

Tipo de explante en el establecimiento *in vitro* del guanábano (*Annona muricata* L.)¹

Explant for *in vitro* establishment of soursop (*Annona muricata* L.)

G. del C. Rivero Maldonado², M. del C. Ramirez Villalobos² y S. León de Sierralta³.

Resumen

La micropropagación de frutales tropicales y subtropicales a través de segmentos nodales permite la propagación clonal de individuos seleccionados. Con la finalidad de determinar el efecto del tipo de explante en el establecimiento *in vitro* de *Annona muricata* se llevó a cabo esta investigación. Para ello se tomó el ápice (ÁPI) y desde éste hacia la base de la rama segmentos de las posiciones nodales 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 (PN3, PN4, PN5, PN6, PN7, PN8 y PN9, respectivamente). El diseño estadístico fue totalmente al azar con arreglo en parcelas divididas, considerando 3 repeticiones de 10 explantes cada una. Las variables evaluadas fueron porcentajes de: contaminación por hongos (PH), bacterias (PB), ambas o contaminación total (PCT), oxidación (PO), brotación (PBR) y viabilidad (PV). Los resultados demostraron que PH fue mayor en las posiciones nodales más lejanas al ápice de la rama, a diferencia de PO cuyos niveles aumentaron a medida que estas se acercaban al mismo: PN3, PN4 y PN5 ($P < 0,01$). PBR fue mayor en PN3 y PN4, la cual ocurrió a los 28 días del cultivo. Los segmentos nodales correspondientes a las posiciones 3 y 4 favorecieron el establecimiento *in vitro* de *Annona muricata* L.

Palabras clave: *Annona muricata*, contaminación, oxidación, brotación, viabilidad, posición nodal, ápice.

Abstract

The micro-propagation of tropical and subtropical fruit trees through nodal segments permits the clonal propagation of selected individuals. This research was conducted with the purpose of determining the effect of explant type in the *in vitro* establishment of *Annona muricata* L. Shoot tips and segments with nodal

Recibido el 15-6-2000 ● Aceptado el 23-7-2001

1. Proyecto de investigación financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES No. 01458-98 y 1790-00).

2. La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. Departamento de Botánica, Apartado 15205, Maracaibo ZU 4005, Venezuela. Fax : 5861-596183. E-mail: riverogisela@cantv.net.

3. La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. Departamento de Química.

positions 3, 4, 5, 6, 7, 8 & 9 counting from the apex to the base of the branches (NP3, NP4, NP5, NP6, NP7, NP8 & NP9 respectively) were used in this case. The statistical design was completely random with split-plot design, with 3 replications of 10 explants each. The variables measured were percentage of fungi contamination (FP), percentage of bacterial contamination (BP), combined or total contamination (TP), oxidation (BP), shoot production (SP) and viability (VP). Results indicated that FP was higher on the nodal positions farther from the apex of the branches as compared to BP for which the percentages increased as they were neared the apex : PN3, PN4 and PN5 ($P < 0.01$). The percentage of shoot production (SP) was higher on PN3 and PN4, which occurred t 28 days of culture. Nodal segments with positions 3 and 4 favored *in vitro* establishment of *Annona muricata* L.

Key words : *Annona muricata*, contamination, browning, shoot production, viability, nodal position, shoot tip.

Introducción

Las Annonáceas son originarias de América tropical. Actualmente se han extendido hacia regiones tropicales y subtropicales libres de heladas de otros continentes, debido a que pueden ser propagadas fácilmente por semillas; además pueden ser cultivadas en un amplio rango de condiciones climáticas, desde las tierras bajas del trópico hasta los 1.000 m.s.n.m., con exigencias de períodos secos en la época de floración, prosperando a temperaturas medias anuales entre 25-28 °C (15).

En Venezuela, el guanábano (*A. muricata* L.) constituye uno de los frutales con grandes perspectivas, tanto para el mercado nacional como internacional, dada sus cualidades nutricionales para consumo fresco y agroindustrial (1).

Por el hecho de propagar el guanábano masivamente a través de semillas, bien sea obteniendo patrones para injerto o variedades comerciales, ha existido una gran desuniformidad

en las plantaciones comerciales (tamaño de fruto, porte del árbol, número de frutos por árbol, etc.), repercutiendo todo ello en bajas considerables de la producción por unidad de superficie cultivada (4). Lo anterior, torna imperativo la búsqueda de otras formas de propagación que permitan una mayor uniformidad de los lotes al disminuir la variabilidad genética; en este sentido la propagación asexual juega un rol de relevante importancia. La clonación de individuos seleccionados por productividad, calidad, resistencia a patógenos, entre otras características, por medio de técnicas convencionales (injertos, enraizamientos de estacas y acodos) o por el cultivo *in vitro* de órganos, tejidos o células puede dar como resultado una ganancia genética importante en una sola generación. Por otra parte, permite la multiplicación de híbridos e individuos poliploides (3).

En la actualidad el desarrollo del

cultivo *in vitro* en frutales resulta poco probable como técnica de propagación para el establecimiento de huertos comerciales; este debe estar enfocado hacia la propagación de árboles con características sobresalientes, hasta un futuro no lejano, donde este objetivo sea una realidad en los programas de producción frutícola como técnica complementaria de los métodos convencionales de propagación (11).

El desarrollo de una tecnología para la propagación *in vitro* de plantas adultas de *A. muricata* puede acelerar los procesos de selección y multiplicación de plantas élites y puede facilitar el intercambio de material entre centros de investigación (7).

Uno de los métodos principales de regeneración de plantas *in vitro* es la formación de yemas axilares en hojas jóvenes o primordios de hojas en meristemos o yemas de tallo que han sido aislados y cultivados *in vitro*. Todas las plantas formadas por este método son genéticamente uniformes y se originan directamente de meristemos preexistentes o recientemente formados sin intervención del estado de callo (2). La formación de brotes a partir de callo es sumamente difícil, y frecuentemente

genera anomalías, no garantizando la propagación clonal (6).

Al utilizar yemas vegetativas de segmentos nodales tomados de árboles adultos, se desarrolló una técnica exitosa para propagar *in vitro* un híbrido de *A. squamosa* X *A. cherimola*. Esta permitió obtener 3 a 4 brotes producidos por explante, usando para ello el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS), suplementado con 0,5 mg L⁻¹ de bencilaminopurina (BAP) y kinetina (KIN) 100 mg L⁻¹ (10).

Estableciendo segmentos nodales de un cultivar de chirimoya (*A. cherimola* cv. "Concha lisa"), sobre el medio Nitsh y Nitsh, suplementado con 1 mg L⁻¹ de benciladenina (BA) y 0,1 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) se obtuvo 50 % de explantes con brotes en inicio y 40 % con brotes desarrollados (5).

Con la finalidad de establecer una metodología para el establecimiento *in vitro* de explantes provenientes de plantas adultas de *A. muricata* se planteó el siguiente objetivo: evaluar el efecto del tipo de explante : ápice y segmentos nodales sobre el establecimiento *in vitro* de esta especie.

Materiales y métodos

Se seleccionó una planta donante de seis años de edad de *A. muricata* propagada por semilla, de donde fueron escogidas ramas terminales ubicadas en el tercio central de la misma, a las que se les eliminaron las hojas cuidando de no maltratar las yemas ; luego, fueron sumergidas en una solución antioxidante

de ácido cítrico y ácido ascórbico de marca SIGMA (0,25 g L⁻¹), durante su traslado al laboratorio . Posteriormente se separó el ápice y los segmentos nodales de las posiciones 3^{era}, 4^{ta}, 5^{to}, 6^{ta}, 7^{ma} , 8^{va} y 9^{na} nudo desde el ápice de la rama hacia su base, midiendo cada sección entre 1 a 1,5 cm . La 1^{era} y 2^{da} posición

fueron eliminadas, puesto que se deterioraron durante el corte y transporte.

El protocolo de desinfección utilizado fue el descrito por Ramirez (13), con ciertas modificaciones tal como es descrito a continuación : inmersión por un período de tiempo de 5 minutos en cloro comercial al 15% (hipoclorito de sodio 5,25% i.a.), seguido por tres enjuagues con agua destilada esterilizada. Luego se introdujeron en una solución fungicida a base de 4 g L^{-1} de benomil durante un período de 10 minutos y por último en una solución bactericida de rifampicina (300 mg L^{-1}) por 10 minutos.

El medio de cultivo utilizado fue el de Murashige y Skoog (9) a la mitad de la concentración de las sales, complementado con 1 mg L^{-1} de cada una de las siguientes vitaminas : tiamina, piridoxina y ácido nicotínico, 100 mg L^{-1} de mioinositol, 20 g L^{-1} de sacarosa y 7 g L^{-1} de agar marca Sigma. El pH del medio se ajustó a 5,8 antes de esterilizarlo en autoclave a 121°C y $1,1 \text{ Kg cm}^{-2}$ por 15 min. El medio fue suplementado con $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de bencilaminopurina (BAP) y por último dispensado en tubos de ensayos de dimensiones $150 \times 25 \text{ mm}$ agregando 10 mL por tubo. La implantación de los explantes se llevó a cabo individualmente en cada tubo, los cuales se mantuvieron en una incubadora durante 49 días bajo condiciones controladas (Temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas y $23,26 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Los tratamientos correspon-

dieron al ápice y segmentos nodales de acuerdo a la posición que ocupaban los nudos en la rama, asignándoles la siguiente identificación : ápice, tercera posición nodal, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava y novena.

El diseño experimental utilizado fue totalmente al azar con un arreglo en parcelas divididas, utilizando tres repeticiones por tratamiento y diez explantes como unidad experimental.

Semanalmente fueron realizadas las observaciones evaluándose las siguientes variables : porcentaje de viabilidad, % de contaminación por hongos, % de contaminación por bacterias, % de contaminación por ambos o contaminación total, % de oxidación y % de brotación. Los hongos fueron detectados por medio de la presencia de micelio y las bacterias a través de los exudados presentes en el explante. Así mismo fue considerado explante viable, aquel que presentaba color verde uniforme y sin presencia de organismos contaminantes y explante oscurecido aquel parcial o totalmente ennegrecido (13).

Para las variables de estudio que no presentaron una distribución normal procedió a aplicarse una transformación, empleando el arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción de la variable respuesta. El análisis de los resultados se realizó utilizando el procedimiento GLM del paquete Statistycal Analisis System (17), y la comparación de medias a través de la prueba de Duncan para estimar los efectos simples.

Resultados y discusión

Porcentaje de Contaminación.

Al analizar los resultados, puede observarse que se presentaron diferencias significativas ($P < 0,01$) entre tratamientos para todas las variables estudiadas, excepto para el Porcentaje de contaminación por Bacterias (cuadro 1), encontrándose en un rango de 16,66 % y 4,28 %, valores considerados bajos cuando se trabaja con frutales leñosos provenientes del campo en condiciones tropicales (8). Estos bajos porcentajes se pueden atribuir al método de desinfección utilizado en el cual se aplicó rifampicina 300 mg L⁻¹ en un tiempo de 10 min, ya que en guayabo el utilizar este mismo antibiótico a igual dosis y tiempo permitió reducir la presencia de las bacterias (13).

Porcentaje de contaminación por Hongos. El mayor valor fue para la novena posición nodal (81,91%), mientras que el menor correspondió a la cuarta (1,43 %). Al relacionar el comportamiento de los diferentes explantes se determinó que el ápice, la tercera y cuarta posición nodal no presentaron diferencias. La tendencia general fue que a medida que la posición se alejaba del ápice mayor era la contaminación por hongos. Se infiere que esto puede tener relación con el tamaño del explante el cual era mayor en aquellos correspondientes a las posiciones nodales 9, 8, 7 y 6. En diversas investigaciones se ha observado que al reducir el tamaño del explante se disminuye la contaminación y el problema de desinfección superficial (16, 18). Así mismo, se puede observar que los valores de la variable

porcentaje de contaminación total (contaminación por hongos + contaminación por bacterias), estuvieron influenciados por el efecto del porcentaje de hongos, siguiendo su tendencia. En diversas especies leñosas propagadas a través de segmentos nodales, el establecimiento *in vitro* de los cultivos se ve dificultado por la contaminación con hongos, bacterias o ambos (14), lo cual coincide con esta investigación.

Porcentaje de Oscurecimiento. Se observa como el ápice presentó el mayor valor (69,52 %), al compararlo con las diferentes posiciones nodales. La séptima, octava y novena posición arrojaron los valores más bajos y no mostraron diferencias entre sí; así como la tercera, cuarta y quinta expresando valores intermedios de la variable. Estos resultados coinciden con los obtenidos en guayabo donde a medida que la distancia entre la posición nodal y el ápice terminal se hacía mayor, la oxidación fenólica disminuía. En esa misma investigación, las yemas laterales del primer nudo se oxidaron completamente y los mejores resultados se obtuvieron con los segmentos nodales del tercer y cuarto nudo (12).

Se presume que existe una relación entre la oxidación y la posición que ocupa el nudo en la rama, ya que en cultivos como la uva (*Vitis vinifera* L.), se ha detectado un efecto significativo de la posición de los ápices, determinando menor contenido de compuestos fenólicos en los laterales que en los terminales, con la consecuente reducción de la oxidación (19).

Cuadro 1. Efecto del tipo de explante sobre los porcentajes de contaminación por hongos, contaminación total, oxidación, brotación y viabilidad en el establecimiento *in vitro* del guanábano *Annona muricata* L.

Tratamiento	Porcentaje de contaminación por Hongos	Porcentaje de Contaminación Total	Porcentaje de Oxidación	Porcentaje de Brotación	Porcentaje de Viabilidad
Ápice	5,71e	14,29d	69,52a	13,33ab	30,48b
Tercera posición Nodal	6,19e	15,24d	23,8b	22,86ab	74,76a
Cuarta posición Nodal	1,43e	18,09 d	25,24b	26,67a	70,00a
Quinta posición Nodal	17,61d	19,52d	20,48b	24,76a	69,57a
Sexta posición Nodal	30,00c	42,38c	10,61bc	20,95ab	56,67a
Séptima posición Nodal	70,00b	80,48ab	2,64c	7,62abc	25,24bc
Octava posición Nodal	68,00b	70,95 b	2,38c	5,71bc	32,65b
Novena posición Nodal	81,91a	89,05 a	3,70c	0c	11,43c

Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0,01$).

Porcentaje de Brotación.

La brotación ocurrió a los 28 días del cultivo, alcanzando su mayor valor en la cuarta posición nodal con 26,67 % y un bajo porcentaje en la novena debido a la alta incidencia de hongos. No se determinaron diferencias estadísticas significativas entre la cuarta y tercera posición. Estos resultados son similares a los obtenidos en guayabo (*Psidium guajava* L.), donde las posiciones intermedias, especialmente la tercera posición nodal, exhibió el mayor porcentaje de brotación (12).

Porcentaje de Viabilidad. Los mayores porcentajes se observaron en las posiciones intermedias: tercera, cuarta, quinta y sexta, donde no hubo diferencias entre sí; mientras que la

novena obtuvo el valor mas bajo; es importante señalar que esta variable se mantuvo constante después de los 20 días de cultivo.

La viabilidad estuvo mayormente influenciada por la presencia de organismos contaminantes que por efecto la oxidación, ya que las posiciones nodales que presentaron la menor viabilidad fueron las que arrojaron la más alta incidencia de contaminación por hongos. Ello se contradice con lo obtenido en segmentos nodales de guayabo (13), en donde se logró obtener entre 80 a 100% de viabilidad al cultivarlos *in vitro* aplicando un protocolo de desinfección muy parecido al empleado en esta investigación.

Conclusiones

En el establecimiento *in vitro* del guanábano *Annona muricata*, la tercera y cuarta posición nodal mostraron un mejor comportamiento al presentar menores porcentajes de contaminación por hongos y en consecuencia mayor porcentaje de viabilidad con respecto a las otras

posiciones.

El establecimiento *in vitro* de *A. muricata* a través de segmentos nodales es factible si se controlan factores como la contaminación por hongos y la oxidación en la primera etapa del cultivo.

Recomendaciones

Evaluar el efecto de la aplicación de diversos fungicidas a diferentes dosis e intervalos en las plantas madres a fin de controlar en mayor medida la contaminación por hongos.

Evaluar otros tiempos de exposición de los explantes a los desinfectantes superficiales cloro, benomil y rifampicina, empleados en la presente investigación.

Literatura citada

1. Avilán, L. ; F. Leal y D. Bautista. 1992. Manual de Fruticultura. Principios y manejo de la producción. Segunda edición. Tomo I. Editorial América C. A. Caracas, Venezuela p. 777-1472.
2. Binding, H. 1975. Reproducibly high plating efficiencies of isolated mesophyll protoplasts from shoot cultures of Tobacco. *Physiology Plantarum* 35 : 225-227.
3. Caso, O. H. 1992. Juvenilidad, rejuvenecimiento y propagación vegetativa de las especies leñosas. *Agriscientia* 9 : 5-16.
4. George A. P. y R. J. Nissen. 1987. Propagation of *Annona* Species : a Review. *Scientia Horticulturae*. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam 33 : 75-85
5. Jordan, M., L. Iturriaga, C. Roveraro y A. Goreux. 1991. Promotion of *Annona cherimola* *in vitro* shoot morphogenesis as influenced by antioxidants. *Gartenbauwissenschaft* 56: 224-227.
6. Krikorian, A. D. 1991. Propagación clonal *in vitro*. p. 95-125. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT. Cali, Colombia. Publicación N° 151.
7. Lemos, E. E. P. y J. Blake. 1996. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. *Journal of Horticultural Science* 71: 395-403.
8. Litz, R. E. y R. Conover. 1981. Effect of sex type, season and other factors on the *in vitro* establishment and culture of *Carica papaya* L. explants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106: 792-794.
9. Murashige, T y P Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Phys. Plant.* 15: 473-493.
10. Nair, S., P. K. Gupta y A. F. Mascarenhas. 1984. *In vitro* propagation of *Annona* hybrid (*Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* L.). *Indian J. Hortic.* 4: 160-165.
11. Pardos, J. A. y M. Toribio. 1984. El cultivo *in vitro* aplicado a la mejora forestal. *Comunicaciones I.N.I.A. Serie Recursos Naturales* N° 28. 55 p.
12. Pirela, M. y N. Mogollón. 1996. *In vitro* clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Mara-7 from stem shoots of cv. Mara-7. *Acta Horticulturae* 452: 47-52.
13. Ramirez, M. 1998. Tratamientos a plantas madres y al explante para el establecimiento *in vitro* del guayabo (*Psidium guajava* L.). La Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía, Maracaibo – Venezuela. Trabajo de Grado para optar al título de Magister Scientiarum en Fruticultura. 132 p.
14. Rey, H. Y., O. J. Burtnik, P. A. Sansberro y L. A. Mroginski. 1991. Medios de cultivo para el establecimiento *in vitro* de explantos de yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *Turrialba* 41: 306-310.
15. Samson. 1991. *Fruticultura Tropical*. Primera edición. Editorial Limusa, Grupo Noriega editores. México. 396 p.
16. Sandoval, J. A. y L. E. Muller. 1992. Influencia del tamaño del explante en la propagación *in vitro* de cuatro cultivares de *Musa*. *Turrialba* 42: 243-248.
17. SAS, Institute, INC. 1987. SAS (Statistical Analysis System) the Institute INC, Cary, NC, USA.
18. Somarribas, Y., G. Nir, L. Fanberstein y S. Lavee. 1983. The effect of cyanamide on the release from dormancy of grapevine buds. *Scientia Hort.* 19: 97-104.
19. 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.