



**Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela Profesional de Biología con Mención en Biotecnología**

Transformación genética de “pitahaya” *Hylocereus* sp. mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando el gen NPTII como marcador de selección

**Tesis**

Para optar el Título Profesional de Biólogo con Mención en Biotecnología

**Autora**

Alexandra Jherina Pineda Lazaro

**Asesora**

Dra. Hermila Belba Díaz Pillasca

Univ. Nac. José Faustino Sánchez Carrión  
FACULTAD DE CIENCIAS  
  
Dra. HERMILA B. DÍAZ PILLASCA

**Huacho – Perú**

**2026**



**Reconocimiento - No Comercial – Sin Derivadas - Sin restricciones adicionales**

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

**Reconocimiento:** Debe otorgar el crédito correspondiente, proporcionar un enlace a la licencia e indicar si se realizaron cambios. Puede hacerlo de cualquier manera razonable, pero no de ninguna manera que sugiera que el licenciante lo respalda a usted o su uso. **No Comercial:** No puede utilizar el material con fines comerciales. **Sin Derivadas:** Si remezcla, transforma o construye sobre el material, no puede distribuir el material modificado. **Sin restricciones adicionales:** No puede aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros de hacer cualquier cosa que permita la licencia.



# UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN

(Resolución de Consejo Directivo N° 012-2020-SUNEDU/CD de fecha 27/01/2020)

## FACULTAD CIENCIAS




### ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

#### INFORMACIÓN

<b>DATOS DEL AUTOR (ES):</b>		
<b>NOMBRES Y APELLIDOS</b>	<b>DNI</b>	<b>FECHA DE SUSTENTACIÓN</b>
Alexandra Jherina Pineda Lazaro	74966172	22/10/2025
<b>DATOS DEL ASESOR:</b>		
<b>NOMBRES Y APELLIDOS</b>	<b>DNI</b>	<b>CÓDIGO ORCID</b>
Dra. Hermila Belba Diaz Pillasca	15601607	<a href="https://orcid.org/0000-0002-2491-3774">https://orcid.org/0000-0002-2491-3774</a>
<b>DATOS DE LOS MIEMBROS DE JURADOS – PREGRADO/POSGRADO-MAESTRÍA-DOCTORADO:</b>		
<b>NOMBRES Y APELLIDOS</b>	<b>DNI</b>	<b>CÓDIGO ORCID</b>
Dr. William Andrés Guzman Sánchez	06015776	<a href="https://orcid.org/0000-0003-1424-4287">https://orcid.org/0000-0003-1424-4287</a>
Blgo. Luis Alberto La Cruz Arévalo	15612160	<a href="https://orcid.org/0009-0009-4576-5107">https://orcid.org/0009-0009-4576-5107</a>
Dr. Carlos Roberto Pesantes Rojas	17937958	<a href="https://orcid.org/0009-0007-8472-3044">https://orcid.org/0009-0007-8472-3044</a>

# Alexandra Jherina Pineda Lázaro

## Transformación genética de “pitahaya” *Hylocereus* sp. mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando el gen NP...

-  Quick Submit
-  Quick Submit
-  Facultad de Ciencias

### Detalles del documento

Identificador de la entrega

tm:old::1:3330651354

Fecha de entrega

5 sep 2025, 9:25 p.m. GMT-5

Fecha de descarga

5 sep 2025, 9:41 p.m. GMT-5

Nombre del archivo

TESIS\_PINEDA\_CORREGIDO-11-80.pdf

Tamaño del archivo

1.7 MB

70 páginas

16.194 palabras

97.570 caracteres



Página 2 de 76 - Descripción general de integridad

Identificador de la entrega tm:old::1:3330651354

## 7% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...




### Filtrado desde el Informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

### Exclusiones

- ▶ N.º de coincidencias excluidas

### Fuentes principales

- 6%  Fuentes de Internet
- 2%  Publicaciones
- 3%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

### Marcas de Integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

## **DEDICATORIA**

A Dios, por bendecir a mi familia, brindándonos fuerza, unión y perseverancia.

A mis amados padres, Santos Yolanda Lázaro Reyes y Alex Irineo Pineda Porras, por los valores inculcados y por el ejemplo silencioso que ha guiado mi camino.

A mi hijo, Aaron David Hernández Pineda, fuente de inspiración constante y motivo profundo de cada esfuerzo. Tu compañía en este camino me fortaleció en cada paso, por ello; este logro también es tuyo, porque en cada página escrita hubo un pensamiento para ti, una esperanza depositada en el futuro que compartimos. Espero que este trabajo te inspire a lograr todas tus metas propuestas y que nunca dejes de soñar, mi pequeño.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi asesora Dra. Hermila Belba Díaz Pillasca, por su apoyo en la realización de la presente tesis.

A mis profesores que me inspiraron hacia el camino de la investigación durante toda mi estancia académica.

Al Dr. Mike Anderson Corazón Guivin, por permitirme formar parte del Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Universidad Nacional de San Martín, por brindarme todo su apoyo y asesoramiento continuo.

Al MSc. (c) Angel David Hernández Amasifuen, cuya fortaleza y dedicación me inspiraron a adentrarme en el mundo de la investigación, y a quien agradezco profundamente por haberme enseñado, con amor, a amar la ciencia.

A mi compañera de escuela, Valentina Argüelles Sáenz, por su compañerismo y amistad verdadera.

# ÍNDICE

<b>DEDICATORIA</b> .....	v
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	vi
<b>RESUMEN</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>Capítulo I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	2
<b>1.1. Descripción de la realidad problemática</b> .....	2
<b>1.2. Formulación de problema</b> .....	5
<b>1.2.1. Problema general</b> .....	5
<b>1.2.2. Problemas específicos</b> .....	5
<b>1.3. Objetivos de la investigación</b> .....	5
<b>1.3.1. Objetivo General</b> .....	5
<b>1.3.2. Objetivos Específicos</b> .....	5
<b>1.4. Justificación de la investigación</b> .....	6
<b>1.5. Delimitación del estudio</b> .....	7
<b>1.6. Viabilidad del estudio</b> .....	7
<b>Capítulo II: MARCO TEORICO</b> .....	8
<b>2.1. Antecedentes de la investigación</b> .....	8
<b>2.1.1. Investigaciones Internacionales</b> .....	8
<b>2.1.2. Investigaciones nacionales</b> .....	9
<b>2.2. Bases teóricas</b> .....	11
<b>2.2.1. Pitahaya</b> .....	11
<b>2.2.2. Descripción botánica de la pitahaya</b> .....	12
<b>2.2.3. Problemas que afectan al cultivo</b> .....	15

2.2.4. Regeneración de plantas mediante cultivo <i>in vitro</i> .....	16
2.2.5. Transformación Genética en plantas.....	17
2.3. Definiciones de términos básicos.....	18
2.4. Hipótesis de investigación.....	18
2.4.1. Hipótesis General.....	18
2.4.2. Hipótesis Especificas.....	18
2.5. Operacionalización de las variables.....	19
Capítulo III: METODOLOGIA.....	20
3.1. Diseño metodológico.....	20
3.1.1. Tipo de investigación.....	20
3.1.2. Nivel de investigación.....	20
3.1.3. Diseño de la investigación.....	20
3.1.4. Enfoque de la investigación.....	21
3.2. Población y muestra.....	21
3.2.1. Población.....	21
3.2.2. Muestra.....	21
3.3. Técnicas de recolección de datos.....	21
3.3.1. Técnicas a emplear.....	21
3.3.1.1. Material vegetal.....	21
3.3.1.2. Proceso de lavado.....	22
3.3.1.3. Desinfección.....	22
3.3.1.4. Crecimiento e inducción de brotes de los explantes.....	22
3.3.1.5. Cultivo de <i>Agrobacterium</i> .....	23
3.3.1.6. Transformación genética medida por <i>Agrobacterium</i> .....	23
3.3.1.7. Regeneración de plantas transgénicas putativas.....	24

3.3.1.8. Confirmación de plantas transgénicas .....	25
3.3.2. Descripción de los instrumentos .....	27
3.4. Técnicas para el procesamiento de la información.....	28
Capítulo IV: RESULTADOS .....	29
4.1. Transformación genética medida por <i>Agrobacterium</i> .....	29
4.2. Regeneración de plantas transgénicas putativas .....	32
4.3. Confirmación de plantas transgénicas .....	37
Capítulo V: DISCUSIÓN.....	40
Capítulo VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	45
6.1. Conclusiones.....	45
6.2. Recomendaciones.....	46
Capítulo VII: FUENTES DE INFORMACIÓN.....	47
7.1. Fuentes Bibliográficas .....	47
ANEXOS .....	58

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1 .</b> Tratamientos empleados en la transformación genética de pitahaya. ....	25
<b>Tabla 2.</b> Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para la eficiencia de transformación putativa de explantes de pitahaya.....	31
<b>Tabla 3.</b> Análisis de varianza para la eficiencia de transformación putativa de explantes de pitahaya. ....	31
<b>Tabla 4.</b> Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para regeneración de brotes.	33
<b>Tabla 5.</b> Análisis de varianza para regeneración de brotes. ....	33
<b>Tabla 6.</b> Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para número de brotes. ....	35
<b>Tabla 7.</b> Análisis de varianza para número de brotes.....	35
<b>Tabla 9.</b> Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para eficiencia de transformación.....	38
<b>Tabla 10.</b> Análisis de varianza para eficiencia de transformación.....	38

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Explantes inertes de pitahaya en medio de cultivo con kanamicina.....	29
<b>Figura 2.</b> Explantes de pitahaya posterior al proceso de transformación genética mediada por <i>Agrobacterium</i> , con señales de vitalidad (coloración verde). .....	30
<b>Figura 3.</b> Porcentaje de eficiencia de transformación putativa en explantes de pitahaya. .	32
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de regeneración de brotes por explante de pitahaya.. .....	34
<b>Figura 5.</b> Formación de brotes en los explantes de pitahaya posterior al proceso de transformación genética mediada por <i>Agrobacterium</i> . .....	35
<b>Figura 6.</b> Número de brotes por explante de pitahaya posterior a la transformación genética mediada por <i>Agrobacterium</i> .....	36
<b>Figura 7.</b> Electroforesis de productos PCR de muestras de pitahayas transgénicas putativas, las cuales son confirmaron como plantas transgénicas al tener el gen <i>nptII</i> integrado a su genoma. ....	37
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de eficiencia de transformación genética de plantas de pitahaya mediada por <i>Agrobacterium</i> , confirmadas mediante PCR. ....	39
<b>Figura 9.</b> Plantas de pitahaya naranja de churuja en el banco de germoplasma de pitahayas del Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Universidad Nacional de San Martín.	58
<b>Figura 10.</b> Desinfección del material vegetal para la introducción <i>in vitro</i> de pitahaya....	59
<b>Figura 11.</b> Plántulas <i>in vitro</i> de pitahaya naranja de churuja. ....	59
<b>Figura 12.</b> Cuantificación de ADN extraído de pitahayas del proceso de transformación.	60
<b>Figura 13.</b> Preparación de gel de agarosa para corrida electroforética. ....	61
<b>Figura 14.</b> Siembra de productos PCR en gel de agarosa. ....	62
<b>Figura 15.</b> Equipo de electroforesis. ....	62
<b>Figura 16.</b> Visualización de la corrida electroforética de los productos PCR. ....	63

## RESUMEN

La pitahaya o fruta del dragón (*Hylocereus spp.*) es un cultivo que recientemente ha cobrado relevancia en el Perú, posicionada en el mercado por su sabor fresco y dulce, también ha resaltado por sus características farmacológicas para el tratamiento de problemas digestivos. Sin embargo, la gran demanda por este fruto ha desarrollado una forma de cultivo poco técnica acarreado problemas agronómicos, afectado por patógenos. Por ello, la mejora genética de este cultivo es de suma importancia y la transformación genética de la pitahaya mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando el gen *nptII* como marcador de selección, representa un avance significativo en el campo de la biotecnología vegetal. Por lo previamente descrito, la presente investigación planteó el objetivo de transformar genéticamente la pitahaya mediante tres métodos de agroinfiltración; por inyección, co-cultivo y bomba de vacío, donde se emplearon cladodios de pitahaya ecotipo naranja de churuja, Los resultados obtenidos evidenciaron que el mejor método de agroinfiltración es por bomba de vacío con un 95% de eficiencia de transformación y seguida por el método de inyección con un 83% de eficiencia de transformación. Se confirmó la acción del gen *nptII* mediante la tasa de eficiencia de regeneración, donde la eficiencia del 93% se obtuvo con la vía de bomba de vacío y 78% por inyección, por último, se verificó la integración del gen *nptII* al genoma de la planta mediante pruebas moleculares, donde se observaron las bandas de un peso molecular de aproximadamente 700 pb correspondientes al gen en el gel de agarosa.

**Palabras clave:** transformación genética, marcador de selección, *Hylocereus*, agroinfiltración, biotecnología vegetal.

## ABSTRACT

Pitahaya or Dragon Fruit (*Hylocereus* spp.) is a crop that has recently gained relevance in Peru, becoming popular in the market due to its fresh and sweet flavor. It has also stood out for its pharmacological properties, particularly in the treatment of digestive disorders. However, the growing demand for this fruit has led to non-technical cultivation practices, resulting in agronomic challenges and susceptibility to pathogens. Therefore, the genetic improvement of this crop is of great importance, and the genetic transformation of pitahaya mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, using the *nptII* gene as a selection marker, represents a significant advancement in plant biotechnology. Based on this, the present study aimed to genetically transform pitahaya using three agroinfiltration methods: syringe injection, co-cultivation, and vacuum infiltration, employing cladodes of the ecotype orange of Churuja. The results showed that vacuum infiltration was the most effective method, with a transformation efficiency of 95%, followed by syringe injection with 83%. The activity of the *nptII* gene was confirmed through regeneration efficiency rates, with 93% efficiency via vacuum infiltration and 78% via injection. Finally, the presence of the *nptII* gene was verified through molecular analysis, revealing DNA bands of approximately 700 bp in agarose gel, corresponding to the target gene.

**Keywords:** genetic transformation, selection marker, *Hylocereus*, agroinfiltration, plant biotechnology.

## INTRODUCCIÓN

La pitahaya (*Hylocereus* sp.), es una especie cactácea de creciente importancia económica en América Latina y Asia, debido a su alto valor nutricional, potencial antioxidante y creciente demanda en mercados internacionales (Santos-Pelaez, et al., 2020). Sin embargo, el cultivo de esta especie enfrenta desafíos como la susceptibilidad a patógenos, baja eficiencia en la propagación vegetativa y limitada disponibilidad de variedades mejoradas, lo cual ha incentivado la exploración de herramientas biotecnológicas para su mejoramiento genético (Peña, 2022; Jara, 2024).

Una de las estrategias biotecnológicas más eficiente y accesible para la introducción de genes de interés en plantas es la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Baron y Zambryski, 1996). Esta técnica aprovecha la capacidad natural de *A. tumefaciens* para transferir segmentos de ADN (T-DNA) hacia el genoma de células vegetales (Lacroix, y Citovsky, 2019). Su uso ha sido ampliamente documentado en cultivos como tomate, arroz y tabaco, pero aún es limitado en especies no modelo; como las cactáceas, donde se requieren protocolos específicos para garantizar la eficiencia y regeneración de plantas transformadas (Díaz Granados y Chaparro-Giraldo, 2012; Ochoa-Jiménez, et al., 2019; Aguilar-Bartels, 2021).

Dentro del sistema de transformación un componente clave son los genes marcadores de selección, como la neomicina fosfotransferasa (*nptII*), que otorga resistencia a antibióticos aminoglucósidos como la kanamicina, asimismo este gen es el primer marcador genético que se utilizó para selección de plantas transgénicas (Hernández-Díaz, et al. 2018). Su función fundamental en la transformación genética es demostrar visiblemente la incorporación exitosa del transgén, mediante la sobrevivencia del tejido vegetal frente a la acción de kanamicina en el medio de cultivo, facilitando así el aislamiento de líneas transformadas. A pesar de que el uso de *nptII* ha sido objeto de debates regulatorios, su eficacia, estabilidad y seguridad han sido respaldadas por diversas agencias internacionales (Pons, et al., 2012).

La optimización de protocolos de transformación genética en *Hylocereus* sp. requiere no solo de una adecuada susceptibilidad al *Agrobacterium*, sino también del establecimiento de condiciones *in vitro* que favorezcan la regeneración eficiente a partir de tejidos

transformados. Factores como el tipo de explante, la duración de la cocultivación, la concentración de acetosiringona y el régimen hormonal son determinantes para el éxito del proceso. A su vez, la implementación de pruebas moleculares contribuye a la validación de la integración y expresión del gen de interés.

En este contexto, la investigación tiene como objetivo establecer un protocolo eficiente de transformación genética para pitahaya (*Hylocereus* sp.) utilizando *Agrobacterium tumefaciens* y el gen *nptIII* como marcador de selección. Los resultados contribuirán al desarrollo de una plataforma biotecnológica que permita futuras estrategias en el mejoramiento genético en esta especie, con especial énfasis en la obtención de líneas resistentes a enfermedades y adaptadas a condiciones edafoclimáticas específicas.

## **Capítulo I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **1.1. Descripción de la realidad problemática**

La pitahaya (*Hylocereus* sp.), comúnmente conocida como fruta del dragón, es un cultivo muypreciado para América del Sur no sólo por ser su centro de origen, sino que el consumo de su fruto exótico se encuentra incrementándose aceleradamente alrededor del mundo, debido a sus distintas propiedades beneficiosas para la salud humana (Legaria-Solano, et al. 2005; Verona-Ruiz et al., 2020). Posee diversos bioactivos antioxidantes responsables de actividades farmacológicas, como acciones antitumorales. (Mállap-Detquizán et al., 2021), así mismo tiene una gran adaptabilidad en climas con poca precipitación, creciendo, troncos secos, muros, árboles y arena.

Actualmente la comercialización de pitahaya es liderada por países como Vietnam, Colombia, México, Costa Rica y Nicaragua, cuyos genotipos codiciados por aliados comerciales como la Unión Europea y Asia, principalmente China; son frutos de coloración roja, amarilla y fucsia (Viñas et al., 2012). En Perú la producción de esta especie se da naturalmente en Amazonas, seguido de Ancash, Lambayeque, Lima, Piura y San Martín, sumado a ello se viene incrementando áreas cultivadas, en la producción de esta especie, gracias a los factores edafoclimáticas favorables para su crecimiento (Vargas-Gutiérrez y López-Montañez, 2020).

No obstante, el creciente interés por la expansión del cultivo para cubrir la alta demanda nacional e internacional, el país se ve restringido por la limitada oferta de semillas vegetativas de calidad y la inexistencia de paquetes tecnológicos adaptados a los distintos contextos agroecológicos de cada zona de producción (Santos-Peláez et al., 2024). La propagación asexual es el método más práctico para los agricultores; sin embargo, el uso de esquejes presenta una baja eficiencia, debido al gran tamaño del tejido restringe una producción masiva de plántulas (Estrada-Luna et al., 2008). La reproducción sexual a partir de semilla botánica es limitada, debido al desarrollo lento, requiere cuidado especial, producción tardía, bajos rendimientos y gran variabilidad genética (Montesinos et al., 2015).

La pitahaya se ve afectada por diversos agentes, plagas y enfermedades: como *Fusarium*, *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Colletotrichum*, nemátodos, polillas y entre otros. Afectando la calidad fitosanitaria, ocasionando un 80% de pérdida, elevando hasta un 50% en los costos de producción (Zambrano-Forero et al., 2015). Como alternativa de solución se plantea el uso de las herramientas de biotecnología vegetal, mediante ingeniería genética y cultivo de tejidos vegetales (Nyaboga et al., 2014).

Mediante la ingeniería genética, se han incorporado diferentes rasgos relacionados con la tolerancia al estrés biótico y abiótico en diversos cultivos. Estas tecnologías trascienden los métodos tradicionales del cultivo de plantas al permitir una transferencia genética rápida y predecible a través de las fronteras de las especies. La transformación genética mediada por *Agrobacterium* se utiliza ampliamente para la introducción de genes extraños en dicotiledóneas (Hwang et al., 2017). Hay varios estudios que informan la incorporación exitosa de genes extraños en diversos cultivos mediante transformación mediada por *Agrobacterium* (Vinterhalter et al., 2008; Cingel et al., 2010; Ahmed et al., 2018). No obstante, desde una perspectiva más amplia, estos procedimientos enfrentan limitaciones de menor frecuencia de transformación, dependencia del genotipo o variaciones somaclonales debido principalmente a condiciones prolongadas de cultivo de tejidos, lo que resulta en un menor rendimiento de plantas transgénicas estables (Beaujean et al., 1998).

El establecimiento de un protocolo eficiente y reproducible de regeneración y transformación vegetal constituye un requisito fundamental para llevar a cabo estudios de ingeniería genética de plantas (Hayta et al., 2019). La transformación exitosa de una planta requiere un sistema adecuado de entrega de ADN, un sistema de regeneración de la planta y un sistema de selección para reconocer las células transgénicas. En este contexto,

actualmente no existe un protocolo de transformación genética en pitahaya, la cual pueda ser eficiente y reproducible. Este punto de partida permitirá sentar las bases para a futuro tener líneas de pitahayas que puedan presentar características relacionadas a la tolerancia estreses biótico y abiótico.

## 1.2. Formulación de problema

### 1.2.1. Problema general

¿Se podrá determinar el tipo de método que permita la transformación genética de “pitahaya” *Hylocereus* sp. mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando el gen *nptII* como marcador de selección?

### 1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuál será el mejor método de transformación genética de “pitahaya” *Hylocereus* sp. mediada por *Agrobacterium tumefaciens*?
- ¿Se podrá confirmar que el gen *nptII* actúa como marcador de selección en plantas de “pitahaya” *Hylocereus* sp. transformadas genéticamente?
- ¿Se logrará la integración el gen *nptII* como marcador de selección en plantas transgénicas putativas de “pitahaya” *Hylocereus* sp?

## 1.3. Objetivos de la investigación

### 1.3.1. Objetivo General

Determinar el tipo de método que permite la transformación genética en “pitahaya” *Hylocereus* sp. mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando el gen *nptII* como marcador de selección.

### 1.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar el mejor método de transformación genética de “pitahaya” *Hylocereus* sp. mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.
- Confirmar la acción del gen *nptII* como marcador de selección en plantas “pitahaya” *Hylocereus* sp. transformadas genéticamente.
- Verificar molecularmente la integración del gen *nptII* como marcador de selección en plantas transgénicas putativas de “pitahaya” *Hylocereus* sp.

#### 1.4. Justificación de la investigación

Actualmente, el cultivo de pitahaya muestra una tendencia creciente en el Perú, presentando regiones con gran producción de este cultivo. Pero como cualquier otro cultivo también presenta problemas por enfermedades y plagas, que con regularidad se tratan de controlar utilizando agentes químicos, los cuales terminan no solo afectando a los organismos que causan los problemas, sino también a organismos benéficos. Todo ello termina afectando al ecosistema y diversidad de estos organismos, y también estos agentes químicos quedan rastros en los cultivos que afectan en cierta medida a los consumidores.

En un futuro cercano el cultivo de pitahaya también podría verse afectado por el cambio climático, presentando estreses abióticos e incrementados en gran medida los problemas por estreses bióticos. Para ello se necesitarán líneas o variedades de pitahaya que presenten tolerancia frente a esas futuras problemáticas, mediante programas de mejoramiento genético, pero con técnicas modernas de biotecnología e ingeniería genética que puedan reducir el tiempo para la obtención de dichos genotipos, para ello se podría recurrir como alternativa a la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

En la actualidad, numerosas especies de importancia agronómico y hortícola se transforman de forma rutinaria utilizando esta *Agrobacterium tumefaciens*, y la lista de especies transformadas mediada por *Agrobacterium* parece crecer diariamente. En algunos países desarrollados, un alto porcentaje de la superficie de cultivos económicamente importantes como maíz, soja, algodón, papa y tomates es transgénica; un número cada vez mayor de estas variedades transgénicas se generan o se generarán pronto mediante transformación mediada por *Agrobacterium*. Sin embargo, al no presentarse actualmente un antecedente de transformación genética en pitahaya quedan muchos desafíos para la transformación de este cultivo.

Establecer un protocolo eficiente de transformación mediada por *Agrobacterium* en pitahaya permitirá ser una herramienta para la ingeniería genética vegetal y futuras mejoras en la tecnología de transformación implicarán necesariamente la manipulación de estos procesos biológicos fundamentales. Con todo ello, se plasmará una metodología que pueda ser la guía para la obtención de nuevas líneas de pitahayas con genes que permitan al cultivo tolerancia frente a estreses bióticos y abióticos.

### **1.5. Delimitación del estudio**

El desarrollo del presente proyecto de tesis será ejecutado en la Universidad Nacional de San Martín (UNSM), específicamente en la Facultad de Ciencia Agrarias, dentro del Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM). Este laboratorio está a cargo del Dr. Mike Anderson Corazón Guivin, quién asumirá la supervisión del proyecto, junto al asistente de investigación al MSc. (c) Angel David Hernández Amasifuen, ambos brindarán orientación técnica y académica a lo largo de todo el proceso investigativo. En conjunto con las condiciones óptimas del laboratorio, que incluyen el equipamiento y reactivos necesarios, permitirán la correcta aplicación de todos los conocimientos requeridos para alcanzar los objetivos planteados.

### **1.6. Viabilidad del estudio**

La viabilidad del estudio se sustenta en fuentes bibliográficas relevantes en repositorios institucionales nacionales e internacionales. A ello se le suma que el Laboratorio de Biología y Genética Molecular cuenta con todos los recursos técnicos indispensables: equipos, reactivos y materiales requeridos para la investigación.

## Capítulo II: MARCO TEORICO

### 2.1. Antecedentes de la investigación

#### 2.1.1. Investigaciones Internacionales

Según la revisión bibliográfica en avances de transformación genética de plantas, hasta la fecha no se ha establecido un protocolo enfocado a la transformación genética de pitahaya (*Hylocereus* sp.); sin embargo, existen reportes de transformación genética en otros géneros de la misma familia Cactácea:

Llamoca-Zárat et al. (1999), evaluaron la respuesta de meristemas apicales de tuna (*Opuntia ficus-indica*) a la transformación genética mediante biobalística. En esta investigación emplearon el vector pFF19G con los genes GUS y *nptII* (gen que confiere resistencia a kanamicina) como marcador de selección. Los explantes de meristemas apicales de tuna fueron bombardeados con partículas de tungsteno con el vector. En resultados los explantes fueron evaluados a la resistencia al antibiótico y mediante expresión transiente del gen GUS. En conclusión, obtuvieron 34.7% de explantes de tuna con expresión transiente del gen GUS.

Silos-Espino et al. (2006), diseñaron un sistema orientado a la transformación genética de un genotipo de cactus élite de tuna (*Opuntia ficus-indica*) cultivar Villa Nueva, mediante *Agrobacterium tumefaciens*. En su metodología aplicaron infecciones directas de *A. tumefaciens* cepa C58C1RifR (pGV2260) con jeringas hipodérmicas en el tejido meristemático de las areolas. En sus resultados obtuvieron plantas transgénicas putativas mediante selección con 100 mg/L de kanamicina, así mismo confirmaron las plantas transgénicas mediante actividades transitorias y estables de GUS, y mediante PCR y análisis Southern blot. En conclusión, lograron establecer una metodología para la transformación genética de tuna con una frecuencia de transformación del 3.2%.

Al-Ramamneh (2006), desarrollo su investigación en transformación genética de *Schlumbergera truncata* y *Rhipsalidopsis gaertneri*. En su metodología se enfocaron a inducir inicialmente embriones somáticos de ambas especies y para la transformación utilizó el vector pBII21 en la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*, vector que contenía los genes *uidA* y *nptII* como marcador de selección por resistencia a kanamicina. En sus resultados determinaron que el uso de 600 mg/L de kanamicina era el óptimo para la selección de

plantas transgénicas putativas, logrando una alta eficiencia de transformación. En conclusión, en la investigación obtuvieron un máximo de 22% de eficiencia de transformación en ambas especies vegetales.

Seol *et al.* (2008), realizaron una investigación enfocada a la transformación genética en *Notocactus scopia* cultivar Soonjung. En su metodología emplearon bulbos del cactus como explante inicial para la transformación genética, y probaron cuatro diferentes métodos: infiltración al vacío, pinchazo y pinchazo combinado con infiltración al vacío antes del corte superior y después del corte superior. En todos los métodos emplearon *A. tumefaciens* cepa LBA4404 con el vector pBI-121. En sus resultados obtuvieron como mejor resultado el método de punción con aguja combinada con la infiltración al vacío, con un rango de 67 al 100%, y la confirmación de las plantas putativas transgénicas la desarrollaron mediante PCR de los genes *uidA* y *nptII*.

Angulo-Bejarano *et al.* (2019), implementaron un protocolo eficiente de transformación genética de tuna (*Opuntia ficus-indica*) variedad Blanco sin Espinas mediante bombardeo de partículas. En la metodología trabajaron con cladodios estériles de tuna, para el bombardeo se empleó presión del disco de ruptura de 900 psi y distancia de recorrido del microproyector de 8 cm, todo ello con partículas de oro recubiertas con el vector pBI426. Como resultados obtuvieron un 23% de eficiencia de transformación en regenerantes a partir del antibiótico de selección kanamicina (100 mg/L) y se confirmaron por PCR y RT-PCR los transgenes *nptII* y *uidA*.

### **2.1.2. Investigaciones nacionales**

En el contexto nacional no hay reportes de investigaciones realizadas en transformación genética de pitahaya o en otros géneros de la misma familia Cactácea. Pero si se han realizado investigaciones de transformación genética en otros cultivos de la familia Convolvulácea y Solanácea:

Ormachea (2011), realizó la transformación genética del camote (*Ipomoea batatas*) variedad Jewel, insertando los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Su metodología consto como explantes iniciales hojas con peciolo y co cultivados con *A. tumefaciens* con los vectores pCIP78 y pCIP79, cada vector con los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1*, respectivamente. Ambos vectores estaban basados en el vector

pCAMBIA2305.2 en conjunto con el marcador de selección; resistencia a kanamicina (*nptII*). En sus resultados obtuvo 9 plantas transgénicas putativas, las cuales fueron confirmadas por PCR y posteriormente analizadas por PCR en tiempo real (qPCR) para determinar la planta con mayor expresión génica.

Reaño (2013), realizó la transformación genética del camote (*Ipomoea batatas*) variedad Huachano, insertando los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1* mediada por *A. tumefaciens*. En su metodología trabajo con meristemos y hojas como explantes iniciales para la regeneración de plantas en la búsqueda de seleccionar el mejor explante inicial para la transformación genética. Como resultados obtuvo un total de ocho plantas transgénicas putativas, representando 8.7% de eficiencia de transformación. La confirmación de plantas transgénicas fue realizada primero por resistencia a kanamicina (*nptII*) y por PCR por integración de los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1*, obtenidos un total de ocho plantas transgénicas confirmadas molecularmente.

Cancino (2014), evaluó la transformación genética de papa (*Solanun tuberosum*) mediada por *A. tumefaciens*, en la inserción de genes de expresión de metabolitos (GGP1, CYP79A2 y CYP83B1). Los explantes utilizados en la metodología correspondieron a peciolas y entrenudos, los cuales se mantuvieron en co-cultivo con *A. tumefaciens* con el vector pRbsc:ORF1.3. Posterior al co-cultivo las plantas fueron regeneradas vía organogénesis directa, luego evaluadas primeramente por el gen *bar* como marcador de selección y posteriormente por PCR, para la confirmación de las plantas transgénicas putativas. En conclusión, el proceso permitió la obtención de 21 plantas de papa transformadas genéticamente vía *A. tumefaciens* y con la capacidad de producción de bencilglucosinolato.

Díaz (2016), estudio la respuesta de embriones somáticos de camote (*Ipomoea batatas*) al proceso de transformación genética vía *A. tumefaciens* en la búsqueda de resistencia contra el gorgojo. En la investigación utilizaron tres variedades de camote (Imby, CIP440163 y Jonathan) y se indujeron a callos embriogénicos, los cuales fueron evaluados en kanamicina y posteriormente transformados vía *A. tumefaciens* con los vectores pCIP100 y pCIP84. En los resultados determinaron que la concentración óptima de kanacimina como marcador de selección fue de 10 mg/l y en transformación más eficiente, la variedad Imby presentó 40%, Jonathan 22% y CIP440163 12%. En conclusión, obtuvieron 55 plantas

transgénicas con el vector pCIP84, que confiere resistencia al gorgojo por la inserción de los genes *cry3Ca1* y *cry7Aa1*.

Quispe (2016), estudio la transformación genética de tabaco (*Nicotiana tabacum*) mediada por *A. tumefaciens* con la finalidad de la inserción de los genes *TgMYB1* y *TgMYB2* de *Tectona grandis*. En esta investigación se ha empleado la *A. tumefaciens* cepa GV3101 conteniendo el vector PK7FWG2 como vector de destino final, posteriormente procedieron a transformar genéticamente en segmentos foliares de tabaco y regenerar plantas vía organogénesis indirecta. En sus resultados se obtuvieron 13 plantas transgénicas putativas con el gen *TgMYB1* y 18 con el gen *TgMYB2*, para la confirmación se basaron en PCR y secuenciamiento.

## **2.2. Bases teóricas**

### **2.2.1. Pitahaya**

La pitahaya, considerada actualmente como una fruta tropical de creciente popularidad, es una especie perenne epífita o hemiepífita, trepadora que necesita soporte para su desarrollo debido a que no puede sostenerse por sí misma como, tutores vivos o muertos, piedras, entre otros. Pertenece a la familia Cactaceae, la cual cuenta con unas 2000 especies, siendo México el que alberga la mayoría de ellas, de tal manera es el principal centro de diversidad, con cerca del 79% de estas especies. Asimismo, se conoce que, el género *Hylocereus* reúne distintas especies con gran potencial productivo, valor nutricional y relevancia agroeconómica (Garbanzo-León et al., 2021).

Originario del continente americano, el género *Hylocereus* comprende 16 especies que habitan principalmente en regiones tropicales, subtropicales y boscosas de México, centro y Sudamérica. Además, por su gran adaptabilidad a la altitud y regímenes de precipitación, estas especies se han extendido a nivel mundial. A su vez el más adecuado es el clima cálido subhúmedo y un suelo con excelente drenaje (Montesinos-Cruz et al., 2015).

La pitahaya presenta la clasificación filogenética de angiospermas de acuerdo con la siguiente clasificación taxonómica (APG IV, 2016):

Reino: Plantae

División: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales

Familia: Cactaceae

Género: *Hylocereus*

Especie: *Hylocereus* sp.

### **2.2.2. Descripción botánica de la pitahaya**

La pitahaya es una planta con tallos denominados cladodios que son fotosintetizadores, es decir que sustituyen a las hojas, presentan tres aristas en la que están las areolas que son medianas yemas homólogas de donde se producen nuevos brotes, espinas y formación de botones florales (Manzanero-Acevedo et al., 2014). En el caso de sus raíces presentan raíces fibrosas, gruesas la cual dan origen a raíces secundarias, que se desarrollan de los cladodios encontrándose en los primeros 25 cm de profundidad, proporcionando anclaje de la planta a su tutor, así mismo ayuda a absorber sustancias nutritivas y sales (Cevallos y Maldonado, 2022).

Las flores de la pitahaya se caracterizan por ser grandes, hermafroditas y altamente ornamentales, lo que las hace particularmente atractivas para una amplia variedad de polinizadores nocturnos. Estas estructuras florales presentan brácteas de tonalidad verde que envuelven pétalos de color blanco o con matices amarillo-verdosos, alcanzando dimensiones que pueden superar los 30 cm de longitud y 23 cm de anchura. Su desarrollo ocurre en las axilas de las espinas, y su comportamiento fenológico es peculiar: se abren únicamente durante la noche y se marchitan con la llegada del amanecer, un fenómeno adaptativo que favorece la polinización por especies nocturnas como murciélagos e insectos (Cevallos y Maldonado, 2022).

En cuanto al fruto, este presenta una forma elipsoidal u ovoide, con un rango de tamaño que oscila entre 8 y 15 cm de largo y 10 a 12 cm de diámetro, pudiendo alcanzar un peso promedio de 350 a 700 gramos. La estructura del fruto comprende aproximadamente un 30% de cáscara (exocarpo) y un 70% de pulpa comestible (endocarpo). El exocarpo exhibe una gran diversidad de colores, incluyendo tonalidades rojas, magentas, amarillas,

anaranjadas e incluso fucsias, con brácteas en las puntas que varían entre el verde y el rojo, lo cual le confiere un aspecto exótico y atractivo (García-Rubio et al., 2015).

El interior del fruto contiene una pulpa jugosa, carnosa y agridulce, que puede presentar colores como blanco, amarillo, rosado, magenta o fucsia, dependiendo de la variedad. Este tejido comestible alberga numerosas semillas pequeñas, de color negro, que están recubiertas por una sustancia mucilaginosa que facilita su dispersión. Dichas semillas, con una longitud aproximada de 4 a 5 mm, están distribuidas homogéneamente en toda la pulpa (Andrade et al., 2007). Esta combinación de características no solo hace a la pitahaya altamente valorada en la industria alimentaria, sino también en el ámbito nutracéutico y farmacéutico, gracias a su alto contenido de compuestos funcionales y antioxidantes (Ojeda-Zacarías et al., 2012). Cabe destacar que la diversidad morfológica de los frutos, tanto en forma como en color, es un reflejo de la variabilidad genética presente dentro del género *Hylocereus*, lo cual representa un recurso valioso para programas de mejoramiento y conservación.

### **2.2.5. Importancia de la pitahaya**

La importancia de la pitahaya radica en su alto valor comercial, sobre todo el fruto debido a su calidad, aroma, color y sabor, derivando múltiples usos en la industria alimentaria como jugos, bebidas, vinos y mermeladas y gran demanda en los mercados nacionales e internacional. Además, se consume las flores, brotes tiernos y semillas utilizadas por su alto contenido de oligosacáridos (Esquivel y Araya, 2012). Contiene propiedades importantes para la salud, rico en polifenoles, pigmentos, azúcares, vitaminas, aminoácidos y ácidos grasos insaturados. (Martínez, 2023).

La pitahaya es ampliamente reconocida por su elevado valor nutricional, atribuido principalmente a su abundante contenido de agua y la presencia de diversos metabolitos secundarios que influyen en su sabor, coloración y beneficios para la salud humana. Dentro de sus compuestos bioactivos destacan los flavonoides, conocidos por su función cardioprotectora, ya que contribuyen a la prevención de enfermedades cardiovasculares. Asimismo, la fruta es rica en fibra dietética y vitaminas del complejo B, las cuales favorecen el tránsito intestinal, ayudan a disminuir los niveles de colesterol y colaboran en el control glucémico, lo que resulta beneficioso para personas con riesgo de desarrollar diabetes mellitus (Martínez, 2022).

Otro componente relevante es la vitamina C, esencial en numerosos procesos fisiológicos como la síntesis de colágeno, la formación de glóbulos rojos, así como en el mantenimiento de dientes y huesos. Esta vitamina también fortalece el sistema inmunológico, mejorando la resistencia frente a infecciones comunes (Verona-Ruiz et al., 2020). A nivel neurofisiológico, las betalainas presentes en la pitahaya ejercen un papel importante en la protección del sistema nervioso central, actuando como antioxidantes que retardan el envejecimiento celular y combaten el estrés oxidativo.

El perfil sensorial del fruto, especialmente su sabor, está directamente relacionado con su pH y el contenido de ácido málico. En variedades agridulces, los valores de pH suelen oscilar entre 2.4 y 3.0, mientras que las variantes más dulces presentan un contenido de malato relativamente bajo, entre 0.5 y 0.6%, lo que influye en su percepción organoléptica (Mercado-Silva, 2018).

Además de sus frutos, los tallos carnosos de la pitahaya también poseen interés culinario y nutricional. Estos presentan un alto contenido de agua (84.4 g/100 g), así como cantidades moderadas de proteína cruda (0.4 g), fibra (0.5 g) y un aporte energético aproximado de 50 calorías por cada 100 gramos de porción comestible. También aportan minerales esenciales como fósforo (16 mg), zinc, cobre, magnesio, sodio y potasio, todos ellos cruciales para el funcionamiento adecuado del metabolismo humano (Juárez-Cruz et al., 2012). Esta combinación de propiedades convierte a la pitahaya no solo en una fruta de interés agroindustrial, sino también en un alimento funcional con potencial aplicación en dietas saludables, formulaciones nutracéuticas y estrategias de prevención de enfermedades crónicas no transmisibles.

Diversos estudios han demostrado que los frutos de la pitahaya poseen una alta capacidad antioxidante, lo que les permite neutralizar radicales libres y prevenir el daño oxidativo en las células del cuerpo humano. Esta propiedad está directamente asociada con la prevención de trastornos metabólicos, como la obesidad y otras condiciones vinculadas al estrés oxidativo (Ochoa-Velasco et al., 2012).

El consumo regular de alimentos con propiedades antioxidantes, como la pitahaya, resulta esencial para mantener la homeostasis celular y reducir la incidencia de enfermedades crónicas no transmisibles, tales como aterosclerosis, cáncer, diabetes, anemia y artritis reumatoide, entre otras. Esto se debe a su capacidad para disminuir el estrés oxidativo

sistémico, considerado uno de los principales desencadenantes de procesos inflamatorios crónicos y degenerativos (Tapia et al., 2004).

Adicionalmente, extractos obtenidos de diferentes partes de la planta han demostrado poseer un conjunto de compuestos bioactivos con efectos terapéuticos, incluyendo actividades antiinflamatorias, antibacterianas y cicatrizantes. Estos extractos han sido utilizados en ensayos preliminares para la aceleración de procesos de curación de heridas y en la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos, lo cual sugiere su posible aplicación en el desarrollo de productos fitofarmacéuticos y tratamientos alternativos (Montadher et al., 2018).

### **2.2.3. Problemas que afectan al cultivo**

Las pérdidas económicas en el cultivo de pitahaya es debido a las enfermedades que actualmente la están afectando, se tiene reportado que hay 17 géneros y 25 especies de patógenos que afectan los frutos. La mayoría son causadas por agentes fúngicos que atacan tallo, frutos y flores, otras son causadas por bacterias, virus y nemátodos. Entre las enfermedades más comunes son la pudrición de frutos y tallos (*Bipolaris cactivora*), chancro (*Neoscytalidium dimidiatum*), antracnosis (especies de *Colletotrichum*) y virus (Cactus virus X) (Balendres y Bengoa, 2019)

Estas enfermedades se transmiten a través de los agujeros y daños que dejan los insectos son sitios de entrada de hongos y bacterias que eventualmente pueden matar las plantas. La mosca de la lanza (*Dasiops saltans*) causa pérdidas del 40 al 80% en la floración de *H. megalanthus*, y por ende en la producción. Esta mosca deposita sus huevos en los botones florales y las larvas perforan las anteras (Delgado et al., 2010).

Diversos estudios han reportado que las enfermedades bacterianas representan una amenaza significativa para el cultivo de pitahaya, afectando tanto la parte aérea como los frutos. Entre los principales agentes patógenos se encuentran *Erwinia carotovora* y *Xanthomonas campestris*, ambos identificados como causantes de infecciones que generan síntomas de maceración y descomposición tisular (Wang y Lin, 2005).

Además, se han descrito otras enfermedades bacterianas relevantes, como la pudrición blanda y la pudrición del tallo, provocadas por *Enterobacter cloacae* y *Paenibacillus polymyxa*, respectivamente. Estas patologías, conocidas por su impacto en la

calidad comercial del cultivo, presentan manifestaciones iniciales caracterizadas por el reblandecimiento acuoso de los tejidos afectados. En el caso de *E. cloacae*, los tallos infectados suelen adquirir una tonalidad amarillenta, mientras que la infección por *P. polomyxa* produce un oscurecimiento pardo en la zona afectada, comprometiendo la integridad estructural de la planta (Taba et al., 2006; Masyahit et al., 2009).

El aumento de patógenos a nivel mundial es sin duda una pista de la necesidad de conservación de recursos genéticos que aún no han sido explorados, como los endemismos o especies silvestres, que poseen características de resistencia (Verona-Ruiz et al., 2020). Que gracias a las técnicas de mejoramiento pueden servir para contrarrestar el problema con las enfermedades y así evitar la pérdida de especies no sólo frente a factores bióticos, sino que también climatológicos (Zhao et al., 2018).

#### **2.2.4. Regeneración de plantas mediante cultivo in vitro**

Las técnicas biotecnológicas aplicadas recientemente a las plantas tienen un gran potencial agrícola (Encina y Regalado, 2022). Proporcionan nuevos enfoques para superar los problemas de las plantas en zonas marginales, ambientales, estrés biótico y plagas y enfermedades, lo que permite que se produzcan plantas con combinaciones genéticas únicas, mayor resistencia a plagas y/o rendimientos (Nordine, 2025). Estas técnicas también desempeñan un papel fundamental en la conservación del germoplasma vegetal, ya que permiten preservar la variabilidad genética de una especie bajo condiciones controladas que aseguren su estabilidad a largo plazo (Villalobos y Engelman, 1995; Paunescu, 2009)

Una de esas técnicas biotecnológicas es la aplicación de cultivo de tejidos vegetales (cultivo *in vitro*), en el cual se espera que la estabilidad genética del material a preservar debe ser garantizado. Esto generalmente se logra mediante cultivo de meristemas apicales, que son tejidos ideales para el almacenamiento debido a su estabilidad y potencial morfogénico, en comparación con otros tejidos y células aisladas. deben implementarse protocolos bien definidos, que garanticen un alto porcentaje de recuperación de la planta y un grado aceptable de eficiencia de los tejidos almacenados. Los factores que determinan una buena respuesta en planta regeneración son ambientales, físicas y genotípico (Malabika y Abido, 2014; Lee y Chang, 2022).

El explante potencial (el tejido inicial procedente de la planta donante) consiste principalmente de brote (segmentos nodales), hoja (segmentos de lámina), piezas de flores, embriones inmaduros, fragmentos de hipocótilo o cotiledones. Los fragmentos de plantas se inician en el cultivo axénico a partir de diversas esterilizaciones, estos procedimientos dependen del tejido utilizado. Por regla general, los tejidos frágiles (meristemas, embriones inmaduros, cotiledones, hipocótilos) requiere menos exposición a agentes esterilizantes que semillas u órganos lignificados (Reed et al., 2011).

Aunque se tiene estandarizado los métodos de propagación *in vitro*, cada especie puede tener requerimientos de crecimiento inusuales y por lo tanto puede requerir procedimientos modificados para cultivo *in vitro* (Kulus y Tymoszuk, 2024). En caso de establecer un buen protocolo se obtiene inicialmente la elongación de los brotes, siguiendo su etapa de desarrollo las plántulas crecerán con un buen sistema radicular, el cual es muy importante para el trasplante en suelo (Pasternak y Steinmacher, 2024).

El uso de plantas propagadas *in vitro* para la reintroducción o la restauración de especies en peligro también está encontrando aplicación, y basándose de métodos exitosos para la aclimatación similares a sus condiciones *in situ* del cultivo (Wijerathna-Yapa y Hiti-Bandaralage, 2023). También se usa para estudios de mejoramiento genéticos tradicional y en aplicación de biotecnología por ingeniería genética. Conduciendo a una nueva categoría de germoplasma, clones de categoría especial, líneas celulares élite y material genéticamente transformadas con las características deseadas, a partir de plantas molecular y genéticamente caracterizadas (Malabika y Abido, 2014).

### **2.2.5. Transformación Genética en plantas**

La ingeniería genética involucra la modificación controlada del genoma vegetal para que exprese una característica de interés, al introducir segmentos de ADN foráneo. Esto se realiza mediante la transformación genética, este proceso constituye varias etapas; determinación del gen de interés, integración del gen al casete de expresión, vectores de clonación o transferencia del casete, determinar método de introducción del ADN al genoma, establecer un protocolo de regeneración de plantas completas, identificación de individuos transformados y métodos analíticos para comprobar la presencia de la inserción del gen en el genoma y sus productos (Díaz y Chaparro-Giraldo, 2012).

### 2.3. Definiciones de términos básicos

**Cladodio:** estructura aplanada, parte del tallo que se modifica para cumplir la función de hoja, es característica de las cactáceas. Se utilizan comúnmente como propágulo asexual (Medina y Kondo, 2012).

**Cultivo vegetal in vitro:** cultivo de celular, de tejidos u órganos vegetales bajo condiciones controladas. Se basa en la totipotencia celular de las plantas que permiten seccionar una parte de ella y obtener una nueva planta completa. Se utiliza por los beneficios de obtener principalmente una planta libre de patógenos que produce clones de una planta madre (Thorpe, 2007).

**Marcador molecular:** es una molécula dentro de una muestra de cualquier organismo. Las más utilizadas son los marcadores moleculares de regiones de ADN. Estos indican la variación o polimorfismos en las bandas de ADN del organismo (Adhikari et al., 2007).

### 2.4. Hipótesis de investigación

#### 2.4.1. Hipótesis General

Se transformará genéticamente plantas de “pitahaya” *Hylocereus* sp. mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando el gen *nptII* como marcador de selección

#### 2.4.2. Hipótesis Específicas

- Al menos un método de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tendrá éxito en plantas de “pitahaya” *Hylocereus* sp.
- Se obtendrá una acción positiva del gen *nptII* como marcador de selección en plantas “pitahaya” *Hylocereus* sp. transformadas genéticamente.
- Se verificará molecularmente la integración del gen *nptII* como marcador de selección en plantas transgénicas putativas de “pitahaya” *Hylocereus* sp.

## 2.5. Operacionalización de las variables

Variables	Dimensiones	Indicadores	Escala de dimensión
V1: Marcador de selección de resistencia al antibiótico <i>nptII</i>	Efecto de antibiótico	Eficiencia de transformación putativas	%
	Regeneración de brotes	Respuesta de formación de brotes	%
		Número de brotes por explante	Nº
V2: Transformación genética de pitahaya mediada por <i>A. tumefaciens</i>	Inserción de gen	Eficiencia de transformación	%

## **Capítulo III: METODOLOGIA**

### **3.1. Diseño metodológico**

#### **3.1.1. Tipo de investigación**

Investigación básica ya que busca expandir los conocimientos con respecto al desarrollo de plantas transgénicas de pitahaya, así como también determinar que metodología de transformación es el óptimo para este genotipo de esta especie. Todo ello con expectativas a futuro de poder aplicar la tecnología para el desarrollo de plantas mediante edición genética, mientras las plántulas regeneradas podrían emplearse en programas de mejoramiento genético

#### **3.1.2. Nivel de investigación**

El presente estudio corresponde al nivel explicativo, ya que busca identificar y analizar los factores determinantes que influyen en el proceso de transformación genética en pitahaya. A través de esta investigación, se pretende comprender las condiciones técnicas que favorecen la incorporación y expresión estable de genes de interés, así como los elementos críticos que permiten la regeneración eficiente de plantas transformadas. Este enfoque explicativo permite ir más allá de la simple descripción o correlación, orientándose a establecer relaciones causales entre las variables que intervienen en el proceso biotecnológico evaluado.

#### **3.1.3. Diseño de la investigación**

El diseño adoptado en esta investigación es de tipo experimental, dado que implica la manipulación deliberada de variables con el propósito de identificar los tratamientos más eficaces en el proceso de transformación genética de pitahaya. Se llevarán a cabo ensayos comparativos entre diferentes condiciones experimentales, permitiendo evaluar el efecto de factores. Estas variables fueron medidas y analizadas de forma sistemática, con el fin de establecer cuáles combinaciones favorecen una mayor eficiencia en la incorporación de genes y la regeneración de plantas transformadas. Este diseño permite determinar relaciones causales y validar estadísticamente las diferencias entre tratamientos.

#### **3.1.4. Enfoque de la investigación**

La presente investigación se desarrolla bajo un enfoque cuantitativo, ya que se basa en la recolección y análisis de datos numéricos para evaluar el efecto de diversas condiciones experimentales sobre la transformación genética de pitahaya. Este enfoque permite establecer relaciones de causa y efecto entre la variable independiente (tratamientos aplicados) y la variable dependiente (eficiencia de transformación y regeneración de plantas). Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis estadísticos que faciliten la interpretación objetiva de los resultados, permitiendo validar hipótesis. De esta forma, el estudio se enmarca en una metodología rigurosa orientada a la medición, comparación y verificación de resultados experimentales.

### **3.2. Población y muestra**

#### **3.2.1. Población**

La población fue definida por un total de 30 plantas de pitahaya naranja de churuja con cinco cladodios como mínimo, las plantas fueron mantenidas en condiciones de invernadero del Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM) de la Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto.

#### **3.2.2. Muestra**

La muestra fue definida por un total de 50 cladodios homogéneos de pitahaya naranja de churuja, los cladodios fueron colectados a partir de las plantas mantenidas en condiciones de invernadero del Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM) de la Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto.

### **3.3. Técnicas de recolección de datos**

#### **3.3.1. Técnicas a emplear**

##### **3.3.1.1. Material vegetal**

El material vegetal estuvo conformado por cladodios de pitahaya naranja de Churuja mantenidas en condiciones de invernadero del Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM) de la Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto. A partir de este

material se seleccionaron los cladodios con las mejores características (vigorosas, robustas, sanas, etc) para la introducción en condiciones *in vitro*.

#### **3.3.1.2. Proceso de lavado**

Los cladodios de pitahaya naranja de Churuja fueron segmentados en tamaños de 3 cm aproximada y posteriormente lavados con agua de caño y jabón líquido para retirar el máximo posible de tierra presente. Después de este proceso se colocaron en un vaso de precipitación de 500 ml con una solución de antifúngico comercial a una concentración de 1 mL/L. Se dejaron remojar por un periodo de 45 minutos en constante movimiento, transcurrido el tiempo se enjuagaron con agua destilada hasta observar que no presente restos de la solución.

#### **3.3.1.3. Desinfección**

El proceso de la desinfección se realizó en cámara de flujo laminar, primeramente, los cladodios se sumergieron en alcohol al 70% durante un minuto, seguidamente fueron transferidos a una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% durante 15 minutos estando en constante movimiento. Posterior al lavado se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril, cada lavado fue de 10 minutos. Luego los cladodios fueron colocados en un papel absorbente estéril para eliminar el exceso de agua y se dejaron secar la muestra durante 10 minutos. Finalmente, los cladodios fueron cortados en fragmentos de 2 cm e introducidos en medio de cultivo.

#### **3.3.1.4. Crecimiento e inducción de brotes de los explantes**

El medio de cultivo para el crecimiento e inducción de brotes de los explantes de fragmentos de cladodio de pitahaya estuvieron constituidos por macronutrientes y micronutrientes descritas por Murashige y Skoog (1962) a media concentración, adicionado con sacarosa (30 g/L); se graduó el pH a 5.8, se agregó agar (6 g/L), carbón activado (2 g/L) y 1 mg/L de Bencilaminopurina (BAP). Posteriormente se trasladaron los medios al autoclave para ser esterilizados a 1.2 Bar de presión y 121° C durante 20 minutos. Por último, todos los explantes fueron incubados a una temperatura de 23°C con periodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, durante un periodo de 30 días.

### **3.3.1.5. Cultivo de *Agrobacterium***

El cultivo *A. tumefaciens* inició con la reactivación de la cepa GV3101 conteniendo el vector AtBBM::pk7WG2, el cual es un vector de sobre expresión y que presenta al gen *nptII* como marcador de selección. La reactivación de la bacteria se realizó descongelando un tubo con stock de *A. tumefaciens* y tomando 90 µl del stock se añadieron a 30 mL de medio LB suplementado con 50 mg/ml de kanamicina en un matraz Erlenmeyer estéril de 125 ml cubierto con papel de aluminio. La incubación se realizó en una incubadora con agitación de 200 rpm durante 16 horas a 25° C en total oscuridad.

Transcurrida las 16 horas se realizó una medición de densidad óptica (OD) a 600 nm. Se trabajará con una OD600 de 1 y se transfirió todo el cultivo a un tubo de centrifuga de 50 ml, luego se centrifugo a 1000 rpm, 25 ° C, durante 5 minutos para sedimentar las bacterias. Se descarto el sobrenadante y se resuspendió en 30 mL de medio LB libre de antibióticos. Se incubaron durante 5 horas en oscuridad a 100 rpm y 25° C.

### **3.3.1.6. Transformación genética medida por *Agrobacterium***

En la transformación genética mediada por *A. tumefaciens* se probaron tres métodos de transformación, el primer método consistió en co-cultivo de *A. tumefaciens* con los explantes de pitahaya, el segundo método consistió en inyección directa de la suspensión bacteria en areolas de los explantes de pitahaya, y el tercer método consistió en agro infiltración al vacío. Los explantes que se utilizaron para esta fase consistirán en segmentos de cladodios de aproximadamente 1 cm de longitud, los cuales presentaron únicamente tres areolas.

Para el método de inyección directa de la suspensión bacteria de *A. tumefaciens* se trabajó con la suspensión que se incubo durante 5 horas. Se utilizaron jeringas de tuberculina de 1 ml con aguja de 25 x 5/8. La inyección se realizó directamente sobre las areolas de segmentos de pitahaya. Posteriormente los explantes se colocaron en papel estéril para la eliminación de exceso de suspensión bacteriana. Luego los explantes fueron colocados en medio de cultivo MS.

Para el método de co-cultivo se realizó colocando la suspensión bacteria de *A. tumefaciens* en una placa Petri estéril y luego se añadieron los explantes en la misma placa y se incubaron durante 2 horas. Posterior al tiempo mencionado, los explantes se

transfirieron a papel estéril para la eliminación de exceso de suspensión bacteriana y luego cultivadas en medio de cultivo MS.

Para el método de agro infiltración al vacío se trabajó con una placa Petri estéril con papel filtro, en esta placa se añadió toda la suspensión bacteriana y luego se añadieron los explantes de pitahaya, luego las placas fueron colocadas en bomba de vacío y se trabajó 30 minutos por cada lado del explante. Luego los explantes se transfirieron a papel estéril para la eliminación de exceso de suspensión bacteriana y luego cultivadas en medio de cultivo MS.

Adicionalmente se trabajó con dos tratamientos controles, ambos no pasaron por proceso de adición de *A. tumefaciens*, el primero consistió en un tratamiento control absoluto para evidenciar el desarrollo o formación de brotes a partir de los explantes de pitahaya, es decir en este tratamiento no se utilizaron medios de cultivo con antibióticos. El segundo control siguió el mismo proceso que los demás métodos de transformación para evidenciar el efecto del antibiótico kanamicina en plantas no transgénicas.

El medio MS estuvo compuesto por sales Murashige y Skoog (1962) a media concentración, adicionado con sacarosa (30 g/L); se graduó el pH a 5.8, se agregó agar (6 g/L), carbón activado (2 g/L) y 1 mg/L de BAP. Todos los explantes fueron incubados a una temperatura de 25°C durante 48 horas en oscuridad total. Transcurrido el tiempo todos los explantes fueron transferidos a nuevos medios de cultivo MS, pero con la adición del antibiótico meropenem 200 mg/ml para la eliminación de *A. tumefaciens* y fueron incubados a una temperatura de 23°C durante 7 días con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

Transcurrido los días establecidos se realizó un cambio de medio de cultivo, esta vez para la selección de plantas transgénicas. Todos los explantes fueron transferidos a medio de cultivo MS con kanamicina a 50 mg/ml. Todos los explantes fueron incubados a una temperatura de 23°C con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad y los explantes fueron transferidos a medios de cultivo nuevos cada 15 días durante 45 días.

#### **3.3.1.7. Regeneración de plantas transgénicas putativas**

En el experimento se tuvo tres métodos (tratamientos) de transformación genética y dos tratamientos controles (Tabla 1), de estos se evaluó el efecto del antibiótico kanamicina en los explantes para determinar que el gen *nptII* integrado en el genoma de las plantas transgénicas putativas es estable como marcador de selección. Está

evaluación consistió en dos recopilaciones de datos visuales, la primera consistió en la pigmentación de los explantes, considerando verde como viable y marrón como no viable; la segunda evaluación se basó en la formación de brotes a partir de cada areola de los explantes, recalando que los explantes que se utilizaron presentaron tres areolas, por lo tanto, en los resultados se pudo tener de 0 a 3 brotes por explante y los resultados son presentados en porcentaje de eficiencia de transformación putativas utilizando la siguiente formula: Eficiencia de transformación putativas (%) = (Número de plantas transgénicas regeneradas/número total de explantes) X 100.

**Tabla 1 .** Tratamientos empleados en la transformación genética de pitahaya.

Tratamiento	Proceso
T0	Control absoluto
T1	Control negativo
T2	Método de transformación por inyección directa
T3	Método de transformación por co-cultivo
T4	Método de transformación por bomba de vacío

### 3.3.1.8. Confirmación de plantas transgénicas

Las plántulas transgénicas putativas de pitahaya fueron transferidas individualmente a medios de cultivo MS frescos con kanamicina a 50 mg/ml, para continuar con su desarrollo y se mantuvieron durante 30 días. Transcurrido el tiempo establecido se extrajo ADN de todas las plántulas transgénicas putativas de pitahaya y las plántulas regeneradas del tratamiento de control absoluto (T0), la extracción de ADN se realizó mediante el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), según el protocolo descrito por Doyle y Doyle (1987).

La solución CTAB estuvo compuesto por bromuro de cetiltrimetilamonio al 2% (p/v), Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, NaCl 1.4 M y  $\beta$ -mercaptoetanol. La extracción consistió inicialmente pesando aproximadamente 100 mg de muestra en tubo Eppendorf de 2 mL, y se añadieron 200  $\mu$ L de solución de extracción CTAB 2% pre-calentada. También se añadió 2  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol y se trituraron con la ayuda de un pilón hasta obtener una masa homogénea. Luego se añadió 600  $\mu$ L de solución de extracción CTAB 2% adicionales y 10  $\mu$ L de Proteínasa K. Las muestras se mezclaron

vigorosamente en vortex y se incubaron en baño maría a 65 °C durante 16 horas aproximadamente.

Se continuó añadiendo 1000 µL cloroformo a cada muestra, y se mezcló suavemente por inversión durante 10 minutos. Luego las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. De las fases obtenidas se recuperó cuidadosamente el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL limpio. Luego se añadió 700 µL de isopropanol frío y se mezclaron suavemente por inversión. Luego las muestras se incubaron a -20 °C durante 2 horas. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. De este paso se obtuvo la formación del pellet de ADN, el cual se formó en la parte inferior del tubo, de esta manera se descartó el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet. Luego se añadió 700 µL de etanol al 70% frío y las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y luego se descartó el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet, este paso se repitió dos veces. Posteriormente se dejaron secando las muestras durante 20 minutos.

Las muestras secas se resuspendieron con 30 µL de agua libre de nucleasas. A partir de estas muestras resuspendidas se realizaron las cuantificaciones correspondientes de ADN mediante espectrofotometría con NanoDrop. Se evaluó la concentración (ng/µL) y la pureza mediante las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230. Luego se verificó la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Finalmente, las muestras de ADN se conservaron a -30 °C hasta su posterior uso.

El ADN total extraído se cuantificó mediante espectrofotometría y se diluyó a una concentración de 50 ng/µL para continuar con el proceso de PCR. La PCR se realizó utilizando 1 µL de muestra de ADN diluida (50 ng/µL) con 20 µL de mezcla maestra para PCR y 2 µL de cada cebador específico (forward y reverse) para el gen *nptII*.

Los resultados de la PCR se evaluaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Las muestras de plántulas transgénicas putativas de pitahaya con bandas de amplicon de 700 pb aproximadamente se consideraron positivas, es decir plántulas transgénicas de pitahaya con la inserción del gen *nptII*. Los resultados son presentados en porcentaje de eficiencia de transformación utilizando la siguiente fórmula: Eficiencia de transformación (%) = (Número total de plantas PCR positivas/número total de explantes) X 100.

### 3.3.2. Descripción de los instrumentos

- **Congeladora Templog:** equipo que permitió conservar a -20 °C las muestras y reactivos empleando durante el proceso de transformación genética, así como para la amplificación por PCR.
- **Balanza analítica Ohaus Pioneer:** equipo para obtener la medición del peso necesario para cada componente de las soluciones preparadas, así como de los medios de cultivo.
- **Potenciómetro SI Analytics Lab 850:** equipo para la determinación del potencial de hidrogeno (pH) requeridas de las soluciones y medios de cultivo.
- **Ultracongeladora Thermo Scientific:** equipo que permitió conservar a -80 °C las bacterias durante el proceso de transformación genética.
- **Autoclave Yamato SM511:** equipo que permitió esterilizar a 121 °C materiales, soluciones y medios de cultivo, con la finalidad de evitar la contaminación de estos que pueda afectar los resultados de los experimentos desarrollados.
- **Cabina de flujo laminar AirClean 4000 Workstation:** equipo para el proceso de trabajo en condiciones asépticas, eso incluyendo la introducción y multiplicación in vitro de las plantas y transformación genética.
- **Sistema de documentación en gel omniDOC de Cleaver Scientific:** equipo que permitió la visualización de los resultados de los productos PCR colocados en geles de agarosa mediante transiluminación UV.
- **Termociclador Applied Biosystems:** equipo que permitió la corrida de muestras empleando la técnica de PCR para la amplificación de los genes marcadores.
- **Cámara extractora de gases LABCONCO:** equipo que permitió la preparación de solución y extracción de ADN empleando reactivos volátiles y nocivos.
- **Cabina de PCR LABCONCO:** equipo que permitió la preparación de master mix para la corrida de PCR en un área libre de patógenos y contaminantes.
- **Productor de agua ultrapura Milli-Q:** equipo que permitió disponer de agua ultrapura libre de nucleasas necesarias para los procesos de análisis moleculares.
- **Espectrofotómetro NanoDrop One Thermo Scientific:** equipo que permitió la cuantificación de la densidad óptica (OD) así como del ADN extraído de las muestras.
- **Vortex Thermo Scientific:** equipo que permitió la homogenización de las muestras durante el proceso de extracción de ADN.

- **MiniSpin Eppendorf:** equipo que permitió la centrifugación de muestras durante el proceso de extracción de ADN donde era necesario trabajar a temperatura ambiente.
- **Sistema de electroforesis Cleaver Scientific:** equipo que permitió las corridas electroforéticas de las muestras durante el proceso de determinación de integridad de ADN extraído como de los productos PCR.
- **Centrifuga refrigerada Eppendorf 5430 R:** equipo que permitió la centrifugación de muestras durante el proceso de extracción de ADN donde era necesario trabajar a temperaturas de 4 °C.

### 3.4. Técnicas para el procesamiento de la información

Para el análisis de los datos obtenidos en los diferentes experimentos, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) en todas las evaluaciones realizadas. Cada tratamiento fue replicado diez veces, siendo la unidad experimental una placa Petri que contenía seis explantes de pitahaya.

El análisis estadístico se basó en el siguiente modelo lineal general:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$ : valor observado en la unidad experimental correspondiente al  $i$ -ésimo tratamiento y  $j$ -ésima repetición.

$\mu$ : media general.

$\alpha_i$ : Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento.

$\epsilon_{ij}$ : error experimental aleatorio asociado.

El procesamiento de los datos se realizó mediante el software libre R (versión 4.5.0), utilizando los paquetes estadísticos agricolae y car, dentro del entorno de desarrollo RStudio Desktop (versión 2025.05.0+496). Se efectuó un Análisis de Varianza (ANVA) para determinar la existencia de diferencias significativas entre tratamientos, seguido de una prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ , para identificar las diferencias específicas entre grupos.

## Capítulo IV: RESULTADOS

### 4.1. Transformación genética medida por *Agrobacterium*

Se realizó la transformación genética medida por *Agrobacterium* con el vector AtBBM::pk7WG2, con el gen *nptII* como marcador de selección. Se probaron tres métodos de la adición de las bacterias a los explantes de pitahaya, además de probar tener dos controles, uno como control absoluto para mostrar el desarrollo normal de los nuevos brotes sin pasar por la adición de antibióticos, mientras que el otro control considerado como negativo, fueron los explantes en medios con antibiótico y de esta manera se mostraba como el antibiótico afecta a los explantes. En la Figura 1 se evidencia a los explantes de coloración marrón, lo cual representa que el tejido ha perdido su color verde (vital) y muestra oscurecimiento, lo cual es un signo claro de oxidación fenólica y muerte celular inducida, esta muerte celular fue inducida con estrés por antibióticos, kanamicina en este caso, y por ello el tejido es considerado inerte e indicando que la actividad metabólica ha cesado.



**Figura 1.** Explantes inertes de pitahaya en medio de cultivo con kanamicina.

En el caso de los explantes control absoluto y los que pasaron por los métodos de transformación genética, en los casos que hubo hipotéticamente transformación del explante, mantuvieron su característica coloración verde (Figura 2). A partir de estas respuestas se realizó la evaluación correspondiente de eficiencia de transformación putativa. Primeramente, se realizó análisis de normalidad con la prueba de Shapiro y análisis de homogeneidad de varianza, obteniendo P valores de 0.0694 y 0.2573, respectivamente (Tabla 2). Estos resultados permiten interpretar que los datos obtenidos cumplen con normalidad y homogeneidad de varianza, y a la vez cumplen con lo requerido para las evaluaciones de los análisis paramétricos, razón por la cual se continua con análisis de varianza. El análisis de varianza (ANVA) mostro un P valor  $< 0.0001$ , por lo cual existe significancia entre al menos de uno de los tratamientos evaluados (Tabla 3).



**Figura 2.** Explantes de pitahaya posterior al proceso de transformación genética mediada por *Agrobacterium*, con señales de vitalidad (coloración verde).

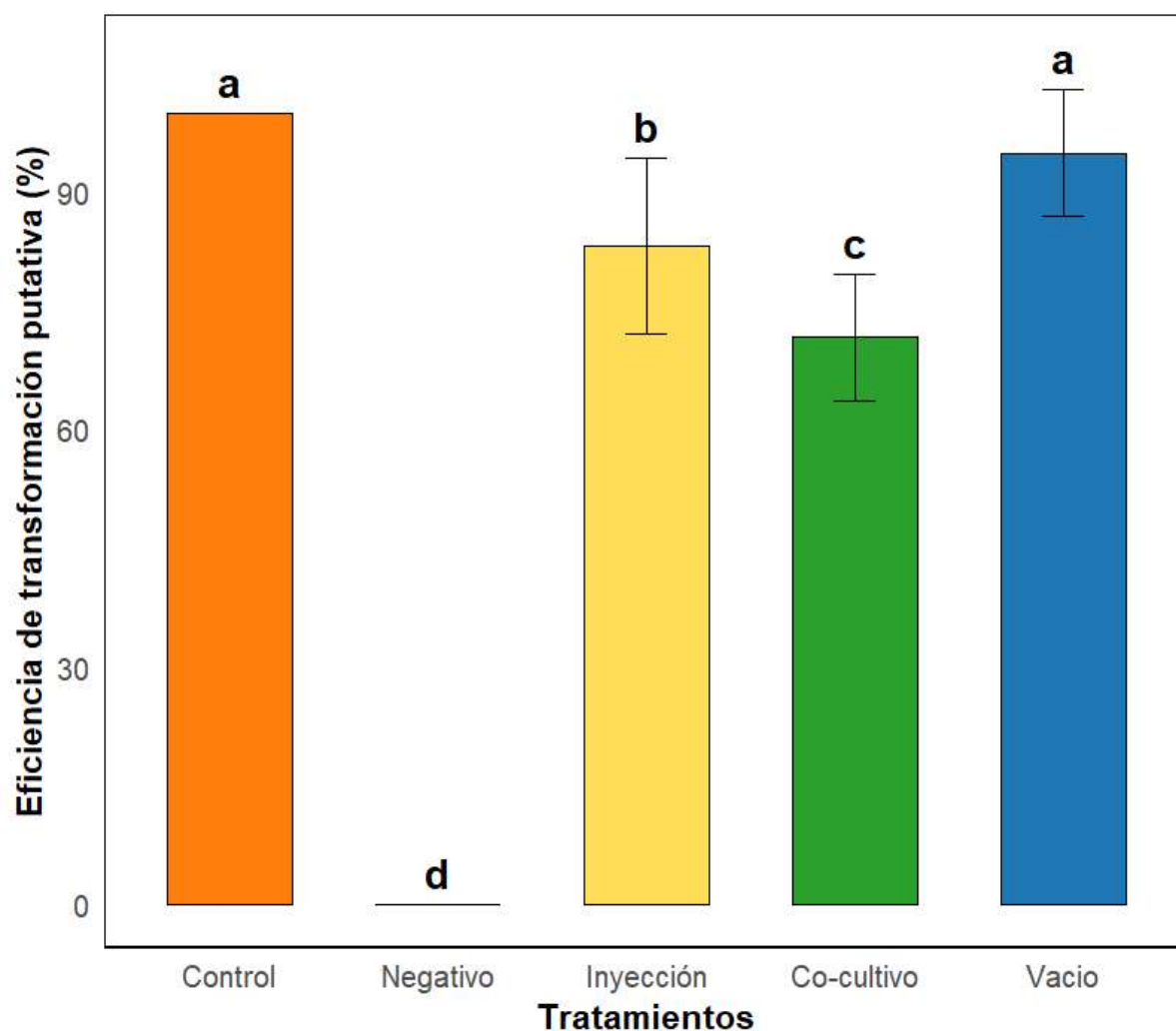
**Tabla 2.** Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para la eficiencia de transformación putativa de explantes de pitahaya.

Análisis	Prueba	P valor
Normalidad	Shapiro	0.0694
Homogeneidad de varianza	Bartlett	0.2573

**Tabla 3.** Análisis de varianza para la eficiencia de transformación putativa de explantes de pitahaya.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F cal.	P valor
Tratamiento	4	69088	17272	198.4	< 0.0001
Error	45	3917	87		
Total	49	73005			

Los resultados de la transformación genética putativa se consideraron a los explantes que presentaron coloración vital posterior a los procesos de transformación genética mediada por *Agrobacterium* con el vector AtBBM::pk7WG2, lo que consideraría hipotéticamente que las plantas (putativas) tienen integrado a su genoma el gen *nptII*, el cual les permite tolerar a kanamicina adicionado en el medio de cultivo. Para determinar el o los mejores tratamientos en la eficiencia de transformación putativa, se realizó la prueba de comparación de medios de Tukey. En la Figura 3 se muestran los resultados de la comparación de medias, mostrando como mejor tratamiento que se empleó a la bomba de vacío, obteniéndose 95% de eficiencia de transformación genética putativa. Mientras que el segundo mejor tratamiento corresponde al método de inyección directa a las areolas de los explantes, con 83% de eficiencia de transformación genética putativa.



**Figura 3.** Porcentaje de eficiencia de transformación putativa en explantes de pitahaya.

#### 4.2. Regeneración de plantas transgénicas putativas

Para la regeneración de plantas primeramente se consideró el porcentaje de respuesta de los explantes a la formación de nuevos brotes, en este caso se tenía un máximo de brotes esperados (3 brotes) por explante, debido a que cada explante contenía tres areolas, cada una con tejido meristemático potencialmente inductivo para la organogénesis de nuevos brotes. Se realizó análisis de normalidad con la prueba de Shapiro y análisis de homogeneidad de varianza, obteniendo P valores de 0.0746 y 0.1914, respectivamente (Tabla 4). El análisis de varianza (ANVA) mostro un P valor  $< 0.0001$ , por lo cual existe significancia entre al menos de uno de los tratamientos evaluados (Tabla 5).

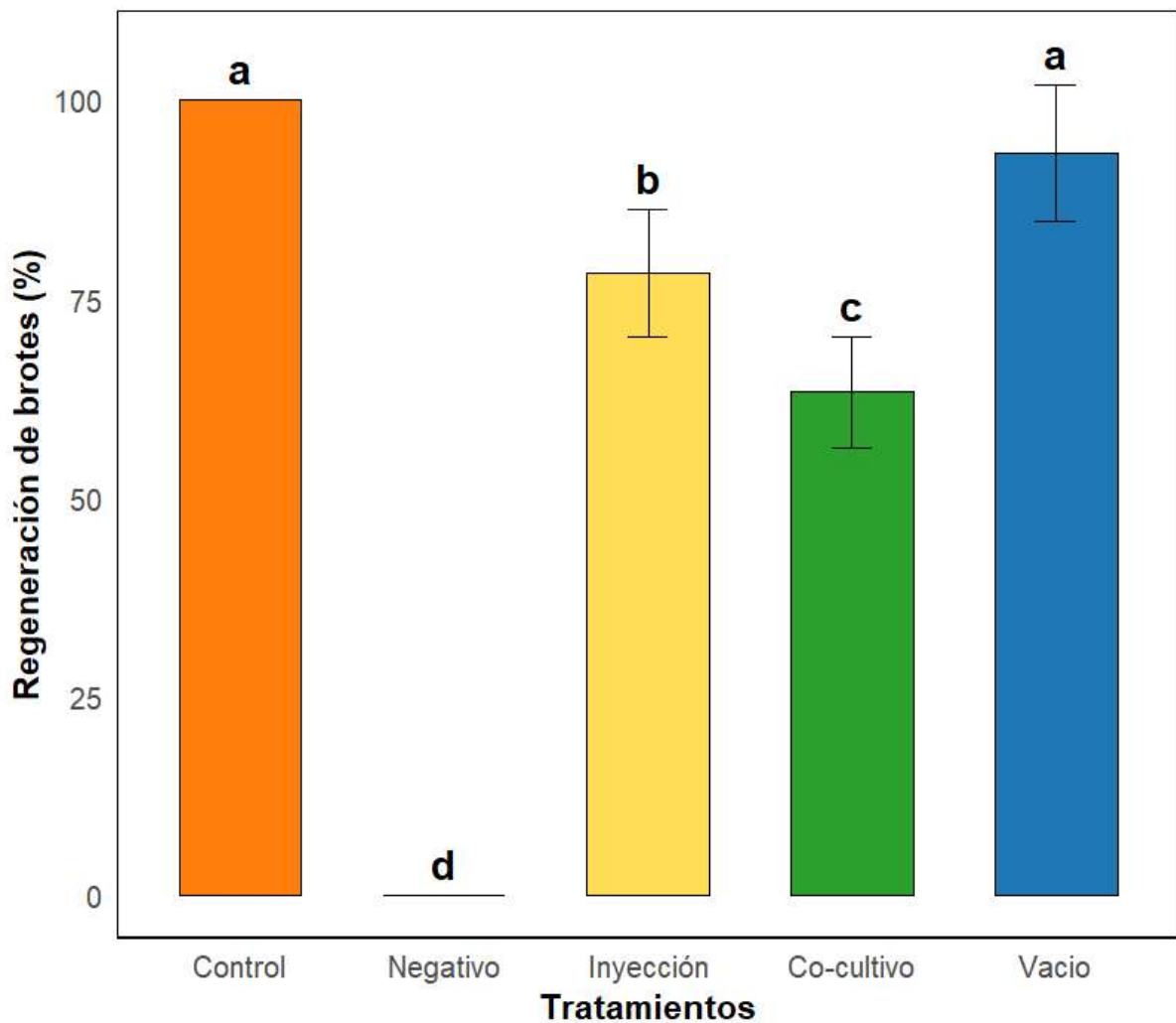
**Tabla 4.** Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para regeneración de brotes.

Análisis	Prueba	P valor
Normalidad	Shapiro	0.0746
Homogeneidad de varianza	Bartlett	0.1914

**Tabla 5.** Análisis de varianza para regeneración de brotes.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F cal.	P valor
Tratamiento	4	66166	16541	227.1	< 0.0001
Error	45	3278	73		
Total	49	69444			

En la Figura 4 se muestran los resultados de la comparación de medias del porcentaje de formación de brotes, al mejor tratamiento al que se empleó bomba de vacío, obteniéndose 93% de regeneración de brotes, sin diferenciarse estadísticamente del tratamiento control absoluto. Demostrando que el proceso fue efectivo y no disminuyó o afectó negativamente la capacidad organogénica de las areolas. El segundo mejor tratamiento corresponde al método de inyección directa a las areolas de los explantes, con 78% de regeneración de brotes. Mientras que el tratamiento de co-cultivo presentó 63% de regeneración de brotes. El tratamiento de control negativo presentó 0% de regeneración debido a que todos los explantes ya habían sido considerados inertes al no poder sobrevivir al proceso de adición a medio de cultivo con presencia de kanamicina.



**Figura 4.** Porcentaje de regeneración de brotes por explante de pitahaya.

Se realizó la evaluación del número de brotes por cada explante en cada uno de los tratamientos, evidenciándose la formación de brotes en los diferentes tratamientos posterior a la transformación genética (Figura 5). En el análisis de normalidad con la prueba de Shapiro y análisis de homogeneidad de varianza, se obtuvieron P valores de 0.1226 y 0.3472, respectivamente (Tabla 6). Estos resultados permiten interpretar que los datos obtenidos cumplen con normalidad y homogeneidad de varianza, y a la vez cumplen con lo requerido para las evaluaciones de los análisis paramétricos, razón por la cual se continúa con análisis de varianza. El análisis de varianza (ANVA) mostro un P valor  $< 0.0001$ , por lo cual existe significancia entre al menos de uno de los tratamientos evaluados (Tabla 7).



**Figura 5.** Formación de brotes en los explantes de pitahaya posterior al proceso de transformación genética mediada por *Agrobacterium*.

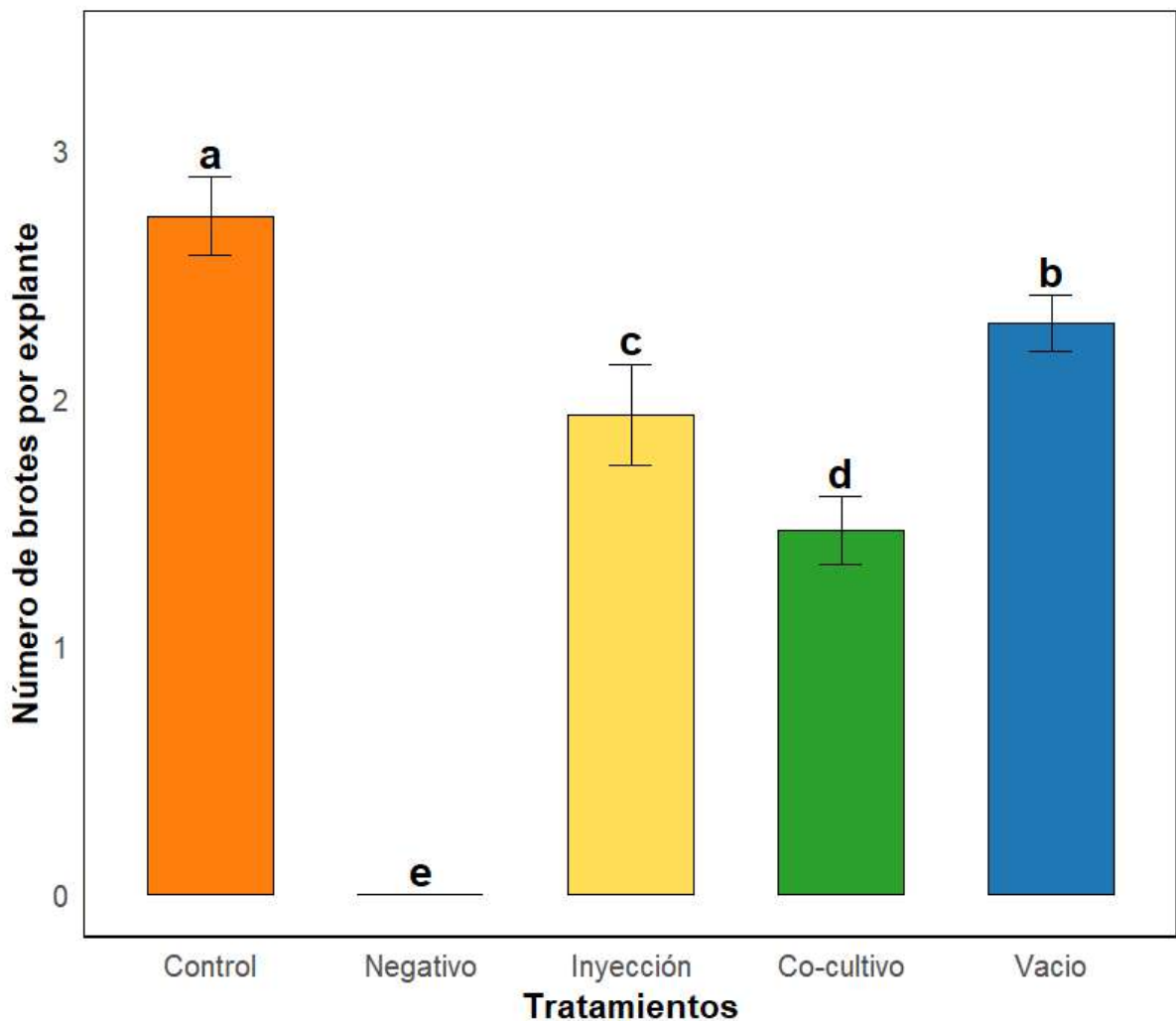
**Tabla 6.** Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para número de brotes.

Análisis	Prueba	P valor
Normalidad	Shapiro	0.1226
Homogeneidad de varianza	Bartlett	0.3472

**Tabla 7.** Análisis de varianza para número de brotes.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F cal.	P valor
Tratamiento	4	44.26	11.066	569.9	< 0.0001
Error	45	0.87	0.019		
Total	49	45.13			

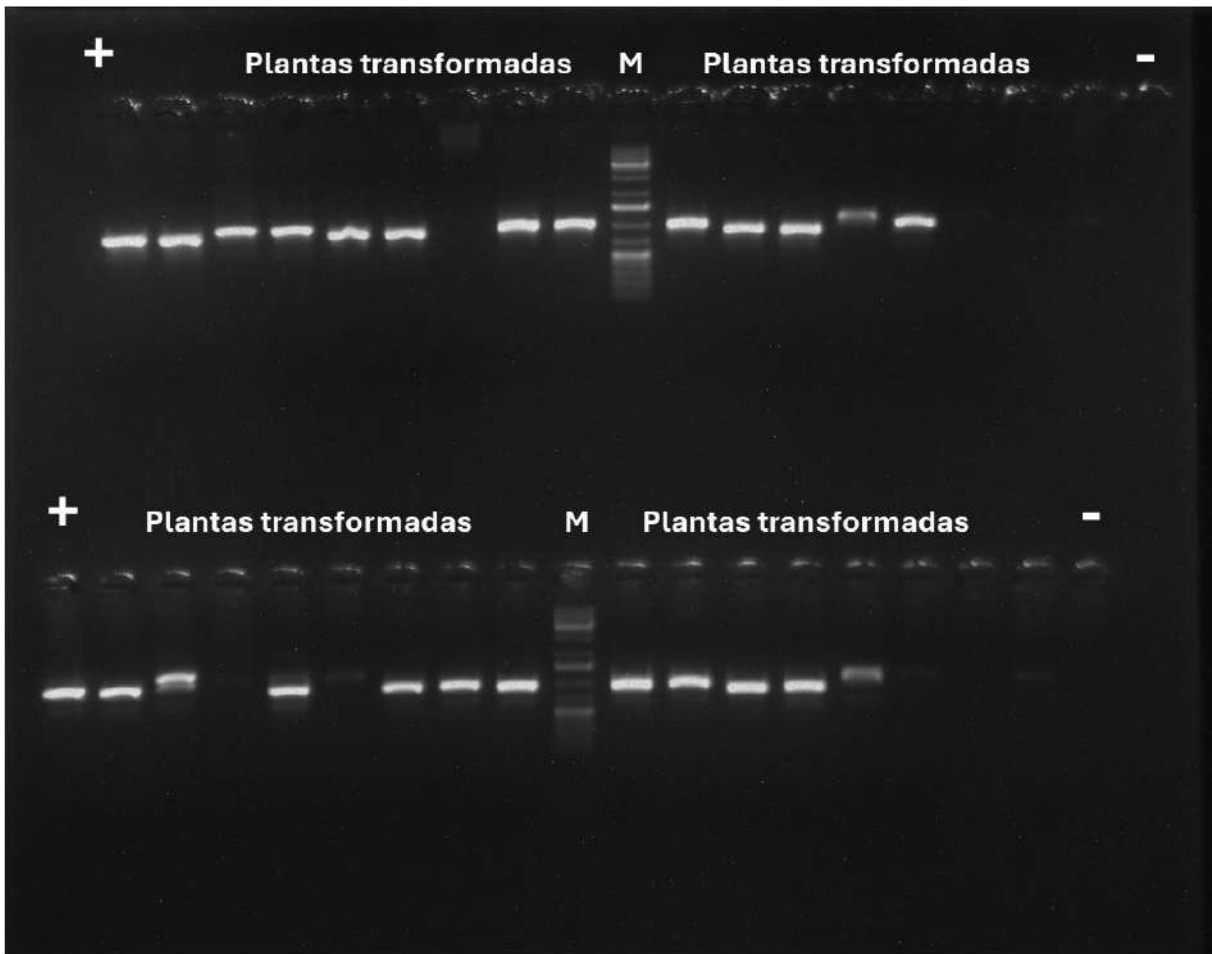
En la Figura 6 se muestran los resultados de la comparación de medias del número de brotes por explante de pitahaya posterior a la transformación genética mediada por *Agrobacterium*. Los mejores resultados fueron obtenidos con el tratamiento control absoluto, con un 2.73 de media de brotes por explante. El segundo mejor tratamiento fue el que se empleó bomba de vacío, obteniéndose 2.30 de media de brotes por explante. En cuanto al tratamiento con el método de inyección directa a las areolas y el tratamiento de co-cultivo, presentaron 1.93 y 1.47 de media de brotes por explante, respectivamente, ubicándose en los grupos c y d respectivamente.



**Figura 6.** Número de brotes por explante de pitahaya posterior a la transformación genética mediada por *Agrobacterium*.

### 4.3. Confirmación de plantas transgénicas

La confirmación de transgénesis a partir de las plantas transgénicas putativas se realizó mediante PCR. Los resultados se observaron en gel de agarosa mediante un fotodocumentador, donde se puede apreciar las bandas de ADN amplificadas con tamaños esperados de aproximadamente 700 pb (Figura 7), las muestras negativas no presentaron amplificación por lo que se interpreta que el gen *nptII* no se integro al genoma de la planta.



**+ = Vector ; M = Marcador; - = agua**

**Figura 7.** Electroforesis de productos PCR de muestras de pitahayas transgénicas putativas, las cuales son confirmaron como plantas transgénicas al tener el gen *nptII* integrado a su genoma.

Se realizó la evaluación de la eficiencia de transformación en cada uno de los tratamientos, a partir de las bandas amplificadas por cada grupo de plantas regeneradas. En el análisis de normalidad con la prueba de Shapiro y análisis de homogeneidad de varianza, se obtuvieron P valores de 0.1912 y 0.7740, respectivamente (Tabla 9). Estos resultados permiten interpretar que los datos obtenidos cumplen con normalidad y homogeneidad de varianza, y a la vez cumplen con lo requerido para las evaluaciones de los análisis paramétricos, razón por la cual se continua con análisis de varianza. El análisis de varianza (ANVA) permitió obtener 0.0289 de P valor, por lo cual existe significancia entre al menos de uno de los tratamientos evaluados (Tabla 10).

**Tabla 8.** Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para eficiencia de transformación.

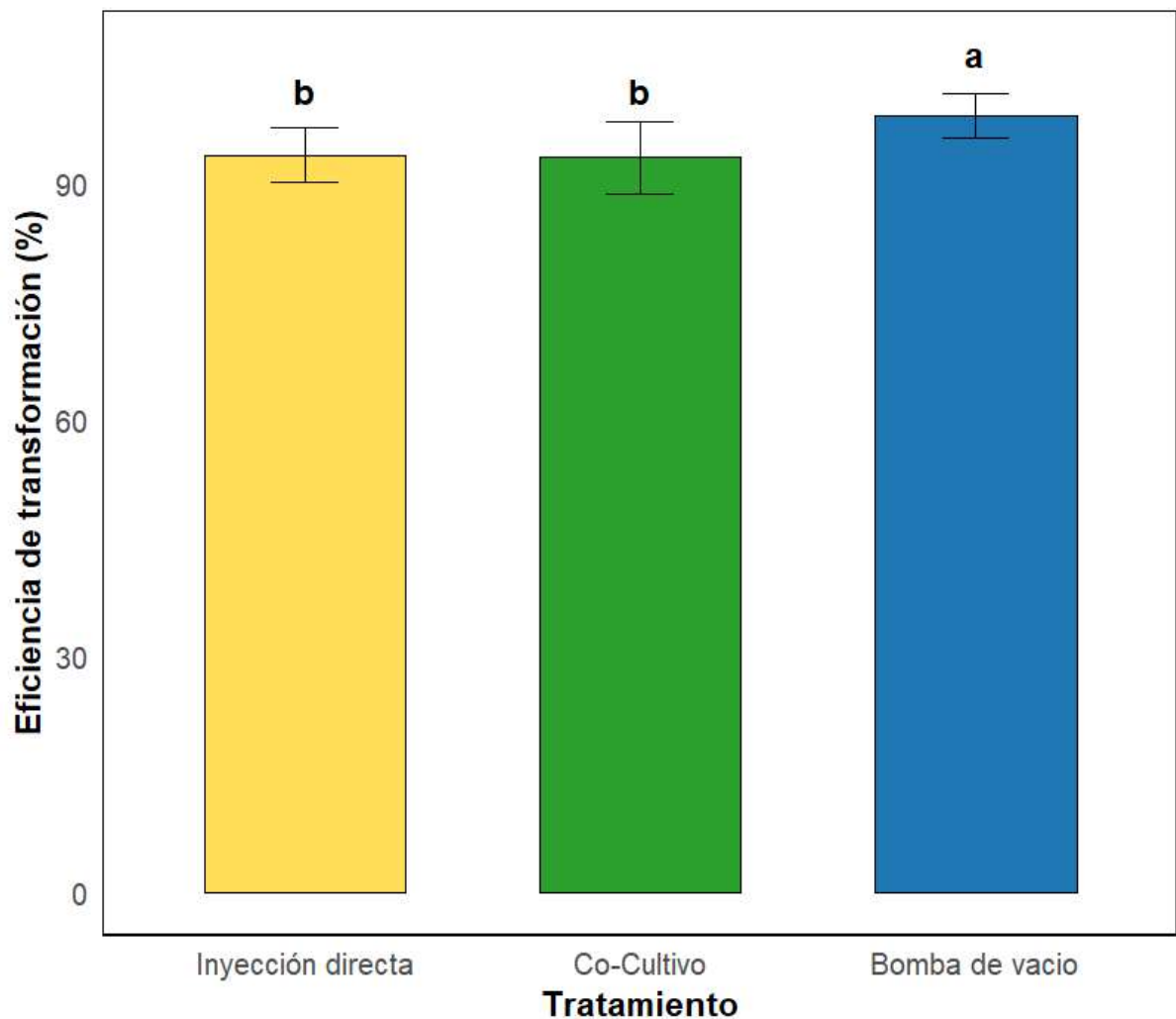
Análisis	Prueba	P valor
Normalidad	Shapiro	0.1912
Homogeneidad de varianza	Bartlett	0.7740

**Tabla 9.** Análisis de varianza para eficiencia de transformación.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F cal.	P valor
Tratamiento	2	276.1	138.05	4.054	0.0289
Error	27	919.4	34.05		
Total	29	1195.5			

Finalmente se realizó la prueba de comparación de grupos de Tukey para determinar el mejor tratamiento en relación con la eficiencia de transformación genética de plantas de pitahaya mediada por *Agrobacterium*. Los mejores resultados fueron obtenidos con el tratamiento empleando bomba de vacío, presentando 98% de eficiencia de transformación

confirmada por productos PCR. Mientras que los tratamientos con el método de inyección directa a las areolas y el tratamiento de co-cultivo, presentaron 93.61% y 93.27% de eficiencia de transformación confirmada por productos PCR, respectivamente, ambos tratamientos no presentaron diferencias significativas entre ellas. En general estos resultados demuestran que el método de bomba de vacío es el más eficiente al presentar una tasa baja de falsos positivos que escaparon a la selección por kanamicina, es decir que hay un porcentaje muy bajo (menos del 2%) de plantas que sobrevivieron al proceso de selección y regeneraron, pero realmente no estaban transformadas (PCR negativa).



**Figura 8.** Porcentaje de eficiencia de transformación genética de plantas de pitahaya mediada por *Agrobacterium*, confirmadas mediante PCR.

## Capítulo V: DISCUSIÓN

Se desarrollo la transformación genética de explantes de pitahaya, pero para ello previamente se estudió la regeneración de este genotipo para determinar su optima respuesta a la formación de nuevos brotes. Es por ello por lo que la regeneración *in vitro* de pitahaya constituye un pilar fundamental en el establecimiento de un protocolo exitoso de transformación genética. En esta investigación, la utilización de cladodios con tres areolas demostró ser efectiva para inducir brotes bajo condiciones controladas, lo cual está alineado con lo descrito por Manzanero-Acevedo et al. (2014), quienes destacan la importancia de la zona meristemática en la regeneración. El medio MS suplementado con BAP favoreció el desarrollo de nuevos brotes sin evidenciar efectos negativos sobre la morfología vegetal. De acuerdo con Encina y Regalado (2022), el cultivo de tejidos vegetales permite la propagación clonal eficiente en especies de difícil multiplicación convencional, lo cual refuerza el valor de esta etapa previa a la transformación.

La metodología de regeneración de brotes *in vitro* de pitahaya naranja de churuja estuvo basada en los resultados obtenidos por Saavedra (2023), quien empleo BAP para obtener mayor número de brotes por explante, así mismo en su metodología empleo carbón activado adicionado en el medio de cultivo, reduciendo la oxidación de los explantes. Estos resultados en comparación mantienen relación, al permitir que los explantes no se oxidarán en el tratamiento control y permitiendo tener un control en el número máximo de brotes por explante deseado.

La presente investigación empleó *Agrobacterium tumefaciens* como agente de transformación genética, una estrategia biotecnológica ampliamente utilizada en dicotiledóneas por su capacidad natural para transferir T-DNA al genoma vegetal. Esta característica hace de *A. tumefaciens* un vector eficiente y versátil para la inserción de genes de interés. Diversos estudios como los de Lacroix y Citovsky (2019) han descrito la eficacia de esta bacteria en la transformación de cultivos hortícolas y ornamentales. En este contexto, su aplicación en cactáceas representa un desafío técnico que requiere adaptaciones particulares, como la selección de explantes apropiados y el ajuste de condiciones de co-cultivo para asegurar la regeneración post-transformación (Ochoa-Jiménez et al., 2019).

Al comparar los resultados obtenidos con otras investigaciones que utilizaron *A. tumefaciens* en especies de la familia Cactaceae, se observa que el porcentaje de eficiencia

logrado en esta investigación (hasta 95% con bomba de vacío) supera ampliamente registros previos. Por ejemplo, Silos-Espino et al. (2006) reportaron una eficiencia del 3.2% en *Opuntia ficus-indica*, utilizando jeringas hipodérmicas para introducir la bacteria. Asimismo, Seol et al. (2008) evaluaron varios métodos de transformación en *Notocactus scopia*, destacando que la combinación de punción e infiltración al vacío brindó entre 67% y 100% de éxito, dependiendo del protocolo. Esto coinciden con los de la presente investigación y refuerzan la utilidad del vacío como herramienta para facilitar la entrada bacteriana en tejidos densos como los cladodios.

Uno de los aspectos críticos en la transformación genética *in vitro* es el conjunto de factores fisiológicos, genotípicos y ambientales que influyen directamente en la eficiencia del proceso. La respuesta de los explantes puede variar según el estado fisiológico de la planta madre, la edad del tejido, el tipo y la concentración de fitohormonas empleadas, así como las condiciones de luz y temperatura durante el cultivo. Reed et al. (2011) enfatizan que incluso pequeñas variaciones en estos factores pueden alterar significativamente la regeneración y la integración del transgén. Asimismo, Hayta et al. (2019) señalan que la composición del medio de cultivo y la susceptibilidad del genotipo a *Agrobacterium* son elementos decisivos para lograr un protocolo reproducible y eficiente.

El uso del gen *nptII* como marcador de selección se mostró efectivo para discriminar entre tejidos transformados y no transformados. Este gen, ampliamente validado por organismos reguladores internacionales, confiere resistencia a la kanamicina, permitiendo una selección precisa mediante medios con el antibiótico (Pons et al., 2012). En esta investigación, los explantes que sobrevivieron en presencia de kanamicina y desarrollaron brotes fueron considerados como putativamente transformados. La especificidad del marcador se reflejó en la alta tasa de regeneración observada en los tratamientos exitosos, sin afectar negativamente la morfología ni el vigor de los brotes.

Otras investigaciones, como las de Al-Ramamneh (2006) y Angulo-Bejarano et al. (2019), también utilizaron el gen *nptII* como marcador de selección en cactáceas, obteniendo eficiencias de transformación del 22% y 23% respectivamente. A pesar de usar diferentes especies y condiciones, los resultados confirman la utilidad de este gen en la selección de transformantes. Asimismo, estos estudios validan que el *nptII* no interfiere con la regeneración post-transformación, permitiendo el desarrollo adecuado de las plantas putativas, lo que coincide con lo observado en la presente investigación.

Un hallazgo importante fue la aparente resistencia a la kanamicina en algunos explantes no transformados, lo cual podría deberse a falsos positivos. Este fenómeno puede atribuirse a una tolerancia natural al antibiótico en ciertos tejidos o a una absorción desigual del antibiótico en el medio de cultivo. Según Rommenset (2006), algunas especies o genotipos pueden mostrar cierta insensibilidad a la kanamicina, lo cual representa un reto en la selección de plantas transgénicas. Por ello, es indispensable complementar la selección fenotípica con análisis moleculares como la PCR.

Los tres métodos de transformación evaluados (bomba de vacío, inyección directa y co-cultivo) mostraron diferencias significativas en eficiencia de transformación, siendo el método por bomba de vacío el más efectivo con un 95% de eficiencia. La bomba de vacío facilita la infiltración homogénea de la suspensión bacteriana, lo que se traduce en una mayor probabilidad de transformación en todas las areolas del explante. El método de inyección directa también fue efectivo (83%), pero con mayor variabilidad entre explantes. El co-cultivo, aunque más sencillo, presentó la menor eficiencia (63%), posiblemente debido a una menor penetración de la bacteria (Ahmed et al., 2018).

Comparado con investigaciones anteriores que utilizaron bomba de vacío, los resultados de esta investigación están en concordancia con los de Seol et al. (2008), quienes evidenciaron que este método permite una penetración más efectiva de *A. tumefaciens* en tejidos vegetales, especialmente en especies con estructuras densas. La eficiencia obtenida en este estudio (95%) supera la mayoría de los registros previos en otras especies, lo que puede atribuirse al ajuste específico de los parámetros como tiempo de exposición al vacío y densidad bacteriana, lo que destaca la importancia de la optimización protocolo-específica.

La confirmación de las plantas transformadas mediante PCR constituyó una herramienta clave para validar la integración del gen *nptII* en el genoma de pitahaya. Esta técnica permitió diferenciar explantes realmente transformados de aquellos que mostraban crecimiento aparente por escape a la selección. Las bandas obtenidas de aproximadamente 700 pb coinciden con la región amplificada esperada del gen marcador, confirmando su presencia en los explantes transformados. Por lo tanto, la PCR es una técnica sensible y confiable en la detección de transformantes en etapas tempranas (Sripriya et al., 2024)

Otras investigaciones como las de Ormachea (2011) y Reaño (2013) han empleado PCR como método estándar para la detección de transgenes, incluyendo *nptII*, en camote (*Ipomoea batatas*), mostrando resultados consistentes con los de esta investigación. En

ambos casos, la PCR se utilizó para confirmar transformación en plantas regeneradas a partir de explantes tratados con *Agrobacterium*, lo que respalda su aplicabilidad universal en estudios de transformación vegetal.

Es importante considerar que la generación de un cultivo transgénico no se limita a la transformación y regeneración exitosa de plantas, sino que implica un conjunto de eventos moleculares complejos que deben ser comprendidos y controlados. En esta investigación se empleó la técnica de PCR para confirmar la presencia del gen *nptII* en las plantas regeneradas; sin embargo, esta confirmación inicial representa solo una etapa preliminar en el análisis de eventos transgénicos. La integración del transgén puede ser simple o compleja, incluyendo inserciones múltiples, fragmentos truncados, translocaciones cromosómicas o repeticiones invertidas. Estas complejidades pueden afectar la expresión génica, estabilidad del transgén y el comportamiento fenotípico de la planta transformada (Kohli et al., 2003; Gelvin, 2017). Por tanto, es crucial considerar que una planta PCR positiva podría no expresar de manera eficiente el transgén debido a silenciamiento génico inducido por estos eventos.

Asimismo, la localización cromosómica de la inserción y el número de copias integradas pueden tener efectos pleiotrópicos sobre el fenotipo de la planta hospedante. En la presente investigación, si bien se obtuvo una alta eficiencia de regeneración y confirmación molecular por PCR, sería recomendable en investigaciones futuras complementar este análisis con técnicas como Southern blot, RT-PCR o secuenciación genómica, para identificar eventos de integración múltiples o truncados. Estudios como los de Sripriya et al. (2024) señalan que estos análisis avanzados permiten identificar no solo la estabilidad del transgén en generaciones sucesivas, sino también la posible inactivación de genes endógenos por inserción aleatoria, lo cual, aunque indeseable en términos de uniformidad, podría abrir nuevas vías para descubrir funciones génicas mediante mutagénesis insercional.

La importancia de esta investigación radica en la metodología planteada para la transformación genética de pitahaya. Pero la aplicación de la ingeniería genética en pitahaya no debe limitarse a la inserción de genes marcadores, sino que puede extenderse a herramientas más avanzadas como el silenciamiento génico mediado por ARN interferente (RNAi) o microARNs (miRNAs), y la edición genética mediante CRISPR/Cas. Estas tecnologías permiten modular la expresión de genes endógenos asociados a enfermedades o

características agronómicas de interés (Limpens et al., 2004; Zeng et al., 2019; Zhang et al., 2019; Zhang et al., 2020). No obstante, para que estas tecnologías puedan implementarse eficazmente en pitahaya, es imprescindible contar con una metodología de transformación genética robusta y reproducible.

Cuando se emplean métodos basados en la transferencia genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, como los utilizados en esta investigación, resulta fundamental optimizar cada etapa del proceso desde la selección del explante hasta la confirmación de integración transgénica para garantizar una plataforma confiable que sustente futuras aplicaciones de edición genética, ya que recientes avances en edición genética con CRISPR/Cas han impulsado la optimización de protocolos de transformación y regeneración, con miras a la generación acelerada de líneas editadas genéticamente para la mejora de cultivos (Molina-Risco et al., 2021; Bélanger et al., 2024).

Es importante resaltar la realidad de las investigaciones de plantas transgénicas en el Perú, la regulación sobre el uso de OGM está enmarcada por la Ley N. 29811, actualmente prorrogada mediante la Ley N.º 31111, el Perú mantiene una moratoria al ingreso y producción de cultivos transgénicos hasta el año 2035, con el objetivo de proteger su biodiversidad nativa (Congreso de la República del Perú, 2011; MINAM, 2021). Esta legislación busca proteger la biodiversidad nativa mientras se desarrollan capacidades nacionales en bioseguridad. Sin embargo, el uso de OGM en investigación bajo condiciones confinadas está permitido, lo que representa una oportunidad para fortalecer el desarrollo de tecnologías locales y protocolos como el propuesto en esta tesis. Según ISAAA (2019), el Perú aún no cultiva OGM comercialmente, pero existen avances significativos en investigación aplicada, especialmente en universidades y centros de investigación públicos. Por tanto, es necesario promover el debate científico y social sobre la adopción regulada y responsable de los cultivos transgénicos en el país.

Finalmente, los resultados de esta investigación no solo sientan las bases para el desarrollo de protocolos eficientes de transformación genética en pitahaya, sino que también abren nuevas posibilidades para incorporar genes de interés agronómico. El establecimiento de este protocolo representa una contribución significativa a la biotecnología vegetal aplicada a cultivos tropicales no tradicionales. Tal como lo señalan Nyaboga et al. (2014), el desarrollo de protocolos en especies no modelo es un paso clave para su mejoramiento genético mediante herramientas modernas como la edición genética.

## Capítulo VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1. Conclusiones

Se logró transformar genéticamente plantas de pitahaya (*Hylocereus* sp.) ecotipo naranja de Churuja mediante la metodología de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando el gen *nptII* como marcador de selección. Esta transformación representa una evidencia sólida de que este sistema puede ser aplicado de forma efectiva en cactáceas. La viabilidad de los cladodios como explantes adecuados refuerza su uso potencial en protocolos biotecnológicos dirigidos al mejoramiento genético de pitahaya.

Se determinó que el método de agroinfiltración por bomba de vacío fue significativamente más eficiente en términos de éxito de transformación, alcanzando un 95% de efectividad, seguido por la técnica de inyección directa, que obtuvo una eficiencia del 83%. Estos resultados muestran una clara diferencia en la capacidad de penetración y distribución del *Agrobacterium* dentro del tejido vegetal.

La funcionalidad del gen *nptII* como marcador de selección fue validada no solo mediante el desarrollo de brotes resistentes a kanamicina, sino también a través de la amplificación exitosa de un fragmento de aproximadamente 700 pb mediante PCR, lo que corrobora su integración en el genoma vegetal. Estos resultados refuerzan la utilidad del gen *nptII* como un sistema de selección confiable para plantas transformadas, particularmente en cultivos no modelo como la pitahaya.

Se estableció un protocolo eficiente, reproducible y adaptado a las condiciones específicas de la pitahaya, lo que constituye un aporte significativo a la biotecnología vegetal aplicada a especies frutales tropicales. Este protocolo ofrece un punto de partida para futuras aplicaciones que involucren inserción de genes de interés agronómico o uso de herramientas avanzadas como edición génica, contribuyendo así a enfrentar desafíos bióticos como patógenos emergentes o abióticos como el estrés hídrico.

## 6.2. Recomendaciones

Optimizar aún más el protocolo de agroinfiltración por bomba de vacío, evaluando diferentes concentraciones de acetosiringona, tiempos de co-cultivo y condiciones físicoquímicas del medio, con el objetivo de incrementar la eficiencia de transformación y reducir la aparición de falsos positivos.

Evaluar la expresión estable del transgén *nptII* en plantas transformadas a lo largo de múltiples generaciones, mediante análisis transcriptómicos y fenotípicos, para garantizar que el evento transgénico sea heredable, funcional y sin efectos pleiotrópicos adversos.

Extender el estudio a otros genotipos o variedades de pitahaya, con el fin de validar la versatilidad del protocolo en diferentes materiales genéticos. Esto permitiría ampliar la aplicabilidad del sistema en programas de mejoramiento genético enfocados en diversidad genética intraespecífica.

Explorar el uso de otros explantes alternativos como callos, embriones cigóticos o ápices caulinares, los cuales podrían presentar tasas de regeneración y transformación distintas. Esta evaluación contribuiría a identificar tejidos más competentes para diferentes aplicaciones biotecnológicas.

Evaluar diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens* como EHA105, GV3101 y AGL1, ya que su eficiencia puede variar según el tipo de tejido vegetal y el plásmido utilizado. Comparar estas cepas podría mejorar la eficiencia de integración del transgén y reducir efectos secundarios no deseados.

Incluir ensayos con genes de interés agronómico o funcional, como genes de resistencia a enfermedades fúngicas o genes relacionados con la tolerancia a sequía o acumulación de metabolitos bioactivos, con el objetivo de avanzar hacia una transformación funcional con impacto agronómico.

Considerar la aplicación de este protocolo como base para tecnologías emergentes como CRISPR/Cas9 o silenciamiento génico (RNAi), lo que abriría nuevas líneas de investigación en edición y regulación génica en pitahaya y otras cactáceas de interés.

## Capítulo VII: FUENTES DE INFORMACIÓN

### 7.1. Fuentes Bibliográficas

- Adhikari, S., Saha, S., Biswas, A., Rana, T. S., Bandyopadhyay, T. K., Ghosh, P. (2017). Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. *The Nucleus* 60(3): 283-297.
- Aguilar-Bartels, C., Quirós-Segura, P., García-Piñeres, A., Gatica-Arias, A., Arrieta-Espinoza, G. (2021). Aspectos clave para la transformación genética de arroz (*Oryza sativa* L.) subespecie indica mediante *Agrobacterium tumefaciens*. *Agronomía Mesoamericana*, 764-778.
- Ahmed, H.A., Barpete, S., Akdogan, G., Aydin, G., Sancak, C., Ozcan, S. (2018). Efficient regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Fresenius Environ Bull.* 27(5):3020–7.
- Al-Ramamneh, E. (2006). Somatic Embryogenesis and Transformation Studies in *Schlumbergera* and *Rhipsalidopsis*. Tesis de doctorado. Universidad Hannover, Sweileh, Jordania.
- Andrade, A., Geraldo, M., Habib, S. (2007). Influência da fonte material e do tempo de cura na propagação vegetativa da pitaya vermelha (*Hylocereus undatus* Haw). *Bras. Frutic* 29 (1). <https://doi.org/10.1590/S0100-29452007000100039>
- Angiosperm Phylogeny Group. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181(1): 1–20.
- Angulo-Bejarano, P.I., Sharma, A., Paredes-López, O. (2019). Factors affecting genetic transformation by particle bombardment of the prickly pear cactus (*O. ficus-indica*). *3 Biotech* 9(3):98. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1627-6>.
- Balendres, M., y Bengoa, J. (2019). Diseases of dragon fruit (*Hylocereus* species): Etiology and current management options, *Crop Protection* 126: 104920.

- Baron, C., y Zambryski, P. (1996). Plant transformation: a pilus in *Agrobacterium* T-DNA transfer. *Current Biology*, 6(12): 1567-1569.
- Beaujean, A., Sangwan, R.S., Lecardonnel, A., Sangwan-Norreel, B.S. (1998). *Agrobacterium*-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: An efficient protocol of transformation. *J Exp Bot.* 49(326): 1589–95. <https://doi.org/10.1093/jxb/49.326.1589>
- Bélangier, J.G., Copley, T.R., Hoyos-Villegas, V. (2024). A comprehensive review of in planta stable transformation strategies. *Plant Methods* 20: 79. <https://doi.org/10.1186/s13007-024-01200-8>
- Braverman, I. (2014). Conservation without nature: the trouble with in situ versus ex situ conservation. *Geoforum*, 51: 47-57.
- Cancino, K. (2014). Co – transformación genética de *Solanum tuberosum* cv. Desireé por introducción y expresión de los genes Citocromo P450 (CYP79A2, CYP83B1) y el gen  $\gamma$ -glutamyl peptidasa 1 (GGP1) para la producción de bencilglucosinolato. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú.
- Cevallos, K. y Maldonado, C. (2022). Caracterización morfológica en el cultivo de pitahaya (*Hylocereus* spp) en el Ecuador. 2022.
- Cingel, A., Vinterhalter, B., Vinterhalter, D., Čalić-Dragosavac, D., Smigocki, A., Ninković, S. (2010). *Agrobacterium*-mediated transformation of two Serbian potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. cv. Dragačevka and cv. Jelica). *Afr J Biotechnol.* 9(30):4644–50. <https://doi.org/10.5897/AJB09.1241>
- Congreso de la República del Perú. (2011). Ley N.º 29811: Ley que establece la moratoria al ingreso y producción de organismos vivos modificados al territorio nacional. Diario Oficial El Peruano. <https://busquedas.elperuano.pe>
- Delgado, A., Kondo, T., Imbachi, L. K. Quintero, E. M., Belline, M., Burbano, M., Medina, S. (2010). Biología y algunos datos morfológicos de la mosca del botón floral de la pitaya amarilla *Dasiops saltans* (Townsend) Diptera: Lonchaeidae en el valle del

- Cauca, Colombia. Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle 11(2): 1-10.
- Díaz, C., y Chaparro-Giraldo, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica 15(1): 49-61.
- Díaz, D. (2016). Transformación genética de embriones somáticos de *Ipomoea batatas* (L.) LAM. “camote”, (Convolvulaceae) vía *Agrobacterium tumefaciens* para conferir resistencia a *Cylas* spp. (Coleoptera). Tesis de pregrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Doyle, J.J. y Doyle, J.L. (1987). A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. Phytochemical Bulletin, 19, 11-15.
- Encina, C.L., y Regalado, J.J. (2022). Aspects of In Vitro Plant Tissue Culture and Breeding of Asparagus: A Review. Horticulturae, 8(5), 439. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050439>
- Esquivel, P., y Araya Q.Y. (2012). Características del fruto de la pitahaya (*Hylocereus* sp.) y su potencial de uso en la industria alimentaria. Ciencia y Tecnología de Alimentos, 3 (1): 113-129.
- Estrada-Luna, A., Martínez-Hernández, J., Torres-Torres, M., Chablé-Moreno, F. (2008). In vitro micropropagation of the ornamental prickly pear 174 cactus *Opuntia lanigera* Salm-Dyck and effects of sprayed GA3 after transplantation to ex vitro conditions. En: Scientia Horticulturae, 117 (4): 378-385. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.05.042>
- Garbanzo-León, G., Vega-Villalobos, E. V., Rodríguez-Cisneros, J., Urbina-Briceño, C., Lázaro-Rojas, W., Alvarado-Jara, K., Barrientos-Bolaños, R., Duarte-Ortíz, K., Mora-Prendas, J., Trujillo-Olivas, V. (2021). Evaluación de tamaño de cladodios y bio-estimulantes de enraizamiento para la propagación de pitahaya. Agronomía Costarricense, 45(2), 29-40. <https://doi.org/10.15517/rac.v45i2.47765>
- García-Rubio, L.A., Vargas-Ponce, O., Ramírez-Mireles, F.J., Munguía-Lino, G., Corona-Oceguera, C.A., Cruz-Hernández, T. (2015). Distribución geográfica de *Hylocereus*

- (cactaceae) en México. *Botanical Sciences*, 93(4): 921-939.  
<https://doi.org/10.17129/botsci.282>
- Gelvin, S.B. (2017). Integration of Agrobacterium T-DNA into the Plant Genome. *Annu Rev Genet.* 2017 Nov 27(51): 195-217. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035320>
- Hayta, S., Smedley, M.A., Demir, S.U., Blundell, R., Hinchliffe, A., Atkinson, N. (2019). An efficient and reproducible Agrobacterium-mediated transformation method for hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Methods.* 15(1):121.  
<https://doi.org/10.1186/s13007-019-0503-z>
- Hernández-Díaz, E., Pérez-Alonso, N., Chong-Pérez, B. (2018). Estrategias para la selección in vitro de plantas transgénicas de *Digitalis* L. *Biotecnología Vegetal* 18(2): 63-80.
- Hwang, H.H., Yu, M., Lai, E.M. (2017). Agrobacterium-mediated plant transformation: Biology and applications. *Arabidopsis Book.* 15:e0186.  
<https://doi.org/10.1199/tab.0186>
- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). (2019). *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2019.* Ithaca, NY: ISAAA.
- Jara, C. (2024). Dosis de root-hor, tamaño de esquejes y sustratos en la Propagación vegetativa de pitahaya (*Hylocereus spp.*) Variedad physical graffiti en condiciones controladas de la irrigación majes. Tesis doctoral. Universidad Nacional De San Agustín, Arequipa, Perú.
- Juárez-Cruz, A., Livera-Muñoz, M., Sosa-Montes, E., Goytia-Jiménez, M.A., González-Hernández, V.A., Bárcena-Gama, R. (2012). Composición química de tallos inmaduros de (*Acanthocereus spp.*) e *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose. *Fitotecnia mexicana*, 35(2).
- Kohli, A., Twyman, R.M., Abranches, R. (2003). Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Mol Biol* 52: 247–258.  
<https://doi.org/10.1023/A:1023941407376>

- Kulus, D., y Tymoszuk, A. (2024). Advancements in In Vitro Technology: A Comprehensive Exploration of Micropropagated Plants. *Horticulturae*, 10(1), 88. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10010088>
- Lacroix, B., y Citovsky, V. (2019). Pathways of DNA transfer to plants from *Agrobacterium tumefaciens* and related bacterial species. *Annual review of phytopathology*, 57(1): 231-251.
- Lee, Y., y Chang, J. (2022). Development of an Improved Micropropagation Protocol for Red-Fleshed Pitaya ‘Da Hong’ with and without Activated Charcoal and Plant Growth Regulator Combinations. *Horticulturae* 8(2): 104.
- Legaria-Solano, J.P., Alvarado-Cano, M. E., Gaspar-Hernández, R. (2005). Diversidad genética en pitahaya (*Hylocereus undatus* Haworth. Britton y Rose). *Revista Fitotecnia Mexicana* 28(3): 179-179.
- Limpens, E., Ramos, J., Franken, C., Raz, V., Compaan, B., Franssen, H., Bisseling, T., Geurts, R. (2014). RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*, *Journal of Experimental Botany*, 55(399): 983–992. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh122>
- Llamoca-Zárate, R., Aguiar, L., Paiva, F. (1999). Biolistic-Mediated Transient Gene Expression in Shoot Apical Meristems of the Prickly-Pear (*Opuntia ficus-indica*). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 42(3): 299–302. <https://doi.org/10.1590/S1516-89131999000300005>
- Malabika, P., y Abido, M. (2014). The Role Of Biotechnology In The Conservation Of Biodiversity. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* 2(4):352-363.
- Mállap-Detquizán, G., Vilca-Valqui, N.C., Meléndez-Mori, J.B., Huaman-Huaman, E., Oliva, M. (2021). Multiplicación in vitro de pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) a partir de plántulas obtenidas in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 33(1). <https://doi.org/10.15517/am.v33i1.45472>

- Manzanero-Acevedo, L., Isaac-Márquez, R., Zamora-Crescencio, P., Rodríguez, L., Ortega-Haas, J., Dzib, B., 2014. Conservación De La Pitahaya [*Hylocereus Undatus* (Haw.) Britton & Rose] En El Estado De Campeche, México. *Foresta Veracruzana* 16(1): 9-16.
- Martinez, A.M. (2023). Micropropagación de pitahaya (*Hylocereus undatus*) en sistema de inmerción temporal. Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. Campus cordova. 2023.
- Martinez, C.M. (2022). Manejo nutrimental del cultivo de pitahaya de pulpa roja (*hylocereus ocamponis*) en la mixteca poblana. Maestría en ciencias en agroforestería para el desarrollo sostenible. 2022.
- Masyahit, M., Sijam, K., Awang, Y., Satar, M. (2009). The first report of the occurrence of anthracnos disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. on dragon fruit (*Hylocereus* spp.) in peninsular Malaysia. *American Journal of Applied Sciences* 6(3): 902–912.
- Medina J., y Kondo, T. (2012). Listado taxonómico de organismos que afectan la pitaya amarilla, *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran (Cactaceae) en Colombia Corpoica. *Ciencia y Tecnología Agorpecuaria* 13(1): 41- 46.
- Meneses, L. (2017). Una colección de germoplasma para palmira. *Rev. Universitas Científica* 20(1): 52-55.
- Mercado-Silva, E.M. (2018). Pitaya-*Hylocereus undatus* (Haw). *Exotic Fruits*, 339-349. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803138-4.00045-9>
- Ministerio del Ambiente (MINAM). (2021). Ley N.º 31111: Ley que amplía la moratoria al ingreso y producción de OVM hasta el 2035. Recuperado de <https://www.gob.pe/institucion/minam/normas-legales/1812121-ley-n-31111>
- Molina-Risco, M., Ibarra, O., Faion-Molina, M., Kim, B., Septiningsih, E. M., Thomson, M. J. (2021). Optimizing Agrobacterium-Mediated Transformation and CRISPR-Cas9 Gene Editing in the tropical japonica Rice Variety Presidio. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20): 10909. <https://doi.org/10.3390/ijms222010909>

- Montadher, A.M., Mustafa, T.M., Abdulkadir, M., Awatif, I.M. (2018). Phytochemical content and anti-oxidant activity of *Hylocereus undatus* and study of toxicity and the ability of wound treatment. *Plant Archives*, 18 (2): 2672-2680.
- Montesinos-Cruz, J.A., Rodríguez-Larramendi, L., Ortiz-Pérez, R., Fonseca-Flores, M.A., Ruíz-Herrera, G., Guevara-Hernández, F. (2015). Pitahaya (*Hylocereus* spp.) un recurso fitogenético con historia y futuro para el trópico seco mexicano. *Cultivos Tropicales* 36.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3): 473–497.
- Nordine, A. (2025). Trends in plant tissue culture, production, and secondary metabolites enhancement of medicinal plants: a case study of thyme. *Planta*. 261(4):84. <https://doi.org/10.1007/s00425-025-04655-8>
- Nyaboga, E., Tripathi, J.N., Manoharan, R., Tripathi, L. (2014). Agrobacterium-mediated genetic transformation of yam (*Dioscorea rotundata*): an important tool for functional study of genes and crop improvement. *Front Plant Sci*. 15(5): 463. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00463>
- Ochoa-Jiménez, V. A., Berumen-Varela, G., Rivera-Domínguez, M., Báez-Sañudo, R., Troncoso-Rojas, R., Tiznado-Hernandez, M. (2019). Desarrollo de un protocolo de regeneración y transformación genética para tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Rutgers. *Agrociencia*, 53(5): 725-740.
- Ochoa-Velasco, C.E., García-Vidal, V., Luna-Guevara, J.J., Luna-Guevara, M.L., Hernández-Carranza, P., Guerrero-Beltrán, J.A. (2012). Características antioxidantes, fisicoquímicas y microbiológicas de jugo fermentado y sin fermentar de tres variedades de pitahaya (*Hylocereus* spp). *Scientia Agropecuaria*, 3: 279-289.
- Ojeda-Zacarías, M.C., Vázquez-Alvarado, R.E., Santos-Haliscak, J.A., Moreno-Degollado, G., Aguirre-Arsola, V., Iracheta-Donjuan, L., López-Gómez, P., Castellanos-Juárez, M. (2012). Micropropagación de pitahaya, *Hylocereus undatus* (Haworth). *Salud pública y nutrición*, 4: 119-128.

- Ormachea, M. (2011). Transformación genética de “camote” (*Ipomoea batatas* (L.) Lamarck, 1793) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando los genes cry3Ca1 y cry7Aa1. Tesis de maestría. Universidad Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Pasternak, T.P., y Steinmacher, D. (2024). Plant Growth Regulation in Cell and Tissue Culture In Vitro. *Plants*, 13(2), 327. <https://doi.org/10.3390/plants13020327>
- Paunescu, A. (2009). Biotechnology for Endangered Plant Conservation: A Critical Overview. *Romanian Biotechnological Letters* 14(1): 4095-4103.
- Peña, A. (2022). Enfermedades que afectan al cultivo de pitahaya (*Selenicereus undatus*). Tesis de pregrado. Universidad Técnica de Babahoyo, Los Ríos, Ecuador.
- Pons, E., Peris, J. E., Peña, L. (2012). Field performance of transgenic citrus trees: assessment of the long-term expression of uidA and nptII transgenes and its impact on relevant agronomic and phenotypic characteristics. *BMC biotechnology*, 12: 1-16.
- Quispe, H. (2016). Construcción de vectores mediante sistema gateway con genes procedentes de *Tectona grandis* Linn. f. Tesis de pregrado. Universidad Nacional del Centro del Perú, Huancayo, Perú.
- Reaño, R. (2013). Inserción de genes cry3Ca1 y cry7Aa1 en *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Huachano para conferir resistencia a *Cylas puncticollis* y *C. brunneus* “gorgojos del camote” (Coleoptera: Curculionidae). Tesis de pregrado. Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.
- Reed, B.M., Sarasan, V., Kane, M., Bunn, E., Pence, V. (2011). Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 47(1):1-4.
- Rommenset, C. (2006). Kanamycin resistance in plants: an unexpected trait controlled by a potentially multifaceted gene. *Trends in Plant Science* 11(7): 317-319.
- Saavedra, J.M. (2023). Micropropagación de pitahaya naranja de Churuja (*Hylocereus* sp.) a partir de fragmentos de cladodios en condiciones in vitro. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú.

- Santos-Pelaez, J., Saravia-Navarro, D., Cruz-Delgado, J., del Carpio-Salas, M., Barboza, E., Casanova Nuñez Melgar, D. (2024). Phenotypic diversity of morphological traits of pitahaya (*Hylocereus spp.*) and its agronomic potential in the Amazonas region, Peru. *Agriculture*, 14(11): 1968. <https://doi.org/10.3390/agriculture14111968>
- Seol, E., Jung, Y., Lee, J. (2008). In planta transformation of *Notocactus scopa* cv. Soonjung by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 27: 1197–1206. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0540-y>
- Silos-Espino, H., Valdez-Ortiz, A., Rascón-Cruz, Q. (2006). Genetic transformation of prickly-pear cactus (*Opuntia ficus-indica*) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 86: 397–403. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9123-1>
- Sripriya, R., Mahitha, K.P., Shanmugabalaji, V., Shah, J.M. (2024). Molecular Confirmation of Transgenic Events in Plants. In: Tiwari, S., Koul, B. (eds) *Genetic Engineering of Crop Plants for Food and Health Security*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-97-3119-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-97-3119-0_3)
- Taba, S, Mikami, D., Takaesu, K., Ooshiro, A., Moromizato, Z., Nakasone, S., Kawano, S. (2006). Anthracnose of pitaya (*Hylocereus undatus*) by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Japanese Journal of Phytopathology* 72(5): 25-27.
- Tapia, A., Rodriguez, J., Theoduloz, C., Lopez, S., Feresin, E.G., Schmeda-Hirschmann, G. (2004). Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of Ethno-pharmacology*, 95 (2): 155-161. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.035>
- Thorpe, T.A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37(2): 169-180.
- Vargas-Gutiérrez, K.A. y López-Montañez, R.N. (2020). Cultivo de pitahaya (*Hylocereus megalanthus*) en la región Amazonas. INIA.
- Verona-Ruiz, A., Urcia-Cerna, J., Paucar-Menacho, L.M. (2020). Pitahaya (*Hylocereus spp.*): Cultivo, características físicoquímicas, composición nutricional y compuestos bioactivos. *Scientia Agropecuaria*, 11 (3). <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.16>

- Villalobos, V., y Engelmann, F., (1995). Ex situ conservation of plant germplasm using biotechnology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11(4): 375-382.
- Viñas, M., Fernández-Brenes, M., Azofeifa, A., Jiménez, M.V. (2012). In vitro propagation of purple pitahaya (*Hylocereus costaricensis* [F.A.C. Weber] Britton & Rose) cv. Cebra. *In Vitro Cell.Dev.Biol*, 48: 469–477. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9439-y>
- Vinterhalter, D., Zdravković-Korać, S., Mitić, N., Dragičević, I., Cingel, A., Raspor, M. (2008). Protocols for Agrobacterium-mediated transformation of potato. *Fruit Veg Cereal Sci Biotech*. 2:1–5.
- Wang, C., y Lin, C. (2005). Fruit rot of pitaya and stem rot of cacti in Taiwan. *Journal Plant Pathology Bulletin*. 14(4): 269-274.
- Wijerathna-Yapa, A., y Hiti-Bandaralage, J. (2023). Tissue Culture—A Sustainable Approach to Explore Plant Stresses. *Life*, 13(3), 780. <https://doi.org/10.3390/life13030780>
- Zambrano-Forero, C.J., Ríos, J.A., Beltrán, D.M., Mesa, N. (2015). Evaluación de reguladores de crecimiento en la propagación in vitro de *Hylocereus megalanthus* (pitahaya amarilla). *Revista Tumbaga*, 1 (10): 76-87.
- Zeng, H., Xie, Y., Liu, G., Wei, Y., Hu, W., Shi, H. (2019). Agrobacterium-Mediated Gene Transient Overexpression and Tobacco Rattle Virus (TRV)-Based Gene Silencing in Cassava. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16): 3976. <https://doi.org/10.3390/ijms20163976>
- Zhang, Y., Zhang, Q., Chen, Q.J. (2020). Agrobacterium-mediated delivery of CRISPR/Cas reagents for genome editing in plants enters an era of ternary vector systems. *Sci. China Life Sci*. 63: 1491-1498. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1685-9>
- Zhang, Z., Hua, L., Gupta, A., Tricoli, D., Edwards, K.J., Yang, B., Li, W. (2019). Development of an Agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genome editing. *Plant Biotechnol J*. 17(8): 1623-1635. <https://doi.org/10.1111/pbi.13088>.

Zhao, H., Chen, S., Chen, Y., Zou, C., Wang, X., Wang, Z., Liu, A., Ahammed, G. (2018).  
First Report of Red Dragon Fruit (*Hylocereus Polyrhizus*) Anthracnose Caused by  
*Colletotrichum Siamense* in China. *Plant Disease* 102(6): 1175-1175.

## ANEXOS



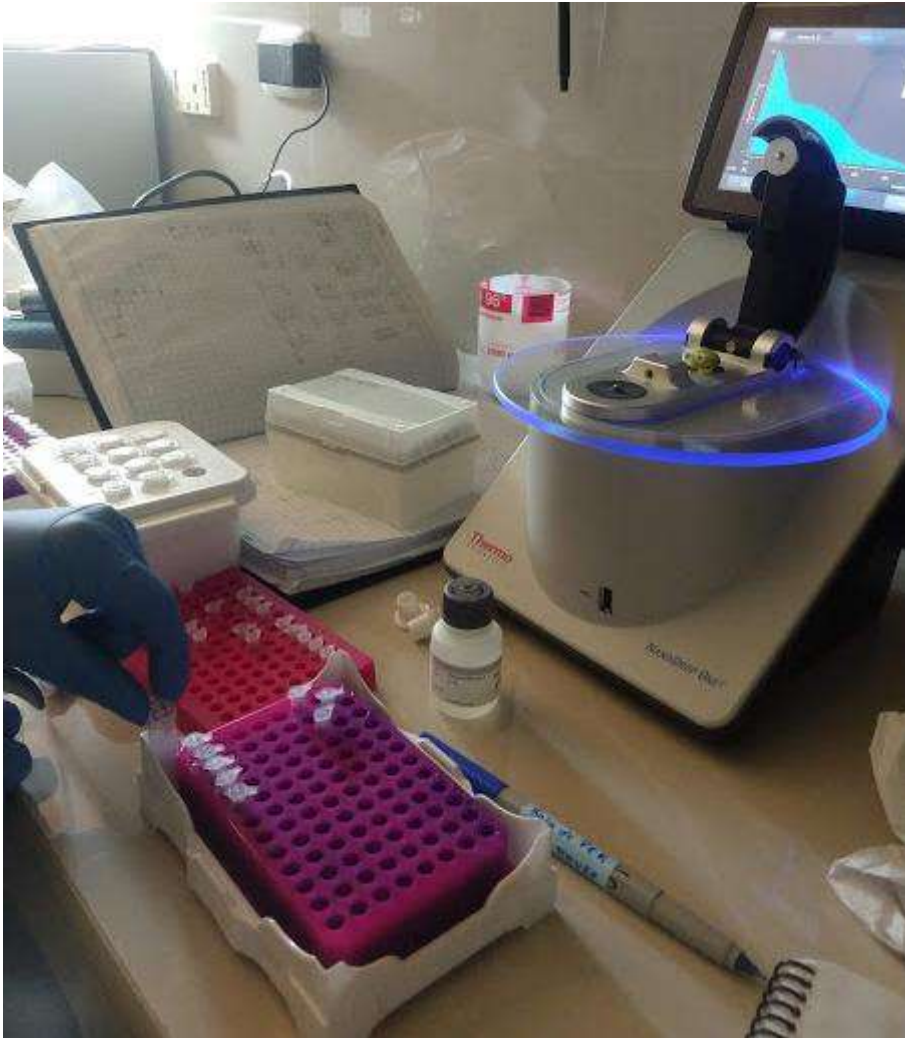
**Figura 9.** Plantas de pitahaya naranja de churuja en el banco de germoplasma de pitahayas del Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Universidad Nacional de San Martín.



**Figura 10.** Desinfección del material vegetal para la introducción *in vitro* de pitahaya.



**Figura 11.** Plántulas *in vitro* de pitahaya naranja de churuja.



**Figura 12.** Cuantificación de ADN extraído de pitahayas del proceso de transformación.



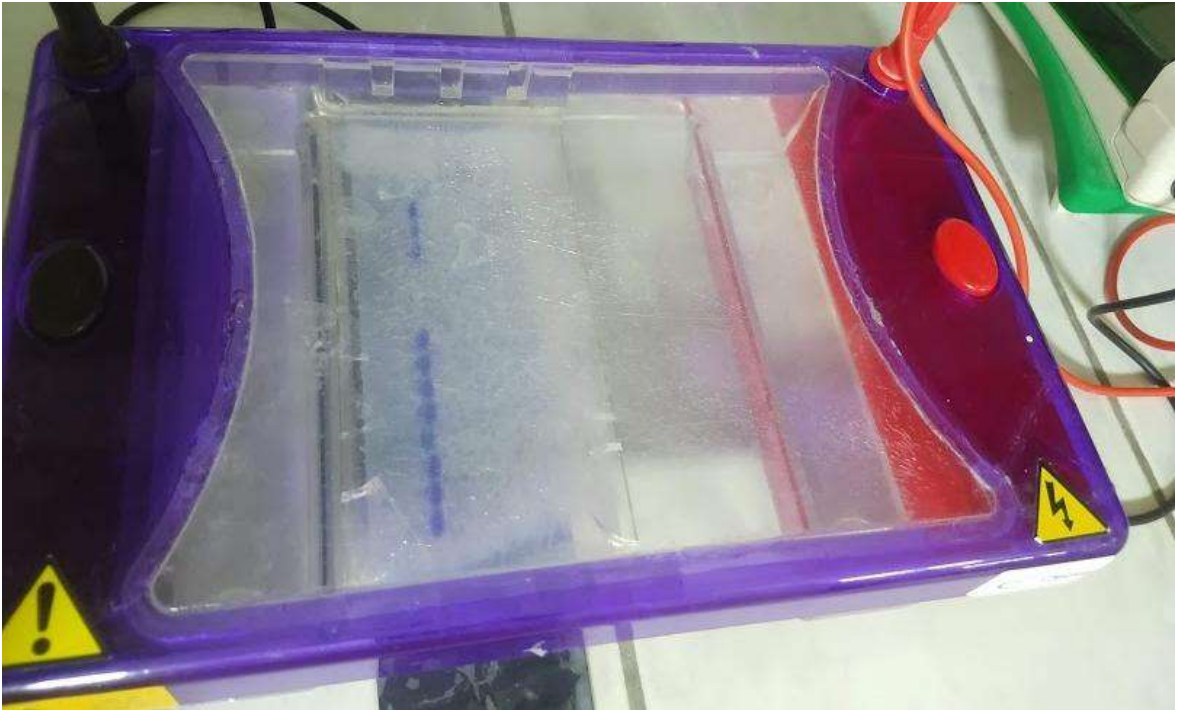
**Figura 13.** Preparación de gel de agarosa para corrida electroforética.



**Figura 14.** Siembra de productos PCR en gel de agarosa.



**Figura 15.** Equipo de electroforesis.



**Figura 16.** Visualización de la corrida electroforética de los productos PCR.