

ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto de diferentes concentraciones de benzilaminopurina (BAP) sobre el establecimiento *in vitro* de pitahaya (*Hylocereus guatemalensis*)

Effect of different concentrations of benzilaminopurine (BAP) on the *in vitro* establishment of pitahaya (*Hylocereus guatemalensis*)

Brian Giuseppe Navarro-Sandoval^{1a*} y Estefany Estrella Canales-Carrera^{1b}

1 CITE Agroindustrial Ica, Unidad Técnica Huaura, Instituto Tecnológico de la Producción, Lima, Perú

^authuaura02@itp.gob.pe, ^bestefany16396@gmail.com

* Autor de correspondencia

Resumen

El interés creciente por el cultivo de pitahaya ha permitido la propagación de esquejes de diferentes variedades promoviendo su comercialización a nivel nacional e internacional, requiriéndose asegurar la calidad fitosanitaria y la propagación masiva en menor tiempo de dicho cultivo. Por ello, en el presente estudio, a través de la técnica de cultivo *in vitro*, se evaluó el efecto de cuatro concentraciones del regulador de crecimiento BAP (Bencilaminopurina) y un control sobre la etapa de establecimiento *in vitro* en explantes provenientes de areolas de *Hylocereus guatemalensis*, comúnmente conocido como American Beauty. Se empleó un total de 60 unidades muestrales evaluados por un periodo de tres meses. El mayor porcentaje de brotación se obtuvo en un periodo mínimo de 30 días con una concentración de 0.5 mg/l de BAP, así mismo, en cuanto a la longitud de cladodios, dicha concentración permitió obtener la mayor longitud con una media de 22.92 mm, estableciéndose diferencias significativas con los demás tratamientos empleados. El mayor número de areolas por cladodio se obtuvo con los tratamientos 0.5 mg/l y 1 mg/l de BAP, respectivamente. Tras superar con éxito la etapa de establecimiento, la presente investigación permitirá continuar con los estudios relacionados a la micropropagación vegetal del cultivo.

Palabras claves: *Hylocereus guatemalensis*, establecimiento *in vitro*, benzilaminopurina, areolas

Abstract

The growing interest in the cultivation of pitahaya has allowed the propagation of cuttings of different varieties promoting their commercialization at national and international level, being required to ensure the phytosanitary quality and the massive propagation in less time of said crop. Therefore, in the present study, through the *in vitro* culture technique, the effect of four concentrations of the growth regulator BAP (Benzylaminopurine) and a control on the *in vitro* establishment stage in explants from areolas of *Hylocereus guatemalensis* was evaluated, commonly known as American Beauty. A total of 60 sample units were used, evaluated for a period of three months. The highest sprouting percentage was obtained in a minimum period of 30 days with a concentration of 0.5 mg/l of BAP, in addition, regarding the length of cladodes, this concentration allowed to obtain the greatest length with an average of 22.92 mm, establishing significant differences with the other treatments used. The highest number of areoles per cladode was obtained with the treatments 0.5 mg/l and 1 mg/l of BAP, respectively. After successfully passing the establishment stage, the present investigation will allow to continue with the studies related to the plant micropropagation of the crop.

Keywords: *Hylocereus guatemalensis*, *in vitro* establishment, benzylaminopurine, areolas

Introducción

El género *Hylocereus* consta de diferentes especies producidas en regiones tropicales y subtropicales de América Latina y el Caribe, presentando posiblemente una amplia variedad vegetal en una misma especie (Montesinos Cruz et al., 2015). La pitahaya (*Hylocereus spp.*), cactácea también conocida en nuestro país como fruta de dragón, se encuentra distribuida en la región Amazonas y algunas zonas costeras como Piura, Lima y la región Lima Provincias donde se pueden encontrar pequeños productores dedicados a su comercialización (Vargas Gutiérrez & López Montañez, 2020).

Se han atribuido diversas propiedades para dicho cultivo, basados en sus componentes nutricionales como la presencia de Vitamina C, ácidos orgánicos, minerales, entre otros (Mercado-Silva, 2018; Montesinos Cruz et al., 2015; Verona-Ruiz

et al., 2020), así mismo la elevada disposición de betalaínas, ha permitido ampliar los estudios para su empleo a nivel industrial (escala piloto) y nutraceutico (*in vitro*) generando óptimos resultados en ambos casos (Herbach et al., 2007; Hernawati et al., 2018).

La forma de propagación más eficiente en los viveros es a través de esquejes (Wu, 2005) y presenta en la zona norte del Perú una cosecha escalonada con tres a cinco floraciones, la cual puede diferir de acuerdo a la variedad, el manejo agronómico y las condiciones ambientales presentes.

Si bien es cierto existen especies con una mayor comercialización a nivel mundial, los productores aledaños a la provincia de Huaura, han propagado grandes cantidades de esquejes de *Hylocereus guatemalensis*, comúnmente conocido como American Beauty, ya que presenta mayor adaptabilidad, fácil propagación, y frutos más atractivos visualmente (cáscara roja y pulpa fucsia), así mismo, se ha observado a nivel de vivero que el enraizamiento de dicha especie se realiza en menor tiempo frente a otras variedades como *Hylocereus undatus* e *Hylocereus megalanthus*.

La micropropagación *in vitro* ha permitido la regeneración de diferentes especies vegetales de manera eficiente, en menor tiempo y sin depender de la estacionalidad, así como también la obtención de plantas con alta calidad sanitaria (Ojeda-Zacarías et al., 2012) favoreciendo la producción masiva de plantas homogéneas y de comportamiento similar en campo.

Dicha técnica alberga distintos métodos dependientes de los objetivos de estudio, siendo la organogénesis indirecta uno de los más empleados para el cultivo de pitahaya en variedades como *H. megalanthuse H. polyrhizus* (Caetano Nunez et al., 2014; Suárez Román et al., 2014), o la propagación a partir de semillas para *H. undatus* e *H. monacanthus* (Montiel-Frausto et al., 2016; Ojeda-Zacarías et al., 2012), sin embargo dichos métodos propician la variabilidad genética, no recomendada para el presente estudio.

Por el contrario, Bozkurt et al. (2020) realizó la micropropagación *in vitro* de areolas para cuatro variedades de pitahaya, incluyendo *H. guatemalensis*, a través del empleo del regulador de crecimiento bencilaminopurina (BAP) en diferentes concentraciones obteniéndose resultados exitosos. Del mismo modo, Viñas et al. (2012) empleando brotes, también llamados cladodios, de *Hylocereus costaricensis* informa que concentraciones altas de BAP promueven sustancialmente la formación de callos y muerte apical, en cambio, concentraciones bajas del mismo reducen significativamente dichos efectos, produciendo plántulas normales y sanas sin afectar la tasa de desarrollo o altura de los nuevos brotes.

El empleo de reguladores de crecimiento, como BAP y 2iP (isopentiladenina), también ha mostrado una disminución en el tiempo para la obtención de cladodios en cultivos *in vitro* de pitahaya obtenidos a partir de areolas, comparados frente a un tratamiento control (Drew & Azimi, 2002; Viñas et al., 2012), al mismo tiempo que estimula la elongación de los cladodios dependientes de las concentraciones empleadas, permitiendo la activación de areolas e incitando la división celular, como se ha observado en otras cactáceas (De la Rosa-Carrillo, et al., 2012).

Por lo anteriormente expuesto, el presente estudio opta por el empleo de dicha técnica utilizando diferentes concentraciones de citoquinina BAP, evaluando su efecto en explantes provenientes de areolas de *H. guatemalensis*, siendo una especie poco estudiada a través del cultivo *in vitro*. Este estudio además promueve la continuación de las etapas de micropropagación en dicha variedad, teniendo en cuenta que la concentración de 0.5mg/l de BAP permitió obtener cladodios en menor tiempo, de mayor tamaño y con el mayor número de areolas.

Material y métodos

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio Agrícola del CITE Agroindustrial U.T. Huaura, ubicado en el distrito de Santa María, provincia de Huaura, región Lima Provincias.

Material Vegetal

Se colectaron estacas de *H. guatemalensis* provenientes de la provincia de Huaral, las cuales fueron instaladas en el vivero del CITE Agroindustrial U.T. Huaura, con la finalidad de ser sometido a un tratamiento sanitario y nutricional que consistió en una aplicación semanal del fungicida Benlate® marca Farmex en concentración 1g/l en combinación con el fertilizante líquido Kelp Way NPK marca Procampo en concentración 1ml/l, aplicados vía foliar y en drench por un periodo de 4 semanas, lo que permitió la obtención de brotes adecuados para su introducción *in vitro*.

Preparación y desinfección de explantes

Se emplearon brotes jóvenes de aproximadamente 10 a 15 cm de longitud cuyos tallos angulados presentaban entre 4 a 6 areolas laterales. Para el proceso de desinfección se empleó la metodología de Bozkurt et al. (2020) modificada, donde el material vegetal fue sometido previamente a una limpieza con detergente industrial Karson y agua corriente. Luego fueron trasladados al Laboratorio Agrícola donde se colocaron en solución Tween 20, marca HIMEDIA al 1% por 10 min, seguido de un enjuague con agua destilada.

Posteriormente los explantes se sumergieron en fungicida Benlate® marca Farmex en concentración 1g/l por 10 min, enjuagándose con agua destilada para eliminar los residuos contaminantes. En cámara de flujo laminar, se procedió a sumergirlos en etanol al 70% por 30 s (Biogenics Lab SAC) y finalmente se empleó una solución de lejía comercial marca Promafa al 1.5 %, realizándose posteriormente dos enjuagues con agua destilada estéril.

Preparación de medios de cultivo

Se empleó medio de cultivo Murashigue & Skoog (MS) suplementado con vitaminas y CaCl₂, marca HIMEDIA, adicionándose 5.7g/l de agar y 25 g/l de sacarosa, distribuidos en un tratamiento control (T0) y cuatro concentraciones de BAP (T1: 0.25 mg/l, T2: 0.5 mg/l, T3: 0.75 mg/l y T4: 1 mg/l). Se ajustó el pH a 5.7 usando NaOH 0.1N y HCl 0.1N, y se dispensaron en tubos de 25 x 150 mm, procediendo a esterilizar los medios en autoclave a 121°C por 15 min.

Introducción in vitro

Para la introducción *in vitro*, se procedió a cortar longitudinalmente los explantes, se separaron las areolas laterales de manera individual con un tamaño aproximado de 20 x 10 mm, para proceder a su introducción en cada tubo de ensayo. Se selló cada tubo con parafilm y se incubaron a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad con una intensidad lumínica de 4000 lux. Se realizaron seguimientos semanales (observaciones) de las vitroplantas, y evaluaciones cada 30 días por 3 meses para el correspondiente reporte de resultados.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el programa INFOSTAT, aplicándose un análisis de varianza (ANOVA) para un diseño experimental completamente al azar (DCA) con 12 repeticiones por cada tratamiento. Se empleó la prueba de LSD Fisher para determinar la diferencia entre los tratamientos con un nivel de significancia de 0.05. Se evaluó el porcentaje de brotación (número de cladodios obtenidos por tratamiento) respecto al tiempo (momento de evaluación), la longitud de los cladodios (mm) y el número de areolas por cladodios.

Resultados y Discusión

La desinfección empleada en el presente estudio, se consideró óptima, debido a que la totalidad de los explantes no mostró contaminación alguna.

Se realizaron tres evaluaciones respecto a la variable porcentaje de brotación correspondientes al tiempo transcurrido luego de su introducción *in vitro* (Tabla 1). Según Montiel (2017), los explantes de pitahaya pueden mantenerse sin subcultivos hasta 180

días, dependiendo del volumen del recipiente, entre otros factores; por ello, se llevó a cabo un recambio de medios de cultivo a los 60 días.

Se observó durante las dos primeras semanas areolas hinchadas (Figura 1), y los primeros brotes a los 20 días después de la introducción *in vitro*, los cuales provenían solamente del T2. A partir de los 30 días, momento de la primera evaluación, empezó la brotación de todos los tratamientos con BAP; tal como se muestra en la Figura 2 el T0 no presentó brotación en ninguno de los momentos de evaluación, los tratamientos T1, T3 y T4 muestran un incremento en el porcentaje de brotación respecto al tiempo, lográndose para el T4 el 100% de brotes emitidos a los 90 días, sin embargo para el T2 se obtuvo en menor tiempo la mayor cantidad de brotes manteniendo un 92% de brotación desde la primera evaluación.

Tabla 1

Momentos de evaluación para la variable porcentaje de brotación

| Evaluaciones | Momento de evaluación |
|--------------|------------------------------|
| E0 | Introducción <i>in vitro</i> |
| E1 | 30 días |
| E2 | 60 días |
| E3 | 90 días |

Nota: Fuente: Elaboración propia.

Figura 1

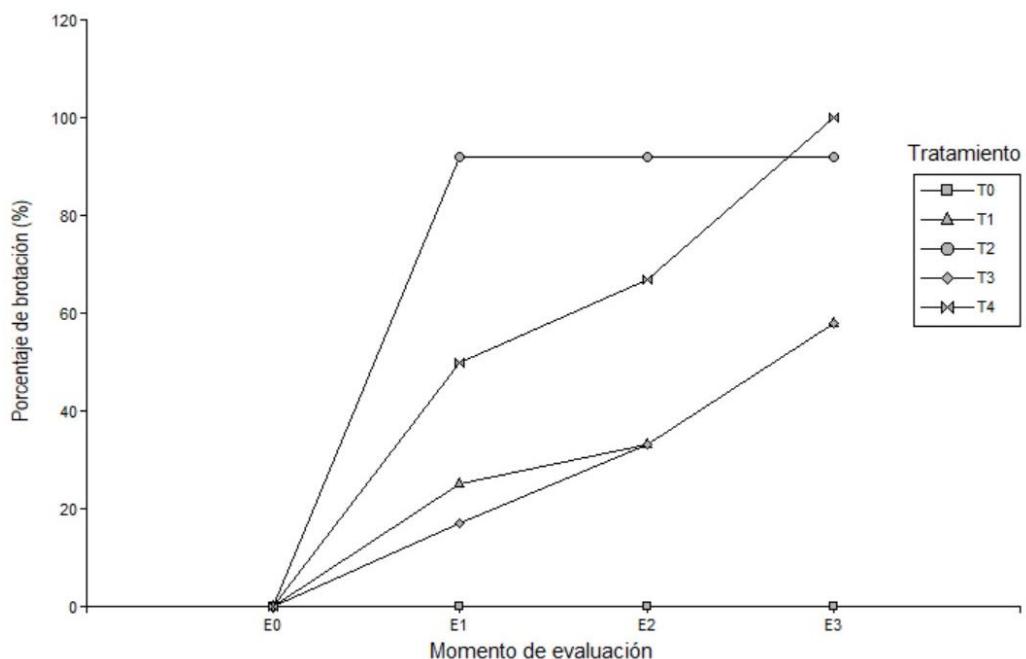
Explantes de H. guatemalensis a las 2 semanas de observación en estado de areola hinchada



Viñas et al. (2012), reportó en *H. costaricensis* la obtención de brotes a partir de los 28 días con concentraciones altas de BAP (15, 30 y 60 μ M), sin embargo todos los explantes en dichos tratamientos presentaron tejido calloso, así mismo la concentración de 5 μ M de BAP produjo el 10% de brotes a los 63 días de realizado el establecimiento *in vitro*, difiriendo con lo obtenido en la presente investigación ya que para el T4 se logró el 50% de brotes emitidos a los 30 días. Por otro lado, Drew & Azimi (2002) en *H. undatus* presentó a los 26 días aproximadamente el 80% de brotación sin adición de reguladores, y con 2iP en una concentración de 5 μ M solo tardó 20 días, dichas diferencias son justificables ya que el empleo de diferentes reguladores de crecimiento, solos o en combinación, presentan una reacción diferente dependiente de la especie utilizada tal como menciona Ojeda-Zacarías et al. (2012).

Figura 2

Porcentaje de brotación para cada tratamiento respecto al momento de evaluación

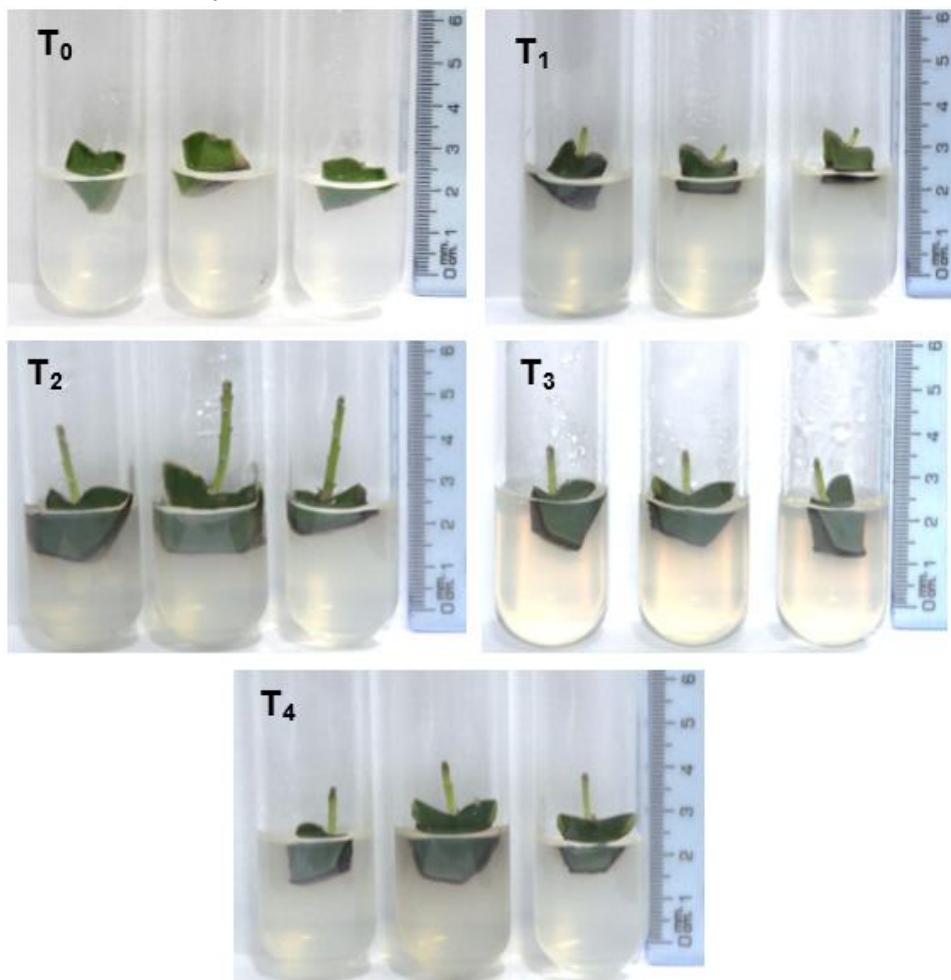


En relación a la variable longitud de cladodios, la evaluación se realizó a los 90 días (Figura 3), donde existieron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados (Tabla 2), el T2 difiere significativamente de todos los demás tratamientos con una media de 22.92 mm, siendo la mejor media obtenida en el presente estudio, estando relacionado con lo reportado por Viñas et al. (2012), que con 2 μ M de BAP, obtuvo una

longitud de 20mm aproximadamente tras 80 días de cultivo. Zambrano-Forero & Ríos Osorio (2015) también obtuvieron la mayor altura con 0.5 mg/l de BAP a los 45 días, considerando que los explantes empleados para su estudio, se encontraban en fase de multiplicación y provenían de segmentos natales *in vitro* de *H. megalanthus*.

Figura 3

Longitud de cladodios provenientes de areolas de H. guatemalensis a los 90 días de evaluación, de acuerdo a los tratamientos empleados



El T₂ y T₄ presentan el mayor número de areolas, no mostrando diferencias significativas entre ellos; el número de areolas nos permite predecir la cantidad de brotes que se podrían obtener en una fase de multiplicación y se encuentran relacionados a la longitud de los cladodios, ya que según lo obtenido por Mohamed-Yasseen (2002), a

pesar de obtener un total de explantes brotados, solo algunos pudieron producir cladodios en la fase de multiplicación, relacionándolo a lo expuesto anteriormente y al daño de manipulación realizado (Tabla 2).

Tabla 2

Efecto de los tratamientos de medios de cultivo en explantes provenientes de areolas de pitahaya

| Tratamiento | Medio de cultivo | Longitud de cladodios | Número de areolas |
|----------------|--------------------|--------------------------|----------------------|
| T ₀ | Control (Medio MS) | 0 ^A | 0 ^A |
| T ₁ | MS + 0.25 mg/l BAP | 5.92 ^{AB} | 6 ^{AB} |
| T ₂ | MS + 0.5 mg/l BAP | 22.92 ^C | 19 ^C |
| T ₃ | MS + 0.75 mg/l BAP | 8.5 ^B | 7.75 ^{AB} |
| T ₄ | MS + 1 mg/l BAP | 10.33 ^B | 12 ^{BC} |

Nota: Medias con letra común dentro de la misma columna, no son significativamente diferentes. (Prueba LSD Fisher, p > 0.05).

Fuente: Elaboración propia

El empleo de BAP en los medios de cultivo *in vitro* ha permitido la proliferación de cladodios, siendo la más eficiente de las citoquininas, puesto que permite la división celular y modifica la dominancia apical (Bhojwani & Dantu, 2013), a pesar de ello existen aún pocos estudios que empleen BAP para la propagación *in vitro* a partir de areolas de pitahaya, sobre todo para variedades como *H. guatemalensis*, además las concentraciones bajas empleadas permitieron explantes libres de tejido calloso por lo que la carga genética de la planta donadora se mantendría sin variación alguna concordando con lo reportado por Viñas et al. (2012) que optó por reducir sustancialmente dichas concentraciones.

Conclusiones

Se logró evaluar el efecto del regulador de crecimiento BAP sobre el establecimiento *in vitro* de *H. guatemalensis* a partir de areolas. Se propone para esta fase el medio de cultivo MS con la adición de 0.5 mg/l de BAP debido al alto porcentaje de brotación obtenido en menor tiempo, así como los mejores promedios respecto a la longitud de cladodios y número de areolas.

El estudio presentado sirve de respaldo para futuras investigaciones que tengan como principio mantener la uniformidad genética en dicho cultivo, así mismo gracias a los resultados obtenidos, la propagación clonal masiva a partir de explantes es posible,

proporcionando en menor tiempo la mayor cantidad de plantas con calidad sanitaria para su ingreso a campo definitivo expandiendo la frontera agrícola del cultivo.

Agradecimientos e información de financiamiento

Gracias a CITE Agroindustrial U.T. Huaura por habilitar sus instalaciones para la realización del presente estudio y a Juan Fumagalli Galli por las gestiones para la adquisición de materiales e insumos.

Contribución de autoría

Brian Giuseppe Navarro-Sandoval, promoción, ejecución y gestión del proyecto, considerando trabajo con productores de pitahaya, diseño de la investigación, redacción, interpretación y revisión del manuscrito.

Estefany Estrella Canales-Carrera, ejecución del proyecto en Laboratorio Agrícola, recopilación de información, diseño, redacción e interpretación y revisión final del manuscrito.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). Plant tissue culture: An introductory text. In *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* (Springer). Springer, India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>.
- Bozkurt, T., İhan, S., & Dündar, İ. (2020). Micropropagation of Different Pitaya Varieties. *International Journal of Agricultural and Natural Sciences E*, 13(1), 39–46. <https://orcid.org/0000-0003-2829-797X>.
- Caetano Nunez, D. G., Escobar, R., Caetano, C. M., & Vaca Vaca, J. C. (2014). Estandarización de un protocolo de regeneración *in vitro* para pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran). *Acta Agronómica*, 63(1), 31–41. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n1.36051>.
- De la Rosa-Carrillo, Ma. de Lourdes; Domínguez-Rosales, Manuel S.; Pérez-Reyes, <https://doi.org/10.54353/ritp.v2i1.e002>

- Martha E.; Pérez-Molphe-Balch, E. (2012). Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género *Turbinicarpus*. *Interciencia*, 37(2), 114–120.
- Drew, R. A., & Azimi, M. (2002). Micropropagation of red pitaya (*Hylocereus undatus*). *Acta Horticulturae*, 575, 93–98. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.575.7>.
- Herbach, K. M., Maier, C., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2007). Effects of processing and storage on juice colour and betacyanin stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) juice. *European Food Research and Technology*, 224(5), 649–658. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0354-5>.
- Hernawati, Setiawan, N. A., Shintawati, R., & Priyandoko, D. (2018). The role of red dragon fruit peel (*Hylocereus polyrhizus*) to improvement blood lipid levels of hyperlipidaemia male mice. *Journal of Physics: Conference Series*, 1013(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1013/1/012167>.
- Mercado-Silva, E. M. (2018). Pitaya— *Hylocereus undatus* (Haw). In *Exotic Fruits*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803138-4.00045-9>.
- Mohamed-Yasseen, Y. (2002). Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose). In *vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 38(5), 427–429. <https://doi.org/10.1079/IVP2002312>.
- Montesinos Cruz, J., Rodriguez-Laramendi, L., Ortiz-Perez, R., Fonseca-Flores, M., Ruiz Herrera, G., & Guevara-Hernández, F. (2015). Revisión bibliográfica Pitahaya (*Hylocereus spp.*) un recurso fitogenético con historia y futuro para el trópico seco mexicano. *Cultivos Tropicales*, 36, 67–76. <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v36s1/ctr07s115.pdf>.
- Montiel-Frausto, L., Enríquez del Valle, J., & Cisneros, A. (2016). Propagación *in vitro* de *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Britton y Rose. *Biotecnología Vegetal*, 16(2), 113–123. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/516/pdf>.
- Montiel, L. (2017). *Conservación in vitro de pitahaya (Hylocereus spp .) mediante el cultivo de mínimo crecimiento*. [Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional]. <https://bit.ly/3Fc6PaF>.
- Ojeda-Zacarías, M. del C., Vázquez-Alvarado, R., Santos-Haliscak, J., Moreno-Degollado, G., Aguirre-Arzola, V., Iracheta-Donjuan, L., López-Gómez, P., & Castellanos-Juárez, M. (2012). Micropropagacion de Pitahaya *Hylocereus* (HAWORTH). *Revista Salud Pública y Nutrición*, 4, 119–128. <https://bit.ly/3muXK4i>.
- Suárez Román, R., María Caetano, C., Ramírez, H., & Morales Osorio, J. (2014). Multiplicación de *Selenicereus megalanthus* (pitahaya amarilla) e *Hylocereus polyrhizus* (pitahaya roja) vía organogénesis somática. *Acta Agronómica*, 68(2), <https://doi.org/10.54353/ritp.v2i1.e002>

- 272–281. <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v63n3/v63n3a10.pdf>.
- Vargas Gutiérrez, K., & López Montañez, R. N. (2020). *Guía técnica del cultivo de pitahaya (*Hylocereus megalanthus*) en la región Amazonas* (Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) (ed.)). <https://bit.ly/3izRpmW>.
- Verona-Ruiz, A., Urcia-Cerna, J., & Paucar-Menacho, L. M. (2020). Pitahaya (*Hylocereus spp.*): Culture, physicochemical characteristics, nutritional composition, and bioactive compounds. *Scientia Agropecuaria*, 11(3), 439–453. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.16>.
- Viñas, M., Fernández-Brenes, M., Azofeifa, A., & Jiménez, V. M. (2012). *In vitro propagation of purple pitahaya (*Hylocereus costaricensis* [F.A.C. Weber] Britton & Rose) cv. Cebra. In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 48(5), 469–477. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9439-y>.
- Wu, J. (2005). Manual del cultivo de la Pitaya. In *Manual de cultivos*. [https://www.icta.gob.gt/publicaciones/Pitaya/Manual del cultivo de la Pitaya.pdf](https://www.icta.gob.gt/publicaciones/Pitaya/Manual%20del%20cultivo%20de%20la%20Pitaya.pdf).
- Zambrano-Forero, C., & Ríos Osorio, J. (2015). Evaluación de reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *Hylocereus megalanthus* (pitahaya amarilla). *Revista Tumbaga*, 1(10), 5. <https://bit.ly/3owjHSS>.