 % sucrose (Table 2).

With regard to shoot diameter, the highest values were 4.9 and 5.9 mm obtained with 1, 2, 3 and 4 % sucrose; medium supplemented with 5 % sucrose showed smaller-diameter shoots (Table 2). This response can be explained

CUADRO 1. Efecto de tipo y concentración de citocininas en la multiplicación de brotes de pitayo.

TABLE 1. Effect of cytokinin type and concentration on shoot multiplication in pitayo.

Tipo y concentración de citocininas (μM)	Inicio de brotación (días)	Explantes con brotes (%)	Brotes por explante (Núm.)	Altura de brotes (mm)
Kn 2.2	14.6 bc	75.0 a	2.3 cd	3.4 bc
Kn 4.4	13.0 bc	75.0 a	3.4 bcd	4.2 b
Kn 8.8	13.6 bc	91.6 a	3.5 bcd	2.0 e
Kn 17.6	13.3 bc	100 a	3.1 bcd	3.9 b
Kn 35.2	13.6 bc	100 a	3.2 bcd	2.7 cde
BA 2.2	18.6 a	100 a	1.5 d	4.2 b
BA 4.4	11.6 c	100 a	3.4 bcd	3.2 bcd
BA 8.8	12.3 c	100 a	4.9 bc	4.0 b
BA 17.6	12.0 c	100 a	8.0 a	3.3 bcd
BA 35.2	14.3 bc	100 a	5.2 ab	2.5 de
2-iP 2.2	17.0 ab	75 a	1.1 d	2.5 de
2-iP 4.4	13.6 bc	100 a	1.5 d	5.5 a
2-iP 8.8	12.0 c	100 a	3.7 bcd	3.6 bcd
2-iP 17.6	16.6 ab	100 a	5.4 ab	3.7 bc
2-iP 35.2	17.0 ab	83.3 a	5.0 bc	2.6 cde
DMS	4.13	25.07	2.84	1.11
CV (%)	9.64	8.92	25.39	8.92
Promedio	14.24	93.30	3.70	3.46

DMS: Diferencia mínima significativa; CV: Coeficiente de variación. Valores con la misma letra en el sentido de las columnas son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

DMS: Spanish acronym for least significant difference, CV: Coefficient of variation. Values with the same letter within each column are not statistically different according to Tukey's test at $P \leq 0.05$.

acanthodes y *Lophophora williamsii*, respectivamente.

Clayton *et al.* (1990) mencionan que la utilización de citocininas para la propagación de cactáceas ha sido ampliamente manejada a diferentes rangos de concentración, así como en varias combinaciones, y que la respuesta morfogénica depende de factores biológicos (especie, tipo y tamaño de explante, edad del explante, nivel de concentración endógena de la hormona, forma de vida, etc.) y de factores ambientales (composición del medio de cultivo, número de subcultivos, tipo y concentración de regulador de crecimiento, tiempo y condiciones de incubación). De igual forma, Chávez *et al.* (2001) señalan que los niveles de citocinina y auxina requeridos deben ser probados experimentalmente para cada especie; a este respecto, George y Sherrington (1984) señalan que en la etapa de multiplicación se suelen utilizar combinaciones de citocininas y auxinas, aunque en algunos casos puede ser mejor el uso de citocininas solas.

Con relación a la altura de los brotes, se observó efecto significativo ($P \leq 0.05$) de los tratamientos con citocininas. Los brotes más altos (5.5 mm) se obtuvieron con 4.4 μM de 2-iP; en contraste, los brotes más pequeños correspondieron a los formados en el medio de cultivo con 8.8 y 35.2 μM de Kn, mismos que fueron estadísticamente iguales a los de 35.2 μM de BA, 2.2 y 35.2 μM de 2-iP (Cuadro 1). Es probable que los resultados obtenidos hayan sido afectados por la estrecha relación que existe entre el número de brotes generados y la altura de éstos, ya que si un explante origina menor número de brotes es casi seguro que éstos serán de mejor calidad (mayor altura, diámetro y consistencia) en comparación con un explante que utiliza más cantidad de energía y nutrientes en formar mayor cantidad de brotes, aunque éstos sean de tamaño menor; esto fue lo que ocurrió cuando se usaron 4.4 μM de 2-iP, ya que se obtuvo la mayor altura, pero sólo se generaron 1.5 brotes por explante.

Crecimiento de brotes

La altura de los brotes fue afectada de manera significativa ($P \leq 0.05$) por la concentración de sacarosa. Las plantas cultivadas en el medio con 3 % de sacarosa mostraron altura mayor, seguidas por aquellas cultivadas con 4 % del carbohidrato (Figura 1h); las concentraciones que originaron menor crecimiento de brotes fueron sacarosa al 5 y 2 % (Cuadro 2).

En cuanto al diámetro de los brotes, los valores más altos fueron de 4.9 a 5.9 mm obtenidos con 1, 2, 3, y 4 % de sacarosa; el medio suplementado con sacarosa al 5 % mostró los brotes con menor diámetro (Cuadro 2). Esta respuesta puede ser explicada por el efecto inductor de este carbohidrato a bajas concentraciones, lo que resulta en un potencial osmótico menos negativo en el medio, estimulando la división y el alargamiento celular por mayor absorción de agua y nutrientes del medio de cultivo;

by the inductive effect of this carbohydrate at low concentrations, resulting in a less negative osmotic potential in the medium, stimulating cell division and elongation by increased absorption of water and nutrients from the culture medium; however, increasing the sucrose concentration in the culture medium produces greater dry mass accumulation in the shoots formed (Múgica and Mogollón, 2004).

Another aspect worth mentioning is that at the time of transplantation to soil, plants from the medium with 5 % sucrose showed flaccid, dark-green tissue (signs of water stress) in contrast with the other plants that showed firm, light-green tissue. This can be attributed to the osmotic potential of the medium, as the high sucrose concentration made the medium become hyperosmotic, which resulted in the shoots being unable to absorb more water and nutrients from the medium, which is why the shoots were smaller. The results agree with those reported by Sánchez-Morán and Pérez-Molphe-Balch (2007), who promoted the growth of *Browningia candelaria* shoots by culturing them in MS (1962) medium with 30 g L^{-1} sucrose and 2 g L^{-1} activated carbon for 30 to 40 days; however, they do not report how much the shoots grew.

Acclimatization

The transplanted plants responded successfully to the acclimatization process (Figure 1i), showing a higher survival rate and better growth when they came from the culture medium with 1 to 3 % sucrose (Table 3). By contrast, when they came from the medium with 4 and 5 % sucrose, they had losses of 7.5 and 10 %, respectively. In general, we had good survival rates that were similar to those obtained by Sánchez-Morán and Pérez-Molphe-Balch (2007), who obtained 87 % acclimatization of *Browningia candelaria* plants.

CONCLUSIONS

Based on research conditions, study factors and levels, it is concluded that the greatest number of shoots was obtained with 17.6 μM 6-benzyladenine; shoot growth was better when using 3 and 4 % sucrose in the culture medium, whereas acclimatization was better when the plants came from culture with 1 to 3 % sucrose.

ACKNOWLEDGMENTS

The second author wishes to thank SNI (34643) and PROMEP for the funding support received through Cuerpo Académico Producción Agrícola UAEMOR-CA-74.

End of English Version

CUADRO 2. Efecto de la concentración de sacarosa en el crecimiento de brotes de pitayo.

TABLE 2. Effect of sucrose concentration on pitayo shoot growth.

Sacarosa	Altura del brote	Diámetro del brote
(%)	(mm)	(mm)
1	20.76 b	5.9 a
2	19.72 bc	5.1 a
3	23.45 a	5.1 a
4	21.97 ab	5.2 a
5	18.30 c	4.0 b
DMS	2.33	1.09
CV (%)	8.81	17.0
Promedio	20.84	5.0

DMS: Diferencia mínima significativa; CV: Coeficiente de variación. Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P < 0.05$.

DMS: Spanish acronym for least significant difference; CV: Coefficient of variation. Values with the same letter within columns are statistically equal according to Tukey's test at $P < 0.05$.

aunque con el aumento de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo se produce mayor acumulación de masa seca en los brotes formados (Múgica y Mogollón, 2004).

Otro aspecto que es importante mencionar es que al momento de realizar el trasplante a suelo, las plantas provenientes del medio con 5 % de sacarosa presentaron tejido flácido y de color verde oscuro (signos de estrés hídrico) en contraste con las demás plantas que presentaban consistencia firme y color verde claro. Esto puede ser atribuido al potencial osmótico del medio de cultivo, ya que la concentración elevada de sacarosa hizo que el medio se volviera hiperosmótico, lo que provocó que los brotes no pudieran absorber más agua y nutrientes del medio, por lo que los brotes fueron más pequeños. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Sánchez-Morán y Pérez- Molphe-Balch (2007), quienes promovieron el crecimiento de brotes de *Browningia candelaria* al cultivarlos en medio MS (1962) con 30 g·L⁻¹ de sacarosa y 2 g·L⁻¹ de carbón activado durante 30 a 40 días; sin embargo, no reportan cuánto crecieron los brotes.

Aclimatación

Las plantas trasplantadas respondieron exitosamente al proceso de aclimatación (Figura 1i); se observó mayor porcentaje de sobrevivencia y mejor crecimiento cuando

CUADRO 3. Efecto de la sacarosa en la sobrevivencia de plantas de pitayo en aclimatación.

TABLE 3. Effect of sucrose on survival of pitayo plants in acclimatization.

Sacarosa usada para crecimiento	Sobrevivencia (%)
(%)	
1	100.0 a
2	95.0 b
3	96.0 ab
4	92.5 bc
5	90.0 c
DMS	4.0
CV (%)	5.8
Promedio	94.7

las plantas provenían de medio de cultivo con 1 a 3 % de sacarosa (Cuadro 3); en cambio cuando provenían del medio con 4 y 5 % se tuvieron pérdidas de 7.5 y 10 %, respectivamente. En general, se tuvieron buenos porcentajes de sobrevivencia, similares a los obtenidos por Sánchez-Morán y Pérez- Molphe-Balch (2007), quienes obtuvieron 86 % de aclimatación de plantas de *Browningia candelaria*.

CONCLUSIONES

Con base en las condiciones de investigación, factores y niveles de estudio, se concluye que el mayor número de brotes se obtuvo con 17.6 μ M de 6-benciladenina; el crecimiento de los brotes fue mejor al usar 3 y 4 % de sacarosa en el medio de cultivo, mientras que la aclimatación fue mejor cuando las plantas provenían de cultivo con 1 a 3 % de sacarosa.

AGRADECIMIENTOS

El segundo autor agradece el apoyo del SNI (34643) y de PROMEP por el financiamiento brindado a través del Cuerpo Académico Producción Agrícola UAEMOR-CA-74.

LITERATURA CITADA

- ÁLVAREZ-AGUIRRE, M. G.; MONTAÑA, C. 1997. Germinación y supervivencia de cinco especies de cactáceas del Valle de Tehuacán: implicaciones para su conservación. *Acta Botánica Mexicana* 40: 43-58.
- AULT, J. R.; BLACKMON, W. J. 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). *HortScience* 22: 126-127.
- BELTRÁN-OROZCO, M. C.; OLIVA-COBA, T. G.; GALLARDO-VELÁZQUEZ, T.; OSORIO-REVILLA, G. 2009. Ascorbic acid, phenolic content and antioxidant capacity of red, cherry, yellow and White type of Pitaya cactus fruit (*Stenocereus stellatus* Riccobono). *Agrociencia* 43: 153-162.
- BRAVO-HOLLIS, H. 1978. Las Cactáceas de México. Vol. 1. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 743 p.
- CLAYTON, P.; HUBSTENBERGER, J.; PHILLIPS, G. 1990. Micropropagation of members of the Cactaceae subtribe Cactinae. *Journal American Society Horticultural Science* 115: 337-343.
- CHÁVEZ, V.; MATA, M.; MOEBIUS, K.; MONROY, A. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In vitro Cell Developmental Biology Plant* 37: 400-404.
- CORRALES-GARCÍA, J.; FLORES, V. C. A.; GÓMEZ, C. M. A.; MERÁZ, A. M. R.; RODRÍGUEZ, C. A.; SCHWENTESIUS, R. R. 2003. Pitayas y Pitahayas, producción, postcosecha, industrialización y comercialización. CIESTAAM. Universidad Autónoma Chapingo. México. 173.
- ESQUIVEL, P. 2004. Los frutos de las cactáceas y su potencial

- como materia prima. *Agronomía Mesoamericana* 15: 215-219.
- GEORGE, E.; SHERRINGTON, P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of comercial laboratorios. Eastern Press. Inglaterra. 709 p.
- GODÍNEZ-ALVAREZ, H.; JIMÉNEZ, M.; MENDOZA, M.; PÉREZ, F.; ROLDÁN, P.; RÍOS-CASANOVA, L.; LIRA, R. 2008. Densidad, estructura poblacional, reproducción y supervivencia de cuatro especies de plantas útiles en el Valle de Tehuacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79: 393-403.
- INFANTE, R. 1992. *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocractus coccineus* (Sal-Dyck). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 31: 155-159.
- LÓPEZ, G. R.; DÍAZ, P. J. C.; FLORES, M. G. 2000. Vegetative propagation of three species of cacti: pitaya (*Stenocereus griseus*), tunillo (*Stenocereus stellatus*) and jiotilla (*Escontria chiotilla*). *Agrociencia* 34: 363-364.
- LUNA, M. C.; AGUIRRE, J. R. R. 2001. Clasificación tradicional, aprovechamiento y distribución ecológica de la pitaya mixteca en México. *Interciencia* 26: 18-24.
- LUNA, M. C. del; AGUIRRE, J. R. R.; PEÑA, V. C. B. 2001. Cultivares tradicionales de *Stenocereus pruinosus* y *Stenocereus stellatus* (Cactaceae). *Anales del Instituto de Biología* 72: 131-155.
- MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, O.; RUBLUO, A. 1989. *In vitro* mass propagation of the near extinct *Mammillaria San-angelensis*. *Journal Horticultural Science* 61: 99-105.
- MARTÍNEZ-CÁRDENAS, M. L.; VICENTE-SOLANO, R.; MARTÍNEZ-HERRERA, A.; CARMONA, A.; VARELA, H. G. 2007. Survival and growth on soil of micropropagate pitaya de mayo plants. *Acta Horticulturae* 748: 237-239.
- MERCADO, B. A.; GRANADOS, S. D. 2002. La pitaya, biología, ecología, fisiología, sistemática y etnobotánica. Universidad Autónoma Chapingo. México. 194 p.
- MOHAMED-YANSEEN, Y. 1995. Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britt. Et Rose). *HortScience* 29: 559.
- MÚJICA, H.; MOGOLLÓN, N. 2004. Bulbificación *in vitro* del ajo (*Allium sativum* L.) con adición de citocininas y sacarosa en el medio de cultivo. *Bioagro* 16: 55-60.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- ORTÍZ-MONTIEL, J. C.; ALCÁNTARA, R. 1997. Propagación *in vitro* de peyote (*Lophophora williamsii* (Lemaire) Coulter). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas XLII*: 3-6.
- SÁNCHEZ-MORÁN, M. R.; PEREZ-MOPHE-BALCH, E. 2007. Propagación *in vitro* de *Browningia candelaria* (Cactaceae) usando metatopolina. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas* 4: 16-18.
- SAS. 1998. SAS User's guide: Statistics. Version 6.12. SAS Institute, Cary, N.C. 1 848 p.