

Tipo de sombreamiento y tiempo de crecimiento de brotes laterales sobre la viabilidad de explantes de *Annona muricata* L.

Stock plant shading and growth time of lateral shoots on the viability of *Annona muricata* L. explants

M. Velázquez¹, A. González², F. Mata¹, S. León de Sierralta¹,
D. Esparza¹ y M. Ramírez¹

¹La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. Venezuela

²UNESUR Venezuela.

Resumen

Con la finalidad de aumentar la viabilidad de explantes de *Annona muricata* se evaluó el efecto del sombreamiento y tiempo de crecimiento de brotes laterales de plantas donantes adultas con seis años de edad provenientes del campo CENFRUZU-CORPOZULIA. Se despuntaron y defoliaron seis ramas por planta para inducir brotación, algunas ramas fueron sometidas a dos condiciones de sombreamiento: 50 % de sombreamiento y 30 % de sombreamiento, el resto de las ramas estuvo totalmente en exposición solar. El tiempo de crecimiento correspondió a los periodos de 8, 16 y 24 días después de la poda. El diseño experimental fue totalmente al azar, con arreglo factorial 3² con cinco repeticiones. Sólo se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0,05$) para el tiempo de crecimiento. Los resultados muestran que la mayor viabilidad (58,44%) se obtuvo cuando los brotes no sombreados se recolectaron a los 8 días después de la poda.

Palabras clave: guanábano, viabilidad, sombreamiento, tiempo de crecimiento, cultivo *in vitro*, brotes laterales.

Abstract

With the purpose to improve adult explant viability, the effect of shading and growth time on six-year-old soursop plants were evaluated at CENFRUZU-CORPOZULIA. Six branches per plant were defoliated and shoot tips were removed to induce bud break some of the branches were covered with different

polythene sheets to reduce irradiance: 50% and 30%, others were not covered. The growth time was 8, 16 and 24 days after pruning. The experiment involved a 3² factorial arrangement in a Completely Randomized Design with five replications. Statistical differences were obtained for growth time ($P < 0.05$). The results showed that the viability (58.44%) was greater when the shaded shoots were collected 8 days after pruning.

Key words: Soursop, viability, shading, growth time, *in vitro* culture, lateral shoots.

Introducción

Los frutales en Venezuela constituyen un renglón que ocupa una posición destacada en el sector agrícola por su elevado aporte al valor total de la producción. Entre éstos, el guanábano (*A. muricata* L.) tiene un gran potencial por su adaptabilidad, producción y valor nutritivo; ya que por su delicioso sabor se consume como fruta fresca, en forma de helados, conservas y bebidas. También con la pulpa cocida se prepara un dulce para rellenar partes de pastelería y fabricar jaleas (1).

Las especies de *Annona* se han propagado tradicionalmente por semilla y los métodos convencionales de propagación vegetativa son muy lentos. Debido a que las colecciones de estas plantas en el campo, generalmente están expuestas a plagas, enfermedades, problemas edáficos, climáticos y de espacio; el cultivo *in vitro* puede ser utilizado para establecer bancos de germoplasma y conservar así la diversidad necesaria para programas de fitomejoramiento (20).

El cultivo *in vitro* ofrece una serie de ventajas incuestionables en la práctica de la multiplicación vegetativa, entre los cuales destaca la

propagación de un gran número de especies difíciles de multiplicar, a menudo por los métodos clásicos (12).

Existe información relacionada con la regeneración de brotes y yemas adventicias usando hipocótilos de semilla. Las yemas laterales son estimuladas desde la iniciación de los meristemas en explantes provenientes de plantas adultas (8); las regiones individuales del hipocótilo juegan un rol fundamental en la producción de brotes adventicios, ya que la región proximal a la raíz y la parte media del hipocótilo producen más brotes y yemas que la región próxima al cotiledón (18). A partir de estos hipocótilos de semillas se ha logrado obtener plántulas enraizadas de guanábana cultivadas de manera *in vitro* (3).

Por otra parte, Margara (12) ha propagado clones por cultivo *in vitro* utilizando segmentos nodales, los cuales permiten que el brote se desarrolle a partir de las yemas, originando una organogénesis directa, puesto que la formación de brotes a partir de callos es sumamente difícil.

Dentro de este tipo de regeneración *in vitro* de *Annona* se ha observado el efecto del ennegrecimiento, por la presencia de

fenoles y polifenoxidasas comunes en el metabolismo de oxidación (7, 18) que pueden limitar el enraizamiento, y disminuir la viabilidad de los explantes y su respuesta morfo genética.

El fenómeno de ennegrecimiento ocurre por acción de enzimas tipo polifenoloxidasas y tirosinasas que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren heridas. Éstas actúan sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos a quinonas que son fitotóxicas, sustancias que a su vez pueden polimerizarse y afectar a las proteínas, y en consecuencia, inhiben el crecimiento y la viabilidad de los explantes (6, 11, 16). Un incremento en la producción de compuestos fenólicos ha sido asociado con una disminución en el crecimiento y declinio en la síntesis de proteínas (15, 16).

Marks y Simpsom (13) demostraron que el mecanismo de la oxidación fenólica y de la inhibición del crecimiento en plantas leñosas, puede ser controlado por los niveles de irradiación recibidos por las plantas madres, debido a que la actividad de muchos sistemas enzimáticos que participan en la síntesis y en la oxidación de los fenoles es inducida por

la luz. Por su parte, Yu y Meredith (23) obtuvieron una mayor viabilidad en meristemos apicales de vid cuando provenían de material crecido bajo sombra. Asimismo, Sharma *et al.* (22) recomendaron el sombreamiento como una técnica efectiva para reducir los niveles de fenoles y la actividad de la enzima polifenoloxidasa e incrementar la viabilidad de los explantes.

En guayabo, León de S. *et al.* (9) reportaron que la protección solar de las ramas de la planta disminuyó el contenido de compuestos fenólicos en el explante. Ramírez (16) registró un 100% de brotación de los explantes sin problemas de ennegrecimiento cuando la planta madre fue sombreada.

La oxidación fenólica es un grave problema en el cultivo *in vitro* de las especies leñosas, entre ellas las Annonáceas, donde se ha logrado disminuir este problema con el uso del sombreamiento (2, 9, 13). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del tipo de sombreamiento y el tiempo de crecimiento de brotes laterales sobre la viabilidad de explantes de *A. muricata* L.

Materiales y métodos

Se seleccionaron 12 plantas adultas de *A. muricata* L., de seis años, cultivadas en el Campo Experimental del Centro Frutícola del Zulia (CENFRUZU-CORPOZULIA) ubicado en la altiplanicie de Maracaibo a 66 msnm (LN 11° 00 ' ; LO 72° 00 '), zona de vida bosque muy seco tropical (5).

En cada planta se seleccionaron

6 ramas que se defoliaron y despuntaron en el segundo nudo, desde el ápice a la base, para inducir la brotación de yemas laterales. De estas ramas se tomaron dos por tratamiento, las cuales fueron sometidas a dos condiciones de sombreamiento: 50 % de sombreamiento y 30 % de sombreamiento; el resto de las ramas

estuvo totalmente en exposición solar. Para las dos condiciones de sombreamiento, las ramas se cubrieron con mallas conocidas como saran y fueron sujetadas en los extremos con cordel, permitiendo el paso de la luz y el intercambio gaseoso. Para el tiempo de crecimiento de los brotes laterales se evaluaron los periodos de 8, 16 y 24 días.

Se recolectaron los 6 primeros brotes de cada rama, éstos se sumergieron en una solución antioxidante de ácido cítrico (75 mg L^{-1}) y ácido ascórbico (50 mg L^{-1}) a una temperatura de 10°C hasta el momento de la desinfección superficial, para lo cual se empleó la metodología descrita por Ramírez (16) modificada: los explantes se expusieron por 5 min en cloro comercial al 50 % v/v (hipoclorito de sodio 2,625%), luego se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada para colocarlos en el fungicida Ridomil (3 g L^{-1}) y el antibiótico Rifampicina (300 mg L^{-1}) durante un tiempo de 15 min cada uno.

Los explantes se sembraron en tubos de ensayo ($150 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$) con 10 ml de medio nutritivo líquido de

Murashige y Skoog (14) Sigma M0153 modificado con el 50% de los macronutrientes y del hierro, suplementado con 20 g L^{-1} de sacarosa, utilizando como soporte puentes de papel Bond N° 20 (75 g m^{-2}). El pH del medio fue ajustado a 5,8 antes de esterilizarlo por 15 min a 121°C y $1,1 \text{ kg cm}^{-2}$. La temperatura de la incubadora fue de 25°C y el fotoperíodo de 12 horas luz con una intensidad luminosa de $19 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Se utilizó un diseño experimental totalmente al azar con 5 repeticiones y un arreglo factorial 3^2 correspondiente a dos factores de estudio: tipo de sombreamiento y tiempo de crecimiento, y a tres niveles de estudio para cada factor. La unidad experimental fue de 6 explantes. La variable respuesta correspondió al porcentaje de viabilidad evaluada durante 24 días después de la siembra. El análisis estadístico se realizó utilizando un análisis de la varianza mediante el empleo del procedimiento GLM (General Lineal Model) y pruebas de medias por el método de los mínimos cuadrados (21).

Resultados y discusión

El análisis estadístico arrojó diferencias ($P < 0,05$) entre los tiempos de crecimiento, no siendo así para el efecto del tiempo de sombreamiento y la interacción entre el tipo de sombreamiento y el tiempo de crecimiento. El sombreamiento de las plantas donantes en el campo resultó no significativo, lo cual difiere de lo señalado por Marks y Simpson (13),

Sharma *et al.* (22) y León de S. *et al.* (9), quienes indican que el sombreado de las plantas donantes permitió incrementar la viabilidad de los explantes y disminuir el problema de oxidación fenólica.

El mayor porcentaje de viabilidad de 58,44% fue obtenido con el tiempo de crecimiento de los brotes laterales de 8 días, el cual fue

significativo ($P < 0,05$) como se puede observar en la figura 1. Los valores de viabilidad obtenidos son altos al compararlos con los reportados por Rincón *et al.* (19) de 28% en plantas adultas de guanábano.

La viabilidad de los explantes fue posiblemente afectada por el tiempo de inmersión de los explantes en el fungicida Ridomil^a (4 g L^{-1}), ya que se notó un quemado en los mismos, coincidiendo con lo observado en guayabo cuando se utilizó este fungicida a la misma dosis (16). También es posible que el hipoclorito de sodio haya incrementado la acción

de quemado del fungicida, dicho resultado concuerda con lo reportado por Cabrera *et al.* (4), quienes evaluaron diferentes dosis de cloro y fungicida para la desinfección superficial de explantes de *A. muricata*, y recomendaron no emplear concentraciones altas de hipoclorito de sodio mayores o iguales a 2,625% v/v , debido a que disminuye la viabilidad de segmentos nodales por el quemado que ocasiona al tejido. Adicionalmente, Ramírez *et al.* (17) señalan que la concentración de 2% de hipoclorito de sodio por 5 ó 10 min disminuyó notablemente la viabilidad

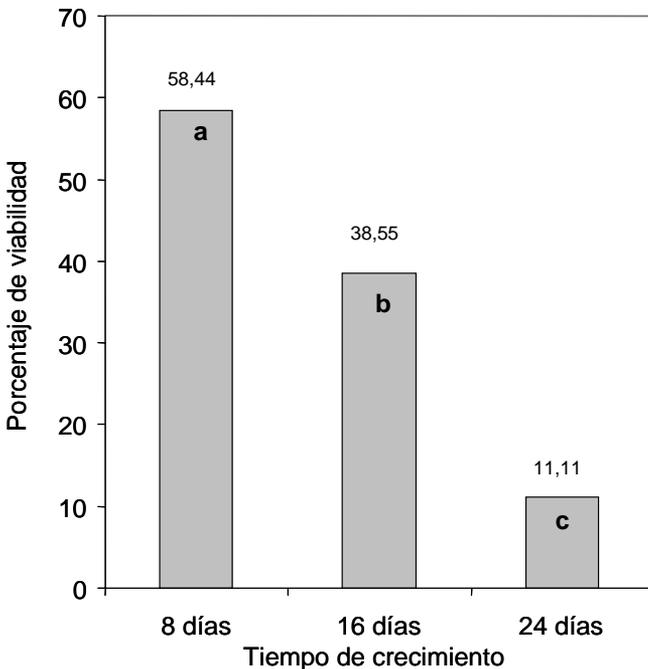


Figura 1. Efecto del tiempo de crecimiento de brotes laterales de *Annona muricata* L. en el porcentaje de viabilidad, a los 24 días de cultivo *in vitro*. Medias con letras distintas difieren significativamente ($P < 0,05$).

en segmentos nodales de guanábano.

Otro aspecto que pudo afectar la viabilidad de los explantes fue la recolección del material en solución antioxidante a una baja temperatura (10 °C) y bajo las condiciones de sombreamiento, debido a que esta situación fue reportada por León de

Sierralta *et al.* (10), como negativa ya que puede inducir una disminución de la viabilidad. Los resultados que obtuvieron indican que el procedimiento de recolección de los explantes debe ser el uso del antioxidante a baja temperatura o el uso del sombreamiento.

Conclusiones y recomendaciones

La utilización de sombreamiento a plantas donantes de *A. muricata* para las condiciones de este experimento no fue necesaria para la obtención de explantes viables.

Para la obtención de los explantes viables de *A. muricata* se sugiere la recolección de los brotes laterales no sombreados a los 8 días de crecimiento después de haber realizado la poda en las plantas donantes.

El efecto combinado del uso del hipoclorito de sodio al 2,625% por 5 min y del fungicida Ridomil^a a razón de 4 g L⁻¹ por 15 min, utilizados durante la desinfección superficial de los explantes, posiblemente afectó el porcentaje de viabilidad, por lo cual se recomienda disminuir la concentración y el tiempo de inmersión de los explantes en el hipoclorito de sodio y en el fungicida.

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento al concejo de Desarrollo Científico y Humanístico

de La Universidad del Zulia. (CONDES-LUZ No. 01458-98 y 1790-00).

Literatura citada

1. Avilán, L., F. Leal y D. Bautista. 1992. Manual de Fruticultura. Editorial América C.A. Segunda edición. Caracas. Venezuela. 1469 p.
2. Albornoz, L., L. Fernández, S. León de Sierralta y C. Castro de Rincón. 1993. Efecto del tratamiento de plantas donantes y del número de explantes a utilizar para el control de la contaminación y ennegrecimiento en el cultivo *in vitro* de *Annona muricata* L. Memorias VI Jornadas Científicas Técnicas de la Facultad de Agronomía (LUZ). Maracaibo, Venezuela. p. 23.
3. Bejoy, M. y M. Hariharan. 1992. *In vitro* plantlet differentiation in *Annona muricata* L. Plant Cell Tissue and Organ Culture 31: 245-247.
4. Cabrera, J., R. Meleán y H. Vázquez. 2000. Evaluación de diferentes dosis de cloro y fungicida utilizados en la esterilización superficial de explantes de *Annona muricata* L. Memorias XIV Congreso Venezolano de Botánica. Caracas, Venezuela. p. 65.
5. COPLANAR. 1975. Inventario Nacional de Tierras. Región Lago de Maracaibo. Atlas MAC-

CENIAP. Caracas, Venezuela.

6. Dalal, M. A., B. B. Sharma y M. Srinivasa R. 1992. Studies on stock plant treatment and initiation culture mode in control of oxidative browning *in vitro*. Cultures of grapevine. Scientia Hort. 51: 35-41.
7. Jordán, M., L. Inturriaga, C. Roveraro y A. Goreux. 1991. Promotion of cherimola *in vitro* shoot morphogenesis as influenced by antioxidants. Gartenbauwissenschaft 56: 224-227.
8. Lemos, B. y J. Blake. 1996. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. J. of Hort. Sci. 72: 395-403.
9. León de S. S., L. Arenas de M. y Z. Viloria. 1997. Efecto de la exposición solar de las plantas donantes en la iniciación del cultivo *in vitro* de guayabo (*Psidium guajava* L.). Rev. Fac. Agron. (LUZ) 14: 43-55.
10. León de S. S., M. Ramírez y D. Medina. 1999. Comparación de métodos de recolección de explantes de *Annona muricata* L. En Memorias: II Congreso Internacional de *Annonaceas*. Tuxtla Gutiérrez. México. p. 84.
11. Loomis, W. D. y J. Battaile. 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phitochem. 5: 423-438.
12. Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro* en meristemas y la organogénesis. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 162 p.
13. Marks, T. y S. Simpson. 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stock plants to darkness or low levels of irradiance. J. of Hort. Sci. 65: 103-111.
14. Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-493.
15. Nash, D. T. y M. E. Davies. 1972. Some aspects of growth and metabolism of Paul's Scarlet rose cell suspension. J. Expt. Bot. 23: 75-91.
16. Ramírez, M. 1998. Tratamientos a plantas madres y al explante para el establecimiento *in vitro* del guayabo (*Psidium guajava* L.). Trabajo de Grado. Maracaibo. La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. División de Estudios para Graduados. Programa Fruticultura. Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. 132 p.
17. Ramírez, M., A. Urdaneta y S. León de S. 2002. Establecimiento *in vitro* de explantes adultos del guanábano (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 19: 48-55.
18. Rasai, S., A. P. George y A. S. Kantharajah. 1995. Tissue culture of *Annona* spp. (Cherimoya, atemoya, sugar apple y soursop): A review. Scientia Horticulturae 62: 1-14.
19. Rincón, A., R. Ortega, J. Urdaneta, S. León de S., B. Bracho y M. Ramírez. 1999. Establecimiento aséptico de brotes laterales de *Annona* spp. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 16: 76-81.
20. Sandoval, J. y L. Muller. 1989. Consideraciones sobre la conservación *in vitro* de Musáceas; posibilidades y limitaciones. ASBANA 13: 21-24.
21. SAS, Institute, Inc. 1987. SAS (Statistical Analysis System) The Institute INC, Cary, NC, USA.
22. Sharma, H. C., R. R. Sharma y A. M. Goswami. 1995. Effect of etiolation on polyphenoxidase activity in shoots of grape and its subsequent *in vitro* survival. Indian J. Hort. 52: 104-107.
23. Yu, D. y C. P. Meredith. 1986. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 11: 972-975.