

Evaluación de reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *Hylocereus megalanthus* (pitahaya amarilla)

Growth regulators assessment for *in vitro* propagation of
Hylocereus megalanthus (Yellow dragon fruit).

Cristian Javier, Zambrano-Forero^I, Juan Alejandro, Ríos Osorio^{II},
Diana Marcela, Beltrán Pedroza^{III}, Neftali Mesa López^{IV}.

Resumen

La pitahaya amarilla es una planta originaria del norte de Suramérica, cuyo cultivo se ha incrementado en Colombia debido a su creciente demanda a nivel internacional, sin que hayan mejorado las técnicas de cultivo de este fruto. La propagación *in vitro* se ha propuesto como alternativa para hacer frente a los problemas fitosanitarios. En este estudio se evaluaron diferentes combinaciones y concentraciones de dos citoquininas (BAP y Kinetina) y una auxina (AIA) en la propagación *in vitro* de *Hylocereus megalanthus* vía organogénesis directa, a partir de segmentos nodales. Se encontró que el mejor tratamiento para elongación y producción de brotes fueron BAP 0,5 mg/L y BAP 1,0 mg/L respectivamente. En cuanto a la producción en número de raíces, el mejor tratamiento fue Kinetina (Kin) 1,0 mg/L + AIA 0,3 mg/L. No existieron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados para el crecimiento de las raíces.

Palabras clave: *Hylocereus megalanthus*, organogénesis directa, citoquininas, auxinas, propagación *in vitro*.

^IEstudiante de Biología Universidad del Tolima, cizambranof@ut.edu.co

^{II}Estudiante de Biología Universidad del Tolima, jarioso@ut.edu.co

^{III}, ^{IV}MSc, Docente Universidad del Tolima, dmbeltranp@ut.edu.co

^{IV}Docente Universidad del Tolima, nmesa@ut.edu.co

Abstract

Yellow dragon fruit is a plant originally from the north of South America, which cultivation has increased in Colombia due to its growing demand in the global market, without having improved cultivation techniques for this fruit. *In vitro* propagation has been proposed as an alternative to face phytosanitary problems. In this study we evaluated different combinations and concentrations of two cytokines (BAP, kinetin) and one auxin (IAA) for *in vitro* propagation of *Hylocereus megalanthus* via direct organogenesis from nodal segments. Best results for shoot elongation and shoot proliferation were obtained for shoots cultured in MS medium supplemented with BAP 0,5 mg/L and BAP 1,0 mg/L respectively. For roots proliferation, best treatment was Kinetin (Kin) 1,0 mg/L + AIA 0,3 mg/L. There was not significant difference among treatments for root growth.

Key words: *Hylocereus megalanthus*, direct organogenesis, cytokines, auxins, *in vitro* propagation.

1. Introducción

Hylocereus megalanthus (K. Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer, conocida como Pitahaya amarilla; es una planta perenne perteneciente a la familia Cactaceae Juss que presenta varios sinónimos como *Cereus megalanthus* K. Schum. ex Ule, *Mediocactus megalanthus* (K. Schum. ex Ule) Britton & Rose, *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran y se distribuye naturalmente en Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú .

La demanda de Pitahaya amarilla crece constantemente a nivel mundial, consecuentemente en Colombia (principal productor) el cultivo ha presentado un proceso de expansión; principalmente en Boyacá, Valle, Tolima, Cundinamarca y Cauca (Perea, Tirado, Micán, Fischer, & Rodríguez, 2010; Mora, 2010). La Pitahaya no solo es utilizada para el consumo de fruta fresca, sino que tiene potencialidades en sectores de la industria como alimentos transformados, farmacéutico, aseo, pecuario y químico (Perea *et al.*, 2010). Adicionalmente, la pitahaya presenta la ventaja de tener metabolismo CAM, que le permite ser eficiente en el uso del agua y por tanto, es una alternativa de cultivo para zonas de baja precipitación; así como una especie probablemente bien adaptada para enfrentar el cambio climático.

Sin embargo, su potencial es mermado por la variedad de problemas fitosanitarios, como los causados por diferentes especies de *Fusarium*, *Colletotrichum* y *Erwinia*; los cuales pueden llegar a generar pérdidas hasta del 80% e incrementar un 50% los costos de producción debido al manejo. Además, Caetano y colaboradores (2011) reportan que esta especie no produce fitoalexinas, lo que la hace más susceptible a dichos problemas fitosanitarios. Una de las soluciones propuestas para hacer frente a las anteriores

problemáticas, es la propagación *in vitro*. Sin embargo, son pocos los reportes de trabajos de investigación en esta área para la pitahaya amarilla. En estos se observa el uso predominante de la auxina 2-ácido naftalenacético (ANA), así como las citoquininas 2-benciladenina (BA) y 3-feniltiazol-urea (Thidiazurón-TDZ); poco se ha evaluado el efecto de la concentración de hormonas en el crecimiento y adicionalmente algunos trabajos solo se enfocaron en la producción de callo (Infante, 1992; Pelah, Kaushik, Mizrah, & Sitrit, 2002; Caetano Nunez, Escobar, Caetano, & Vaca, 2014; Suárez, Caetano, Ramírez, & Morales, 2014).

Con base en lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto en el crecimiento *in vitro* por organogenesis directa de *Hylocereus megalanthus* de dos citoquininas y una auxina poco utilizadas en la micropropagación de esta especie, utilizando diferentes concentraciones hormonales.

2. Metodología

Las plantas madre para la propagación *in vitro* de *Hylocereus megalanthus* se obtuvieron del banco de germoplasma del Laboratorio de Investigación en Genética y Biotecnología de la Universidad del Tolima (GEBIUT), a partir de las cuales se seleccionaron segmentos nodales de aproximadamente 1 cm y que presentaban un brote. La siembra se realizó en el medio de cultivo (MS) (Murashige & Skoog, 1962) complementado con diferentes concentraciones y combinaciones de las citoquininas 6-benzilamino-purina (BAP) y Kinetina (Kin), junto con la auxina ácido indolacético (AIA), las cuales se describen en la Tabla 1.

Además de los tratamientos anteriormente descritos, se hizo una siembra en el medio MS sin ningún regulador de crecimiento como control. Para cada tratamiento y el control se realizaron diez siembras (repeticiones).

Todas las siembras se realizaron en condiciones de asepsia, en cabina de flujo laminar y con instrumentación previamente esterilizada en autoclave; asimismo, se implementaron todas las normas de bioseguridad establecidos para este tipo de procedimientos.

Posterior a las siembras se realizó una observación de todos los tratamientos a los 45 días, tomando como variables para el análisis el número de brotes, la elongación de los tallos, el número y la longitud de raíces, así como la formación de callos.

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico Minitab Statistical Software, aplicando ANOVA y comparaciones usando el test LSD de Fisher con un intervalo de confianza de 95% para todos los tratamientos. También se aplicaron dos pruebas de comparación usando los mismos parámetros para analizar el efecto de la presencia o ausencia de los tres reguladores de crecimiento utilizados.

3. Resultados y discusión

Tabla 1. Segmentos nodales de pitahaya (*Hylocereus megalanthus*) cultivados en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP, Kin y AIA: Elongación, número de brotes, número de raíces y longitud de raíz. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

No.	Medio (mg/L)			Elongación (mm)	No. brotes	No. raíces	Longitud raíz (mm)
	BAP	Kin	AIA				
0	-	-	-	12,50 ^{bcd}	2,00 ^{cde}	2,30 ^{cde}	3,85 ^{cde}
1	0,5	-	-	20,88 ^a	3,25 ^{bc}	1,75 ^{def}	5,56 ^{abcd}
2	1,0	-	-	11,60 ^{cd}	5,30 ^a	0,40 ^f	0,40 ^f
3	1,5	-	-	14,14 ^{bcd}	2,86 ^{bcd}	1,00 ^{ef}	1,36 ^{ef}
4	-	0,5	-	10,50 ^d	1,70 ^{de}	2,90 ^{bcd}	5,55 ^{abcd}
5	-	1,0	-	11,11 ^{bc}	1,22 ^e	3,56 ^{bc}	6,50 ^{abc}
6	-	1,5	-	13,60 ^{bcd}	1,30 ^e	4,00 ^{ab}	7,05 ^{ab}
7	0,5	-	0,3	14,56 ^{bc}	3,11 ^{bc}	3,22 ^{bcd}	7,89 ^a
8	1,0	-	0,3	14,50 ^{bc}	3,40 ^b	2,40 ^{cde}	4,30 ^{bcde}
9	1,5	-	0,3	13,67 ^{bcd}	3,11 ^{bc}	1,22 ^{ef}	3,33 ^{def}
10	-	0,5	0,3	13,73 ^{bcd}	1,53 ^{cde}	3,93 ^{ab}	5,43 ^{abcd}
11	-	1,0	0,3	12,50 ^{bcd}	3,10 ^{bc}	5,20 ^a	6,60 ^{abc}
12	-	1,5	0,3	16,11 ^b	1,89 ^{cde}	3,56 ^{bc}	4,39 ^{bcde}

Efecto del BAP, AIA y Kin en la elongación de los tallos y generación de brotes.

La prueba de ANOVA para las variables elongación y número de brotes mostró que existen diferencias significativas en al menos dos tratamientos. En cuanto a la elongación de los tallos, el tratamiento que mostró mejores resultados fue el número 1, el cual presentó una media de 20,88 mm (Tabla 1, Figura 1b). La prueba de LSD Fisher ($\alpha=5\%$) no agrupa este tratamiento con ningún otro, mostrando que es significativamente diferente; lo que también

se observa en la Figura 2. Por otro lado, el tratamiento que mostró los peores resultados fue el número 4, con una media de 10,50 mm; valor que también mostró diferencias significativas según LSD (Tabla 1). Los únicos estudios realizados en *Hylocereus magalanthus* que utilizaron BAP y Kin como citoquininas fueron Suárez et al. (2014) y Caetano et al. (2014), en donde el primero utilizó las dos citoquininas combinadas y por tanto no es posible hacer comparaciones. Por otro lado, con Caetano et al. (2014), se confirman los resultados de este estudio, ya que reportaron un menor número de brotes con el tratamiento suplementado con Kin. Sin embargo, concentraciones más altas de BAP en relación a las probadas en este estudio, podrían mejorar la elongación y el crecimiento de los brotes de acuerdo con lo reportado por Viñas et al. (2012) para *Hylocereus costarricensis*.

Figura 1. Crecimiento de los segmentos nodales de *Hylocereus magalanthus* en a) Medio MS sin suplementos adicionales (control) b) Medio MS suplementado con BAP a 0,5 mg/l

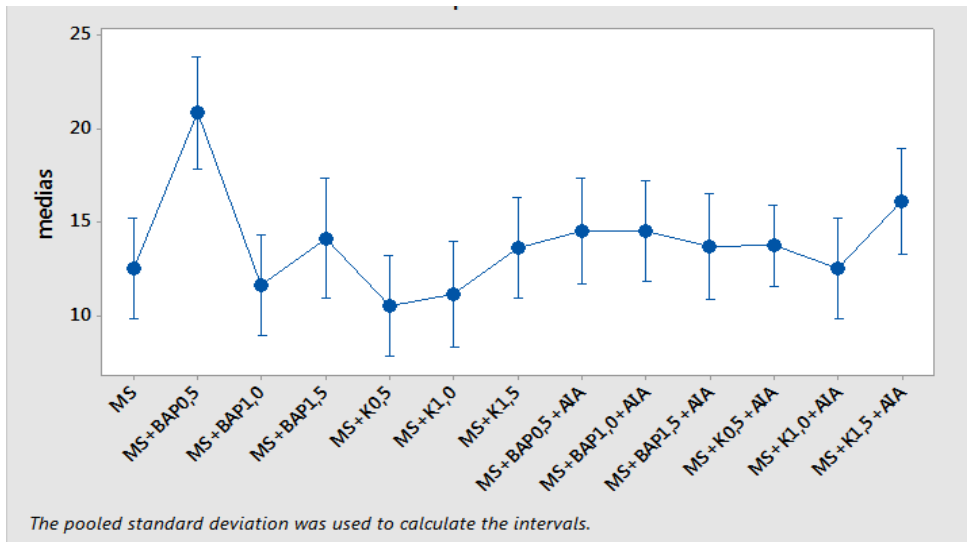


a



b

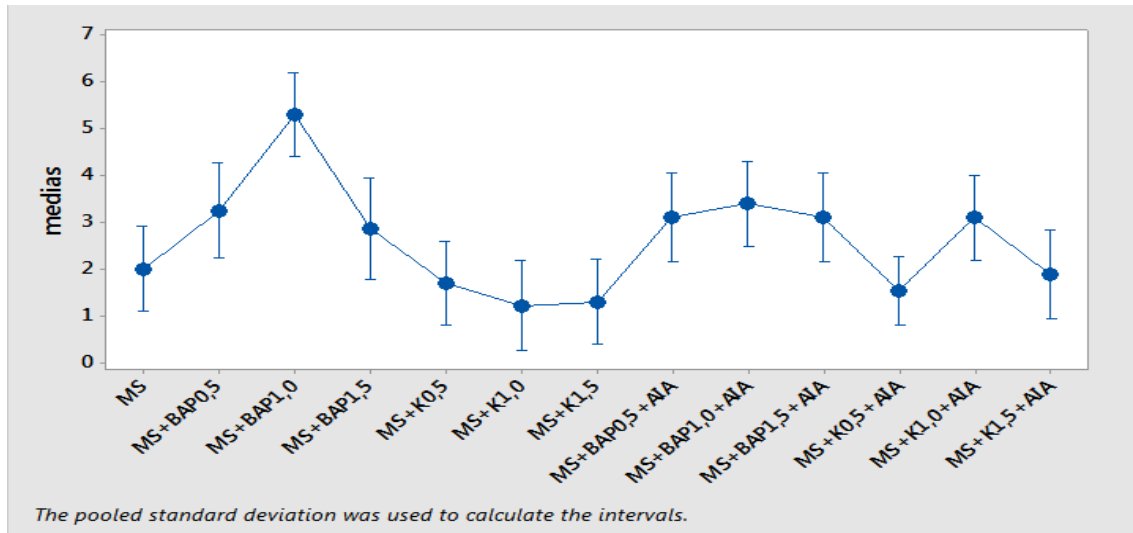
Figura 2. Efecto de las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en la elongación (mm) de los explantes de *Hylocereus megalanthus* a los 45 días. Intervalo de confianza: 95%, según ANOVA con prueba LSD de Fisher



En lo referente a la prueba LSD realizada con categorización presencia-ausencia de citoquininas y auxina, se agruparon todas de la misma manera; lo cual sugiere que la eficiencia de un tratamiento para la elongación de los tallos, depende de la concentración de cada regulador de crecimiento (Tablas 2 y 3). Lo anterior concuerda con los resultados de estudios realizados en otras especies del mismo género (Drew & Azimi, 2002; Mohamed-Yassen, 2002; Viñas et al., 2012).

Para la generación de brotes, el tratamiento con mejores resultados fue el número 2, con una media de 5,30 brotes; resultado que presentó diferencias significativas según la prueba LSD Fisher ($\alpha=5\%$) (Tabla 1; Figura 3). Los tratamientos menos eficientes no presentaron diferencias significativas; sin embargo, todos tienen en común que la citoquinina utilizada fue Kin (Tabla 1). Lo anterior concuerda con la prueba LSD realizada con categorización presencia-ausencia de citoquininas, la cual mostró que el uso de BAP es significativamente diferente al uso de Kin o la ausencia de citoquininas (Tabla 2). Estos resultados coinciden con los reportados por Caetano et al. (2014), lo cual sugiere que la kin no es un regulador de crecimiento eficiente para la producción de brotes en *Hylocereus megalanthus*. A pesar de lo anterior es necesario evaluar diferentes concentraciones de Kin y otras citoquininas, debido a que son pocos los estudios para pithaya amarilla y otras pitahayas.

Figura 3. Efecto de las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en el número de brotes de los explantes de *Hylocereus megalanthus* a los 45 días. Intervalo de confianza: 95%, según ANOVA con prueba LSD de Fisher



Efecto del BAP, AIA y kin en la producción y crecimiento de las raíces.

Se comparó la respuesta de crecimiento radicular de los explantes a diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento. Para el número de raíces el mejor tratamiento fue el número 11 (Tabla 1), que registró una media de 5,2 raíces, seguido por los tratamientos 6 y 10. Según la prueba LSD entre los tres tratamientos no se presentaron diferencias significativas; sin embargo, la prueba también agrupó a los tratamientos 6 y 10 con tratamientos menos eficaces. Esto concuerda con el estudio de Viñas (2012) para *Hylocereus costarricensis*, donde sugiere que las altas concentraciones de BAP inhiben el

crecimiento y proliferación de raíces, cosa que probablemente no ocurrió en este estudio debido a que las concentraciones utilizadas son bajas.

En cuanto a la longitud de las raíces el mejor tratamiento fue el número 2 (Tabla 1), con una media de longitud de raíces de 7,89 mm. Sin embargo, la prueba LSD lo agrupó con otros tratamientos, lo que indicó que aunque existe una diferencia significativa, dicha diferencia no fue lo suficientemente grande para categorizarlos aparte y no fue posible establecer una relación clara entre las combinaciones de reguladores y el crecimiento de las raíces.

La producción de raíces y brotes a la par, es importante en el cultivo *in vitro* porque puede evitar fases adicionales del proceso; lo cual aumenta el tiempo y los costos de este (Viñas, 2012); dicha obtención simultánea de raíces y brotes depende de la proporción auxina/citoquinina (Pérez, 2011). Algunos estudios se han enfocado solo en la producción de brotes, sin tener en cuenta el crecimiento de raíces (Infante, 1992; Mohamed-Yaseen, 2002); no obstante, en este estudio se encontraron tratamientos con resultados favorables para el crecimiento de brotes y raíces a la vez, como es el caso de los tratamientos 7 y 8 (Tabla 1).

Tabla 2. Contraste del efecto de las citoquininas en las variables evaluadas. Las letras en común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Citoquinina	Elongación	No. brotes	No. raíces	Longitud raíz
Ausente	a	b	b	ab
BAP	a	a	b	b
Kin	a	b	a	a

Tabla 3.: Contraste del efecto de la auxina en las variables evaluadas. Las letras en común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Auxina	Elongación	No. brotes	No. raíces	Longitud raíz
Ausente	a	a	b	a
AIA	a	a	a	a

Se comparó el efecto de las citoquininas (Tabla 2) y auxinas (Tabla 3) para establecer su efecto sobre las características medidas en los explantes. A través de la prueba LSD se

encontró para el crecimiento radicular que los tratamientos con la citoquinina Kin produjeron los mejores resultados tanto para producción de raíces como la longitud de estas, con una diferencia significativa ($\alpha=5\%$) respecto a los tratamientos que contenían BAP o con el blanco, siendo inusual ya que en general, las citoquininas no se encuentran asociadas con la producción de raíces (Pérez, 2011); no obstante los estudios en los que se haga mención a la relación entre la producción de raíces y Kin para esta especie y otras del género son escasos.

Para la longitud de raíces la prueba agrupa al blanco con la Kin y con el BAP, lo que muestra diferencias poco marcadas entre los tres tratamientos para esta característica, y no se puede establecer que uno de los reguladores de crecimiento utilizados tenga un mejor efecto.

Para los tratamientos con la auxina AIA, se produjeron mejores resultados en la producción de raíces que los no suplementados con esta auxina, esto concuerda con estudios previos donde se reportó que AIA tiene efecto sobre la producción de raíces en cactáceas, y es un suplemento utilizado con tales fines (Pérez et al., 1998). Sin embargo, para la variable longitud de raíces, no hubo diferencias significativas para la presencia o ausencia de AIA, contrario a lo reportado por Drew et al (2002); no obstante, la auxina evaluada no fue la misma. Es necesario profundizar el efecto que tienen las auxinas sobre el crecimiento de raíces en las diferentes especies y variedades de pitaya.

Crecimiento, oxidación y producción de callo.

Para todos los tratamientos el crecimiento fue normal y en ningún caso hubo presencia de clorosis. El 10% de los explantes suplementados con BAP presentaron oxidación, mientras que ningún explante suplementado con Kin presentó esta característica.

Para ninguno de los explantes en los diferentes tratamientos se generó callo. Probablemente se deba a que los reguladores de crecimiento utilizados no tienen este efecto, además no han sido utilizados tradicionalmente para la promoción de callogénesis, a diferencia de TDZ, ANA o 2,4-D (Mohamed-Yaseen, 2002; Pelah et al., 2002; Suárez et al., 2014). Teniendo en cuenta que el callo favorece la heterogeneidad genética (Pérez, 2011), la cual es una característica no deseada en la propagación *in vitro*; los resultados de este estudio representaron una ventaja respecto a tratamientos estudiados en otros trabajos de investigación, debido a la presencia de un alto número de brotes y la ausencia de tejido desorganizado o callo.

4. Conclusiones

- A diferencia de otros estudios realizados para el género *Hylocereus*, en este trabajo se evaluaron combinaciones de reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones; para los cuales se obtuvieron diferencias significativas, en consecuencia este tipo de evaluación debe aplicarse a futuras investigaciones.
- La citoquinina 6-Bencilaminopurina (BAP) a bajas concentraciones, parece ser eficaz en la producción y crecimiento de brotes vía organogénesis directa en *Hylocereus megalanthus*. Sin embargo, de acuerdo con estudios realizados en otras especies del género; es probable que concentraciones más altas mejoren este efecto.
- Los resultados de este estudio sugieren que la Kin y el AIA promueven la producción en número de raíces. No obstante es necesario profundizar en el estudio de la producción radicular in vitro de *Hylocereus megalanthus*, debido a que ha sido poco estudiado.
- El hecho de que no se presentaran callos para ningún tratamiento probado en este estudio, los hace pertinentes para el cultivo in vitro de pitahaya; debido a que así se disminuye la variabilidad genética.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con financiación de la oficina de investigaciones de la Universidad del Tolima y se presentó en el XI encuentro internacional de semilleros de investigación REDCOLSI en octubre de 2014. Los autores desean agradecer a Joaquín González Borja y Sebastián Cárdenas, docente y estudiante del programa de matemáticas y estadística de la Universidad del Tolima respectivamente.

Referencias bibliográficas

- Bauer, R. (21 de mayo de 2003). A synopsis of the tribe Hylocereeae F. Buxb. . *Cactaceae Systematic Initiatives*, 3-63. Obtenido de Missouri Botanical Garden: <http://www.tropicos.org/Name/50251405>
- Caetano Nunez, D., Escobar, R., Caetano, C., & Vaca, J. (2014). Estandarización de un protocolo de regeneración en pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran). *Acta Agronómica* , 41-51.
- Caetano, M., Morales, J., Martine, M., Parra, E., & Jimenes, J. (2011). Enfoque multidisciplinario para solución en el agro colombiano: el caso Pitahaya amarilla *Selenisereus megalanthus*. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas* , 52-64.
- Clayton, P., Hubstenberger, J., & Phillips, G. (1990). Micropropagation of members of Cactaceae Subtribe Cactineae. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 115 (2): 337-343.
- Drew, R., & Azimi, M. (2002). Micropropagation of Red Pitaya (*Hylocereous undatus*) . *Proc. IS on Trop. & Subtrop. Fruits*, 93-98.
- Infante, R. (1992). In vitro axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck) . *Plant cell, tissue and organ culture*, 155-159.
- Mohamed-Yassen, Y. (2002). Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton Et Rose). *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plan*, 427-429.
- Mora, D. (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo de la pitahaya*. Bogotá: ICA.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 473-497.
- Pelah, D., Kaushik, R., Mizrah, Y., & Sitrit, Y. (2002). Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell, tissue and organ culture* , 81-84.

- Perea, D., Tirado, P., Micán, G., Fischer, G., & Rodríguez, R. (2010). *Bioteología aplicada al mejoramiento de los cultivos de frutas tropicales*. Universidad Nacional de Colombia .
- Pérez, E., Pérez, M., Villalobos, E., Meza, E., Morones, L., & Lizalde, H. (1998). Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell Development Biology-Plant*, 34: 131-135.
- Pérez, J. (2011). *Micropropagación de *hylocereus megalanthus* (k. schum. ex vaupel) ralf bauer e *hylocereus undatus* (haworth) britton y rose, y caracterización molecular de brotes mediante rapds* . Universidad Autónoma de San Luis Potosí .
- Suárez, R., Caetano, C., Ramírez, H., & Morales, J. (2014). Multiplicación de *Selenicereus megalanthus* (pitahaya amarilla) e *Hylocereus polyrhizus* (pitahaya roja) vía organogénesis somática. *Acta Agronómica*, 272-281.
- Viñas, M., Fernández-Brenes, M., Azofeifa, A., & Jiménez, V. (2012). In vitro propagation of purple pitahaya (*Hylocereus costaricensis* [F.A.C. Weber] Britton & Rose) cv. Cebra. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 469-477.

Referencia	Fecha de recepción	Fecha de aprobación
Cristian Javier, Zambrano-Forero, Juan Alejandro, Ríos Osorio, Diana Marcela, Beltrán Pedroza, Neftali Mesa Lopéz. Evaluación de reguladores de crecimiento en la propagación <i>in vitro</i> de <i>Hylocereus megalanthus</i> (pitahaya amarilla). Revista Tumbaga (2015), 10, vol.I,76-87	Días /mes /año 28/01/2015	Días/mes/año 15/03/2015