

INVESTIGACIÓN

Estudio comparativo *in vitro* de estrategias adaptativas en especies de *Hylocereus*, Cactaceae, con distribución ecológica contrastada.

In vitro comparative study of adaptive strategies in *Hylocereus* species, Cactaceae, with contrasted ecological distribution.

Máximo Moreira-Palacios¹, Amina Sánchez-Rodríguez¹

DOI. 10.21931/RB/2017.02.03.3

RESUMEN

Hylocereus ocamponis e *Hylocereus triangularis* son dos especies de cactáceas estrechamente relacionadas filogenéticamente pero que muestran hábitos de crecimiento completamente contrastados. La primera abunda en ecosistemas secos y la segunda en bosque tropical lluvioso, en bosques secos occidentales y la región amazónica del Ecuador, respectivamente. En el presente trabajo se empleó el cultivo *in vitro* como plataforma para el estudio de adaptaciones en ambas especies. El cultivo *in vitro* ofrece la posibilidad de estudiar de forma comparada la respuesta de explantes a reguladores del crecimiento en condiciones altamente controladas. Se evaluaron combinaciones de reguladores de crecimiento thidiazuron (TDZ), bencil amino purina (BAP), ácido naftalenacético (NAA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y Kinetina (KIN) en diferentes tipos de explantes para estudiar sus respuestas morfológicas y hacer una relación con la tolerancia al estrés y capacidad adaptativa (plasticidad fenotípica) en *H. ocamponis* y *H. triangularis*. Los explantes de *H. triangularis* mostraron un mayor rango dinámico de respuesta a los tratamientos, especialmente durante la formación de cladodios y callos; la mejor formación de brotes (1,5 por explante) y callos (0,75 por explante) fue al aplicar 0,5 µl de TDZ con 0,5 µl de NAA. Los explantes de *H. ocamponis* mostraron casi siempre una inhibición ante los tratamientos y la mejor respuesta fue a la formación de raíces (1,43 por explante con 5 µl de BAP) lo que puede estar directamente relacionado con su hábitat de procedencia. El cultivo *in vitro* resultó ser una metodología útil para el estudio de adaptaciones en especies con distribución ecológica contrastada y reveló una gran plasticidad en *H. triangularis* lo que concuerda con su capacidad de expansión de hábitat.

Palabras clave: *Caryophyllales*, *Cactaceae*, *Hylocereus ocamponis*, *Hylocereus triangularis*, cultivo *in vitro*, estrés abiótico, reguladores de crecimiento vegetal, plasticidad fenotípica en plantas.

ABSTRACT

Hylocereus ocamponis and *Hylocereus triangularis* are two phylogenetically closely-related cacti species that show completely different growth habits. The first species occurs in dry ecosystems while the second one grows in the tropical rainforest, in dry forest western and the amazonic region Ecuadorian. In this work, *in vitro* culture was used as platform to study adaptations in both species. *In vitro* culture offers the possibility to compare responses to growth regulators under highly controlled conditions. Combinations of growth regulators (TDZ, BAP, NAA, 2,4-D and KIN) were evaluated in different types of explants to study their morphogenetic responses and make a connection with stress tolerance and adaptive capacity (phenotypic plasticity) in *H. ocamponis* and *H. triangularis*. *H. triangularis* showed a greater dynamic range of responses to the assayed treatments, especially during callus and cladode formation. Treatments produced in most cases an inhibition in *H. ocamponis* explants compared to the untreated control except during root induction, which can be directly related to its growing habits. *In vitro* culture proved to be a useful methodology to study adaptations in species with contrasting ecological distributions and revealed a great plasticity in *H. triangularis* that is consistent with its capacity to conquer new habitats.

Keywords: *in vitro* culture, stress, *Hylocereus*, growth regulators, plant phenotypic plasticity.

Introducción

La relación entre distribución geográfica, hábitos de crecimiento, adaptabilidad, supervivencia y conservación son temas aún no comprendidos a cabalidad en varias especies vegetales¹⁻³. Una de las razones que podría explicar este vacío en nuestro conocimiento es la lenta tasa de crecimiento de muchas plantas^{4,5} lo que impide estudiar sus adaptaciones *in situ*. Una alternativa para circunvalar esta limitación reside en estudiar las adaptaciones de especies de interés en condiciones *in vitro*. El cultivo *in vitro* ofrece la posibilidad de controlar y acelerar las condiciones de crecimiento en especies vegetales y se ha demostrado que es una herramienta que permite estudiar mecanismos adaptativos en plantas^{6,7}.

El empleo de métodos de cultivo *in vitro* para acelerar el crecimiento vegetal es particularmente atractivo en cactáceas, las cuales son ampliamente conocidas por su lento desarrollo en condiciones naturales. El crecimiento *in vitro* de cactáceas se acelera debido a la alta humedad relativa y alta concentración de azúcares que facilitan un incremento en el rango fotosintético⁸⁻¹⁰. Se ha comprobado que *Coryphantha minima*, una cactácea en peligro de extinción, creció 7 veces más rápido en condiciones *in vitro* que en su medio natural¹¹.

El cultivo *in vitro* se basa en el principio de la totipotencia celular, el cual establece que cualquier célula vegetal puede regenerar una planta completa⁸. Las técnicas de cultivo *in vitro* permiten estudiar procesos fisiológicos y bioquímicos que se dan en las plantas

¹ UUniversidad Técnica Particular de Loja, Departamento de Ciencias Biológicas. San Cayetano Alto, Apartado Postal 11-01-608, Loja, Ecuador.

Autor de correspondencia: momoreira@utpl.edu.ec

como respuesta a condiciones ambientales, nutricionales u hormonales. Estos procesos son determinados por varios factores como el tipo y tamaño del material vegetal, constitución genética, edad del órgano o tejido, estado fisiológico/sanitario, ubicación del explante dentro de la planta e incluso la forma en la que se coloque el explante en el medio de cultivo^{8,12,13}.

Es importante señalar que el cultivo *in vitro* como tal constituye una fuente de estrés para el material vegetal el cual debe adaptarse a las nuevas condiciones *in vitro*. El estrés se define como la exposición a condiciones ambientales potencialmente adversas (estresores) que alteran el crecimiento y desarrollo de una planta desencadenando una amplia gama de respuestas, que pueden ir desde una alteración de su expresión génica y del metabolismo celular a cambios en su crecimiento^{14,15}. Superada la fase de introducción *in vitro*, el material vegetal se expone a nuevas condiciones de desarrollo y por tanto de estrés, siendo una de las más comunes el uso de reguladores de crecimiento vegetal (auxinas, citoquininas, giberelinas, entre otros). Los reguladores de crecimiento promueven la diferenciación y desdiferenciación de tejidos mediante variados mecanismos entre los cuales está el control del ciclo celular, y además son conocidos por generar una diversidad de respuestas¹². Durante el cultivo *in vitro* se pueden observar otros fenómenos no deseados como la hiperhidricidad que es inducida principalmente por las citoquininas^{16,17} o procesos de fenolización, desarrollo radicular anormal e ineficiente o mal formación de brotes como respuesta al estrés^{18,19}. La respuesta observada dependerá en gran medida del tipo de explante los cuales varían significativamente entre sí.

Aunque en principio cualquier tejido u órgano de la planta puede ser utilizado como explante de inicio para la introducción *in vitro*, de éste, en gran parte, va a depender el proceso de diferenciación y propagación y por ende la calidad de sus propágulos. En el caso de las Cactáceas, dada su particularidad de formas, se emplean explantes que contengan areolas, con cortes en partes basales, medias o apicales en las cuales se evalúan condiciones óptimas para activar respuestas morfogenéticas^{20,21}. A partir de estos explantes, el cultivo *in vitro* en cactáceas se ha utilizado como una alternativa a la propagación tradicional por semillas ya que estas pueden presentar bajos rangos de germinación¹³. El comportamiento que tienen las cactáceas frente a los reguladores de crecimiento es particularmente variable entre especies. Varios autores sostienen que estas diferencias no son debidas a variaciones en los niveles endógenos hormonales entre especies, ya que las cactáceas de forma general presentan altos niveles endógenos de auxinas y de citoquininas²²⁻²⁶. Esto sugiere que la variabilidad de respuesta a condiciones *in vitro* entre especies se deba fundamentalmente a otros factores genéticos, no relacionados con la expresión de genes que participan en la síntesis de hormonas endógenas, y epigenéticos. Estos últimos son indicadores directos de diferencias en adaptaciones a niveles de estrés entre especies²⁷.

Se conoce que las respuestas de las especies vegetales a las condiciones de cultivo *in vitro* dependen de su genotipo²². Las células vegetales que entran al proceso de desdiferenciación *in vitro*, borran una parte de sus marcas epigenéticas (modificaciones del ADN como la metilación que determinan el estado de expresión de varios genes) para recuperar su totipotencia²⁸. Es por ello que las diferencias en la capacidad regenerativa entre genotipos pudiera deberse a la rapidez o facilidad con que las marcas epigenéticas se borran o reprograman²⁹. Adicionalmente las plantas pueden tener una memoria de estrés en su cromatina, probablemente característica de las condiciones que enfrentan en su hábitat natural y que influye en las reacciones de la célula y su desarrollo^{18,30}.

En el presente trabajo se estudiaron adaptaciones en dos especies de cactáceas del género *Hylocereus* las cuales se encuentran naturalmente distribuidas en dos regiones tropicales y subtropicales³¹. La particularidad de estas especies es que a pesar de su cercanía genética difieren considerablemente en su hábitat natural. Mientras que *H. triangularis* se encuentra en bosques húmedos de la amazonía con precipitaciones sobre los 2000 mm anuales³², *H. ocampionis* se encuentra en bosques secos que no so-

brepan los 600 mm anuales³³. Morfológicamente *H. ocampionis* es más globosa que *H. triangularis*, y es similar a otras especies de hábitats cálidos y secos que presentan mayor globosidad³⁴. Aunque no se han encontrado reportes que comparen la generación de raíces en estas dos especies, este puede ser distinto dado que una especie vive en un ambiente hidromórfico y la otra en un xeromórfico³⁵.

El conocimiento de la capacidad adaptativa y formas de desarrollo en base a su hábitat natural en especies de *Hylocereus* permitirían plantear estrategias de manejo y conservación de estas especies. Ello es particularmente importante en el caso de *H. ocampionis* que se encuentra con un alto nivel de riesgo en sus poblaciones³⁶. Para generar conocimiento sobre el potencial adaptativo y plasticidad en *H. ocampionis* y *H. triangularis* se utilizó el cultivo *in vitro* como plataforma de estudio ya que permite someter a estas especies ante los mismos tipos de estrés (reguladores del crecimiento) en un ambiente altamente controlado. La hipótesis de trabajo fue que la diferencia entre las respuestas de los explantes de ambas especies ante un mismo estrés será proporcional a su capacidad adaptativa para acomodar dicho estrés. Es conocido que para tolerar el estrés las plantas activan mecanismos fisiológicos que les permitan, bajo esas condiciones, adaptarse o morir^{37,38}. El éxito de estos mecanismos podría depender de su genotipo, de su plasticidad epigenética y de la historia evolutiva que han seguido para adaptarse al hábitat del cual provienen. Considerando la cercanía filogenética de las dos especies estudiadas^{39,40}, lo cual impone una similitud en su genotipo y por ende en su plasticidad epigenética, las diferencias en sus respuestas al estrés *in vitro* podrían relacionarse de forma directa a adaptaciones en sus hábitats contrastados.

Métodos

Desinfección y siembra de semillas

Semillas de *H. triangularis* e *H. ocampionis* se introdujeron en condiciones *in vitro* para obtener el material de partida. La importancia de trabajar con semillas es porque toleran los tratamientos de desinfección a diferencia de los cladodios de cactáceas que en sus areolas tienen gran cantidad de esporas de hongos⁴¹⁻⁴⁴. Las semillas se desinfectaron con 200 ml de agua destilada esterilizada con cinco gotas de jabón, seguido de etanol al 70% por 30 segundos y cloro al 1% por 10min, cada paso fue alternado con enjuagues de agua destilada esterilizada. Una vez sembradas en medio semisólido con 2,5g/L de nitrofoska foliar, con 7 g/l de agar, 20 g de sacarosa y pH de 5.80 ± 0.02, se mantuvieron a 25°C con fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, hasta obtener plántulas mayores a 2 cm de largo y de ellas obtener explantos.

Obtención y siembra de explantes

Previas separaciones de las raíces formadas de cada plántula de dos centímetros se obtuvieron explantos de 0.5 cm, considerando cuatro tipos de explante; apical (A), medio apical (MA), medio basal (MB) y basal (B). En plántulas mayores a dos centímetros se aplicó el mismo proceso de división en 4 partes. Cada tipo de explante fue sembrado en medio con reguladores de crecimiento y el testigo. El control fue un medio Murashige & Skoog (1962), MS sin reguladores de crecimiento y con cada uno de los tipos de explante.

Para todos los tratamientos de desarrollo *in vitro* de los cladodios se utilizó el medio MS⁴⁵ semisólido con 7 g/l de agar, 20 g de azúcar y pH 5.80 ± 0.02 ajustado con soluciones de NaOH 1N o HCl 1N, y autoclavado a una presión de 1 kg/cm² y temperatura de 120°C por 20 minutos. En cada frasco se puso aproximadamente 25 ml de medio. A este medio se le adicionaron diferentes reguladores de crecimiento constituyendo los tratamientos aplicados. Se utilizaron 2 citoquininas Thidiazuron, TDZ (0,1 y 0,5 µM) y Bencil amino purina, BAP (1 y 5 µM) solas o combinadas

con ácido naftalenacético, NAA 0,5 μM ⁴⁶⁻⁴⁸ y como medio inductor de callos se utilizó ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2,4 D 9 μM + Kinetina, KIN 4,6 μM ⁴⁹. Ver en la tabla 1 todos los tratamientos aplicados. Los ensayos se mantuvieron a 25°C con fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

Diseño y análisis de datos.

De cada tratamiento se hicieron 2 repeticiones en cada una de las especies de *Hylocereus*. Una repetición consta de 5 frascos. En cada frasco 4 explantes de 0.5 cm (sub-muestras). Los datos de brotación, enraizamiento y formación de callos se tomaron a los 45 días. Se consideraron el porcentaje de explantes que responden por tratamiento y tipo de explante utilizado (apical, medio apical, medio basal y basal). Los explantes se asignaron a cada tratamiento de forma completamente aleatoria y así mismo los tratamientos se realizaron con un diseño completamente aleatorio.

Para representar la formación de cladodios, raíces y callos se utilizaron plots del programa R GNUR versión R-3.2.1⁵⁰. Cada barra simboliza el promedio de cada respuesta (40 réplicas), a la cual se restó el promedio del tratamiento control de su especie correspondiente (40 réplicas). Con ello se obtuvo la desviación de cada tratamiento, el cual indica el efecto que tiene el tratamiento sobre cada respuesta. El tratamiento control al formar naturalmente brotes y raíces sirvió como modelo para evaluar el estrés al que están sometidos los explantes expuestos a diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento.

Resultados

En ambas especies los cladodios se obtuvieron a partir de plántulas desarrolladas de semillas. El tratamiento de desinfección fue exitoso ya que la contaminación no superó el 5% en ninguna de las dos especies. Tanto *H. ocamponis* como *H. triangularis* presentaron alta variación en la capacidad de respuesta de sus explantes para formar brotes, raíces y/o callos. Solo en tres de los diez tratamientos ensayados en *H. ocamponis* se logró una respuesta que alcanzara el 80% de sus explantes. En el caso de *H. triangularis* esto ocurrió en seis tratamientos (Tabla 1).

Los explantes de *H. triangularis* responden de manera general en mayor proporción que los de *H. ocamponis*. El necrosamiento fue mayor en *H. ocamponis*.

	Concentraciones en μM				<i>H. ocamponis</i>		<i>H. triangularis</i>	
	TDZ	BAP	NAA	2,4-D	KIN	%	%	%
TRATAMIENTOS EN MEDIO MS	—	—	—	—	—	59.5	72.3	
	—	—	0.5	—	—	56.5	85.9	
	0.1	—	—	—	—	43.3	85	
	0.1	—	0.5	—	—	53.3	83.6	
	0.5	—	—	—	—	44.5	74.5	
	0.5	—	0.5	—	—	50.5	91.4	
	—	1	—	—	—	67.8	60.5	
	—	1	0.5	—	—	69.8	81.4	
	—	5	—	—	—	81	59.1	
	—	5	0.5	—	—	86.5	83.6	
TIPO DE EXPLANTE	—	—	—	9	4.6	98.3	59.1	
	BASAL					55.7	69.4	
	MEDIO BASAL					61	74.4	
	MEDIO APICAL					67.5	77.9	
ESPECIES	APICAL					74.3	82.5	
						64.61	76	

Tabla 1: Porcentaje de respuestas presentadas según el Tratamiento, Tipo de Explante y la Especie, a los 45 días de experimentación. La tabla indica el porcentaje de explantes que presentó algún tipo de respuesta (cladodio, raíz o callo) en función del tratamiento, el tipo de explante y de forma general la especie de origen. Cada fila indica el tratamiento utilizado, en la cual puede estar el regulador de crecimiento vegetal solo o combinado con otro. El guion representa la ausencia de un regulador.

Respuesta in vitro según el origen del explante.

En ambas especies de *Hylocereus* el explante apical fue el que mejor respondió frente a todos los tratamientos (Tabla 1). La formación de raíces presentada en el explante apical fue significativamente mejor que la del resto de explantes, mientras que en formación de cladodios (brotes) y callos no se observaron diferencias significativas. Todos los resultados que se presentan a partir de esta sección se refieren a la respuesta de explantes apicales para ambas especies.

Formación de raíces por explante en las especies estudiadas.

En la mayoría de las respuestas a los tratamientos se observó una inhibición en formación de raíces a excepción de los tratamientos con 5 μM BAP sólo o combinado con 0.5 μM NAA en *H. ocamponis*, y de los tratamientos con 0.5 μM NAA, 0.1 μM TDZ sólo o combinado con 0.5 μM NAA en *H. triangularis*. Al usar 5 μM BAP sólo se obtuvo una media de 1,43 raíces por explante y combinado una media de 1,36 ambas con $p < 0,001$ en *H. ocamponis*, mientras que en *H. triangularis* al aplicar 0.5 μM NAA se obtuvo una media de raíces por explante de 1,26 con $p < 0,012$. El tratamiento con 5 μM BAP provocó la mayor diferencia en cuanto a la formación de raíces entre las dos especies (Figura 1a). Ello se debe a que en *H. ocamponis* fue el tratamiento que más enraizamiento provocó, mientras que en *H. triangularis* fue uno de los que ocasionó mayor inhibición en formación de raíces respecto al control. De igual manera la respuesta al tratamiento con 0.5 μM NAA mostró una alta diferencia entre las dos especies, pero en este caso de una forma contraria: formación en *H. triangularis* (Figura 1b) e inhibición en *H. ocamponis* con relación a sus respectivos controles.

En *H. ocamponis* el BAP en alta concentración influyó mejor que el TDZ sobre la formación de raíces. En *H. triangularis* bajas concentraciones de TDZ o BAP solas y combinadas generan mayor cantidad de raíces que altas concentraciones de los mismos reguladores. La mayor formación de raíces en *H. triangularis* se logró con el tratamiento de 0.5 μM NAA.

En ambas especies se observaron conjuntos de pelillos radiculares, los cuales estaban distribuidos a lo largo de las raicillas. La formación de pelillos fue mayor en *H. ocamponis*, siendo el control (Figura 2) el que presentó mayor formación seguido de los tratamientos con BAP. Mientras que en *H. triangularis* se observaron en los tratamientos control y con 0.1 μM TDZ.

La longitud de las raíces en función de los tratamientos (datos no presentados) mostró de forma general el mismo patrón que el de formación de raíces en ambas especies. Sin embargo, en *H. ocamponis* el tratamiento con 5 μM BAP+ 0.5 μM NAA tuvo mayor crecimiento de sus raíces, en contraste con el tratamiento de 5 μM BAP que fue la que mayor formación de raíces indujo en *H. ocamponis*. De igual manera, se observó que el BAP genera mayor crecimiento en las raíces de *H. ocamponis* que el TDZ, mientras que en *H. triangularis* el TDZ genera mayor crecimiento que el BAP. Sin embargo, en *H. triangularis*, se observó que altas concentraciones de TDZ influyen negativamente sobre el crecimiento de sus raíces y si está combinado con NAA disminuye aún más su crecimiento.

Formación de callos a partir de explantes en las especies estudiadas.

No todos los tratamientos estimularon la formación de callos en las especies estudiadas. Sin embargo, tal y como se esperaba, la mayor inducción de callos en las dos especies fue con 9 μM 2,4D + 4.6 μM KIN, con 0,64 y 0,51 callos por explantes en *H. triangularis* e *H. ocamponis*, respectivamente y en ambos casos con $p < 0,001$. Sin embargo, los callos se observaron de forma general en mayor cantidad en *H. triangularis*. El tratamiento que indujo la respuesta con mayor contraste para la formación de callos entre las especies fue el de 0.5 μM TDZ + 0.5 μM NAA. Al igual que en el crecimiento de raíces, los tratamientos con 5 μM

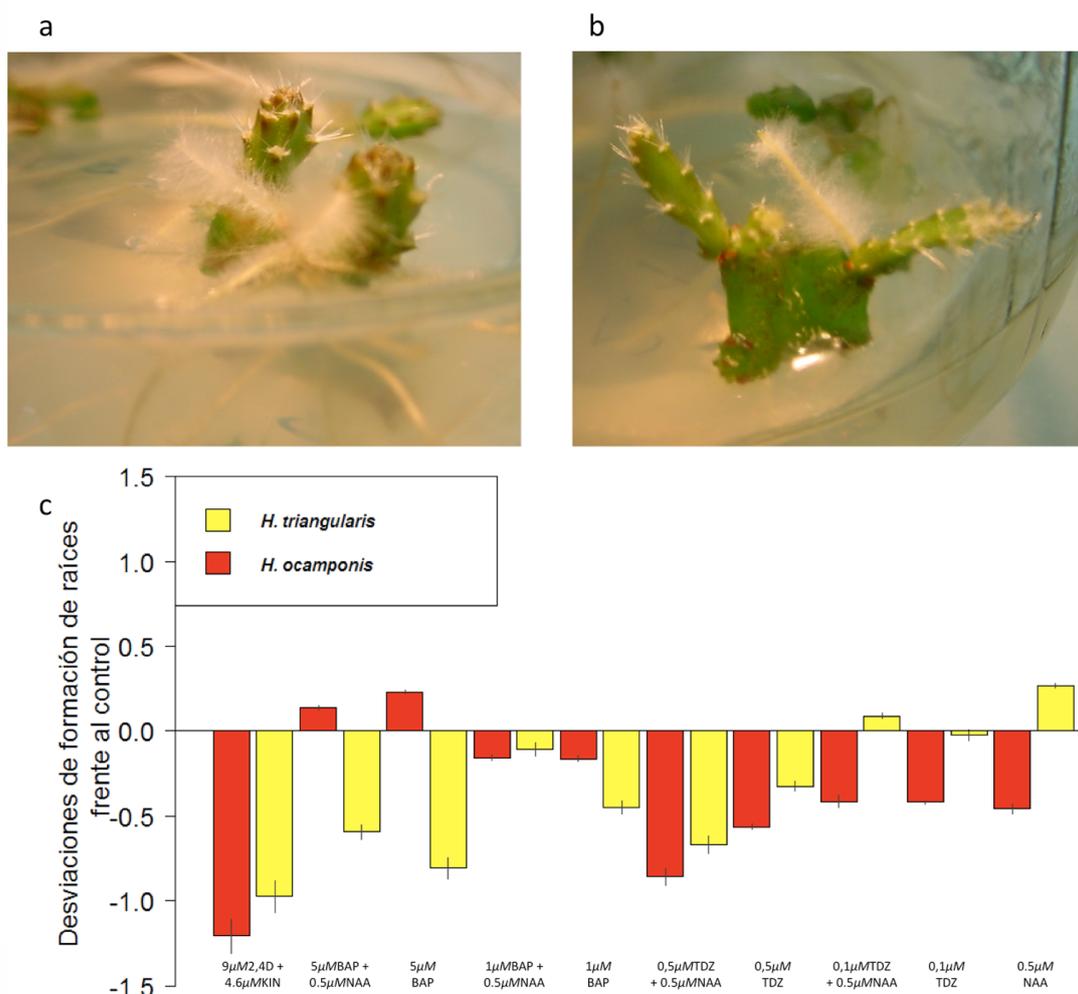


Fig. 1. Formación de raíces por explanto *in vitro* en las dos especies de *Hylocereus*. a. Enraizamiento de *H. ocamponis* con el tratamiento 5 µM BAP. b. Enraizamiento de *H. triangularis* con el tratamiento 0.5 µM NAA. c. Desviaciones de la formación de raíces frente al control. La amplitud de las barras en el eje Y representa la desviación en el número de raíces formadas de ambas especies respecto a sus respectivos controles. Las desviaciones se obtuvieron al restar el valor medio de raíces por explante del control del valor medio de raíces por explante de cada tratamiento (eje X). La media del número de raíces por explante del control fue de 0.98 ± 0.09 y 1.21 ± 0.11 , en *H. triangularis* y *H. ocamponis*, respectivamente. Los errores estándar se muestran en función de las mediciones de los tratamientos sobre cada barra. El tratamiento con 9 µM 2,4D + 4.6 µM KIN no presenta error estándar puesto que no hubo ninguna respuesta de enraizamiento en ambas especies, por tanto, las barras representan el valor de los controles en el sentido negativo.

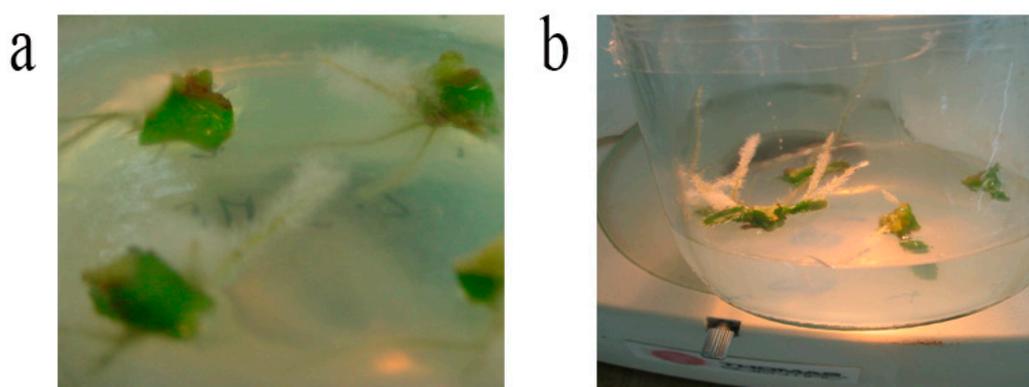


Fig. 2. Formación de pelillos radicales en los tratamientos control de ambas especies de *Hylocereus* a. *H. ocamponis* b. *H. triangularis*.

BAP y 5 µM BAP + 0.5 µM NAA también indujeron respuestas contrastadas (Figura 3).

La mayoría de callos en ambas especies fueron de aspecto transparente, sin embargo, se observaron otros de color verde amarillento los cuales podrían ser más viables³¹. En pocos casos se observaron explantos con aparente hiperhidricidad. La mayoría de callos tenían apariencia granular no friable, es decir no se desmenuza fácilmente, similar a lo observado en *Ananas*⁵².

Formación de cladodios o brotes a partir de explantes en las especies estudiadas.

La mayoría de tratamientos tuvo un efecto inhibitorio para la formación de cladodios. Aquí es importante resaltar que para aquellos tratamientos que tuvieron un efecto estimulador, dicho efecto fue mucho mayor para *H. triangularis* presentando mayor cantidad de cladodios (Figura 4). Al usar 0.5 µM TDZ + 0.5 µM NAA se obtuvo una media de 1,5 cladodios por explante con $p < 0,001$ en *H. triangularis*; mientras que en *H. ocamponis* la mejor

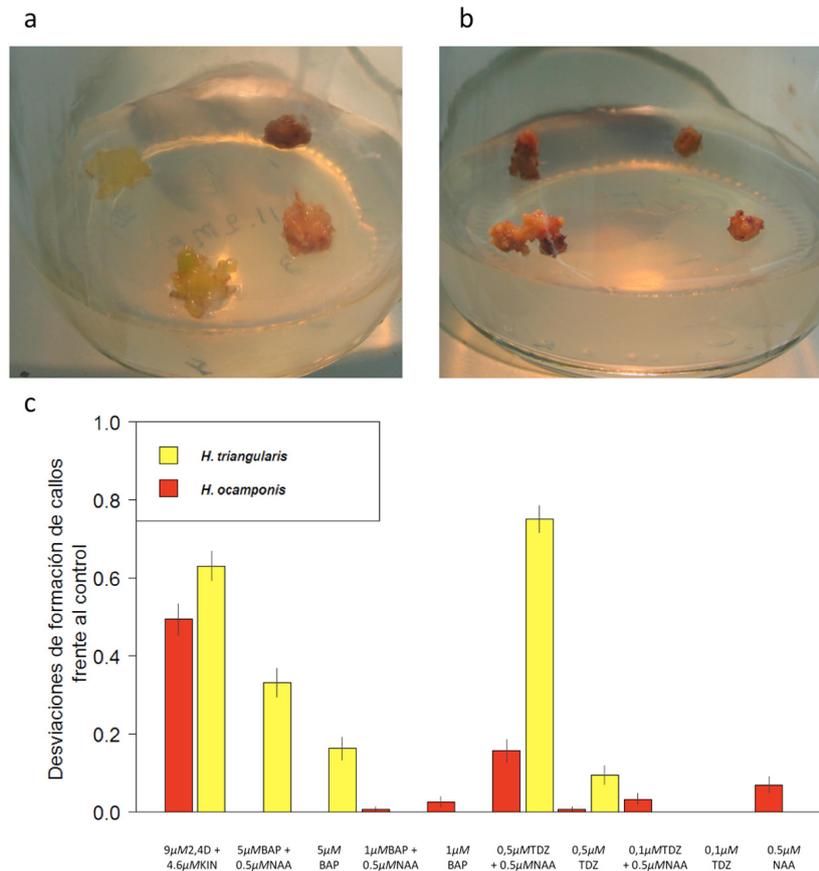


Fig. 3. Formación de callos *in vitro* en las dos especies de *Hylocereus*. a. Callos formados en *H. ocamponis* con el tratamiento 9 μM 2,4D + 4.6 μM KIN. b. Callos formados en *H. triangularis* con el tratamiento 9 μM 2,4D + 4.6 μM KIN. c. Desviaciones de la formación de callos de ambas especies frente al control. La amplitud de las barras en el eje Y representa la desviación en el número de callos formados de ambas especies respecto a sus respectivos controles. Las desviaciones se obtuvieron al restar el valor medio de los explantos transformados en callos del control del valor medio de los explantos transformados en callos de cada tratamiento (eje X). La media de formación de callos del control fue de 0 en ambas especies. Los errores estándar se muestran en función de las mediciones de los tratamientos sobre cada barra. La ausencia de barras es porque no hubo formación de callos en ese tratamiento. Dado que el tratamiento control no presentó callos todos los tratamientos provocan una respuesta nula o en el sentido positivo, pero nunca en el sentido negativo del eje Y.

respuesta fue 5 μM BAP con una media de 0,48 cladodios por explante con $p < 0,001$. El tratamiento que presentó el mayor contraste fue 0.5 μM TDZ + 0.5 μM NAA, en este tratamiento se presentó mayor cantidad de macizos de proliferación de brotes.

Algunos explantos tomaron una coloración marrón (Figura 5a), la cual se debe a la oxidación de compuestos fenólicos en las áreas donde se cortaron los explantos y no afecta su producción de brotes⁵³. En *H. ocamponis* se observaron brotes de color rosado (Figura 5b), lo cual también ha sido reportado en otras cactáceas⁵⁴, aparentemente podrían ser betacianinas⁵⁵. También se observó que un alto número de explantos de ambas especies al ser cortados formaron una capa protectora que cubría el sitio donde se realizó el corte. Ésta capa es un polisacárido particular viscoso, el cual ha sido observado en otras especies en condiciones naturales, considerándolo como una adaptación de los cactus para colmatar y sellar rápidamente los tejidos dañados y evitar la pérdida de agua por evaporación, y de esta manera permite sobrevivir a la planta por largos periodos de tiempo⁵⁶.

DISCUSIÓN

De manera general se observa un alto contraste en las respuestas de inducción de estructuras (raíces, callos y brotes) con respecto al control de cada especie, observándose que *H. triangularis* tiene más respuestas positivas que *H. ocamponis*. Los resultados contrastantes observados en la respuesta *in vitro* entre *H. triangularis* y *H. ocamponis* pudieran deberse a sus adaptaciones ecológicas, las cuales también son contrastantes ya que *H. ocamponis* proviene de bosque seco y *H. triangularis* de bosque húmedo.

La concentración 5 μM BAP es quizás la que mayor número de respuestas contrastantes provoca entre las dos especies para todas las estructuras analizadas. En *H. triangularis* la respuesta es positiva para la formación de callos, es decir tiene mayor inducción de esa estructura respecto a su control. En *H. ocamponis* en cambio la respuesta es positiva para la formación de brotes y crecimiento de raíces. El BAP incrementa el número de replicaciones durante la fase S del ciclo celular y por ello tiene un buen efecto sobre la brotación y elongación, pero puede inhibir la metilación del ADN⁵⁷⁻⁵⁹. La metilación puede provocar alteraciones en la transcripción genética sin alterar la secuencia del ADN (modificaciones epigenéticas) y es un mecanismo responsable de la plasticidad fenotípica. Es bien conocido que el grado de metilación del ADN está relacionado con la respuesta de las plantas al estrés y funciona como mecanismo de protección del ADN²⁷. El hecho de que el BAP produzca una respuesta contrastada en ambas especies unido a su relación con los niveles de metilación de ADN, confirma el hecho de que los niveles de estrés a los cuales *H. ocamponis* y *H. triangularis* están expuestas son bien diferentes.

Otro de los contrastes en respuesta *in vitro* se evidenció frente al tratamiento con 0.1 μM TDZ + 0.5 μM NAA. Este tratamiento produce una respuesta positiva en *H. triangularis* al formar cladodios y raíces, mientras que inhibe la formación de estas estructuras respecto al control en *H. ocamponis*. El TDZ es un potente generador de estrés en las plantas y las obliga a modificar procesos metabólicos para poder sobrevivir⁶⁰⁻⁶². Esa adaptación está determinada por la capacidad de las células de reiniciar su programa genético y epigenético con el fin de soportar el ambiente hormonal²⁸. La forma de actuar del TDZ en los procesos de re-

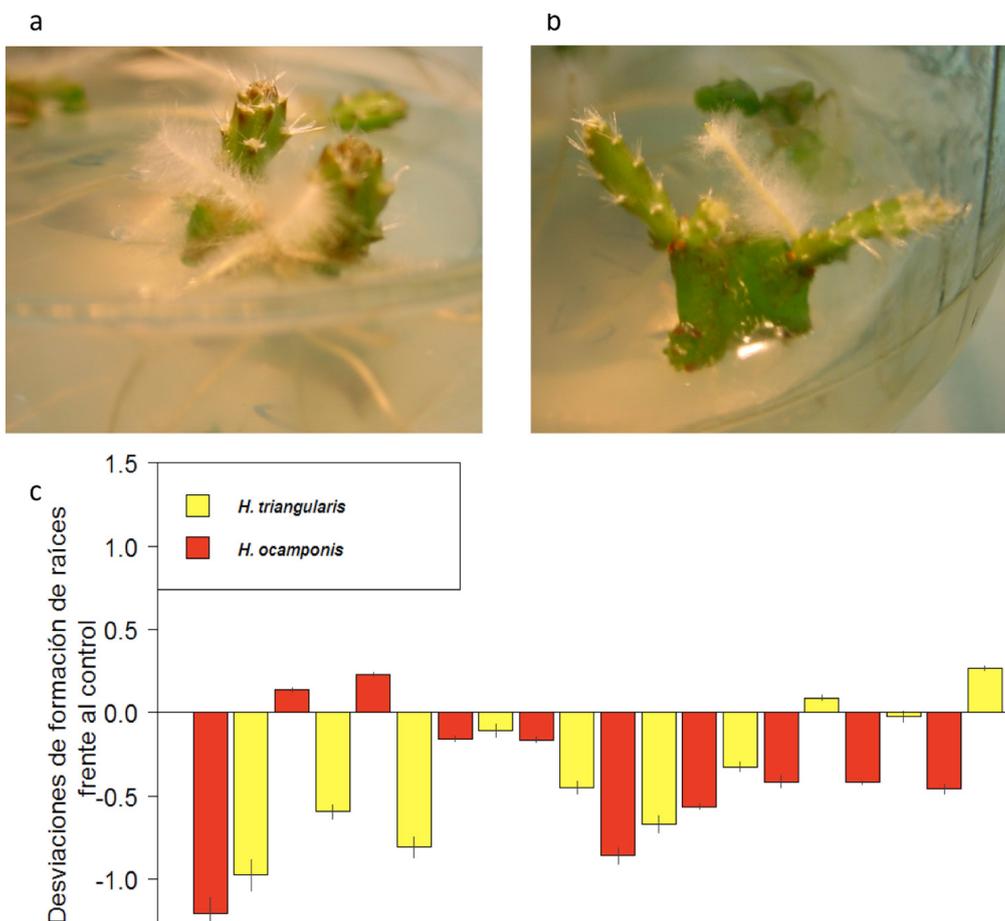


Fig. 4. Formación de cladodios por explante *in vitro* en las dos especies de *Hylocereus*. a. Formación de cladodios de *H. ocamponis* con el tratamiento 5 μ M BAP. b. Formación de cladodios de *H. triangularis* con el tratamiento 0.5 μ M TDZ + 0.5 μ M NAA. c. Desviaciones de la formación de cladodios frente al control. La amplitud de las barras en el eje Y representa la desviación en el número de cladodios formados de ambas especies respecto a sus respectivos controles. Las desviaciones se obtuvieron al restar el valor medio de cladodios formados por explante del control del valor medio de cladodios formados por explante de cada tratamiento (eje X). La media del número de cladodios por explante del control fue de 0.41 ± 0.07 y 0.35 ± 0.07 , en *H. triangularis* y *H. ocamponis*, respectivamente. Los errores estándar se muestran en función de las mediciones de los tratamientos sobre cada barra.

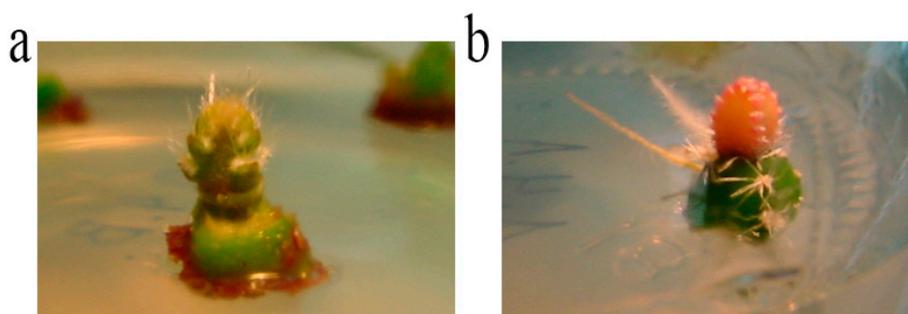


Fig. 5. Cambios de coloración en explantos durante el proceso de brotación. a. Coloración marrón en *H. triangularis* con 5 μ M BAP+NAA. b. Coloración rosada del nuevo cladodio de *H. ocamponis*, tratamiento control.

generación es promoviendo la acumulación de iones minerales³⁷, y de esta manera lo predispone al tejido a adaptarse a las condiciones en las que se encuentra. Se sabe además que el TDZ es un inductor de variabilidad genética⁶³, y que a pesar de ser producto sintético, pudiera ser beneficioso, en condiciones controladas, para *H. triangularis* que es una especie con tendencia a expandir su hábitat. *H. ocamponis* por el contrario es una especie que vive al límite, que presenta una serie de adaptaciones que le permiten sobrevivir en un ambiente mucho más adverso que el de *H. triangularis* y para la cual pudiera ser contraproducente generar individuos con tal variabilidad que pusiera en riesgo su adaptación.

H. triangularis presentó mejores resultados de formación de callos y brotes mostrando mayor plasticidad y adaptabilidad a las condiciones *in vitro* que *H. ocamponis*. Estos resultados son consistentes con la mayor capacidad explorativa y tendencia a exten-

sión de su hábitat que se ha visto en *H. triangularis*. Esa mayor capacidad explorativa de *H. triangularis* se puede relacionar con su predisposición para el aumento de variabilidad genética lo cual se alinea con la propensión observada en esta especie para la formación de callos. Se sabe que los callos se caracterizan por tener mayor variabilidad genética^{8,64}. La rápida y mayoritaria formación de brotes también es un indicador de la capacidad de adaptación y plasticidad de *H. triangularis*. La formación de brotes es indispensable para la colonización de ecosistemas, comportamiento natural en poblaciones naturales de *H. triangularis*⁶⁵. Además, las respuestas de especies de un mismo género en condiciones *in vitro* pueden variar como un reflejo de su normal rango de crecimiento en sus condiciones naturales⁶⁶.

Los procesos de diferenciación son particulares de cada especie y pueden depender más del hábitat del que provienen que

del balance de auxinas y citoquininas⁶⁷, es más, el hábitat afecta los procesos de biosíntesis, metabolismo y transporte de auxinas y citoquininas⁶⁸⁻⁷⁰. Es así que las condiciones ambientales del hábitat pueden conducir a una mayor flexibilidad genómica incluso en las generaciones sucesivas, y pueden aumentar el potencial de adaptación de las especies⁷¹, morfológica, fisiológica y bioquímicamente^{6,72}. Un ejemplo de esas adaptaciones se da en algunas MAC (especies que tienen el metabolismo ácido de las crasuláceas), las cuales a su vez pueden ser MAC facultativas, es decir que pueden alternar con un tipo de fotosíntesis C3 cuando las condiciones de humedad son favorables⁷³. Esto se cumple en *H. triangularis*⁷⁴ y a su vez explica su mejor adaptación y crecimiento en condiciones *in vitro* que *H. ocamponis*.

La formación de raíces fue mayor en *H. ocamponis*, lo cual demuestra una mayor especialización, ya que es un comportamiento típico de especies de ecosistemas secos que están programadas genéticamente para formar una mayor masa radicular como estrategia de sobrevivencia^{56,75}. Esos procesos de enraizamiento también dependen de otros factores como reguladores de crecimiento, luz, temperatura^{76,77}, o el estrés hídrico, que reduce el contenido de citoquininas en la planta⁷⁸. Sin embargo es de considerar que en ambientes altamente estresantes la plasticidad de las especies es reducida⁷⁹. Esta reducción se explica porque en ambientes naturales el estrés induce procesos selectivos de combinaciones de rasgos que confieren mayor aptitud a ese medio a costo de disminución de la variación genética en las generaciones, llegando al punto de que las especies podrían perder la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales¹⁴. Esta reducción de la plasticidad podría estar presente en *H. ocamponis* y se refleja en su baja adaptabilidad *in vitro* frente a todos los tratamientos aplicados.

Una limitante del presente estudio es que no se analizaron los niveles endógenos de reguladores de crecimiento de cada una de las especies. Estos niveles endógenos varían en función de la especie³⁷. Las cactáceas son conocidas por la producción de niveles elevados de auxinas²⁶. Esta alta producción de auxinas es la explicación de que algunas cactáceas, como *Mammillaria gracilllis*, sean capaces de formar callos en condiciones *in vitro* sin necesidad de reguladores de crecimiento⁸⁰. Considerando que la formación de callos se produce con hormonas solas o combinando auxinas y citoquininas, podríamos asumir que la concentración endógena de citoquininas también es elevada. Los elevados niveles endógenos de reguladores de crecimiento explicarían como bajos niveles de auxinas o de citoquininas exógenos incrementan la producción de brotes axilares y raíces en *H. triangularis*^{25,81}. Las respuestas contrastadas que se describen en el presente trabajo frente a las mismas concentraciones exógenas de reguladores de crecimiento en ambas especies pudiera bien deberse a diferencias en sus niveles endógenos. Sin embargo, este supuesto no invalida las conclusiones a las que hemos podido llegar sobre sus procesos adaptativos.

Aunque el papel de los reguladores de crecimiento depende de muchos factores como su concentración, tipo entre otros, es posible que las diferencias en las poblaciones tanto en la producción como en la sensibilidad a diferentes hormonas vegetales pueda contribuir a generar los diferentes patrones de la respuesta plástica en las plantas, por lo que el estudio de poblaciones ecológicamente distintas puede ayudar a proveer información invaluable acerca de los mecanismos más próximos de sus respuestas plásticas⁸². Por tanto la plasticidad observada en *H. triangularis* versus la especialización observada en *H. ocamponis* nos deja ver que *H. triangularis* al tener mayor plasticidad adaptativa puede ser más propensa a sobrevivir en condiciones ambientales nuevas y que sus poblaciones no estén comprometidas, esto es corroborado por⁸³ en su análisis de plasticidad fenotípica en plantas. Mientras que *H. ocamponis* al tener mayor especialización, sus poblaciones podrían estar comprometidas.

H. triangularis mostró mayor capacidad de respuesta frente

a todas las condiciones de estrés *in vitro* que *H. ocamponis*. Nuestros resultados resaltan el hecho de que las poblaciones naturales de *H. triangularis* pudieran tener una mayor capacidad expansiva y ser más tolerante a cambios ambientales. *H. ocamponis* al presentar poca capacidad de respuesta *in vitro* nos lleva a pensar en que sus poblaciones pueden estar comprometidas en cuanto a su supervivencia ante cambios ambientales. El cultivo *in vitro* resultó ser de gran utilidad para evaluar procesos adaptativos en las especies estudiadas.

Referencias bibliográficas

- López Soto JL, Ruiz Corral JA, Sánchez González J de J, Lépiz Idefonxo R. Adaptación climática de 25 especies de frijol silvestre (Phaseolus spp.) en la República Mexicana. Rev Fitotec Mex. 2005;28: 221-230.
- Bayuelo-Jimenez JS, Craig R, Lynch JP. Salinity tolerance of Phaseolus species during germination and early seedling growth. Crop Sci. 2002;42: 1584-1594.
- Kadam NN, Yin X, Bindrabn PS, Struik PC, Jagadish KS V, Rice I, et al. Does morphological and anatomical plasticity during the vegetative stage make wheat more tolerant of water deficit stress than rice? Plant Physiol. 2015;167: 1389-1401. doi:10.1104/pp.114.253328
- Sun Y, Shen Y, Li A, Fu W, Wang Y, Ying Q, et al. Ectopic expression of Dendrobium EREB5 gene in Arabidopsis influences leaf morphology. Vitro Cell Dev Biol - Plant. 2014;50: 425-435. doi:10.1007/s11627-014-9604-6
- Dhar PC, Awal MA, Sultan MS, Rana MM, Sarker A. Interspecific competition, growth and productivity of maize and pea in intercropping mixture. Sci J Crop Sci. 2013;2: 136-143. doi:10.14196/sjcs.v2i10.974
- Cori P Di, Lucioli S, Frattarelli A, Nota P, Tel-Or E, Benyamini E, et al. Characterization of the response of in vitro cultured Myrtus communis L. plants to high concentrations of NaCl. Plant Physiol Biochem. 2013;73: 420-426.
- Boamponsem GA, Leung DWM. Use of compact and friable callus cultures to study adaptive morphological and biochemical responses of potato (Solanum tuberosum) to iron supply. Sci Hortic (Amsterdam). Elsevier B.V.; 2017;219: 161-172. doi:10.1016/j.scienta.2017.03.012
- George E, Hall M, De Klerk G-J. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Vol 1. The Background. Springer. 2008.
- Malda G, Backhaus RA, Martin C. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of in vitro cultured cactus. Plant Cell Tissue Organ Cult. 1999;58: 1-9.
- Elias-Rocha M, Santos-Díaz M, Arredondo-Gómez A. Propagation of Mammillaria candida (Cactaceae) by tissue culture techniques. Haseltonia. 1998;6: 96-101.
- Malda G, Suzán H, Backhaus R. In vitro culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. Sci Hortic (Amsterdam). 1999;81: 71-87.
- Farhadi N, Panahandeh J, Azar AM, Salte SA. Effects of explant type, growth regulators and light intensity on callus induction and plant regeneration in four ecotypes of Persian shallot (Allium hirtifolium). Sci Hortic (Amsterdam). Elsevier B.V.; 2017;218: 80-86. doi:10.1016/j.scienta.2016.11.056
- Pérez-Molphe-Balch E, Santos-Díaz MDS. Tissue culture of ornamental cacti. Sci Agric. 2015;72: 471-563. doi:10.1590/0103-9016-2015-0012
- Grativol C, Hemerly AS, Ferreira PCG. Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. Biochim Biophys Acta. 2011;1819: 176-85. doi:10.1016/j.bbagr.2011.08.010
- Kacperska A. Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? Physiol Plant. 2004;122: 159-168. doi:10.1111/j.0031-9317.2004.00388.x
- Kataeva N, Alexandrova I, Butenko R, Dragavtceva E. Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured in vitro. Plant Cell Tissue Organ Cult. 1991;27: 149-154
- Vasconcelos A, Tomas LF, Camara TR, Willadino L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. Cienc Rural. 2012;42: 837-844.
- Ruffoni B, Savona M. Physiological and biochemical analysis of

- growth abnormalities associated with plant tissue culture. *Hortic Environ Biotechnol.* 2013;54: 191–205. doi:10.1007/s13580-013-0009-y
19. Cassells AC, Curry RF. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2001;64: 145–157.
 20. Dabekaussen M, Pierik R, Van der Laken J, Hoek Spaans J. Factors affecting the areole activation in vitro in the cactus *Sulcorebutia alba* Raush. *Sci Hortic (Amsterdam).* 1991;46: 283–294.
 21. Gomes FLAF, Heredia FF, Silva PBE, Facó O, Campos FDADP. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *Sci Hortic (Amsterdam).* 2006;108: 15–21. doi:10.1016/j.scienta.2005.12.007
 22. Arellano-Perusquía A, López-Peralta M, Chablé-Moreno F, Estrada-Luna A. Effect of growth regulators on the organogenesis and multiplication of *Ortegocactus macdougalii* Alexander. *Propag Ornament Plants.* 2013;13: 160–167.
 23. Vidican I. Studiens on the influence of acid concentration-B indolilbutiric (IBA) on regenerative capacity and organogenesis of explants of *Opuntia* (Tournef.) Mill. *fragilis* var. *fragilis*. *J Analele.* 2012;19: 312–319.
 24. Sriskandarajah S, Prinsen E, Motyka V, Dobrev P, Serek M. Regenerative capacity of cacti *Schlumbergera* and *Rhipsalidopsis* in relation to endogenous phytohormones cytokinin oxidase/dehydrogenase, and peroxidase activities. *J Plant Growth Regul.* 2006;25: 79–88.
 25. Rubluo A, Marín-Hernández T, Duval K, Vargas A, Márquez-Guzmán J. Auxin induced morphogenetic responses in long-term in vitro subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sa. *Sci Hortic (Amsterdam).* 2002;95: 341–349.
 26. Clayton PW, Hubstenberger JF, Phillips GC. Micropropagation of members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. *J Am Soc Hortic Sci.* 1990;115: 337–343.
 27. Peng H, Zhang J. Plant genomic DNA methylation in response to stresses: Potential applications and challenges in plant breeding. *Prog Nat Sci. National Natural Science Foundation of China and Chinese Academy of Sciences;* 2009;19: 1037–1045. doi:10.1016/j.pnsc.2008.10.014
 28. Neelakandan AK, Wang K. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Rep.* 2012;31: 597–620. doi:10.1007/s00299-011-1202-z
 29. Smulders MJM, de Klerk GJ. Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regul.* 2011;63: 137–146. doi:10.1007/s10725-010-9531-4
 30. Miguel C, Marum L. An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *J Exp Bot.* 2011;62: 3713–25. doi:10.1093/jxb/err155
 31. Britton N, Rose J. *The Cactaceae, Hylocereanae* Vol II. Dover, New York; 1963.
 32. Martínez Ruiz ER. Fenología y desarrollo de pitahaya (*Hylocereus undatus* Haw. Britt. & Rose) en la región central de Veracruz. Colegio de Postgraduados Montecillo. 2014.
 33. Aguirre Z, Kvist LP, Sánchez O. Bosques secos en Ecuador y su diversidad. *Botánica Económica los Andes Cent.* 2006;12: 162–187.
 34. Bauk K, Pérez R, Zeballos S, Peñas L, Flores J, Gurchich D. Are seed mass and seedling size and shape related to altitude? Evidence in *Gymnocalycium monvillei* (Lem.) Britton & Rose (Cactaceae). *Bot ja.* 2015;93: 529–533. doi:10.1139/cjb
 35. Ofori D, Newton A, Leakey R, Grace J. Vegetative propagation of *Milicia excelsa* by leaf stem cuttings: effects of auxin concentration, leaf area and rooting medium. *For Ecol Manage.* 1996;84: 39–48.
 36. UNEP-WCMC (Comps.). Index of CITES species. CITES. 2014.
 37. Touati A, Lachachi S, Yahia N, Fyad-Lameche F. In vitro variability of morphogenetic responses of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) explants under salt stress and thidiazuron as plant growth regulator. *J Appl Biol Sci.* 2015;9: 43–49.
 38. Rai MK, Kalia RK, Singh R, Gangola MP, Dhawan a. K. Developing stress tolerant plants through in vitro selection—An overview of the recent progress. *Environ Exp Bot.* 2011;71: 89–98. doi:10.1016/j.envexpbot.2010.10.021
 39. Cisneros A, Tel-Zur N. Evaluation of Interspecific-Interploid Hybrids (F1) and Back Crosses (BC1) in *Hylocereus* Species (Cactaceae). In: Swan A, editor. *Meiosis-Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity.* Rijeka, Croatia: In tech; 2012. p. 472.
 40. Tel-Zur N, Abbo S, Bar-Zvi D, Mizrahi Y. Genetic relationships among *Hylocereus* and *Selenicereus* Vine Cacti (Cactaceae): Evidence from Hybridization and Cytological Studies. *Ann Bot.* 2004;94: 527–534. doi:10.1093/aob/mchl183
 41. Perez-Molphe-Balch E, Perez-Reyes ME, Villalobos-Amador E, Meza-Rangel E, Morones L, Lizalde H. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *Vitr Cell Dev Biol - Plant.* 1998;34: 131–135.
 42. Santos-Díaz MDS, Mendez-Ontiveros R, Arredondo-Gómez A, Santos-Díaz M de L. In vitro organogenesis of *Peleciphora aselliformis* erhenberg (Cactaceae). *Vitr Cell Dev Biol - Plant.* 2003;39: 480–484.
 43. Dávila-Figueroa CA, Rosa-Carrillo M de L, Pérez-Molphe-Balch E. In vitro propagation of eight species or subspecies of *Turbiniacarpus* (Cactaceae). *Vitr Cell Dev Biol - Plant.* 2005;41: 540–545. doi:10.1079/IVP2005668
 44. Rojas-Arechiga M, Vázquez-Yanes C. Cactus seed germination: a review. *J Arid Environ.* 2000;44: 85–104.
 45. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco. *Phy.* 1962;15: 473–497.
 46. Mohamed-Yasseen Y. Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose). *Vitr Cell Dev Biol - Plant.* 2002;38: 427–429. doi:10.1079/IVP2002312
 47. Mohamed-Yasseen Y, Barringer S, Splittstoesser W. Rapid propagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and plant establishment in soil. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1995;42: 117–119.
 48. López-Gómez R, Díaz-Pérez J, Flores-Martínez G. Vegetative propagation of three species of Cacti: Pitaya (*Stenocereus griseus*), Tunillo (*Stenocereus stellatus*) an jiotilla (*Escontria chiotilla*). *Agrociencia.* 2000;34: 363–367.
 49. Bhau BS. Regeneration of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. (Cactaceae) from root explants. *Sci Hortic (Amsterdam).* 1999;81: 337–344.
 50. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-00051-07-0. URL <http://www.R-project.org>. 2015.
 51. Suárez R, Caetano C, Ramírez H, Morales J. Multiplicación de *Selenicereus megalanthus* (pitahaya amarilla) e *Hylocereus polyrhizus* (pitahaya roja) vía organogénesis somática. *Acta Agronómica.* 2014;63: 272–281.
 52. Pineda A, Vargas T, García E. Regeneración de *Ananas comosus* (L.) Merr, ecotipo TABÉ KÁNÁ, mediante organogénesis indirecta. *Bioagro.* 2014;26: 135–142.
 53. Dávila-Figueroa C, Perez Molphe Balch E. In vitro propagation of *Peleciphora aselliformis* ehrenberg and *P. strobiliformis* werdermann (Cactaceae). *Vitr Cell Dev Biol - Plant.* 2002;38: 73–78. doi:10.1079/IVP2001248
 54. Moebius-Goldammer KG, Mata-Rosas M, Chávez-Avila VM. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *Vitr Cell Dev Biol - Plant.* 2003;39: 388–393. doi:10.1079/IVP2003427
 55. Mosco A. Tissue localization of betacyanins in cactus stems. *Rev Mex Biodivers.* 2012;83: 413–420.
 56. Gibson A, Nobel P. *The cactus primer.* Harvard Un. Cambridge, Massachusetts; 1986.
 57. Siddiqui MW, Singh JP, Nayyer MA, Barman K, Ahmad MS, Kumar V. 6-Benzylaminopurine affects lipid peroxidation and membrane permeability and thereby preserves curd quality and antioxidants during storage of cauliflower. *Acta Physiol Plant.* Springer Berlin Heidelberg; 2015;37: 96–104. doi:10.1007/s11738-015-1848-1
 58. Wilson-García CY, Zavaleta-Mancera HA, López-Delgado H, Hernández-Garay A. La citocinina BAP retrasa senescencia, aumenta antioxidantes, proteína y crecimiento en el pasto ovillo (*Dactyloctenium aegyptium* L.). *Agrociencia.* 2008;42: 799–806.
 59. Pillay I, Railton I. Complete release of axillary buds from apical donance in htact, light-grown seedlings of *Pisum sativum* L. following a single application of cytokinin. *Plant Physiol.* 1983;71: 972–974.
 60. Guo B, Abbasi BH, Zeb A, Xu L, Wei Y. Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *African J Biotechnol.* 2011;10: 8984–9000. doi:10.5897/AJB11.636
 61. Murch S, KrishnaRaj S, Saxena P. Thidiazuron-induced morphogenesis of *Regal geranium* (*Pelargonium domesticum*): A potential stress response. *Physiol Plant.* 2006;101: 183–191.

62. Huetteman C, Preece J. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1993;33: 105–119.
63. Ramírez-Mosqueda M a., Iglesias-Andreu LG. Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2015; Publish on. doi:10.1007/s11240-015-0868-2
64. Pant N, Agrawal R, Agrawal S. Mannitol-induced drought stress on calli of *Trigonella foenum-graecum* L. Var. RMT-303. *Indian J Exp Biol.* 2014;52: 1128–1137.
65. Nogueira-Nunes E, Bezerra de Sousa AS, Marques de Lucena C, Silva S de M, Paiva de Lucena RF, Belarmino Alves CA, et al. *Pitaya* (*Hylocereus* sp.): Uma revisão para o Brasil. *Gaia Sci.* 2014;8: 90–98.
66. Pérez-Molphe-Balch E, Pérez-Reyes ME, De La Rosa-Carrillo M de L. In Vitro conservation of *Turbincarpus* (Cactaceae) under slow growth conditions. *BioOne Haseltonia.* 2012;17: 51–57.
67. Mauseth JD. Giant shoot apical meristems in cacti have ordinary leaf primordia but altered phyllotaxy and shoot diameter. *Ann Bot.* 2004;94: 145–53. doi:10.1093/aob/mch121
68. Han H, Zhang S, Sun X. A review on the molecular mechanism of plants rooting modulated by auxin. *African J Biotechnol.* 2009;8: 348–353.
69. Pierre-Jerome E, Moss BL, Nemhauser JL. Tuning the auxin transcriptional response. *J Exp Bot.* 2013;64: 2557–63. doi:10.1093/jxb/ert100
70. Frébort I, Kowalska M, Hluska T, Frébortová J, Galuszka P. Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J Exp Bot.* 2011;62: 2431–2452. doi:10.1093/jxb/err004
71. Molinier J, Ries G, Zipfel C, Hohn B. Transgeneration memory of stress in plants. *Nature.* 2006;442: 1046–1049. doi:10.1038/nature05022
72. Żróbek-Sokolnik A. Temperature stress and responses of plants. In: Ahmad P, Prasad MNV, editors. *Environmental adaptations and stress tolerance of Plants in the Era of Climate Change.* Springer S. New York, NY: Springer New York; 2012. pp. 113–134. doi:10.1007/978-1-4614-0815-4
73. Schulze J. Improvements in cereal tissue culture by thidiazuron: A review. *Fruit, Veg Cereal Sci Biotechnol.* 2007;1: 64–79.
74. Sánchez C, Fischer G, Wilson D. Stomatal behaviour in fruits and leaves of the purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) and fruits and cladodes of the yellow pitaya (*Hylocereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer). *Crop Agron.* 2013;31: 38–47.
75. Shiskova S, Moreno N, Castillo-Díaz V, Arellano J, Dubrovsky J. Variabilidad genotípica de cactáceas con crecimiento determinado de la raíz en la regeneración de raíces a partir de callos. *Zo Áridas.* 2006;10: 41–58.
76. Li S-W, Xue L. The interaction between H₂O₂ and NO, Ca²⁺, cGMP, and MAPKs during adventitious rooting in mung bean seedlings. *Vitr Cell Dev Biol - Plant.* 2010;46: 142–148. doi:10.1007/s11627-009-9275-x
77. Li S-W, Xue L, Xu S, Feng H, An L. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *Bot Rev.* 2009;75: 230–247. doi:10.1007/s12229-009-9029-9
78. Taiz L, Zeiger E. *Plant Cells.* Universita. 2006.
79. Valladares F, Gianoli E. Tansley review Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytol.* 2007;176: 749–763.
80. Poljuha D, Balen B, Bauer A, Ljubescic N, Krsnik-Rasol M. Morphology and ultrastructure of *Mammillaria gracillis* (Cactaceae) in in vitro culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2003;75: 117–123.
81. Papafotiou M, Balotis GN, Louka PT, Chronopoulos J. In vitro plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2001;65: 163–167.
82. Sultan SE. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends Plant Sci.* 2000;5: 537–542. doi:10.1016/S1360-1385(00)01797-0
83. Gratani L. Review Article Plant Phenotypic Plasticity in Response to Environmental Factors. *Adv Bot.* 2014; Article ID: 1–17. doi:dx.doi.org/10.1155/2014/208747

Recibido: 24 de mayo de 2017

Aprobado: 25 de julio de 2017