

Protocolo *in vitro* para la propagación de pitahaya

M.J. Martínez-Hernández^{*1}, N. Vallejo Marcial¹, I. Pastor-Camacho¹, Y. Olarte Reyes¹ y J. Nataren-Velázquez²

¹Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus Xalapa, Universidad Veracruzana

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

*mhernandezmj@gmail.com

Área de participación: Ingeniería Química

Resumen

Se evaluó un método de desinfección y germinación de las semillas *in vitro* de las cinco variedades de pitahaya, (*Hylocereus guatemalensis*, *Hylocereus costaricensis*, *Hylocereus purpusii*, *Hylocereus undatus* y *Hylocereus polirhuzu*), los desinfectantes fueron Hipoclorito de sodio, Nanopartículas de plata, Etanol y Carbón activado con 5 minutos como tiempo de inmersión de las semillas en todos los tratamientos. El medio de cultivo utilizado fue Murashige y Skoog (MS) al 50%. Los resultados de la desinfección mostraron que los tratamientos 1, 2 y 3 la contaminación fue del 100% y los tratamientos 4, 5 y 6 que se les adiciono carbón activado disminuyo la contaminación 70-100%. Cabe mencionar que las variedades no presentaron diferencias estadísticas en la germinación, sin embargo *Hylocereus costaricensis* obtuvo el 92.7% de semillas germinadas. El cultivo *in vitro* es una alternativa para la germinación de semillas de pitahaya, obteniendo así un alto porcentaje de plántulas libres de plagas y enfermedades.

Palabras clave: *Hylocereus spp*, semillas, cultivo de tejidos

Abstract

A method of disinfection and germination of the seeds of the five varieties of pitahaya, (*Hylocereus guatemalensis*, *Hylocereus costaricensis*, *Hylocereus purpusii*, *Hylocereus undatus* and *Hylocereus polirhuzu*) was evaluated *in vitro*. The disinfectants were sodium hypochlorite, silver nanoparticles, ethanol and activated carbon with 5 minutes as immersion time of the seeds in all treatments. The culture medium used was Murashige and Skoog (MS) at 50%. The results of the disinfection showed that the treatments 1, 2 and 3 were 100% contaminated and the treatments 4, 5 and 6 with the addition of activated carbon decreased the contamination by 70-100%. It should be mentioned that the varieties did not present statistical differences in germination, however *Hylocereus costaricensis* obtained 92.7% of germinated seeds. The culture *in vitro* is an alternative for the germination of seeds of pitahaya, obtaining therefore a high percentage of free seedlings of plagues and diseases.

Key words: *Hylocereus spp*, seeds, tissue culture

Introducción

La pitahaya (*Hylocereus undatus* (Haworth) (Britton y Rose) es un cactus suculento epífita nativo que se desarrolla en gran parte de México, Centro y Sudamérica. Diversos autores mencionan que su origen específicamente que de forma comercial solo es cultivada en Colombia y Nicaragua [1,2]. Sin embargo el género *Hylocereus* se ha distribuido al sureste asiático, Europa e Israel [3]. En México la pitahaya es producida de manera comercial en los estados de Quintana Roo, Puebla y Oaxaca, cabe mencionar que se encuentra de manera natural en las selvas altas perennifolias, selvas medianas subperennifolias y selvas bajas caducifolias [4,5].

El cultivo de la pitahaya ha ganado terreno de producción en las zonas áridas, siendo un cultivo alternativo en apoyo a la economía a pequeños productores. La pitahaya o fruta del dragón como popularmente es conocida, es un fruto no tradicional que se ha potencializado como fruto exótico en países asiáticos. La Unión Europea se ha convertido en el principal consumidor desde la década de los 90's, debido a la existencia de mercados étnicos, orientados a segmentos de población provenientes de Asia y Sudamérica cuya demanda de productos es alta [6]. En el mercado internacional la pitahaya es consumida en fresco o pulpa congelada, siendo La Unión Europea, Estados Unidos de América y Japón los principales mercados importadores en los meses de junio y

agosto. Los principales mercados europeos son: Bélgica, Dinamarca, Francia, Suecia, Reino Unido, Holanda, España, Suiza, Alemania y Finlandia [7].

El precio de la pitahaya es variable en cada país y las importaciones disminuyen en determinadas épocas, el origen del fruto y el precio es un factor importante en el consumo del fruto para la unión europea. En 2010 Vietnam fue el principal país exportador que abasteció de fruta a Estados Unidos de América en enero y diciembre. A pesar de que México y Guatemala son países exportadores participan solo con un volumen mínimo lo cual impide estar en los principales centros de comercio internacional, mientras que Colombia y Ecuador son países sudamericanos con experiencia en exportación desde 2003 [8]. La producción de pitahaya en México es obtenida en su mayoría por huertos familiares, potreros o acahuales. Debido a que el cultivo no se ha desarrollado con las debidas condiciones para obtener un producto de calidad y por ende el mercado solo se encuentra a nivel regional, en algunos casos el fruto es comercializado en áreas gourmet de grandes cadenas de supermercados: Guadalajara, Monterrey, Ciudad de México, Puebla y Veracruz. La comercialización del fruto se desarrolla principalmente en los mercados locales y se distribuye a la ciudad de México. [9]. Dado el auge que empieza adquirir la pitahaya por ser uno de los cultivos no tradicionales, es planteo el siguiente objetivo establecer un protocolo de desinfección y germinación *in vitro* para la obtención de plántulas de cinco variedades de pitahaya.

Metodología

La recolección de los frutos, para obtener el material vegetal se realizó en la parcela “La mesa” propiedad del Sr. Esteban Alcalá Acevedo ubicada en el ejido Zoquiác, municipio de Molcaxac, estado de Puebla, con posicionamiento en las coordenadas 18° 42' 27.89" latitud norte y 97° 55' 29" longitud oeste (GPS IN SITU), a una altura a nivel de mar de 1834.245 m. (GPS IN SITU), con una temperatura promedio anual de 19.2°C y precipitación anual de 600 a 700 mm con clima semicálido, subhúmedo con lluvias en verano [10].

Material Vegetativo

Se seleccionaron 5 variedades de pitahaya diferentes (Tabla 1.) las cuales el productor señaló que tenía identificadas.

Tabla1. Variedades de pitahaya a evaluar.

Nombre común	Nombre científico
Pitahaya rosa	<i>Hylocereus guatemalensis</i>
Pitahaya rosa bajo	<i>Hylocereus costaricensis</i>
Pitahaya morada	<i>Hylocereus purpusii</i>
Pitahaya blanca	<i>Hylocereus undatus</i>
Pitahaya roja	<i>Hylocereus polirhizus</i>

Obtención de semilla

Se despulpo el fruto con la intención de obtener la semilla usando un colador y agua, sobre papel filtro se puso a temperatura ambiente y bajo sombra para eliminar el agua aun presente y residuos.

Medio de Cultivo

El medio utilizado para la investigación fue Musashige y Skoog (MS) [11] al 50% adicionado con 2.4 gL⁻¹, 30 gL⁻¹ de sacarosa, phytigel (sigma) 2.6 gL⁻¹. Se ajustó a un pH de 5.7 KOH 1N o HCl 1N. Se utilizaron frascos de vidrio con tapas autoclavables, todo el material de cristalería a utilizar se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1.2 kg/cm² de presión durante 20 minutos, se colocó 20 ml del medio de cultivo en cada frasco de vidrio, de una capacidad de 120 ml. se esterilizó en la autoclave a 120 °C por 15 minutos. En cada frasco se colocaron 3 semillas para su germinación, mantuvieron a una temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de 16 h luz y 6 h de oscuridad.

Desinfección

La desinfección del material vegetal (semillas) se enjuagaron con agua destilada en agitación por 10 minutos se agregaron 2 gotas de Tween 80, se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. Una vez realizado los enjuagues los tratamientos fueron (Tabla 2) para cada una de las especies. Dentro de la cámara de flujo laminar se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril, para cada uno de los tratamientos, el tiempo para todos los tratamientos fue constante de 5 minutos. Las concentraciones de hipoclorito de sodio fue al 4%, etanol al 70 %, estos tratamientos se realizaron al momento de sembrar la semilla se sumergieron por 5 minutos, en constante movimiento, posteriormente se enjuagaron con 4 veces con agua destilada estéril y se realizó la siembra. Para los tratamientos de Nanopartículas de plata se adicionaron 5 gotas al litro de medio de cultivo MS, asimismo para el carbón activado se adicionó un 1 gL⁻¹.

Tabla 2. Tratamientos concentración y tiempos de exposición para las cinco Variedades de Pitahaya.

Tratamientos	Componente
T1 (Testigo)	Hipoclorito de sodio 4% + Etanol 70%
T2	Hipoclorito de sodio 4% + Nanopartículas de Plata
T3	Etanol 70 %+ Nonopartículas de Plata
T4	Hipoclorito de sodio 4%, Nanopartículas de plata y carbón activado.
T5	Etanol 70% + Nanopartículas de plata y carbón activado.
T6	Hipoclorito de sodio 4%, Nanopartículas de plata, Etanol 70% y carbón activado.

Análisis estadísticos

El diseño experimental fue completamente al azar, la unidad experimental la constituyeron 16 frascos que contenían 3 semillas cada uno. Repitiéndose este experimento cuatro veces.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa estadístico Infostat versión 20151. Se realizó el análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$).

Variables evaluadas

Porcentaje de contaminación: se evaluó a las 72 horas de establecido el experimento

Porcentaje de Semillas Germinadas: Se contó el total de semillas germinadas por variedad.

Resultados y discusión

Porcentaje de contaminación

En la figura 1, se puede observar que el porcentaje de contaminación para las cinco variedades, Se muestran los tratamientos establecidos para la desinfección de 5 variedades de semilla de pitahaya, los tratamientos (1 testigo), 2, y 3 representó contaminación al 100 % estos al utilizar como reactivos Etanol, hipoclorito de sodio y Nanopartículas de plata solos y combinados.

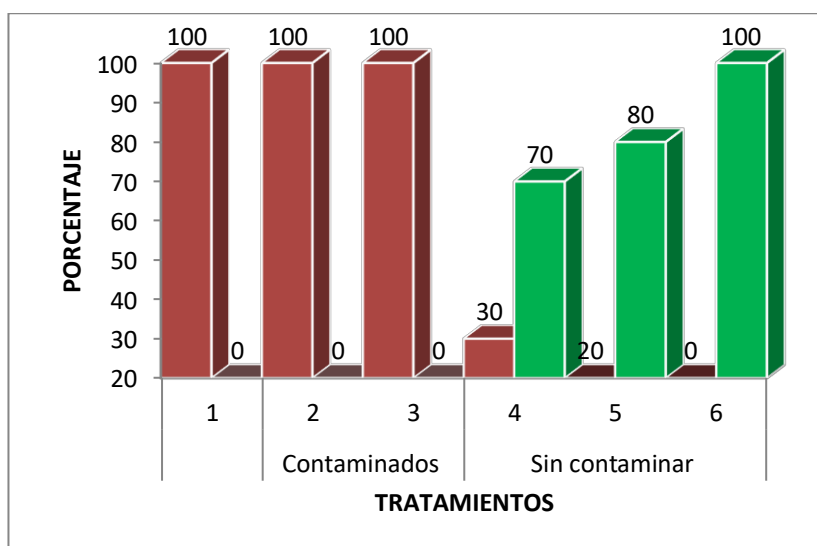


Figura 1. Porcentaje de contaminación por tratamiento

Mientras que los tratamientos 4,5 y 6 presentaron disminución en la contaminación teniendo como reactivo adicional carbón activado (Figura 2). Pierik [12] menciona que el uso de carbón activado como compuesto del medio de cultivo en algunos casos tiene un efecto inhibitor, debido a que puede absorber diferentes sustancias tales como hormonas vegetales y reguladores de crecimiento, además de diversos compuestos orgánicos e inorgánicos, contenidos tanto en el medio de cultivo como liberados por las mismas plantas. De acuerdo con Casells [13], las bacterias y hongos en el cultivo de tejidos puede causar grandes pérdidas en los procesos de propagación *in vitro* debido a que los tejidos se contaminan y mueren.

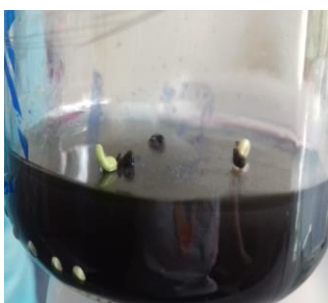


Figura 2. Tratamiento con carbón activado

Porcentaje de Germinación

En la figura 3, se puede observar que no hubo diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba de Tukey al 0.05 %, de significancia, sin embargo la variedad rosa (*Hylocereus gualtemalensis*) y rosa bajo (*Hylocereus costaricensis*) obtuvieron las medias más altas 77-78. Cabe mencionar que las variedades morada (*Hylocereus purpusii*), blanca (*Hylocereus undatus*) y roja (*Hylocereus polirhuzus*) 52-59 de semillas germinadas.

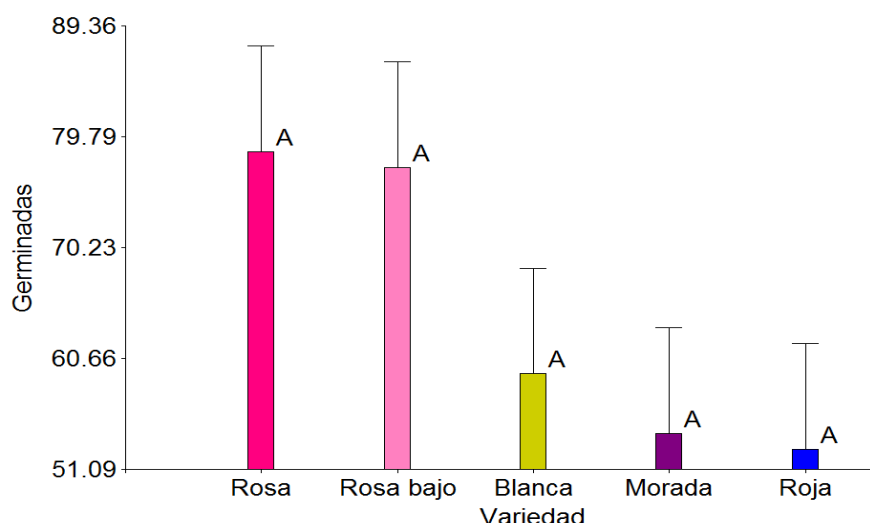


Figura 3. Medias de semillas germinadas de las cinco Variedades de Pitahaya

Es importante resaltar que los tratamientos contaminados también se evaluaron con la finalidad de registrar la capacidad germinativa de las semillas de las distintas variedades así como el efecto de los tratamientos. Es por ello que en la tabla 3, se observan los tratamientos con diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey con 0.05 % de significancia en la germinación por tratamiento, siendo los tratamientos 5 y 6 con mayor promedio y los tratamientos 1, 2 y 3 con menor promedio de germinación.

Tabla 3. Prueba de Tukey con 5 % de significancia en representación de los tratamientos

Tratamiento	Medias	n	E.E			
T6	126.60	5	9.99	A*		
T5	94.40	5	9.99	A	B	
T4	80.20	5	9.99		B	
T3	34.80	5	9.99			C
T2	33.20	5	9.99			C
T1	17.20	5				C

* Letras diferentes indican diferencias significativas estadísticamente $p < 0.05$.

En la figura 4, se muestran los porcentajes de semilla germinadas por variedades y tratamientos. El tratamiento 6 con una solución de Etanol, Hipoclorito de sodio Nanopartículas de plata y carbón activado fue el tratamiento de mayor porcentaje 59- 93%, de semillas germinadas para las cinco variedades. Mientras que los tratamientos 1 al 5 obtuvieron un rango del 0-74% de semillas germinadas. Estos resultados coinciden con los encontrados por Folgueras [14], menciona que las altas concentraciones de reactivos controlan presencia de hongos y bacterias, pero en algunas veces el material vegetal muere. Por otro lado, Martínez [15] menciona que la respuesta a la germinación se debe probablemente a factores internos de las semillas, como su viabilidad y no a los factores externos como temperatura, humedad, oxígeno y luz. En especies de Cítricos se encontró que otros factores no decisivos en la germinación son el medio de cultivo y los reguladores de crecimiento, dado que en éste proceso intervienen grupos hormonales, inhibiendo o activando el crecimiento de las plántulas [16, 17, 18 y 19].

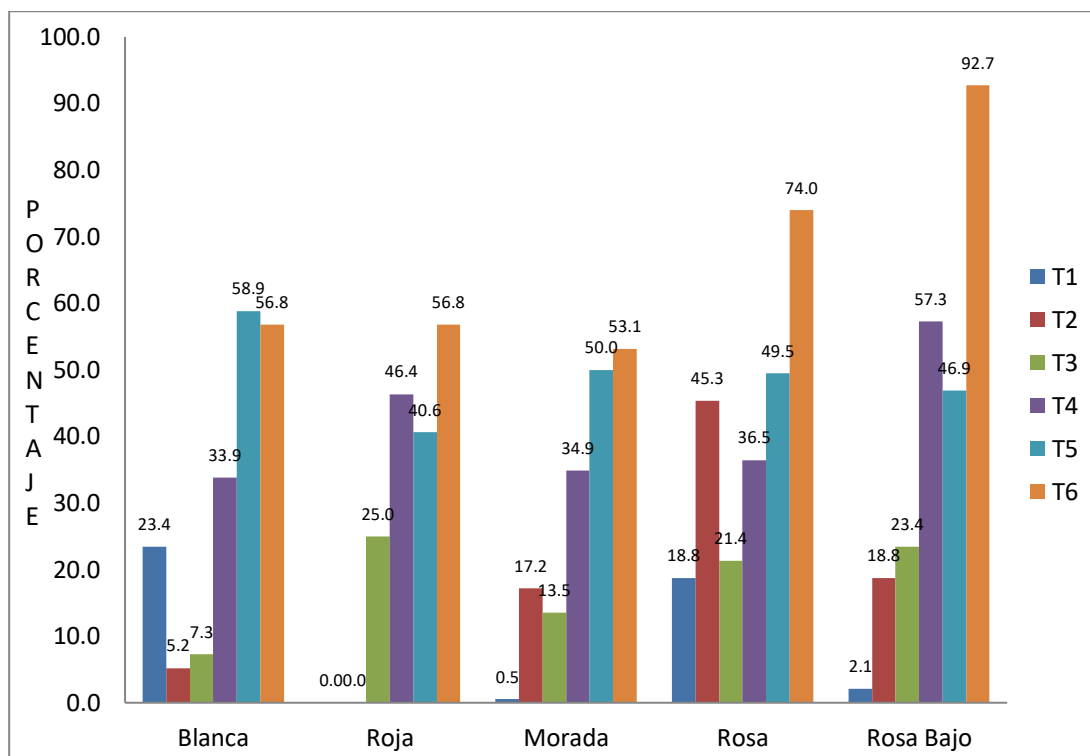


Figura 4. Porcentaje de semillas germinadas de las cinco variedades de Pitahaya

Trabajo a futuro

Las futuras investigaciones estarán encaminadas a la capacidad germinativa del polen, al tubo polínico de las flores así como a pruebas físicas de sustratos y fertilizaciones químicas, orgánicas e incorporación de microorganismos promotores del crecimiento tanto en etapa de germinación como en el trasplante a plantaciones definitivas.

Conclusiones

Los resultados mostraron que al utilizar los reactivos etanol al 70 %, hipoclorito de sodio al 4 %, carbón activado y Nanopartículas de plata en el medio de cultivo, se obtuvieron plántulas libres de patógenos en la germinación de las cinco variedades de pitahaya, sin embargo la variedad Rosa bajo (*Hylocereus costaricensis*) obtuvo el 92.7% de semillas germinadas siendo porcentaje más alto de las cinco variedades. Este protocolo justifica que el cultivo *in vitro* es una alternativa para la germinación de semillas de pitahaya, obteniendo así un alto porcentaje de plántulas libres de plagas y enfermedades, lo que nos llevaría a la propagación masiva de esta especie que representa una opción de producción como frutal no tradicional y su impacto es tanto a nivel agronómico, ambiental y farmacéutica.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Señor Esteban Alcalá Acevedo; Profesor Maximino Escuela Villamil, Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACYT) y a la Facultad de Ciencias Agrícolas Campus Xalapa de la Universidad Veracruzana por su apoyo para esta investigación.

Referencias

- [1] O. L. Becerra, "El cultivo de la pitahaya. Federación Nacional de cafetaleros de Colombia. Bogotá, Colombia", 19 p. 1986.
- [2] H.H. Bravo, y S. Arias, Cactácea. En: "*Flora Mesoamericana*," Vol. 2, parte 1. 2011. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. Disponible en: <http://www.tropicos.org/docs/meso/cactaceae.pdf> > consultado /7/05/ 2020.
- [3] P.A.L. Del Ángel, F.C.A. Hernández, M.A. Rebolledo y L.R. Zetina, "Pitahayas: patrimonio biocultural para diversificar la agricultura y la alimentación". México. INIFAP. 183 p. 2012.
- [4] M.R. Castillo, "Aprovechamiento de la pitahaya: bondades y problemáticas". *Caos Conciencia*, no. 1, , , ISSN 1517-6916, pp. 13-18, 2006.
- [5] Y.D. Ortiz-Hernández, M.M. Livera, y G.G. Alcantara, "Hacia el conocimiento y conservación de la pitahaya. (*Hylocereus* spp)". p.397. 2000 In: Memoria del Simposio Internacional sobre el Cultivo y Aprovechamiento de la Pitaya (*Stenocereus*) y la Pitahaya (*Hylocereus* y *Selenicereus*). Guadalajara, Jal., México.
- [6] S. K.A Cid, y M.H. G. Rojas, "Plan de exportación de pitaya." 2009. Pitaya Fruit <http://pitayafruit-max.blogspot.com/> 10/04/2019.
- [7] International Trade Centre. "Tropical and off-season fresh fruits and vegetables". Market News service (MNS). Monthly edition September. 2009 http://www.intracen.org/uploadsFiles/intracenorg/Content/Exporters/MNS/Fruits_and_Vegetables.pdf. 13705 /2019.
- [8] C.J.A. Lozano, "Plan exportador de uchuva y pitahaya al mercado de Estados Unidos para Exprofruver LTDA". Corporación Universitaria Minuto de Dios. Facultad de Ciencias Empresariales. Bogotá. 2009. [http://www.slideshare.net/guesta7d&ce\\$/trabajo-final-de-formulacion-de-proyectos](http://www.slideshare.net/guesta7d&ce$/trabajo-final-de-formulacion-de-proyectos) 20/05/ 2020.
- [9] P. Bárcenas, Ch. Tijerina, G. Martínez, R. Becerril, F. Larque, L. Colinas, "Respuesta de tres materiales del género *Hylocereus* a la salinidad sulfático 44 clorhídrica". Revista Terra. 20(2) 123-127, 2002.
- [10] INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía México., "Anuario estadístico y geográfico de Puebla" 940 p. 2017.
- [11] T. Murashige, y F. Skoog, "A revised médium for rapad grow and biossays with tobacco tissue cultures". *Physiol. Plant.* 15:473-497. 1962
- [12] R.L.M. Pierik, "Commercial aspects of micropropagation". In: Prakash, J., and R. L. M. Pierik (eds). *Horticulture — New Technologies and Applications*. Springer Netherlands. pp: 141-153. 1991
- [13] A.C. Casells, "Problems in tissue culture: culture contamination". In *debergh* P, RH. Zimmerman eds. *Micropropagation*. Dordrecht, The Netherland. Kluwert Acad. Publish. P. 31-45. 1991
- [14] M. Folgueras, L. Herrera, y D. Carranzana. "La contaminación microbiana en la micropropagación *in vitro* de las raíces y tubérculos tropicales". En: libro de reportes cortos. Ciego de Ávila: Taller-internacional BioVeg . pp.183-185. 2001
- [15] H.M.J. Martínez, L.A. Alonso, A.F. Osorio, L.F. Gallardo, M.H. López, y M.R.M. Mata, "Cultivo in vitro de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al agar". *Interciencia*. 38:616-619. 2006.
- [16] G. Nestares, R. Zorzoli, L. Mroginski, y L. "Picardi, Plant regeneration from cotyledons derived from mature sunflower sedes". *Helia* 19:107-112. 1996.
- [17] M.A. Germana, B. Chiancone, M.R. Melati, and A. Firetto, "Preliminary results on the effect of magnetic fields on anther cultura and pollen germination of *Citrus clementina* Hort. ex Tan". *Acta Horticult.* 625: 411-418. 2003.
- [18] A.M. Hassanein, y M.M. Azoo, "Propagation of Citrus reticulate via in vitro seed germination and shoot cuttings". *Biol. Plant.* 47: 173-177. 2003.
- [19] A Karwa, "In vitro propagation of Citrus reticulate Blanco (*Nagpur mandarin*)". *Ind. J. Genet. Plant Breed.* 63: 187- 188. 2003.