



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CÓRDOBA

PROGRAMA DE POSGRADO EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA  
SUSTENTABLE

## MICROPROPAGACIÓN DE PITAHAYA (*Hylocereus undatus*) EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL

ING. MARÍA CRISTINA MARTÍNEZ ARROYO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO

2023

**MICROPROPAGACIÓN DE PITAHAYA (*Hylocereus undatus*) EN  
SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL**

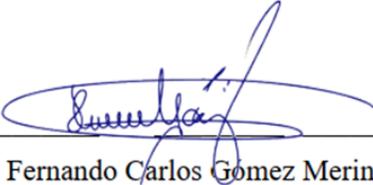
La presente tesis, titulada: Micropropagación de pitahaya (*Hylocereus undatus*) en Sistemas de Inmersión Temporal, realizada por el alumno: María Cristina Martínez Arroyo, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:   
Dr. Jericó Jabín Bello Bello

ASESOR:   
Dra. Obdulia Baltazar Bernal

ASESOR:   
Dr. Fernando Carlos Gómez Merino

ASESOR EXTERNO:   
Dr. Humberto Caamal Velázquez

Amatlán de los reyes, Veracruz a 11 de enero del 2023

## **Micropropagación de pitahaya (*Hylocereus undatus*) en Sistemas de Inmersión Temporal**

María Cristina Martínez Arroyo, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2023

### **RESUMEN**

La micropropagación de pitahaya (*Hylocereus undatus*) es una alternativa para la obtención de plántulas rejuvenecidas con alta calidad genética y fitosanitaria. El objetivo de este estudio fue evaluar diferentes sistemas de cultivo durante la multiplicación *in vitro* y su efecto en la supervivencia durante la etapa de aclimatización de *H. undatus*. Se utilizaron diferentes Sistemas de Inmersión Temporal (SIT): Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT), biorreactor de flujo y reflujo, biorreactor RITA y medio de cultivo semisólido como tratamiento control. A los 60 d de cultivo se evaluó el porcentaje de respuesta de los explantes, variables de desarrollo, determinación de clorofila, caroteno, índice estomático, porcentaje de estomas cerrados, contenido de fosfoenolpiruvato (PEP), Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco) y el porcentaje de supervivencia en la etapa de aclimatización en invernadero. Los sistemas de cultivo con mayor porcentaje de respuesta fueron el medio de cultivo semisólido, los biorreactores de flujo y reflujo y RITA. Los biorreactores de flujo y reflujo y RITA mostraron el mayor número de brotes con mayor longitud, mayor contenido de clorofila y carotenoides. El sistema de cultivo en medio semisólido presentó el mayor índice estomático; mientras que, en el BIT se observó en mayor porcentaje de estomas cerrados. Los sistemas de cultivo en biorreactores de flujo y reflujo y RITA mostraron el mayor contenido de PEP; mientras que, para el contenido de Rubisco no se observaron diferencias en los diferentes sistemas de cultivo. Los sistemas de cultivo en biorreactores de flujo y reflujo y RITA mostraron la mayor tasa de supervivencia durante la aclimatización. La utilización de los biorreactores de flujo y reflujo y RITA son una alternativa para la micropropagación comercial de *H. undatus* y garantizan altos porcentajes de supervivencia durante la aclimatización sin pasar por una fase de enraizamiento.

**Palabras clave:** Fotomixotrofismo, clorofila, caroteno, estomas, fosfoenolpiruvato, rubisco, aclimatización

## **Micropropagation of pitahaya (*Hylocereus undatus*) in Temporary Immersion Systems**

María Cristina Martínez Arroyo, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2023

### **SUMMARY**

Pitahaya (*Hylocereus undatus*) micropropagation is an alternative for obtaining rejuvenated seedlings with high genetic and phytosanitary quality. The aim of this study was to evaluate different culture systems during *in vitro* multiplication and their effect on survival during the acclimatization stage of *H. undatus*. Different Temporary Immersion Systems (TIS) were used: temporary immersion bioreactors (TIB), Ebb-and-Flow bioreactor, RITA bioreactor and semi-solid culture medium as control treatment. At 60 d of culture, the percentage of explant response, developmental variables, chlorophyll and carotene content, stomatal index, percentage of closed stomata, PEP (Phosphoenolpyruvate) and Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase) content and the percentage of survival in the greenhouse acclimatization stage were evaluated. The culture systems with the highest percentage of response were the semi-solid culture medium, Ebb-and-Flow bioreactor and RITA bioreactor. The Ebb-and-Flow and RITA bioreactors showed the highest number of shoots with the greatest length and highest chlorophyll and carotenoid content. The semi-solid medium culture system showed the highest stomatal index, while the TIB had the highest percentage of closed stomata. The Ebb-and-Flow and RITA bioreactor culture systems showed the highest PEP content, whereas, for Rubisco content, no differences were observed in the different culture systems. The Ebb-and-Flow and RITA bioreactor culture systems showed the highest survival rate during acclimatization. The use of Ebb-and-Flow and RITA bioreactors are an alternative for commercial micropropagation of *H. undatus* and guarantee high survival rates during acclimatization without going through a rooting phase.

**Keywords:** Photomixotrophism, chlorophyll, carotenoid, stomata, phosphoenolpyruvate, rubisco, acclimatization

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres por su apoyo incondicional, son mis dos pilares que, aunque sea una adulta siempre me sostienen y siempre necesitare de ustedes.

A mi hermana por ayudarme cuando lo he necesitado, a su esposo Carlos.

A Luis y Say, por ser mi almohada y mi paño de lágrimas, su amistad es energía.

A Fernando, Alma, Lupita, y Olmos por su gran y valiosa amistad que quiero conservar por siempre.

A mi esposo Mario, por su amor y paciencia en este camino de la ciencia y de la vida.

A Nano, siempre has sido mi más grande alegría, con tu existencia haces que todo sea mejor.

A mi más grande motivo: Maximiliano, este logro es tuyo, y algún día leerás esto, tu llegada me cambió la vida, soy afortunada de ser tu mamá, te amo hijo, gracias por serlo todo.

A el Dr. Euca, por todo su apoyo en este camino.

Lors, Lalo, Karen, Monse, Javi, Cesar, Sandra, Jani, Brunito, Ros y Tania por su valiosa amistad que conocí en esta etapa, me enseñó muchas cosas y me llevó gratos momentos.

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo es dedicado a mi pequeño hijo Maximiliano, mi fortaleza, mi debilidad y mi amor más puro.

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	14
1.1 Objetivo general: .....	14
1.2 Objetivos Específicos: .....	14
1.3 Hipótesis .....	15
3. MARCO TEÓRICO.....	16
3.1 La pitahaya ( <i>Hylocereus undatus</i> ).....	16
3.1.1 Descripción taxonomía de la pitahaya.....	16
3.1.2 Origen y distribución .....	17
3.1.3 Importancia del cultivo .....	18
3.4 Cultivo de Tejidos Vegetales.....	19
3.4.1 Micropropagación.....	20
3.5 Sistemas de Inmersión Temporal.....	21
3.5.1 Biorreactor de Inmersión Temporal.....	22
3.5.2 Biorreactor de flujo y reflujó .....	23
3.5.3 Recipiente para Inmersión Temporal Automatizada .....	25
3.6 Fotosíntesis .....	26
3.7 Fotomixotrofismo .....	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
4.1 Estrategia experimental .....	29
4.2 Material vegetal .....	30
4.3 Multiplicación <i>in vitro</i> .....	30
4.4 Evaluación de los diferentes sistemas de cultivo.....	30
4.5 Efecto del sistema de cultivo en generación de brotes .....	31
4.6 Determinación de clorofila y carotenoides .....	32

4.8 Determinación de la actividad ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa.....	33
4.9 Índice estomático y porcentaje de estomas cerrados .....	33
4.10 Diseño experimental y análisis de datos .....	34
5. RESULTADOS .....	35
6. DISCUSIÓN .....	40
7. CONCLUSIONES .....	46
8. REFERENCIAS .....	47

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución de las principales especies cultivadas de pitahaya por provincias biogeográficas en México. ....	18
<b>Figura 2.</b> Funcionamiento del Biorreactor de Inmersión Temporal. ....	23
<b>Figura 3.</b> Funcionamiento del sistema de biorreactor de flujo y reflujo. ....	24
<b>Figura 4.</b> Diseño tecnológico y principio de funcionamiento del sistema RITA®. ....	26
<b>Figura 5.</b> Estrategia experimental. ....	29
<b>Figura 6.</b> Efecto del sistema de cultivo en multiplicación <i>in vitro</i> de pitahaya ( <i>Hylocereus undatus</i> ). ....	36
<b>Figura 7.</b> Índice estomático (IE) y estomas cerrados (EC) en diferentes sistemas de cultivo <i>in vitro</i> de brotes de pitahaya ( <i>Hylocereus undatus</i> ). ....	37
<b>Figura 8.</b> Efecto del sistema de cultivo en variables fotomixotróficas en multiplicación <i>in vitro</i> de pitahaya ( <i>Hylocereus undatus</i> ) después de 60 d en cultivo. ....	38
<b>Figura 9.</b> Plántulas <i>ex vitro</i> de pitahaya obtenidas en diferentes sistemas de cultivo. ....	39

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Hylocereus undatus</i> . .....	17
<b>Tabla 2.</b> Efectos de los sistemas de cultivo en multiplicación <i>in vitro</i> y porcentaje de supervivencia en pitahaya ( <i>Hylocereus undatus</i> ). .....	35

## 1. INTRODUCCIÓN

La pitahaya (*Hylocereus undatus*) conocida como “fruta del dragón” (Cactaceae), (Mercado-Silva, 2018; Chu and Chang, 2022) es un cultivo agroalimentario apreciada por su apariencia exótica y posee un alto valor nutricional ya que es una fuente de compuestos fenólicos, vitaminas (B1, B2, B3, C, niacina, cobalamina y piridoxina) y minerales (calcio, potasio, fósforo, sodio, hierro y zinc), además de tener capacidad antioxidante, gracias a compuestos bioactivos, como flavonoides, y polifenoles (Angonese *et al.*, 2021; Paško *et al.*, 2021; Roriz *et al.*, 2022).

Los métodos convencionales de propagación por esquejes no garantizan su calidad fitosanitaria y las semillas presentan alta variabilidad genética debido a su polinización cruzada (Le Bellec *et al.*, 2006; Trivellini *et al.*, 2020; Chu y Chang *et al.*, 2022). El Cultivo de Tejidos Vegetales a través de la micropropagación es una alternativa para producción masiva de plántulas de alta calidad fitosanitaria; sin embargo, los métodos convencionales de esta técnica utilizan medios de cultivo semisólidos con bajos índices de multiplicación, mayor tiempo de cultivo, dificultan la semiautomatización e incrementan los costos de producción (Bello-Bello *et al.*, 2021). Los sistemas de inmersión temporal (SIT) son una opción que incrementa el coeficiente de multiplicación, disminuye el tiempo de cultivo y permite la semiautomatización debido a que utilizan medio de cultivo líquido con bajo costo (Martinez-Estrada *et al.*, 2019; Arigundam *et al.*, 2020; Hwang *et al.*, 2022). El funcionamiento de los SIT se basa en el principio de introducción de células, tejidos u órganos que mantienen contacto directo con el medio líquido y donde los explantes se encuentran expuestos a un volumen de medio líquido, un tiempo y frecuencia de inmersión determinados (Arano-Avalos *et al.*, 2020; Mancilla-Álvarez *et al.*, 2021). Existen varios modelos comerciales de SIT, algunos de ellos son el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT<sup>®</sup>, Escalona *et al.*, 1999), Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA<sup>®</sup>, Alvard *et al.*, 1995) y el Ebb-and-Flow Bioreactor (Tisserat y Vandercook 1985; Ducos *et al.*, 2007). Los SIT mejoran la aireación del explante, lo que reduce la asfixia, a través de la renovación de la atmósfera del recipiente de cultivo (Monja-Mio *et al.*, 2021). Por lo tanto, al utilizar SIT durante la micropropagación se promueve la fotosíntesis, la respiración, la síntesis de clorofila, y funcionamiento estomático, que favorece el desarrollo durante el proceso de aclimatización (Mancilla-Álvarez *et al.*, 2021). La inducción de la fotosíntesis in vitro es también conocida como fotomixotrofismo. Este término se refiere a: proceso donde las plantas son capaces de obtener energía metabólica tanto de la fotosíntesis como del medio de cultivo. (Aragón *et al.*, 2009; Peñate *et al.*, 2007; Khoobkar y Amrei *et al.*, 2021).

El objetivo de este estudio fue determinar la eficiencia de los diferentes biorreactores en comparación con el sistema de medio semisólido sobre el fotomixotrofismo durante la etapa de multiplicación y su efecto en la aclimatización de *H. undatus*.

## 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 1.1 Objetivo general:

Evaluar diferentes sistemas de cultivo durante la multiplicación *in vitro* de pitahaya (*Hylocereus undatus*).

### 1.2 Objetivos Específicos:

- Evaluar el efecto del cultivo *in vitro* en medio semisólido, Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT), biorreactor de flujo y reflujo y biorreactor RITA sobre el porcentaje de respuesta de los explantes, número y longitud de brotes de *H. undatus* en etapa de multiplicación *in vitro*.
- Determinar el contenido de clorofila y carotenoides durante la multiplicación *in vitro* de *H. undatus* en los diferentes sistemas de cultivo.
- Evaluar el índice estomático y el porcentaje de estomas cerrados en los diferentes sistemas de cultivo durante la multiplicación *in vitro* de *H. undatus*.
- Determinar el contenido de fosfoenolpiruvato (PEP) y ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) durante la multiplicación *in vitro* de *H. undatus*.
- Evaluar el porcentaje de supervivencia de brotes durante la aclimatización en invernadero de *H. undatus* obtenidos en los diferentes sistemas de cultivo.

### **1.3 Hipótesis**

El uso de los diferentes sistemas de cultivo tiene efecto sobre la micropropagación y porcentaje de supervivencia de pitahaya (*Hylocereus undatus*), lo que nos permitirá establecer un sistema eficiente para la propagación *in vitro* de este importante cultivo agroalimentario.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 La pitahaya (*Hylocereus undatus*)

La pitahaya (*Hylocereus undatus*) se conoce con diferentes nombres como fruta del dragón, pera de fresa, reina de la noche, *Cereus* de floración nocturna, bella de la noche, Thang, etc. La planta de pitahaya es una cactácea perenne, hemiepífita y trepadora. Los frutos se caracterizan por sus llamativos colores, escamas de gran tamaño y presencia de raíces aéreas, además, contienen unas estructuras conocidas como areolas que nacen de las costillas que originan espinas y los botones florales (Kishore, 2016). La floración de pitahayas es en verano durante la temporada de lluvias, de cuatro a siete ciclos de floración durante un período de ocho meses, son grandes, de forma acampanadas, tubulares, hermafroditas, blancas o rosadas, miden de 20 a 35 cm de largo y 34 cm de diámetro, con antesis nocturna (Osuna-Enciso *et al.*, 2016).

Según Mizrahi *et al.* (2002) y Jiang *et al.* (2012) los *H. undatus* requiere de largos días para florecer y en otros países; como en Israel se obtienen hasta ocho ciclos de floración por estación y en algunas especies florecen continuamente. Los frutos de *H. undatus* tienen piel roja y pulpa blanca firme con semillas pequeñas de color negro, su sabor es agridulce de un suave y delicado aroma, su propagación es mediante semillas, esquejes o micropropagación (Balendres y Bengoa, 2019; Jalgaonkar *et al.*, 2020). Este cactus trepador puede fructificar después de un año con una gran productividad, y su vida útil puede durar alrededor de 20 años (Tien *et al.*, 2022).

##### 3.1.1 Descripción taxonomía de la pitahaya

La fruta del dragón es miembro del orden de las angiospermas Caryophyllales y la familia Cactaceae, que comprende alrededor de 125–130 géneros y 1400–1500 especies. La mayoría de las especies son conocidas por sus cualidades ornamentales, sin embargo, cerca de 250 especies son conocidas por su valor frutícola (Kishore, 2016; Chen *et al.*, 2021). Nizamlioglu *et al.*, (2021), menciona la siguiente clasificación taxonómica de la pitahaya (Tabla 1).

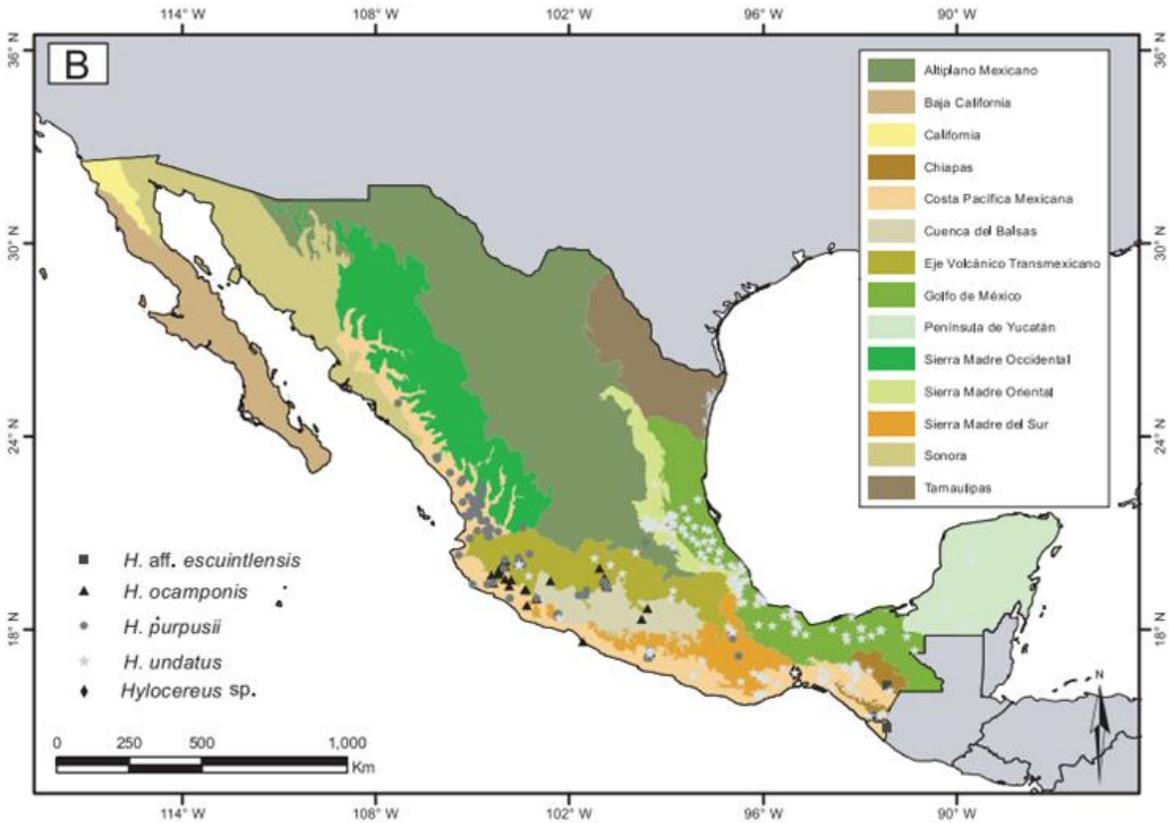
**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Hylocereus undatus*.

Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
Infrareino	Streptophyta
Superdivisión	Embriofita
División	Tracheophytina
Subdivisión	Spermatophytina
Clase	Magnoliopsida
Superorden	Caryophyllanae
Orden	Caryophyllales
Familia	Cactaceae
Género	<i>Hylocereus</i>
Especie	<i>Hylocereus undatus</i> (Haw.)

### 3.1.2 Origen y distribución

La pitahaya, perteneciente a la familia Cactaceae es una fruta tropical nativa de América Central y México (Bello-Bello *et al.*, 2021; Shyamalagowri *et al.*, 2022). Durante la década de 1990, el fruto fue domesticado originalmente por las culturas pre-colombinas, era recolectado de forma silvestre para su alimentación y como medicamento (Le Bellec y Vaillant, 2011). Esta fruta es cultivada en hábitats tropicales y subtropicales, principalmente en Taiwán, Tailandia, Camboya, Filipinas, Israel, México y Vietnam (Balendres y Bengoa, 2019).

En su estudio García-Rubio *et al.* (2015) mencionan que las principales especies cultivadas de pitahaya en México se distribuyen en Altiplano Mexicano, Baja California, California, Chiapas, Costa del Golfo y del Pacífico, Durango, Tamaulipas y San Luis Potosí. La especie cultivada que predomina es *H. undatus* (Figura 1).



**Figura 1.** Distribución de las principales especies cultivadas de pitahaya por provincias biogeográficas en México.

Actualmente, es una especie exótica de piel roja rica en antioxidantes con actividad hipocolesterolémicas y citotóxicas. La fruta del dragón es adaptable a diversos entornos ya puede tolerar estrés abiótico (sequía y altas temperaturas), lo que hacen que esta planta comestible sea prometedora para la agricultura (Santos *et al.*, 2020; Paško *et al.*, 2021).

### 3.1.3 Importancia del cultivo

El aumento de la diversidad gastronómica exige una demanda de consumo de frutas tradicionales y raras que proporcionan nuevos sabores, aromas y colores al consumidor. La familia de las cactáceas ofrece varios frutos comestibles que se consumen en fresco con alto valor comercial (Balois-Morales *et al.*, 2013).

La pitahaya tiene un gran potencial como nuevo cultivo debido a su poco consumo de agua y adaptabilidad a altas temperaturas presentes en invernadero. Además, el mercado muestra una creciente demanda de frutas exóticas nuevas y saludables. Actualmente, el fruto de pitahaya es importante para los productores y consumidores, ya que se considera una “superfood”, debido a

su calidad, color, sabor y aroma. La importancia en la industria alimentaria es el consumo en fresco o procesada en jugo, jaleas, mermeladas, vinos y bebidas (Attar *et al.*, 2022).

La fruta del dragón tiene potentes propiedades para la salud y un destacado valor nutricional debido a su riqueza en polifenoles, vitaminas, azúcares, aminoácidos y pigmentos betalainas. Además, la pitahaya contiene ácidos grasos insaturados (linoleico y linolénico) con aplicaciones cosméticas y en preparaciones terapéuticas (Al-Mekhlafi *et al.*, 2021).

Los estudios sobre la fruta de dragón se han centrado principalmente en su cáscara y pulpa. Sin embargo, existen pocos estudios sobre sus semillas (Nizamlioglu *et al.*, 2021). En un trabajo por Khalili *et al.* (2009) reportaron los minerales primarios existentes en pitahaya roja son Ca, P, Mg, Na, K, Fe, Zn y Cu.

Además, investigaciones recientes indican que los frutos y otras partes botánicas de la fruta del dragón tienen un gran potencial como colorantes naturales y en la síntesis de nanopartículas (de Araújo *et al.*, 2021). Otra aplicación en la industria, es la utilización de la biomasa residual de la cascara del fruto para eliminar el colorante amarillo de metanilo (MY) de las aguas coloreadas (Georgin *et al.*, 2021).

La creciente popularidad del concepto de alimento funcional atrae la atención de investigadores en el estudio de especies como la pitahaya que se ha convertido en un producto agrícola popular, debido a su alto valor nutricional. Por lo que, la implementación de técnicas biotecnológicas para aumentar el rendimiento de especies de importancia economía es fundamental (Nizamlioglu *et al.*, 2021). Una de las técnicas biotecnológica se encuentra el Cultivo de Tejidos Vegetales.

### **3.4 Cultivo de Tejidos Vegetales**

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es una rama de la Biotecnología Vegetal que consiste en un conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento, manipulación y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas (Phillips y Garda, 2019). Estas técnicas biotecnológicas se fundamentan a partir de la teoría celular mediante la totipotencia como potencial de una célula vegetal para generar un organismo completo (Fehér, 2019; Bednarek y Orłowska, 2020).

La tecnología CTV ofrece la ventaja de propagación confiable para la obtención de biomasa libre de contaminantes (plagas y enfermedades) en un corto periodo de tiempo (Georgiev *et al.*, 2018). Ofrece también, la micropropagación de plantas en amenaza o en peligro de extinción que son

difíciles de propagar mediante técnicas convencionales o con tasas de propagación lenta. Además, la técnica requiere de pequeñas cantidades de material vegetal de la planta donante, lo que permite la propagación masiva con escaso impacto en hábitats silvestres (Coelho *et al.*, 2020).

### **3.4.1 Micropropagación**

La micropropagación o propagación *in vitro* es una de las aplicaciones actuales del CTV, explota la propiedad fundamental de las células vegetales para la rápida multiplicación masiva de genotipos de élite a gran escala en un corto período de tiempo (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018; Soumare *et al.*, 2021).

La técnica implica el cultivo aséptico de explantes de tejidos y órganos en recipientes cerrados utilizando medios de cultivo definidos en condiciones controladas. Actualmente, la micropropagación ofrece la ventaja de aumentar la producción de cultivos de importancia agroalimentaria, reemplazando los métodos tradicionales de corte, injerto y división (Debnath *et al.*, 2020).

La micropropagación juega un papel muy importante en la agricultura, la horticultura y en la industria a través de la producción de plántulas sanas durante todo el año y la reducción del ciclo vegetal. Además, este junto de técnicas favorecen la conservación de los recursos fitogenéticos, la mejora de cultivos y la propagación de nuevas variedades a partir de la variación somaclonal y la manipulación genética (Soumare *et al.*, 2021).

Dentro de las etapas de la micropropagación se encuentra la selección de la planta madre, establecimiento, multiplicación *in vitro*, elongación y enraizamiento, finalmente la aclimatización (Bhojwani y Dantu, 2013). La multiplicación *in vitro* es una de las etapas más importante dentro de la micropropagación, donde se determina la eficiencia y el costo de producción. La propagación convencional en medio semisólido involucra altos costos de producción causados principalmente por la mano de obra, el uso de agentes gelificantes y la falta de automatización (Estrada-Martínez *et al.*, 2019; Monja-Mio *et al.*, 2021; Correa-Hernández *et al.*, 2022).

Una alternativa son los sistemas automatizados conocidos como Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), que disminuyen los costos, aumentan las tasas de multiplicación de los explantes y reducen la manipulación, disminuyendo la contaminación (De Carlo *et al.*, 2021).

### 3.5 Sistemas de Inmersión Temporal

Los SIT son biorreactores semiautomáticos diseñados para la micropropagación masiva de tejidos, embriones u órganos mediante el principio de inmersión temporal, donde los explantes están en contacto con el medio de cultivo líquido que facilita una mayor absorción de nutrimentos, ya que el medio de cultivo cubre los explantes durante un tiempo determinado y permite una renovación del ambiente dentro del recipiente, lo que reduce la hiperhidricidad (Bello-Bello *et al.*, 2021; Monja-Mio *et al.*, 2021; Hwang *et al.*, 2022). Por lo que, el éxito de los SIT está determinado por el tiempo de inmersión, la frecuencia y el volumen de medio líquido por explante (Martínez-Estrada *et al.*, 2019).

La micropropagación comercial en los SIT utilizando medio líquido tiene una serie de ventajas sobre el uso de medio gelificado ya que reduce los costos de producción de un gran número de importantes cultivos agroalimentarios, además los medios se pueden renovar fácilmente sin cambiar el contenedor (Regueira *et al.*, 2018; Correa-Hernández *et al.*, 2022).

La fisiología, el crecimiento y desarrollo de las plántulas micropropagadas puede estar influenciado por el diseño de los modelos, entre las características se puede encontrar: el tamaño del recipiente, el tipo del soporte del cultivo, inmersión computarizada o de un temporizador simple, uso de bomba peristáltica o movimiento mecánico para desplazar el líquido, medio reciclado, tanque del medio separado o incorporado en el contenedor de cultivo (Carvalho *et al.*, 2019; Bello-Bello *et al.*, 2019).

Durante la propagación comercial

Los SIT son una alternativa para la propagación comercial y para la mejora del rendimiento logrando una producción de alta calidad que reduce el impacto al medio ambiente, además, se obtienen brotes vigorosos, en cuanto a longitud, peso y sistema radical (Galan *et al.*, 2018; Trentini *et al.*, 2021).

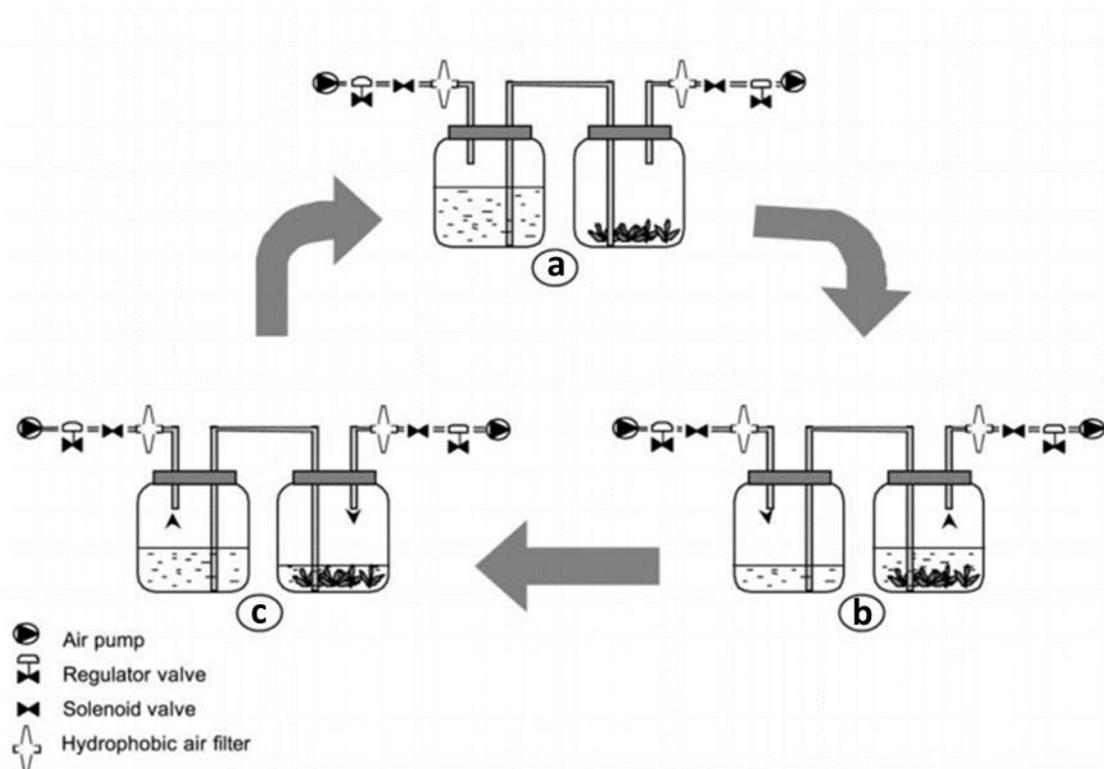
Entre los diferentes diseños de SIT, se encuentra el biorreactor MATIS<sup>®</sup> (Etienne *et al.*, 2013), biorreactor SETIS<sup>™</sup> (Vervit, 2020), biorreactor de flujo y reflujo (Ducos *et al.*, 2007), Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA<sup>®</sup>) (Alvard *et al.* 1993) y el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT) (Escalona *et al.* 1999).

### 3.5.1 Biorreactor de Inmersión Temporal

El Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT) o biorreactores de frascos gemelos han demostrado su aplicación en la micropropagación ya que mejora el crecimiento de las plántulas y reduce la mano de obra. Además, los BIT funcionan aprovechando los efectos de un medio líquido sobre el cultivo y muestran ventajas en relación con otros sistemas debido a la amplia disponibilidad de componentes, diferente capacidad y fácil montaje (Georgiev *et al.*, 2014; Leyva-Ovalle *et al.*, 2020; Lu y Merkle, 2021).

El diseño ofrece la ventaja de llevar a cabo tres fases *in vitro*: la multiplicación, elongación y enraizamiento, con la ventaja de cambiar el medio en uno de los contenedores (Loyola-González *et al.*, 2019).

Los BIT están compuestos por dos frascos de vidrio transparente (Figura 2): uno de los frascos es para los explantes y el otro es para el depósito de medio de cultivo líquido. Los dos frascos están conectados entre si con tubos de silicon. En ambos frascos el flujo de aire se esteriliza atravesando unos filtros hidrófobos. La presión del compresor de aire, empuja el medio de cultivo de un recipiente a otro para bañar los explantes o brotes completamente. El flujo de aire se invierte para retirar el medio de cultivo del recipiente que contiene los explantes. Las válvulas solenoide de tres vías controlan la operación de encendido/apagado y los temporizadores electrónicos controlan la frecuencia y la duración del período de inmersión y (Rivero *et al.*, 2018).

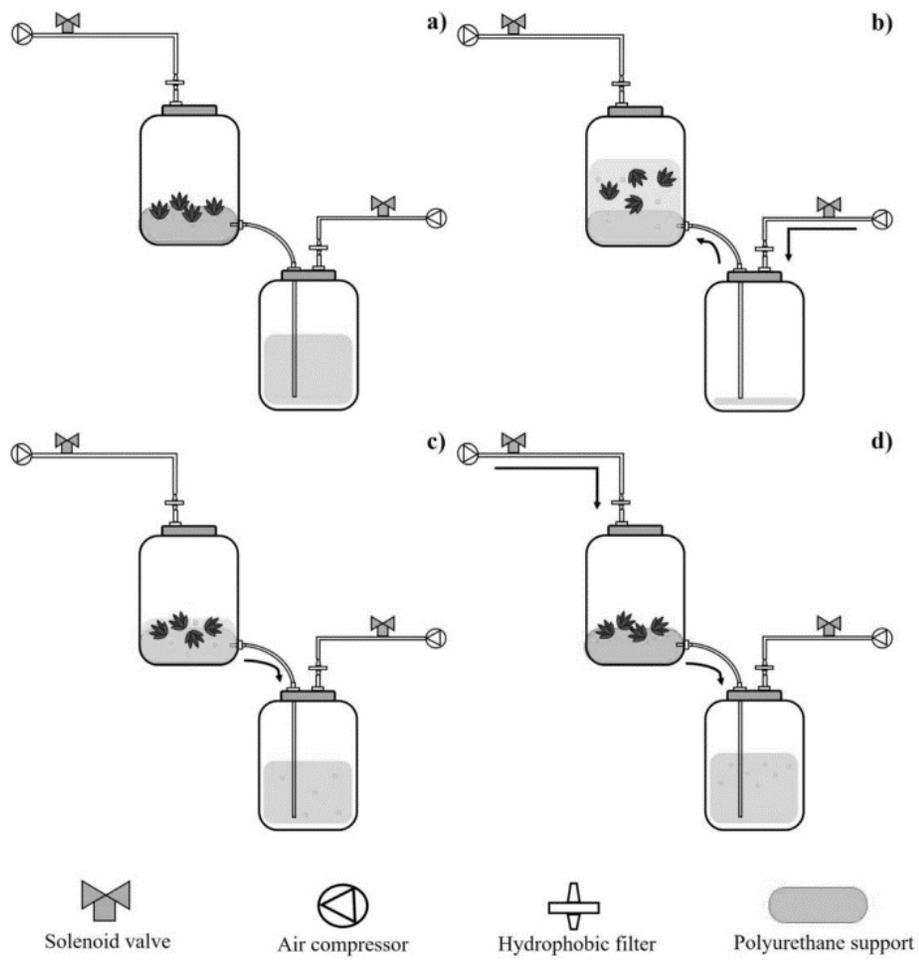


**Figura 2.** Funcionamiento del Biorreactor de Inmersión Temporal. a) Los explantes y el medio líquido se encuentran independientemente, b) El medio de cultivo pasa al frasco que contiene los explantes, c) Después de un periodo de tiempo el medio de cultivo regresa a tu frasco original (Escalona *et al.*, 2003).

### 3.5.2 Biorreactor de flujo y reflujo

Los biorreactores de flujo y reflujo podrían describirse como un sistema simplificado de modificación de los sistemas BIT. El sistema consiste de dos recipientes (Figura 3): un recipiente que funciona como una cámara de cultivo que contendrá un soporte de poliuretano para los explantes y un recipiente que funciona para el almacenamiento del medio lo que le brinda la ventaja de una construcción fiable y sencilla. El soporte de poliuretano mantiene suficiente humedad (85% a 90%) durante la exposición. El sistema funciona por una diferencia de presiones que entra dentro del frasco que contiene el medio, el medio gracias a la presión, sube al frasco que contiene los explantes por un tiempo determinado y regresa a su origen por gravedad (Georgiev *et al.*, 2014).

Se ha reportado el uso de estos sistemas para cultivos como anturio (*Anthurium andreanum* Lind) (Martínez-Estrada *et al.*, 2019), pitahaya (*Hylocereus undatus*) (Bello-Bello *et al.*, 2021) y agave (*Agave potatorum* Zucc.) (Correa-Hernández *et al.*, 2022) entre otros.



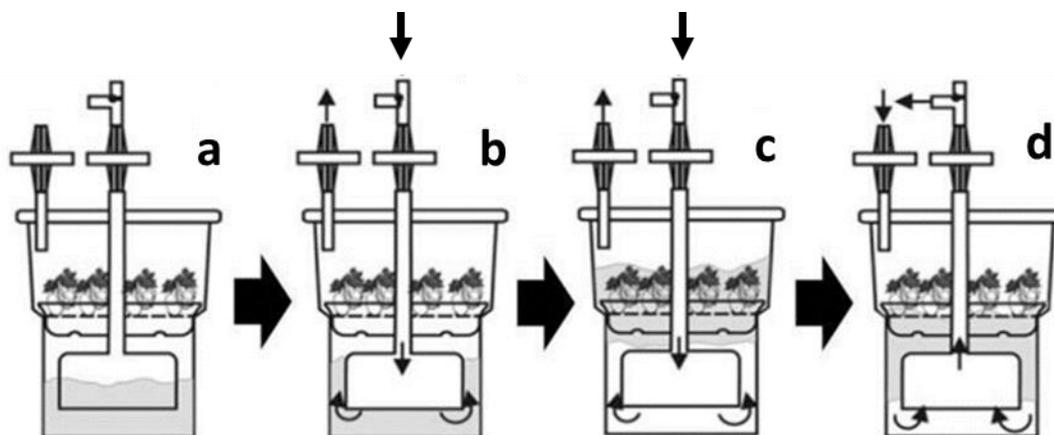
**Figura 3.** Funcionamiento del sistema de biorreactor de flujo y reflujó. a) Fase de espera, b) período c) drenado por gravedad, d) período de suministro de aire (Correa-Hernández *et al.*, 2022).

### 3.5.3 Recipiente para Inmersión Temporal Automatizada

El Recipiente para Inmersión Temporal Automatizada (RITA) (Figura 4) es un SIT que se conforma de un solo recipiente de polipropileno de 1 L, con dos de compartimentos, separados por un soporte con malla y un tubo de plástico, montado en su centro, el compartimento superior contendrá el material vegetal y el compartimento inferior contendrá el medio líquido, cabe mencionar, que es un sistema de alto costo y capacidad limitada comparado con otros diseños (Georgiev *et al.*, 2014; Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2019).

El sistema RITA<sup>®</sup> funciona cuando la presión de aire es suministrada al compartimento inferior y ésta empuja el medio hacia el compartimento superior. El material vegetal en el compartimento superior es sumergido mientras se aplica la presión. Durante el tiempo de inmersión, se burbujea aire, agitando suavemente los tejidos y renovando la atmósfera del espacio de cabeza dentro del recipiente de cultivo, con la presión escapando a través de las salidas en la parte superior del aparato (Lu y Merkle, 2021).

El biorreactor RITA<sup>®</sup> ofrece la ventaja de ser un recipiente compacto para funcionamiento, mantiene una humedad relativa con separación del material vegetal del medio de cultivo líquido. Todas las piezas están conectados entre sí y pueden ser manipulados como una sola, esto facilita el manejo de los explantes o brotes, no obstante, una de las desventajas es no poder renovar el medio nutritivo (Georgiev *et al.*, 2014; Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2016). Este sistema ha sido utilizado durante la micropropagación de otras especies como vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks ex Andrew) (Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2016), anturio (*Anthurium andreanum* L.) (Alamilla-Magaña *et al.*, 2019), campanilla de primavera (*Leucojum aestivum* L.) (Ptak *et al.*, 2020).



**Figura 1.** Diseño tecnológico y principio de funcionamiento del sistema RITA®. a) Período de exposición, b) dislocación del medio líquido, c) período de inmersión, d) drenar el nutriente medio (Georgiev *et al.*, 2014).

Los SIT se han convertido en la actualidad en una de las herramientas más empleadas para la micropropagación de plantas a gran escala (Ruta *et al.*, 2020). Además, se ha informado que SIT facilita las condiciones fotomixotróficas y promueve procesos fisiológicos como el funcionamiento estomatal y síntesis de clorofila (Correa-Hernández *et al.*, 2022).

### 3.6 Fotosíntesis

Los informes sobre la evaluación fotosintética de plantas *in vitro* es poca, sin embargo, evaluar la tasa fotosintética es importante ya que las plantas dependen de la fotosíntesis para absorber la energía de la luz y obtener carbono, durante su desarrollo (Neumann *et al.*, 2020). De manera general, las plantas cultivadas en medio semisólido mantienen un microambiente en los contenedores de cultivo que es diferente al ambiente *ex vitro* en el que normalmente crecen las plantas (Askari *et al.*, 2022).

La técnica de propagación *in vitro* se caracteriza por ser heterótrofa, donde su principal fuente de energía es agregar al medio azúcares. El microambiente del cultivo *in vitro* convencional (medio semisólido) consiste en recipientes cerrados, con alta humedad relativa, con reducido intercambio gaseoso y condiciones artificiales de temperatura y luminosidad controladas (Rodríguez *et al.*, 2014). Por lo que, dentro de los contenedores pueden ocurrir grandes

variaciones en la acumulación de CO<sub>2</sub> y etileno a lo largo del día (Martins *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2020).

En general, la baja concentración de CO<sub>2</sub> junto con la baja intensidad de la luz es perjudicial, debido a la falta de aceptores en la cadena de transporte de electrones fotosintéticos, restringiendo la fotosíntesis (Askari *et al.*, 2022).

El método de ventilación natural se describe principalmente como un intercambio de aire, sin embargo, en la micropropagación convencional se estimula una diferencia de presión parcial en el vapor de agua y aire, ya que la diferencia de presión del aire entre el interior y el exterior del recipiente es causado por la corriente de aire que rodea al recipiente, lo que es necesario el uso de recipientes con tapas que generen un intercambios gaseosos, sin incidir en la contaminación de los medios de cultivo (Galan *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2020).

Aragón *et al.* (2010) y Galan *et al.* (2018) señalan que el intercambio de gas que ocurre durante la inmersión puede provocar una mejora en la actividad fotosintética. Esto se debe a que el uso de los biorreactores permite un mayor flujo de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y etileno, provocando que las brotes o plántulas *in vitro* mejoren su capacidad fotomixotrófica.

### **3.7 Fotomixotrofismo**

Las plantas mixotróficas combinan el metabolismo autótrofo con el metabolismo heterótrofo, oxidando la fuente reducida de carbono disponible en el medio (Bhojwani y Dantu, 2013; Cecchin *et al.*, 2018).

Durante la micropropagación de plantas, el fotomixotrofismo es un sistema metabolismo mixotrófico, que se debe principalmente a la alta concentración de sacarosa en el medio de cultivo y a la alta humedad relativa en recipientes herméticamente cerrados sin intercambio de gases (Ševčíková *et al.*, 2019). Por lo que, en el sistema convencional, existe una acumulación de etileno y otros gases volátiles dentro de los matraces, reduciendo el CO<sub>2</sub> y la disminución del flujo de fotones fotosintéticamente activos, lo que puede limitar la fotosíntesis en su conjunto. Como consecuencia, las tasas de crecimiento y desarrollo disminuyen, lo que genera pérdidas considerables debido a la mortalidad de las plantas durante la aclimatación (Pinheiro *et al.*, 2021).

Las condiciones fotomixotróficas durante la propagación *in vitro* puede deberse no sólo a los azúcares como fuente de carbono, se puede llegar a este sistema suministrando CO<sub>2</sub> a recipientes con filtros que permiten el libre intercambio de gases, o incluso usando una atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub> (Hoang *et al.* 2017). En comparación con las condiciones heterótrofas, se

ha demostrado que el uso de cultivos *in vitro* en condiciones fotomixotróficas proporciona una mejor formación de raíces, menos trastornos fisiológicos y altas tasas de crecimiento después de la fase de aclimatación (Martins *et al.*, 2020).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Estrategia experimental

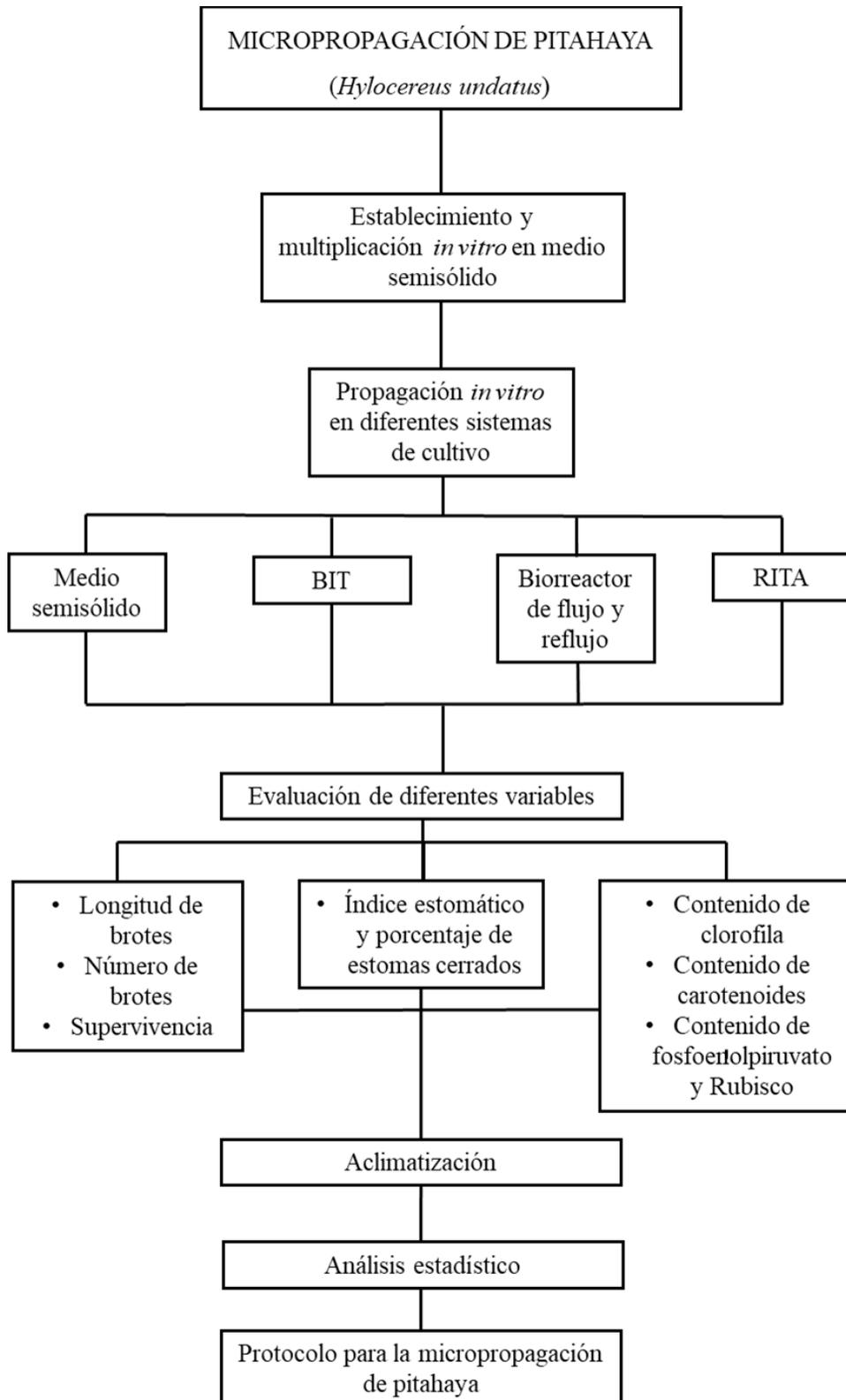


Figura 5. Estrategia experimental. Poner otro título

## 4.2 Material vegetal

Se recolectaron esquejes con areolas de pitahaya (*Hylocereus undatus* cv. White) de 40–50 cm de largo en la ciudad Guanajuato, México (20° 06' 33.1" N 101° 12' 00.3" W). Estos fueron colocados en macetas en condiciones de invernadero para su cuarentena y se trataron cada 15 días con 2 g L<sup>-1</sup> de bactericida (Agri-mycin, Pfizer, N. Y., USA) y 3 g L<sup>-1</sup> de fungicida (Captan-ultra®, Arysta Life Science México S.A. de C.V. Coah., MX.) Después de 2 meses, se recolectaron nuevos brotes que fueron lavados con agua corriente y jabón líquido (Axion Complete®, Mission Hills, S.A. de C.V., San José de Iturbide, Gto., MX.). Posteriormente, se seccionaron microesquejes de 3 cm de largo y se sumergieron en una solución con 2 mL L<sup>-1</sup> de sales de amonio cuaternario (Beta Quat 4™, BETA, Gto., MX) durante 25 min, seguido de cuatro enjuagues con agua destilada. Los microcortes se llevaron a una campana de flujo laminar y se sumergieron en etanol al 70% durante 30 s, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Finalmente, con la ayuda de un bisturí, los brotes se seccionaron en forma triangular y se cultivaron en medio MS (½) (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 2 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (BAP, Sigma-Aldrich® Chemical Company, St. Louis, MO, USA) y 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol-3-butírico (IBA, Sigma-Aldrich®), esto de acuerdo a Bello-Bello *et al.*, (2021). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8± 0.1 con hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 N, el medio de cultivo se solidificó con 0.55% (p/v) de Agar (Plant TC phytoteclab, Shawnee Mission, KS, USA). Se llevó a la autoclave a 121 °C y 115 kPa durante 30 min. Los cultivos se incubaron a 24 ± 2 °C y un fotoperíodo de 16 h de luz, con lámparas de luz blanca de entre 40 - 50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de irradiancia lumínica.

## 4.3 Multiplicación *in vitro*

Para la multiplicación *in vitro* se utilizó el medio de cultivo semisólido MS, suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Sigma-Aldrich®). El medio de cultivo fue ajustado a un pH de 5.8 con 0.1 N de NaOH y se agregó 0.55% (p/v) de Agar (Plant TC phytoteclab, Shawnee Mission). Las condiciones de esterilización e incubación del cultivo fueron las mismas descritas anteriormente.

## 4.4 Evaluación de los diferentes sistemas de cultivo

Después de 40 días en multiplicación con medio MS, los brotes generados en la etapa anterior fueron utilizados como explantes para la evaluación de los diferentes sistemas de multiplicación:

convencional en medio semisólido y medio líquido en los tres diferentes SIT (BIT, biorreactor de flujo y reflujo y RITA). Se utilizó el medio de multiplicación antes mencionado. Se utilizaron frascos con 1 L de capacidad para el biorreactor de flujo y reflujo y BIT, cada uno con 10 explantes y en el RITA se utilizaron 5 explantes debido a su capacidad. Los explantes consisten en dos brotes unidos de la base con longitud de 2 cm. Para los biorreactores de flujo y reflujo y BIT se utilizaron 500 mL de medio de cultivo a razón de 50 mL por explante, y para el RITA 250 mL de medio de cultivo. El tiempo de inmersión fue de 2 min cada 8 h. Para cada sistema se realizaron por triplicado con las condiciones de incubación descritas anteriormente.

#### **4.5 Efecto del sistema de cultivo en generación de brotes**

Después de 60 días en multiplicación, los brotes generados fueron utilizados como explantes para la evaluación de los sistemas de multiplicación convencional en medio semisólido y medio líquido en diferentes SIT (BIT, biorreactor de flujo y reflujo y RITA). Todos los experimentos se condujeron en igualdad de condición. Se utilizó el medio de multiplicación antes mencionado. Para sistema semisólido, el biorreactor de flujo y reflujo y BIT, se utilizaron frascos con capacidad de 1 L con 10 explantes cada uno, manteniendo 100 mL de volumen de espacio de cabeza por explante. En el RITA se utilizaron 5 explantes para mantener la proporción de 50 mL de medio de cultivo y 100 mL de volumen de espacio de cabeza por explante. Los explantes consisten en dos brotes unidos de la base con longitud de 2 cm. El tiempo de inmersión fue de 2 min cada 8 h.

#### 4.6 Determinación de clorofila y carotenoides

El contenido de clorofila se determinó según Harborne (1973). Para todos los experimentos se utilizaron 0,2 g de materia fresca y se maceró con acetona al 80%. Las muestras se almacenaron a una temperatura de -4 °C durante 24 h. La mezcla se ajustó a 6,25 mL con acetona al 80% y se filtró con papel. Finalmente, las muestras se midieron las absorbancias en un espectrofotómetro (Genesys 10S, Thermo Scientific, MA, USA) a 663 y 645 nm para la clorofila a y b, respectivamente. La determinación de clorofilas se calculó utilizando la siguiente formulas:

$$\text{Chl a} = [(12.7 \times A_{663}) - (2.59 \times A_{645})] (V) / (1000 \times W)$$

$$\text{Chl b} = [(22.9 \times A_{645}) - (4.70 \times A_{663})] (V) / (1000 \times W) \text{ y Total Chl (C)} = [(8.20 \times A_{663}) - (20.2 \times A_{645})] (V) / (1000 \times W)$$

$$\text{Chl Total} = [(8.20 \times A_{663}) - (20.20 \times A_{645})] (V) / (1000 \times W)$$

Donde:

$A_{663}$  y  $A_{645}$  = absorbancia

V = volumen de graduación en  $\text{mL}^{-1}$

W = peso de la muestra en g

1000 = factor de conversión.

El contenido de carotenoides se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$C = A_{450} \times M \times 1000 / \varepsilon \times \delta$$

Dónde:

A = Absorción determinada a la longitud de onda de 450 nm

M = masa molecular de  $\beta$ -caroteno =  $537 \text{ g}^{-1} \text{ mol}$

$\varepsilon$  = coeficiente de extinción molar del  $\beta$ -caroteno en acetona ( $140663 \text{ l}^{-1} \text{ mol cm}$ ) de acuerdo con Biehler *et al.* (2010)

$\delta$  = trayectoria óptica (cm)

#### **4.7 Determinación de la actividad de fosfoenolpiruvato**

Para la determinación de fosfoenolpiruvato (PEP), utilice un kit de ensayo colorimétrico/fluorométrico (MAK102, Sigma-Aldrich®). Se congelaron 50 mg de tejido de hojas en hielo seco/solución de metanol y luego se pulverizaron a fondo con mortero y mano. Luego, se centrifugó a  $12.000 \times g$  durante 3 min. para eliminar el material insoluble. Todas las muestras se ajustaron a un volumen final de 50  $\mu$ l con tampón de ensayo PEP. Finalmente, se añadieron 50  $\mu$ L de la mezcla de reacción adecuada a cada uno de los pocillos y se incubaron durante 60 min. a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 570 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S). La concentración de PEP se calculó utilizando la siguiente fórmula:  $S_a/S_v = C$

$S_a$  = Cantidad de PEP en la muestra desconocida (nmol) de la curva estándar

$S_v$  = Volumen de muestra ( $\mu$ L) agregado al pocillo de reacción

$C$  = Concentración de PEP en la muestra

#### **4.8 Determinación de la actividad ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa**

Para la determinación de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) (Plant Rubisco ELISA Kit, NOVUSBIO®), se añadió 1 mL de Buffer de extracción a 200 mg de tejido foliar fresco y se trituró con mortero. Luego, se transfirió a un vial Eppendorf y se mantuvo a 4°C durante 30 min. Se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm y se recogió el sobrenadante para la prueba. Luego, se agregaron 50  $\mu$ l de Anticuerpo (1X) a cada pocillo. Se mezcló bien y se incubó durante 60 min a 37 °C. Cada pozo fue aspirado y lavado. Después, se agregaron 100  $\mu$ l de conjugado de HRP (1x) a cada pocillo. Luego, se mezcló bien y se incubó durante 60 min. a 37 °C. A cada pocillo se añadieron 90  $\mu$ l de sustrato TMB, se mezcló bien y se incubó durante 20 min. a 37 °C. Posteriormente, se agregaron 50  $\mu$ l de solución de parada a cada pocillo. La absorbancia se midió a 570 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S). La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración con estándar Rubisco.

#### **4.9 Índice estomático y porcentaje de estomas cerrados**

Se evaluó índice estomático (IE) y porcentaje de estomas cerrados (EC) en muestras de la tercera hoja del ápice caulinar en los diferentes sistemas de cultivo. El IE se estimó utilizando el método descrito por Xu *et al.* (2008). Se utilizó el envés de las hojas desarrolladas. Las muestras se

observaron bajo un microscopio (M5LCD Velab, Co., Pharr, TX, USA.). El IE se calculó mediante la fórmula:  $IE = [NE / (EC + NE)] \times 100$

donde: IE = índice estomático, NE = número de estomas, EC = número de células epidérmicas. El porcentaje de estomas cerrados se calculó utilizando la siguiente fórmula:  $\% EC = (EC \times 100) / NE$

donde: EC: estomas cerrados y NE: número de estomas.

#### **4.10 Diseño experimental y análisis de datos**

Todos los experimentos se realizaron con un diseño completamente al azar y replicados tres veces. En todos los tratamientos se evaluó el número y longitud de brotes por explante. Adicionalmente, se determinó el contenido de clorofilas, carotenoides, índice estomático, estomas cerrados, PEP y Rubisco a los 60 días de cultivo. Se realizó un análisis de varianza seguido de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) mediante el software estadístico SPSS (versión 22 de Windows). Previo al análisis estadístico, los porcentajes de respuesta y supervivencia fueron transformados con la fórmula  $Y = \arcsen(\sqrt{x/100})$ , donde x es el valor del porcentaje. El porcentaje de supervivencia durante la aclimatización fue evaluado a los 30 días.

## 5. RESULTADOS

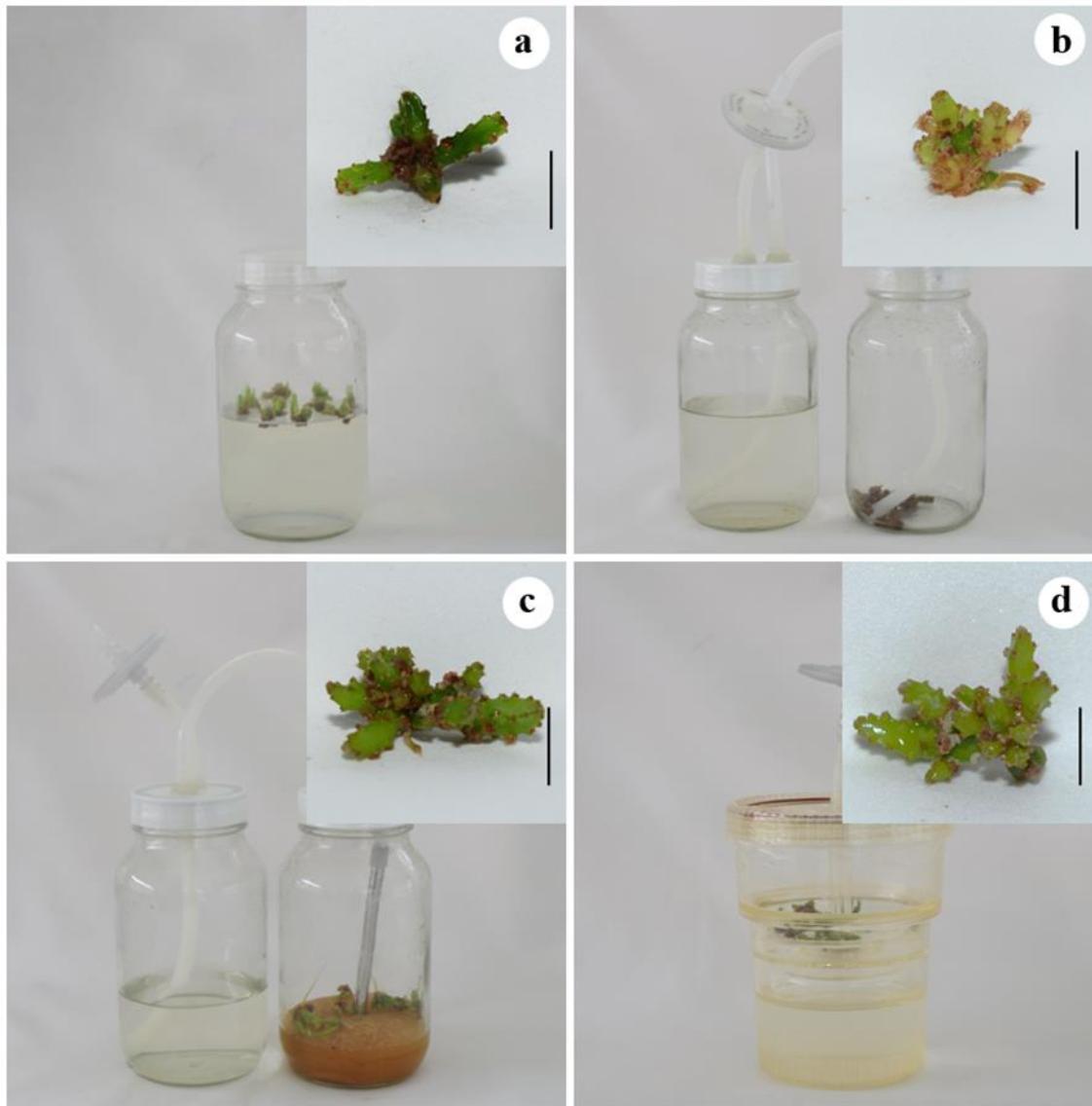
### 5.1 Efectos de los sistemas de cultivo en la multiplicación *in vitro*

Al evaluar los diferentes sistemas de cultivo sobre la multiplicación *in vitro* se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de respuesta, número y longitud de brotes (Tabla 2). La mayor respuesta de los explantes durante la multiplicación se observó en el medio semisólido e inmersión temporal en biorreactor de flujo y reflujo y RITA, con 96, 93 y 90 % de respuesta a la morfogénesis; mientras que, el menor porcentaje de respuesta se observó en el biorreactor BIT, con 46% de respuesta. Respecto al número de brotes por explante, la mayor cantidad de brotes se observó en el biorreactor de flujo y reflujo y RITA, con 8.55 y 9 brotes por explante; mientras que la menor cantidad de brotes generados fue en medio semisólido, con 4.59 brotes por explante. Para la variable longitud de brote, los brotes de mayor altura se observaron en los biorreactores de flujo y reflujo y RITA, con 1.62 y 1.71 cm de longitud; mientras que, los brotes de menor tamaño fueron observados en el BIT, con 1.21 cm de longitud (Figura 6).

**Tabla 2.** Efectos de los sistemas de cultivo en multiplicación *in vitro* y el porcentaje de supervivencia en pitahaya (*Hylocereus undatus*) durante la aclimatización.

Sistema de cultivo	Respuesta (%)	No. de brotes/ explante	Long. de brote (cm)	Supervivencia (%)
Semisólido	96.66±3.33a	4.59±0.22c	2.50±0.09ab	92.00±3.51b
BIT	46.66±3.33b	6.40±0.37b	2.21±0.11b	30.00±5.77c
Biorreactor de flujo y reflujo	93.33±3.33a	9.55±0.25a	2.62±0.08a	99.60±0.33a
RITA®	90.00±5.77a	9.00±0.40a	2.71±0.13a	99.66±0.33a

Los valores representan la media ± error estándar. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). BIT: Biorreactor de Inmersión Temporal; biorreactor RITA®: Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado.



**Figura 6.** Efecto del sistema de cultivo en multiplicación *in vitro* de pitahaya (*Hylocereus undatus*). a) Cultivo semisólido, b) biorreactor de inmersión temporal, c) biorreactor de flujo y reflujo y c) biorreactor RITA.

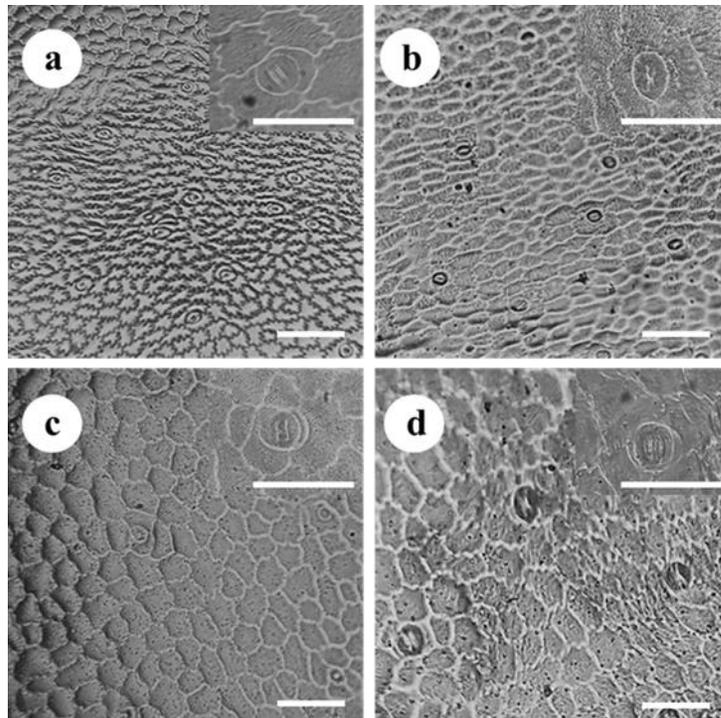
## 5.2 Contenido de clorofilas y caroteno

Los contenidos de clorofilas (a, b y total) y carotenoides mostraron diferencias significativas entre los diferentes sistemas de cultivo evaluados (Figura 8). Los mayores contenidos de clorofila a se observaron los biorreactores de flujo y reflujo y RITA, con  $0.17$  y  $0.16 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$ , respectivamente; mientras que, el menor contenido de clorofila a se observó en el BIT con  $0.06 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$ . Para la clorofila b, los mayores contenidos se observaron en medio semisólido, biorreactores de flujo y reflujo y RITA, con  $0.10$ ,  $0.12$  y  $0.12 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$ , respectivamente; mientras que el menor contenido de clorofila b se obtuvo en el BIT, con  $0.07 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$ . Respecto

a la clorofila total, los mayores contenidos se observaron en los biorreactores de flujo y reflujo y RITA, con 0.30 y 0.28 mg g<sup>-1</sup> PF; mientras que el menor contenido se observó en el BIT, con 0.14 mg g<sup>-1</sup> PF (Figura 8a). En relación al contenido de carotenoides, el mayor contenido de este pigmento se encontró en los biorreactores de flujo y reflujo y RITA, con 2.25 y 2.20 μg mL<sup>-1</sup>, respectivamente; mientras que el menor contenido de carotenoides se observó en el sistema de cultivo en medio semisólido y BIT, con 1.44 y 1.15 μg mL<sup>-1</sup> (Figura 8b).

### 5.3 Índice estomático y estomas cerrados

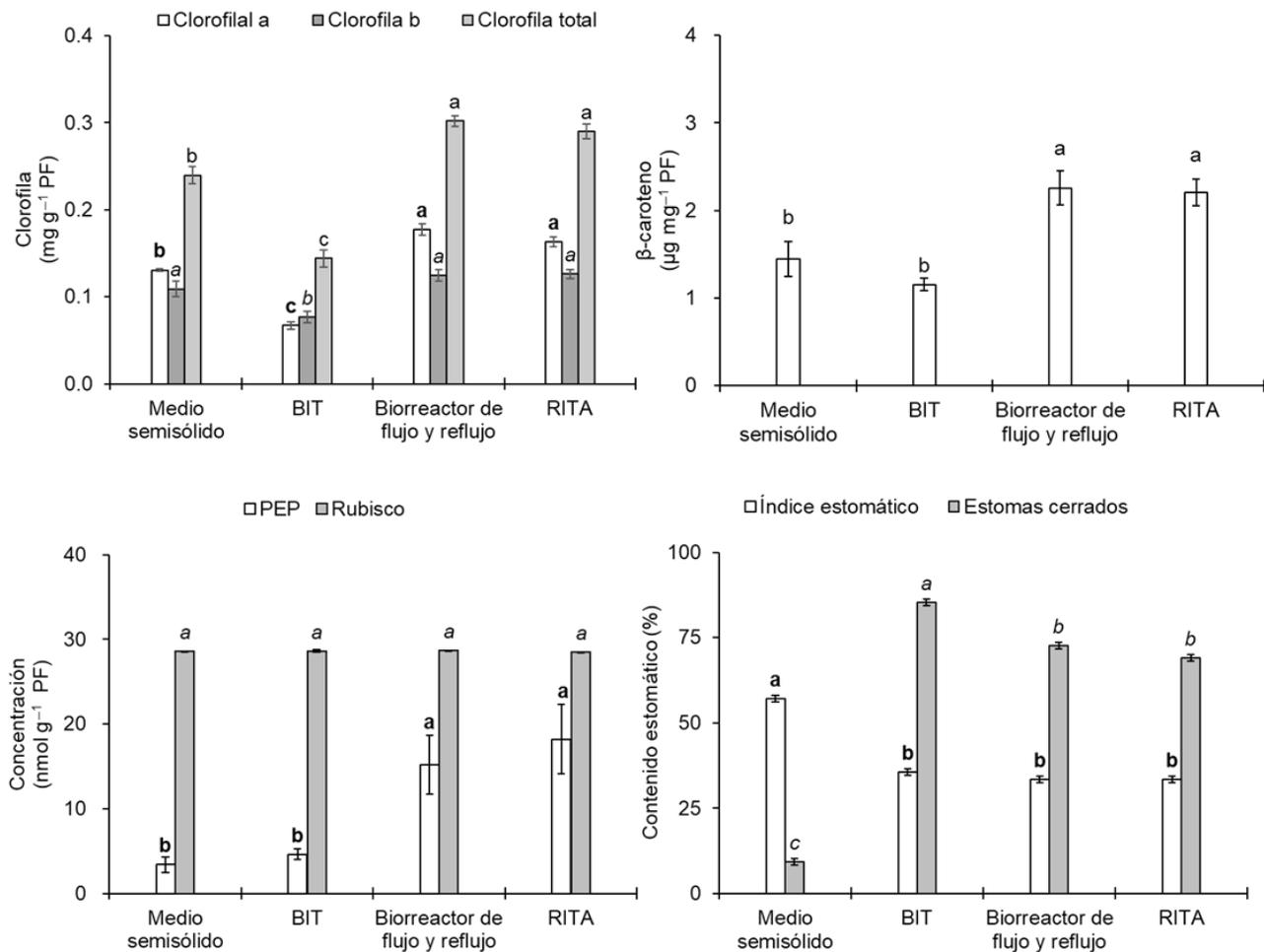
El índice estomático (IE) y porcentaje de estomas cerrados (%EC) mostraron diferencias significativas entre los sistemas de cultivo (Figura 9c). Se observó una morfología estomática similar en todos los sistemas evaluados; sin embargo, el IE más alto fue en sistemas semisólidos, con 57.11%, mientras que los SIT exhibieron un IE más bajo, variando de 33.36% a 35.58%. Para el %CE, los brotes cultivados en inmersión temporal presentaron el mayor %CE, entre 69.11% y 85.30%. Los brotes cultivados en el medio semisólido tuvieron el %CE más bajo, con 9.29%.



**Figura 7.** Índice estomático (IE) y estomas cerrados (EC) en diferentes sistemas de cultivo *in vitro* de brotes de pitahaya (*Hylocereus undatus*). a) Cultivo semisólido, b) biorreactor de inmersión temporal, c) biorreactor de flujo y reflujo y c) biorreactor RITA.

## 5.4 Determinación de fosfoenolpiruvato y Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa

Al evaluar el metabolismo fotosintético en los diferentes sistemas de cultivo no se observaron diferencias en el contenido de Rubisco; sin embargo, se observaron diferencias en el contenido de PEP. Los mayores contenidos de PEP se observaron en inmersión temporal en los sistemas de flujo y reflujo y RITA; mientras que, los menores contenidos se observaron en medio semisólido y BIT (Figura 8c).



**Figura 8.** Efecto del sistema de cultivo en variables fotomixotróficas en multiplicación *in vitro* de pitahaya (*Hylocereus undatus*) después de 60 d en cultivo. a) Contenido de clorofila, b) contenido de carotenoides, c) contenido de fosfoenolpiruvato y Rubisco y c) contenido estomático.

## 5.5 Aclimatización

En la etapa de aclimatización, no se observaron diferencias en el porcentaje de supervivencia en los sistemas de inmersión; los biorreactores de flujo y reflujo y RITA. Las plántulas de pitahaya mostraron una tasa de supervivencia del 99.6% después de 60 d de aclimatización y finalmente fueron trasplantados al campo después de 90 d de cultivo en invernadero (Figura 9).



**Figura 9.** Plántulas *ex vitro* de pitahaya obtenidas en diferentes sistemas de cultivo. a) Plántulas *ex vitro*, b) plántulas después de 20 d en invernadero, c) plántulas después de 60 d en invernadero y d) plantas en campo.

## 6. DISCUSIÓN

### 5.1 Efectos de los sistemas de cultivo en la multiplicación *in vitro*

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la eficiencia de los biorreactores de flujo y reflujo y RITA durante la multiplicación *in vitro* de *H. undatus* en comparación con el sistema de cultivo semisólido y BIT. El bajo porcentaje de respuesta en el BIT podría deberse a que en el biorreactor permanece una fase medio de cultivo líquido, lo que podría ocasionar hipoxia en los explantes. Esto debido a que la pitahaya en condiciones naturales es un cultivo CAM, caracterizada por un metabolismo con mayor eficiencia en el uso del agua y fotorrespiración reducida (Wang *et al.*, 2019). La hipoxia impone un estrés predominantemente a través de la privación de oxígeno, ocasionado además cierre estomático, pérdida de biomasa, necrosis y como consecuencia la muerte de los tejidos (Colmer y Voeselek, 2009; Jensen *et al.*, 2022). Correa-Hernández *et al.* (2022) mencionan que el uso de esponja de poliuretano en los sistemas de inmersión, evita el estrés y la hiperhidricidad, reduciendo la muerte en los explantes.

El incremento de la tasa de multiplicación de *H. undatus* en los biorreactores de flujo y reflujo y RITA podría deberse por una mayor la disponibilidad de nutrimentos y reguladores de desarrollo en el medio de cultivo líquido al permanecer en contacto con toda la superficie de los explantes, en cambio en el medio semisólido los explantes solo toman los nutrimentos de la parte basal del explante. Además, en los sistemas de cultivos semisólido, no hay pérdida de dominancia apical, como ocurre en los sistemas de inmersión evaluados que se encuentran en constante movimiento ocasionada durante la inmersión de los explantes. La pérdida de dominancia apical causada por el transporte de auxinas desde el meristemo apical a la base del explante tiene un efecto sobre la proliferación de nuevos brotes (Nasri *et al.*, 2019). En *Agave angustifolia*, Monja-Mio *et al.* (2021) compararon el biorreactor RITA y medio semisólido, obteniendo 6.23 y 4.01 brotes por explante, respectivamente. En *A. potatorum* Correa-Hernández *et al.* (2022) demostraron el uso eficiente del biorreactor de flujo y reflujo obteniendo 27.71 brotes por explante, en comparación con el medio semisólido, con 6.27 brotes por explante. Recientemente, en *H. undatus* Bello-Bello *et al.* (2021), obtuvieron 10.78 brotes por explante en el biorreactor flujo y reflujo, en comparación con el sistema semisólido, con 5.14 brotes por explante.

### a. Contenido de clorofila y carotenoides

El contenido de clorofila es importante para determinar la tasa fotosintética de los brotes indirectamente en condiciones *in vitro*. En *H. undatus*, respecto a la clorofila total, los mayores contenidos en los biorreactores de flujo y reflujo y RITA pudieron deberse debido a una mayor disponibilidad del nitrógeno (N) y magnesio (Mg), estos elementos forman parte de la molécula de clorofila y cofactores como el cobre (Cu) y hierro (Fe), importantes activadores enzimático en la síntesis de clorofila. El N es un elemento estructural de la clorofila y las moléculas de proteínas, por lo tanto, afecta la formación de cloroplastos y la acumulación de clorofilas (Queiroz-Zepka *et al.*, 2019), el Mg participa en las reacciones de absorción de luz y asimilación de CO<sub>2</sub> en el cloroplasto (Chaudhry *et al.*, 2021). El Fe es esencial en las plantas para prevenir la clorosis de las hojas (Guo *et al.*, 2020); mientras que el Cu desempeña una función clave en la asimilación de CO<sub>2</sub> y la producción de ATP (Marques *et al.*, 2018) y principal constituyente de diversas proteínas como la plastocianina del sistema fotosintético y el citocromo oxidasa de la cadena de transporte de electrones (Zeng *et al.*, 2019). El bajo contenido de clorofila en el BIT pudo deberse al estrés generado por la constante exposición al medio líquido. Fisiológicamente, varios procesos de las plantas se ven afectados por el estrés por deficiencia de O<sub>2</sub>. El exceso de H<sub>2</sub>O aunado a una deficiencia de O<sub>2</sub> puede tener efectos sobre la turgencia celular, índice estomático, transpiración, fotosíntesis, respiración, actividad antioxidante y captación de luz (Falqueto *et al.*, 2017).

En este estudio, el mayor contenido de carotenoides se encontró en los biorreactores de flujo y reflujo y RITA. Los carotenoides juegan un papel importante en el complejo captador de luz y en la fotoprotección de los fotosistemas I y II (Netto *et al.*, 2005). La biosíntesis de carotenoides está regulada por la fitoeno sintasa inducida en respuesta a varios factores como la irradiancia lumínica, el fotoperíodo y longitud de onda (Hirschberg *et al.*, 2001). Por lo tanto, la disponibilidad del β-caroteno probablemente se deba a las condiciones ambientales *in vitro* generadas en los biorreactores de flujo y reflujo y RITA, que favorecen el incremento del contenido de carotenoides en los brotes de *H. undatus*; en comparación con el medio semisólido y el BIT, donde hay una baja acumulación de pigmentos fotosintéticos. De acuerdo a Hendry y Price (1991) una baja síntesis de pigmentos fotosintéticos o la degradación de estos está asociada al estrés oxidativo. Probablemente, el estrés por hipoxia o anoxia en el BIT ocasionó una reducción en la síntesis o degradación de pigmentos fotosintéticos ocasionados por estrés oxidativo; mientras que, el bajo contenido de pigmentos fotosintéticos en medio semisólido podría estar asociada a una menor disponibilidad de nutrientes y/o una baja tasa fotosintética.

### 5.3 Índice estomático y porcentaje de estomas cerrados

El IE y %EC tuvieron un efecto por los diferentes sistemas de cultivo evaluados. El IE es un parámetro fisiológico que mide la densidad de la superficie estomática y se ve afectado por la disponibilidad de agua, humedad relativa, estrés hídrico y la luz (irradiancia, fotoperíodo e intensidad) (Mancilla-Álvarez *et al.*, 2021). En los SIT muestran una reducción en IE, en comparación con el medio semisólido. Este hecho podría deberse a que el sistema de cultivo semisólido mantiene una alta humedad relativa en el recipiente de cultivo, lo que podría provocar altas tasas de transpiración en los brotes. El bajo índice estomático en IT podría deberse a una menor transpiración, lo que provoca una menor humedad relativa en el recipiente de cultivo debido a la aireación constante durante la inmersión temporal. Respecto al alto porcentaje de estomas cerrados en los sistemas de flujo y reflujo y RITA, esta variable indica una adecuada funcionalidad estomática (Hazarika, 2006); sin embargo, en el biorreactor BIT se observó mayor porcentaje de estomas cerrados, esto probablemente a la condición de estrés por hipoxia. Esto se debe cuando la lámina de medio de cultivo cubre parcialmente el explante e impide la circulación libre de oxígeno (San José *et al.*, 2020). De acuerdo a Wang *et al.*, (2017), las plantas cierran sus estomas para regular el consumo de O<sub>2</sub> disponible. Los resultados obtenidos en el sistema semisólido con 90% de estomas abiertos indica una capacidad parcial para la funcionalidad estomática. Según Aragón *et al.* (2014), mencionan que en el sistema semisólido tiene una tasa de fotosíntesis más baja y una tasa de respiración más alta que los SIT. En los SIT ocurre una aireación constante del espacio de cabeza y la humedad relativa es menor, permitiendo la entrada de gases y el enriquecimiento de CO<sub>2</sub>, evitando su acumulación, favoreciendo así el funcionamiento estomático y contribuyendo a la preparación de las estomas para la transición de *in vitro* a *ex vitro* (Monja-Mio *et al.*, 2015; Asayesh *et al.*, 2017).

#### 5.4 Determinación de PEP y Rubisco

El mayor contenido de PEP en los biorreactores de flujo y reflujo y RITA demuestra un efecto fotomixotrófico bajo las condiciones de cultivo evaluadas. El contenido de PEP es un indicador de la actividad enzimática de PEPC (fosfoenolpiruvato carboxilasa) tanto en plantas C<sub>4</sub> como en CAM. La PEPC funciona para la fijación de CO<sub>2</sub> durante la fase oscura de fotosíntesis y por lo tanto promueve una mayor tasa fotosintética (Hurtado-Gaitán *et al.*, 2021). Por otro lado, los otros sistemas de cultivo no mostraron un incremento en el contenido de PEP, por lo tanto, una menor capacidad fotomixotrófica. El contenido de PEP es esencial para el desarrollo de cloroplastos funcionales, asegura la acumulación de proteínas fotosintéticas en las membranas tilacoides y Rubisco en el estroma (Shi *et al.*, 2015; Vitlin y Feiz, 2018). Yoon *et al.* (2009), en plántulas de orquídea (*Phalaenopsis* cv 'Amaglade') observaron que durante el crecimiento *in vitro* hubo un incremento significativo de la actividad de Rubisco (0.25 nmol mg<sup>-1</sup> proteína min<sup>-1</sup>) y PEPC (0.23 nmol mg<sup>-1</sup> proteína min<sup>-1</sup>) bajo enriquecimiento de CO<sub>2</sub>. Ping *et al.* (2018), en orquídea (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*) determinaron que durante el desarrollo de protocormos, las fluctuaciones diurnas en la actividad PEPC (18 μmole mg<sup>-1</sup> proteína h<sup>-1</sup>) fueron similares a los contenidos en malato. Giuliani *et al.* (2019), en plantas de arroz (*Oryza sativa*) determinaron que el contenido de PEP puede variar tanto en la luz como en la oscuridad, la actividad de PEP *in vitro* fue 25 veces mayor en plantas que sobre expresaron PEP en comparación con el grupo de plantas control.

Respecto a Rubisco, todos los sistemas de cultivo tuvieron el mismo contenido. EL contenido de Rubisco es importante para la fijación de CO<sub>2</sub>, esta enzima restringe el flujo de carbono a los ciclos de Calvin y la fotorrespiración (Golovko *et al.*, 2021). El contenido de Rubisco afecta directamente la tasa fotosintética (Orlov *et al.*, 2022). En este estudio, el contenido de Rubisco fue más alto que PEP. Esto podría deberse a la afinidad por el sustrato generada por la variación de la concentración de CO<sub>2</sub>, fotoperíodo y fuente de carbono (sacarosa). De la Viña *et al.* (1999), en plántulas de aguacate (*Persea americana* Mill.) cultivadas *in vitro*, encontraron un incremento en la actividad de Rubisco (0.32 g m<sup>-2</sup>) al usar concentraciones bajas de sacarosa y elevadas de CO<sub>2</sub>. Aragón *et al.* (2010) en brotes *in vitro* de plátano (*Musa* AAB, CEMSA 3/4), reportaron un incremento en la actividad de PEPC (17 Ug PF<sup>-1</sup>) inducida por una alta irradiancia de luz y enriquecimiento de CO<sub>2</sub> utilizando biorreactores BIT. He *et al.* (2020) en plántulas de aceite de árbol (*Camellia oleifera*) cultivadas *in vitro*, observaron un incremento en la actividad de Rubisco (74 y 80 Ug PF<sup>-1</sup>) bajo diferentes espectros de luz blanca y azul, respectivamente; en comparación con la luz roja (60 Ug PF<sup>-1</sup>).

Las plantas CAM exhiben grandes cantidades de PEP para la fijación de CO<sub>2</sub> y poseen sistemas de enzimas decarboxilasas activas para poder proveer refijación de CO<sub>2</sub> mediante el ciclo de Calvin. Rubisco como la PEPC se encuentran fuertemente influenciadas por concentraciones de sustratos: ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP) y fosfoenolpiruvato, respectivamente; así, el suministro de RuBP demanda suficientes electrones en la cadena transportadora de la fotosíntesis para generar sustrato de manera lineal con la demanda enzimática. La inducción del comportamiento fotomixotrófico *in vitro* de brotes mejoró la supervivencia *ex vitro*. El fotomixotrofismo en plantas cultivadas *in vitro* podría deberse a la variación en el contenido de sacarosa (Iarema *et al.*, 2012), enriquecimiento con CO<sub>2</sub> (Saldanha *et al.*, 2013), el uso de biorreactores para mejorar el intercambio de gases (Martínez-Estrada *et al.* 2017), variación en la irradiancia lumínica (Askari *et al.*, 2022) y, la combinación en el contenido de sacarosa y enriquecimiento de CO<sub>2</sub> (Gago *et al.*, 2022). En este estudio, el aire inyectado por el compresor mantiene un suministro constante de 500 ± 50 ppm de CO<sub>2</sub> en una frecuencia de inmersión, considerando tres frecuencias de inmersión por día se obtiene suministro de 1500 ± 150 ppm de CO<sub>2</sub>. Probablemente, parte de esta cantidad de CO<sub>2</sub> es aprovechada para promover la fotosíntesis *in vitro* debido a que las plantas CAM como pitahaya fijan CO<sub>2</sub> atmosférico por la noche, promoviendo así un metabolismo fotomixotrófico para promover el proceso de aclimatización.

## 5.5 Aclimatización

La aclimatización es la etapa final de la micropropagación. En esta etapa, los brotes *in vitro* deben ajustarse al ambiente *ex vitro*. Durante el cultivo *in vitro*, los brotes exhiben cambios fisiológicos problemas que dificultan su aclimatización, entre ellos, el limitado mecanismo de cierre de estomas causado por la alta humedad relativa en los contenedores de cultivo, lo que resulta un bajo porcentaje de supervivencia durante la aclimatización. Varios estudios muestran que los SIT promueven la apertura y el cierre de estomas (Aragón *et al.* 2014; Ahmadian *et al.* 2017; Martínez-Estrada *et al.* 2019). Las altas tasas de supervivencia (99.6%) obtenidas durante la aclimatización con los sistemas de cultivo; de flujo y reflujo y RITA, garantizan la eficiencia del protocolo de propagación *in vitro* de pitahaya. Estos resultados podrían deberse a las prácticas adecuadas de manejo de las plántulas en el invernadero, como riego, fertilización, humedad relativa e irradiancia adecuadas. Estos factores contribuyen a una tasa de mortalidad mínima. Según Malda *et al.* (1999), la familia Cactaceae y otras especies con CAM tienen una cutícula fuertemente desarrollada y se puede rehidratar fácilmente. La actividad fotomixotrófica en inmersión temporal con biorreactores de flujo y reflujo y RITA mejoró la tasa de

supervivencia durante la aclimatización. Estas ventajas podrían explicar el alto porcentaje de supervivencia de los brotes obtenidos *in vitro* en estos sistemas de cultivo.

## **5.6 Discusión general**

Actualmente existen diferentes modelos de biorreactores para la micropropagación; sin embargo, el diseño es un factor que influye en la fisiología de las plantas cultivadas *in vitro* (Bello-Bello *et al.*, 2019; Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2019). Es importante realizar estudios que comparen la eficiencia de cada sistema de cultivo debido a su disponibilidad y variaciones en el costo, el tamaño del biorreactor y la vía de regeneración utilizada (Kime *et al.*, 2020; José *et al.*, 2020). Además, se ha demostrado que en los SIT que utilizan un flujo de aire mejoran la capacidad fotomixotrófica debido a que el aire que se suministra contiene gases como Nitrógeno, Oxígeno y CO<sub>2</sub>. Este último es importante para inducir el fotomixotrofismo *in vitro*, el cual es importante para continuar con el proceso de fotosíntesis *ex vitro* durante la aclimatización.

## 7. CONCLUSIONES

- Los sistemas de cultivo en medio semisólido y los biorreactores de flujo y reflujo y RITA mostraron el mayor porcentaje de respuesta de los explantes; mientras que, el mayor número de brotes con mayor longitud se observó en los biorreactores de flujo y reflujo y RITA.
- El cultivo en los biorreactores de flujo y reflujo y RITA presentaron un alto contenido de clorofila y carotenoides respecto a los sistemas de cultivo en medio semisólido y BIT.
- El sistema de cultivo en medio semisólido presentó el mayor índice estomático, mientras que, en el BIT se observó el mayor porcentaje de estomas cerrados.
- Los sistemas de cultivo en biorreactores de flujo y reflujo y RITA mostraron el mayor contenido de PEP; mientras que, para el contenido de Rubisco no se observaron diferencias en los diferentes sistemas de cultivo.
- Los sistemas de cultivo en los biorreactores de flujo y reflujo y RITA mostraron la mayor tasa de supervivencia durante la aclimatización.
- La utilización de los biorreactores de flujo y reflujo y RITA son una alternativa para la micropropagación comercial de *H. undatus*; sin embargo, debido a su bajo costo, se recomienda el uso del biorreactor de flujo y reflujo.

## 8. REFERENCIAS

- Ahmadian, M., Babaei, A., Shokri, S., y Hessami, S. (2017). Micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in liquid medium by temporary immersion bioreactor in comparison with solid culture. *Journal, Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.07.005>
- Alamilla-Magaña, J. C., Caamal-Velázquez, J. H., Criollo-Chan, M. A., Vera-López, J. E., y Reyes-Montero, J. A. (2019). Biofábricas y biorreactores de inmersión temporal: Propagación *in vitro* de *Anthurium andreanum* L., y su viabilidad económica. *Agro Productividad*, 12(10). <https://doi.org/10.32854/agrop.vi0.1457>
- Al-Mekhlafi, N. A., Mediani, A., Ismail, N. H., Abas, F., Dymerski, T., Lubinska-Szczygeł, M., and Gorinstein, S. (2021). Metabolomic and antioxidant properties of different varieties and origins of Dragon fruit. *Microchemical Journal*, 160, 105687. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105687>
- Alvard, D., Cote, F., and Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant cell, tissue and organ culture*, 32(1), 55-60. <https://doi.org/10.1007/BF00040116>
- Alvard, D., Cote, F., and Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant cell, tissue and organ culture*, 32(1), 55-60. <https://doi.org/10.1007/BF00040116>
- Aragón, C. E., Escalona, M., Rodriguez, R., Cañal, M. J., Capote, I., Pina, D., and González-Olmedo, J. (2010). Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46(1), 89-94. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9246-2>
- Aragón, C. E., Escalona, M., Rodriguez, R., Cañal, M. J., Capote, I., Pina, D., and González-Olmedo, J. (2009). Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46(1), 89-94. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9246-2>
- Aragón, C. E., Escalona, M., Rodriguez, R., Cañal, M. J., Capote, I., Pina, D., & González-Olmedo, J. (2010). Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant: Journal of the Tissue Culture Association*, 46(1), 89–94. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9246-2>
- Aragón, C. E., Sánchez, C., Gonzalez-Olmedo, J., Escalona, M., Carvalho, L., & Amâncio, S. (2014). Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors

- and gelled medium during *in vitro* growth and acclimatization. *Biologia Plantarum*, 58(1), 29–38. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0381-6>
- Arano-Avalos, S., Gómez-Merino, F. C., Mancilla-Álvarez, E., Sánchez-Páez, R., & Bello-Bello, J. J. (2020). An efficient protocol for commercial micropropagation of malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) using temporary immersion. *Scientia Horticulturae*, 261, 108998. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108998>
- Askari, N., Aliniaiefard, S., and Visser, R. G. (2022). Low CO<sub>2</sub> Levels Are Detrimental for *In Vitro* Plantlets through Disturbance of Photosynthetic Functionality and Accumulation of Reactive Oxygen Species. *Horticulturae*, 8(1), 44. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8010044>
- Askari, N., Aliniaiefard, S., and Visser, R. G. (2022). Low CO<sub>2</sub> Levels Are Detrimental for *In Vitro* Plantlets through Disturbance of Photosynthetic Functionality and Accumulation of Reactive Oxygen Species. *Horticulturae*, 8(1), 44. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8010044>
- Attar, S. H., Gündeşli, M. A., Urün, I., Kafkas, S., Kafkas, N. E., Ercisli, S., Ge, C., Mlcek, J., and Adamkova, A. (2022). Nutritional Analysis of Red-Purple y White-Fleshed Pitaya (*Hylocereus*) Species. *Molecules*, 27(3): 808. <https://doi.org/10.3390/molecules27030808>
- Balendres, M. A., and Bengoa, J. C. (2019). Diseases of dragon fruit (*Hylocereus* species): Etiology and current management options. *Crop protection*, 126, 104920. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104920>
- Balois-Morales, R., Peña-Valdivia, C.B., and Arroyo-Peña, V.B. (2013). Síntomas y sensibilidad al daño por frío de frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus* (haw.) britton & rose) durante la poscosecha. *Agrociencia*, 47 (8), 795-813.
- Bednarek, P.T., and Orłowska, R. (2020). Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 140: 245-257. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01724-1>
- Bello-Bello, J. J., Cruz-Cruz, C. A., and Pérez-Guerra, J. C. (2019). A new temporary immersion system for commercial micropropagation of banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine). *In Vitro Cellular & Developmental Biology–Plant*, 55: 313-320. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09973-7>
- Bello-Bello, J. J., Schettino-Salomón, S., Ortega-Espinoza, J., and Spinoso-Castillo, J. L. (2021). A temporary immersion system for mass micropropagation of pitahaya (*Hylocereus undatus*). *3 Biotech*, 11: 437. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02984-5>
- Bhojwani, S. S., and Dantu, P. K. (2013). Micropropagation. In: *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer, India, pp. 245-274. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9\\_17](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_17)

- Carvalho, L. S. O., Ozudogru, E. A., Lambardi, M., and Paiva, L. V. (2019). Temporary immersion system for micropropagation of tree species: a bibliographic and systematic review. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(2): 269-277. <https://doi.org/10.15835/nbha47111305>
- Cecchin, M., Benfatto, S., Griggio, F., Mori, A., Cazzaniga, S., Vitulo, N., Delledonne, M., and Ballottari, M. (2018). Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana*. *Scientific Reports*, 8: 6465. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24979-8>
- Chaudhry, A. H., Nayab, S., Hussain, S. B., Ali, M., & Pan, Z. (2021). Current understandings on magnesium deficiency and future outlooks for sustainable agriculture. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1819. <https://doi.org/10.3390/ijms22041819>
- Chen, J. Y., Xie, F. F., Cui, Y. Z., Chen, C. B., Lu, W. J., Hu, X. D., and Qin, Y. H. (2021). A chromosome-scale genome sequence of pitaya (*Hylocereus undatus*) provides novel insights into the genome evolution and regulation of betalain biosynthesis. *Horticulture Research*, 8: 164. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00612-0>
- Chu, Y. C., and Chang, J. C. (2022). Codification and description of the phenological growth stages of red-fleshed pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) using the extended BBCH scale-with special reference to spines, areole, and flesh color development under field conditions. *Scientia Horticulturae*, 293, 110752. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110752>
- Coelho, N., Gonçalves, S., and Romano, A. (2020). Endemic plant species conservation: Biotechnological approaches. *Plants*, 9(3), 345. <https://doi.org/10.3390/plants9030345>
- Colmer, T. D., & Voesenek, L. (2009). Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Functional plant biology : FPB*, 36(8), 665–681. <https://doi.org/10.1071/FP09144>
- Correa-Hernández, L., Baltazar-Bernal, O., Sánchez-Páez, R., and Bello-Bello, J. J. (2022). *In vitro* multiplication of agave tobala (*Agave potatorum* Zucc.) using Ebb-and-Flow bioreactor. *South African Journal of Botany*, 147: 670-677. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.03.009>
- Correa-Hernández, L., Baltazar-Bernal, O., Sánchez-Páez, R., and Bello-Bello, J. J. (2022). *In vitro* multiplication of agave tobala (*Agave potatorum* Zucc.) using Ebb-and-Flow bioreactor. *South African Journal of Botany*, 147: 670-677. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.03.009>
- Courbaril L. (caesalpinioideae). *Water, Air, and Soil Pollution*, 229(5). <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3769-2>
- de Araújo, F.F., de Paulo Farias, D., Neri-Numa, I.A., and Pastore, G.M. (2021). Underutilized plants of the Cactaceae family: Nutritional aspects and technological applications. *Food Chemistry*, 362, 130196. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130196>

- De Carlo, A., Tarraf, W., Lambardi, M., and Benelli, C. (2021). Temporary Immersion System for Production of Biomass and Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *Agronomy*, 11(12): 2414. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122414>
- De Carlo, A., Tarraf, W., Lambardi, M., and Benelli, C. (2021). Temporary Immersion System for Production of Biomass and Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *Agronomy*, 11(12): 2414. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122414>
- De dios, H. C. (2005). A new subspecies of *Hylocereus undatus* (Cactaceae) from southeastern México. *Haseltonia*, (11): 11-17. [https://doi.org/10.2985/1070-0048\(2005\)11\[11:ANSOHU\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2985/1070-0048(2005)11[11:ANSOHU]2.0.CO;2)
- de la Viña, G., Pliego-Alfaro, F., Driscoll, S. P., Mitchell, V. J., Parry, M. A., & Lawlor, D. W. (1999). Effects of CO<sub>2</sub> and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown *in vitro*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(7–8), 587–595. [https://doi.org/10.1016/s0981-9428\(00\)80111-4](https://doi.org/10.1016/s0981-9428(00)80111-4)
- Debnath, S. C., and Arigundam, U. (2020). *In vitro* propagation strategies of medicinally important berry crop, lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *Agronomy*, 10(5): 744. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050744>
- Debnath, S. C., and Arigundam, U. (2020). *In vitro* propagation strategies of medicinally important berry crop, lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *Agronomy*, 10(5): 744. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050744>
- Ducos J. P., Lambot, C., and Pétiard, V. (2007). Bioreactors for coffee mass propagation by somatic embryogenesis. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 1:1-12.
- Ducos J. P., Lambot, C., and Pétiard, V. (2007). Bioreactors for coffee mass propagation by somatic embryogenesis. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 1:1-12.
- Escalona, M.; Lorenzo, J.C.; Daquinta, M.; Desjardins, Y.; Borroto, C.G. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep.* 1999,18, 743–748. <https://doi.org/10.1007/s002990050653>
- Etienne, H., Bertrand, B., Georget, F., Lartaud, M., Montes, F., Dechamp, E., and Barry-Etienne, D. (2013). Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects. *Tree Physiology*, 33(6): 640-653. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt034>
- Etienne, H., Bertrand, B., Georget, F., Lartaud, M., Montes, F., Dechamp, E., and Barry-Etienne, D. (2013). Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects. *Tree Physiology*, 33(6): 640-653. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt034>
- Falqueto, A. R., da Silva Júnior, R. A., Gomes, M. T. G., Martins, J. P. R., Silva, D. M., & Partelli, F. L. (2017). Effects of drought stress on chlorophyll a fluorescence in two

rubber tree clones. *Scientia horticultrae*, 224, 238–243.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.06.019>

- Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in plant science*, 10: 536.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Gago, D.; Bernal, M.Á.; Sánchez, C.; Aldrey, A.; Cuenca, B.; Christie, C.B.; Vidal, N. Effect of Sucrose on Growth and Stress Status of *Castanea sativa* x *C. crenata* Shoots Cultured in Liquid Medium. *Plants* 2022, 11, 965. <https://doi.org/10.3390/plants11070965>
- Galan, V., Rangel, A., Lopez, J., Hernandez, J. B. P., Sandoval, J., and Rocha, H. S. (2018). Propagación del banano: técnicas tradicionales, nuevas tecnologías e innovaciones. *Revista Brasileira de fruticultura*, 40. <https://doi.org/10.1590/0100-29452018574>
- García-Rubio, L. A., Vargas-Ponce, O., Ramírez-Mireles, F. D. J., Munguía-Lino, G., Corona-Oceguera, C. A., y Cruz-Hernández, T. (2015). Distribución geográfica de *Hylocereus* (Cactaceae) en México. *Botanical Sciences*, 93(4): 921-939.  
<https://doi.org/10.17129/botsci.282>
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., and Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in life sciences*, 14(6), 607-621.  
<https://doi.org/10.1002/elsc.201300166>
- Georgiev, V., Slavov, A., Vasileva, I., and Pavlov, A. (2018). Plant cell culture as emerging technology for production of active cosmetic ingredients. *Engineering in life sciences*, 18 (11): 779-798. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800066>
- Georgin, J., da Boit Martinello, K., Franco, D. S., Netto, M. S., Picilli, D. G., Yilmaz, M., Silva, L.F.O., and Dotto, G. L. (2022). Residual peel of pitaya fruit (*Hylocereus undatus*) as a precursor to obtaining an efficient carbon-based adsorbent for the removal of metanil yellow dye from water. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(1), 107006.  
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.107006>
- Giuliani, R., Karki, S., Covshoff, S., Lin, H.-C., Coe, R. A., Koteyeva, N. K., Evans, M. A., Quick, W. P., von Caemmerer, S., Furbank, R. T., Hibberd, J. M., Edwards, G. E., & Cousins, A. B. (2019). Transgenic maize phosphoenolpyruvate carboxylase alters leaf-atmosphere CO<sub>2</sub> and 13CO<sub>2</sub> exchanges in *Oryza sativa*. *Photosynthesis Research*, 142(2), 153–167. <https://doi.org/10.1007/s11120-019-00655-4>
- Golovko, T. K., Zakhochiy, I. G., & Tabalenkova, G. N. (2021). Induction of CAM photosynthesis in *Hylotelephium triphyllum* (haw.) Holub (crassulaceae) under climatic conditions of the European northeast of Russia. *Russian Journal of Plant Physiology: A Comprehensive Russian Journal on Modern Phytophysiology*, 68(1), 179–187.  
<https://doi.org/10.1134/s1021443720060047>

- Guo, A., Hu, Y., Shi, M., Wang, H., Wu, Y., & Wang, Y. (2020). Effects of iron deficiency and exogenous sucrose on the intermediates of chlorophyll biosynthesis in *Malus halliana*. *PloS One*, 15(5), e0232694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232694>
- Hazarika, B. N. (2006). Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108(2), 105–120. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.038>
- He, C., Zeng, Y., Fu, Y., Wu, J., & Liang, Q. (2020). Light quality affects the proliferation of *in vitro* cultured plantlets of *Camellia oleifera* Huajin. *PeerJ*, 8(e10016), e10016. <https://doi.org/10.7717/peerj.10016>
- Hirschberg, J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(3), 210–218. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(00\)00163-1](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(00)00163-1)
- Hoang, N. N., Kitaya, Y., Morishita, T., Endo, R., and Shibuya T. (2017). A comparative study on growth and morphology of wasabi plantlets under the influence of the micro-environment in shoot and root zones during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 130:255-263. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1219-2>
- Hurtado-Gaitán, E.; Sellés-Marchart, S.; Hartwell, J.; Martínez-Esteso, M.J.; Bru-Martínez, R. Down-Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase Kinase in Grapevine Cell Cultures and Leaves Is Linked to Enhanced Resveratrol Biosynthesis. *Biomolecules* 2021, 11, 1641. <https://doi.org/10.3390/biom11111641>
- Hwang, H. D., Kwon, S. H., Murthy, H. N., Yun, S. W., Pyo, S. S., and Park, S. Y. (2022). Temporary immersion bioreactor system as an efficient method for mass production of *in vitro* plants in horticulture and medicinal plants. *Agronomy*, 12(2): 346. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020346>
- Hwang, H. D., Kwon, S. H., Murthy, H. N., Yun, S. W., Pyo, S. S., and Park, S. Y. (2022). Temporary immersion bioreactor system as an efficient method for mass production of *in vitro* plants in horticulture and medicinal plants. *Agronomy*, 12(2): 346. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020346>
- Iarema, L., da Cruz, A. C. F., Saldanha, C. W., Dias, L. L. C., Vieira, R. F., de Oliveira, E. J., & Otoni, W. C. (2012). Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110(2), 227–238. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0145-6>
- Jalgaonkar, K., Mahawar, M. K., Bibwe, B., and Kannaujia, P. (2020). Postharvest profile, processing and waste utilization of dragon fruit (*Hylocereus* spp.): a review. *Food Reviews International*, 1-27. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1742152>
- Jiang, Y.L., T.S. Lin, Ch.L. Lee, Ch.R. Yen, and W.J. Yen. (2011). Phenology, canopy composition, and fruit quality of yellow pitaya in tropical Taiwan. *HortScience* 46: 1497-1502. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.11.1497>

- Khalili R.M.A., Norhayati A.H., Rokiah M.Y., Asmah R., Muskinah M.S., Manaf A.A. (2009) Hypocholesterolemic effect of red pitaya (*Hylocereus* sp.) on hypercholesterolemia induced rats. *International Food Research Journal*, 16:431–440.
- Khoobkar, Z., & Delavari Amrei, H. (2021). Effect of photo, hetero and mixotrophic conditions on the growth and composition of *Anabaena variabilis*: An Energy Nexus approach. *Energy Nexus*, 2(100010), 100010. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2021.100010>
- Kishore, K. (2016). Phenological growth stages of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) according to the extended BBCH-scale. *Scientia Horticulturae*, 213: 294-302. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.10.047>
- Le Bellec, F. y Vaillant, F. (2011). Pitahaya (pitaya) (*Hylocereus* spp.). En *Biología y tecnología poscosecha de frutas tropicales y subtropicales* (págs. 247-273e). Editorial Woodhead. <https://doi.org/10.1533/9780857092618.247>
- Leyva-Ovalle, O. R., Bello-Bello, J. J., Murguía-González, J., Núñez-Pastrana, and Ramírez-Mosqueda, M. A. (2020). Micropropagation of *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler et W. E. Higging in Temporary Immersion Systems. *3 Biotech*, 10, 26. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2010-3>
- Loyola-González, O., Medina-Pérez, M. A., Hernández-Tamayo, D., Monroy, R., Carrasco-Ochoa, J. A., and García-Borroto, M. (2019). A pattern-based approach for detecting pneumatic failures on temporary immersion bioreactors. *Sensors*, 19(2): 414. <https://doi.org/10.3390/s19020414>
- Loyola-Vargas, V. M., and Ochoa-Alejo, N. (2018). An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Prospects. En: Loyola-Vargas, V.M. y Ochoa-Alejo, N. (eds) *Protocolos de cultivo de células vegetales*. Springer, Nueva York, NY, pp 3-13. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_1)
- Lu, S., and Merkle, S.A. (2021). Enhancing hybrid Liquidambar somatic seedling production using a temporary immersion bioreactor. *Trees Structure and Function*, 35, 503-512. <https://doi.org/10.1007/s00468-020-02052-0>
- Malda, G., Backhaus, R. A., & Martin, C. (1999). *Plant cell, tissue and organ culture*, 58(1), 1–9. <https://doi.org/10.1023/a:1006377206855>
- Maleki Asayesh, Z., Vahdati, K., Aliniaiefard, S., & Askari, N. (2017). Enhancement of ex vitro acclimation of walnut plantlets through modification of stomatal characteristics *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 220, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.03.045>
- Mancilla-Álvarez, E., Pérez-Sato, J. A., Núñez-Pastrana, R., Spinoso-Castillo, J. L., and Bello-Bello, J. J. (2021). Comparison of different semi-automated bioreactors for *in vitro* propagation of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott). *Plants*, 10(5), 1010. <https://doi.org/10.3390/plants10051010>

- Marques, D. M., Veroneze Júnior, V., da Silva, A. B., Mantovani, J. R., Magalhães, P. C., & de Souza, T. C. (2018). Copper toxicity on photosynthetic responses and root morphology of *Hymenaea*
- Martínez-Estrada, E., Islas-Luna, B., Pérez-Sato, J. A., and Bello-Bello, J. J. (2019). Temporary immersion improves *in vitro* multiplication and acclimatization of *Anthurium andreaeanum* Lind. *Scientia Horticulturae*, 249, 185-191. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.053>
- Martins, J. P. R., de Almeida Rodrigues, L. C., and Santos, E. R. (2020). Impacts of photoautotrophic, photomixotrophic, and heterotrophic conditions on the anatomy and photosystem II of *in vitro*-propagated *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. (Bromeliaceae), *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 56: 350-361. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10034-2>
- Martins, J. P. R., Verdoodt, V., Pasqual, P., and De Proft, M. (2015). Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on *in vitro* propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123:121-132. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0820-5>
- Mizrabi, Y., A. Nerd, and Y. Sitrit. (2002). New fruits for arid climates. In: Janick, J., and A. Whipkey (eds). *ASHS Press: New Trends in New Crops and New Uses*. Alexandria, VA. pp: 378-384.
- Monja-Mio, K. M., Olvera-Casanova, D., Herrera-Alamillo, M. Á., Sánchez-Teyer, F. L., and Robert, M. L. (2021). Comparison of conventional and temporary immersion systems on micropropagation (multiplication phase) of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora'. *3 Biotech*, 11(2): 1-8. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02604-8>
- Monja-Mio, K. M., Pool, F. B., Herrera, G. H., EsquedaValle, M., & Robert, M. L. (2015). Development of the stomatal complex and leaf surface of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora' plantlets during the *in vitro* to *ex vitro* transition process. *Scientia Horticulturae*, 189, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.032>
- Nasri, A., Baklouti, E., Ben Romdhane, A., Maalej, M., Schumacher, H. M., Drira, N., & Fki, L. (2019). Large-scale propagation of *Myrobolan* (*Prunus cerasifera*) in RITA® bioreactors and ISSR-based assessment of genetic conformity. *Scientia Horticulturae*, 245, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.016>
- Netto, A. T., Campostrini, E., Oliveira, J. G. de, & Bressan-Smith, R. E. (2005). Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Scientia Horticulturae*, 104(2), 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.08.013>
- Neumann, K. H., Kumar, A., and Imani, J. (2020). Historical Developments of Cell and Tissue Culture Techniques. In *Plant Cell and Tissue Culture—A Tool in Biotechnology*; Springer: Cham, Germany, pp. 13-24. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-49098-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-49098-0_2)

- Nguyen, Q. T., Xiao, Y., and Kozai, T. (2020). Photoautotrophic micropropagation. *Plant Factory (Second Edition)*, pp, 333-346. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816691-8.00023-6>
- Nizamlioglu, NM, Ünver, A. y Kadakal, Ç. (2021). Contenido mineral de semillas de Pitaya (*Hylocereus polyrhizus* e *Hylocereus undatus*) cultivadas en Turquía. *Erwerbs-Obstbau*, 63: 209-213. <https://doi.org/10.1007/s10341-021-00561-x>
- Orlov, N. M., Viktorova, V. A., & Eskov, A. K. (2022). CAM (crassulacean acid metabolism) photosynthesis in vascular epiphytes. *Biology Bulletin Reviews*, 12(5), 527–543. <https://doi.org/10.1134/s2079086422050073>
- Osuna-Enciso, T., Valdez-Torres, JB, Sañudo-Barajas, JA, Muy-Rangel, MA, Hernández-Verdugo, S., Villarreal-Romero, M., & Osuna-Rodriguez, J.M. (2016). Fenología reproductiva, rendimiento y calidad de fruto de pitahaya (*Hylocereus undatus* (How.) Britton and Rose) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Agrociencia*, 50 (1), 61-78.
- Paško, P., Galanty, A., Zagrodzki, P., Ku, Y. G., Luksirikul, P., Weisz, M., and Gorinstein, S. (2021). Bioactivity and cytotoxicity of different species of pitaya fruits—A comparative study with advanced chemometric analysis. *Food Bioscience*, 40: 100888. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100888>
- Paško, P., Galanty, A., Zagrodzki, P., Ku, Y. G., Luksirikul, P., Weisz, M., and Gorinstein, S. (2021). Bioactivity and cytotoxicity of different species of pitaya fruits—A comparative study with advanced chemometric analysis. *Food Bioscience*, 40, 100888. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100888>
- Peñate, L., Concepción, O., Aragón, C., Rodríguez, R., González-Olmedo, J. L., Escalona, M., Cid, M., & Pina, D. (2007). Evaluation the effect of three *in vitro* culture conditions in the quality of sugar cane plants propagated in Temporary Immersion Bioreactors. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ20220227629>
- Ping C-Y, Chen F-C, Cheng T-C, Lin H-L, Lin T-S, Yang W-J and Lee Y-I (2018) Expression Profiles of Phosphoenolpyruvate Carboxylase and Phosphoenolpyruvate Carboxylase Kinase Genes in *Phalaenopsis*, Implications for Regulating the Performance of Crassulacean Acid Metabolism. *Front. Plant Sci.* 9:1587. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01587>
- Pinheiro, M.V.M., Ríos-Ríos, A.M., da Cruz, A.C.F., Rocha, D.I., Orbes, M.Y., Saldanha, C.W., Batista S.D., Prtugal, A.C., de Cavalho P., and Otoni, W.C. (2021). CO2 enrichment alters morphophysiology and improves growth and acclimatization in *Etilingera elatior* (Jack) RM Smith micropropagated plants. *Brazilian Journal of Botany*, 44(4), 799-809.
- Price, A. H., & Hendry, G. A. F. (1991). Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. *Plant, Cell & Environment*, 14(5), 477–484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1991.tb01517.x>

- Ptak, A., Morańska, E., Skrzypek, E., Warchoń, M., Spina, R., Laurain-Mattar, D., and Simlat, M. (2020). Carbohydrates stimulated Amaryllidaceae alkaloids biosynthesis in *Leucojum aestivum* L. plants cultured in RITA® bioreactor. *PeerJ*, 8, e8688. <https://doi.org/10.7717/peerj.8688>
- Queiroz Zepka, L., Jacob-Lopes, E., & Roca, M. (2019). Catabolism and bioactive properties of chlorophylls. *Current Opinion in Food Science*, 26, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.04.004>
- Ramírez-Mosqueda, M. A., and Iglesias-Andreu, L. G. (2016). Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 52, 154-160 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9735-4>
- Ramírez-Mosqueda, M. A., Cruz-Cruz, C. A., Cano-Ricárdez, A., and Bello-Bello, J. J. (2019). Assessment of different temporary immersion systems in the micropropagation of anthurium (*Anthurium andreanum*). *3 Biotech*, 9, 307. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1833-2>
- Regueira, M., Rial, E., Blanco, B., Bogo, B., Aldrey, A., Correa, B., Varas, E., Sánchez, C., and Vidal, N. (2018). Micropropagation of axillary shoots of *Salix viminalis* using a temporary immersion system. *Trees Structure and Function*, 32: 61-71. <https://doi.org/10.1007/s00468-017-1611-x>
- Rivero, A. M., Frómeta, O. M., Daquinta, M., and Morgado, M. M. E. (2018). Efecto del Vitrofur® en la calidad morfofisiológica de brotes de caña de azúcar var. C1051-73 propagados en Biorreactores de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal*, 18(2).
- Rodrigues, S. P., Picoli, E. A. T., Oliveira, D. C., Carneiro, R. G. S., Isaias, R. M. S. (2014). The effects of *in vitro* culture on the leaf anatomy of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). *Bioscience Journal*, 30:1933-1941.
- Roriz, C. L., Heleno, S. A., Alves, M. J., Oliveira, M. B. P., Pinela, J., Dias, M. I., Calhelha, L. C., Morales, P., Ferreira, I. C. F. R., and Barros, L. (2022). Red pitaya (*Hylocereus costaricensis*) peel as a source of valuable molecules: Extraction optimization to recover natural colouring agents. *Food Chemistry*, 372, 131344. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131344>
- Saldanha, C. W., Otoni, C. G., Notini, M. M., Kuki, K. N., da Cruz, A. C. F., Neto, A. R., Dias, L. L. C., & Otoni, W. C. (2013). A CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant: Journal of the Tissue Culture Association*, 49(4), 433–444. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9529-5>
- San José, M. C., Blázquez, N., Cernadas, M. J., Janeiro, L. V., Cuenca, B., Sánchez, C., & Vidal, N. (2020). Temporary immersion systems to improve alder micropropagation. *Plant Cell*,

Tissue and Organ Culture, 143(2), 265–275. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01937-9>

- Sand-Jensen, K., Borum, J., Møller, C. L., & Baastrup-Spohr, L. (2022). Physiological Adaptation and Plant Distribution along a Steep Hydrological Gradient. *Plants*, 11(13), 1683. <https://doi.org/10.3390/plants11131683>
- Santos, G. B. M., Dionísio, A. P., Magalhães, H. C. R., de Abreu, F. A. P., Lira, S. M., de Lima, A. C. V., da Silva, S., G. S., Guedes, C., J. A., Araujo, S. I. M., Artur, G., A., Pontes, F., D., and Zocolo, J., G. (2020). Effects of processing on the chemical, physicochemical, enzymatic, and volatile metabolic composition of pitaya (*Hylocereus polyrhizus* (FAC Weber) Britton & Rose). *Food Research International*, 127: 108710.
- Ševčíková, H., Lhotáková, Z., Hamet, J., and Lipavská, H. (2019). Mixotrophic *in vitro* cultivations: the way to go astray in plant physiology. *Physiologia plantarum*, 167(3): 365-377. <https://doi.org/10.1111/ppl.12893>
- Shi, J., Yi, K., Liu, Y., Xie, L., Zhou, Z., Chen, Y., Hu, Z., Zheng, T., Liu, R., Chen, Y., & Chen, J. (2015). Phosphoenolpyruvate carboxylase in *Arabidopsis* leaves plays a crucial role in carbon and nitrogen metabolism. *Plant Physiology*, 167(3), 671–681. <https://doi.org/10.1104/pp.114.254474>
- Shyamalagowri, S., Charles, P., Manjunathan, J., Kamaraj, M., Anitha, R., and Pugazhendhi, A. (2022). *In vitro* anticancer activity of silver nanoparticles phyto-fabricated by *Hylocereus undatus* peel extracts on human liver carcinoma (HepG2) cell lines. *Process Biochemistry*, 116: 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.02.022>
- Soumare, A., Diehdiou, A. G., Arora, N. K., Tawfeeq Al-Ani, L. K., Ngom, M., Fall, S., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Kouisni, L., and SY, M. O. (2021). Potential role and utilization of plant growth promoting microbes in plant tissue culture. *Frontiers in Microbiology*, 12, 615. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.649878>
- Tien, N.N.T., Le, N.L., Khoi, T.T., and Richel, A. (2022). Influence of location, weather condition, maturity, and plant disease on chemical profiles of dragon fruit (*Hylocereus* spp.) branches grown in Vietnam. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-02146-w>
- Tisserat, B., and Vandercook, C. E. (1985). Development of an automated plant culture system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 5: 107-117. <https://doi.org/10.1007/BF00040307>
- Trentini, G. E., Rojas, M., Gajardo, D., Alburquenque, D., Villagra, E., Gómez, A., Arru, L., and Arencibia, A. D. (2021). Elicitation of phenylpropanoids in maqui (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) plants micropropagated in photomixotrophic temporary immersion bioreactors (TIBs). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 146: 607–619. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02097-0>

- Trivellini, A., Lucchesini, M., Ferrante, A., Massa, D., Orlando, M., Incrocci, L., & Mensuali-Sodi, A. (2020). Pitaya, an attractive alternative crop for Mediterranean region. *Agronomy* (Basel, Switzerland), 10(8), 1065. <https://doi.org/10.3390/agronomy10081065>
- Vervit (2020). SETIS™ Biorreactor Sistemas de inmersión temporal en micropropagación de plantas. <http://www.setis-systems.be>. Citado 30 de diciembre 2022
- Vervit (2020). SETIS™ Biorreactor Sistemas de inmersión temporal en micropropagación de plantas. <http://www.setis-systems.be>. Citado 30 de diciembre 2022
- Vitlin Gruber, A., & Feiz, L. (2018). Rubisco assembly in the chloroplast. *Frontiers in molecular biosciences*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00024>
- Wang, H., Prentice, I. C., Davis, T. W., Keenan, T. F., Wright, I. J., & Peng, C. (2017). Photosynthetic responses to altitude: an explanation based on optimality principles. *The New Phytologist*, 213(3), 976–982. <https://doi.org/10.1111/nph.14332>
- Wang, L., Liu, Y., Ashraf, S., Jiang, J., Han, G., Gao, J., Wu, X., & Li, B. (2019). Pitaya pulp structural cobalt–carbon composite for efficient hydrogen generation from borohydride hydrolysis. *Journal of Alloys and Compounds*, 808, 151774. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.151774>
- Yoon Y-J, Mobin M, Hahn E-J, Paek K-Y (2009) Impact of *in vitro* CO<sub>2</sub> enrichment and sugar deprivation on acclimatory responses of *Phalaenopsis* plantlets to ex vitro conditions. *Environ Exp Bot* 65:183–188. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.08.001>
- Zeng, X., Yan, W., Paeth, M., Zacate, S. B., Hong, P.-H., Wang, Y., Yang, D., Yang, K., Yan, T., Song, C., Cao, Z., Cheng, M.-J., & Liu, W. (2019). Copper-catalyzed, chloroamide-directed benzylic C-H difluoromethylation. *Journal of the American Chemical Society*, 141(50), 19941–19949. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b11549>