

## Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas jóvenes de *Annona muricata* L.

Leyanis García-Águila<sup>1\*</sup>; José Manuel Álvarez<sup>2</sup>, Yelenys Alvarado-Capó<sup>1</sup>, Milagros González<sup>1</sup>, Mariana La O<sup>1</sup>; Deivis Mirabal<sup>1</sup>, Carlos Romero<sup>1</sup>. \*Autora para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5 Santa Clara, Villa Clara. Cuba, CP 54 830. e-mail: leyanis@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Grupo Empresarial LABIOFAMAve. Independencia, km 16 1/2, Boyeros, La Habana, Cuba.

### RESUMEN

El empleo del cultivo *in vitro* de tejidos para la propagación vegetativa de árboles promisorios de guanábana (*Annona muricata* L.), puede contribuir a incrementar la disponibilidad de plantas para el desarrollo de plantaciones en campo. Es por ello, que este trabajo tuvo como objetivo establecer *in vitro* segmentos nodales de plantas jóvenes de guanábana. Los segmentos nodales con 1.5 cm de longitud se desinfectaron superficialmente con etanol al 70% durante un minuto e hipoclorito de sodio (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0%), durante 15 minutos. A los 15 y 25 días de cultivo se evaluó la presencia de contaminación microbiana, el número de segmentos con brotación de la yema axilar, así como la longitud (cm) del brote. Los resultados mostraron una baja incidencia de contaminantes fúngicos. Sin embargo, el 3.8% de los segmentos se contaminaron con bacterias en el tratamiento de menor concentración de hipoclorito de sodio. En el 73% de los explantes se observó brotación de la yema axilar cuando se utilizó hipoclorito de sodio al 1.0%, sin diferencias significativas con 1.5%. A los 25 días de cultivo se apreció crecimiento de los brotes con la presencia de las primeras hojas expandidas y su longitud osciló entre 0.8 y 1.5 cm. Sin embargo, con el incremento del tiempo de cultivo se produjo abscisión de las hojas. Estos resultados demuestran que se puede utilizar el cultivo *in vitro* para la propagación de guanábana. No obstante, hay que profundizar en el estudio de las condiciones de cultivo durante la fase de multiplicación.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, brotación, contaminación microbiana, oxidación fenólica.

## *In vitro* establishment of nodal segments of *Annona muricata* L. young plants

### ABSTRACT

The use of tissue *in vitro* culture for plant propagation of soursop (*Annona muricata* L.) promissory trees can help increasing the availability of plants for developing field plantations. Considering these aspect, this work aimed to establish *in vitro* nodal segments of young plants of soursop. Nodal segments with 1.5 cm of length were superficially disinfected with 70% ethanol during one minute and with sodium hypochlorite (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0%) during 15 minutes. The presence of microbial contamination and the number of segments with axillary buds were evaluated after 15 and 25 days of culture. The length (cm) of buds was also determined. Results showed a low incidence of microbial contamination in the explants because the presence of fungi in treatments was not observed. However, 3.8% segments were contaminated with bacteria in the treatment with lower concentration of sodium hypochlorite. Axillary shoots were observed in 73.0% of explants when 1.0% of sodium hypochlorite was used, without significant differences using 1.5%. Shoots development with first expanded leaves and a length ranged between 0.8 and 1.5 cm was observed after 25 days of culture. Increasing culture time, plants showed leaf abscission. These results demonstrate that *in vitro* culture can be used for the propagation of soursop. However, we must make emphasis in the study of the culture conditions for the multiplication phase.

Key words: *in vitro* culture, microbial contamination, phenolic oxidation, shoot production.

### INTRODUCCIÓN

La guanábana (*Annona muricata* L.) es un árbol frutal que pertenece a la familia Anonacea.

Es originaria de las regiones tropicales de América del Sur y se encuentra dispersa en Mesoamérica y las Antillas (Pinto *et al.*, 2005). Por sus aplicaciones en las industrias

agropecuaria y farmacéutica esta especie ha ganado importancia en diferentes países de América Latina (Cordeiro *et al.*, 2005). Su fruto se distingue por su excelente sabor y contenido de calcio, fósforo, vitaminas y fibras. Además, posee sustancias como las acetogeninas con reconocida actividad citotóxicas en células cancerígenas y biopesticida (Badrie y Schauss, 2010).

En Cuba, la siembra de *Annona muricata* L. ha estado limitada a patios y jardines de viviendas (Rodríguez-Dopazo *et al.*, 2010). Su método natural de propagación es a través de semillas, las cuales presentan una germinación irregular por poseer diferentes niveles y tipos de dormancia. Esto hace que el tiempo requerido para formar una planta sea muy largo (Pinto, 2005).

La propagación vegetativa es la más indicada para proporcionar plantas uniformes. Existen varios métodos como el acodado aéreo, estaquillado y el injerto, siendo este último el más utilizado (Pinto *et al.*, 2005). Según Barros-Neto (2008), la producción de plántulas de *Annonas* comerciales en condiciones de campo es extremadamente cara. Los patrones tardan alrededor de un año para alcanzar el desarrollo óptimo y el injerto puede dar lugar a graves problemas en relación con el vigor de las plantas, la productividad, así como el riesgo de transmisión de patógenos (Soares y Martins, 2003). Para el fomento de plantaciones de esta especie vegetal se requiere de gran cantidad de plantas de calidad genética y fitosanitaria con el propósito de obtener altos rendimientos en campo.

En este sentido, el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales podría contribuir a la propagación vegetativa, a partir de árboles promisorios de *Annona muricata* L. En la literatura científica se encuentran avances relacionados con el tema en diferentes especies de *Annona*. Sin embargo, en *Annona muricata* L. se presentan dificultades relacionadas con el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales procedentes de plantas adultas. Algunos autores han observado alta contaminación microbiana, oscurecimiento de los explantes por oxidación fenólica y bajos porcentajes de brotación de las yemas (Bring, 2000; Rivero *et al.*, 2001; Ramírez-Villalobos *et al.*, 2002; Velázquez *et al.*, 2004).

El desarrollo de una metodología a través del cultivo *in vitro* permitiría altas tasas de multiplicación, la obtención de plantas vigorosas, productivas, libres de microorganismos patógenos y fieles al fenotipo seleccionado en campo. Es por ello, que se requiere determinar las condiciones de trabajo para lograr la desinfección superficial de los explantes y altos porcentajes de brotación de las yemas axilares. Teniendo en cuenta los aspectos anteriormente descritos, este trabajo tuvo como objetivo establecer *in vitro* segmentos nodales a partir de plantas jóvenes de *Annona muricata* L.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal*

Se utilizaron plantas procedentes de semillas de árboles seleccionados por el Grupo Empresarial LABIOFAM, las cuales permanecieron en casa de cultivo bajo condiciones semicontroladas (Fig. 1A). Estas se desarrollaron en bolsas con 500 cm<sup>3</sup> de un sustrato, compuesto por 80% de materia orgánica (compost) y 20.0% de zeolita. A partir de los cuatro meses se realizaron podas periódicas para estimular la formación de nuevos brotes y de esta forma mantener el estado juvenil de las plantas donantes. Cuatro semanas antes de la colecta de los explantes se efectuó la aplicación foliar de un fungicida sistémico (Benomyl) a una concentración de 2.0 g l<sup>-1</sup> (i.a).

### *Establecimiento in vitro de las plantas donantes*

A los ocho meses de cultivo se colectaron los cuatro primeros segmentos nodales a partir de la yema terminal de la rama (Fig. 1B). Cada segmento con su yema axilar, desprovistos de hojas y de aproximadamente 1.5 cm de longitud se introdujeron en recipientes que contenían una solución antioxidante estéril de ácido cítrico (100 mg l<sup>-1</sup>). La desinfección superficial se realizó con etanol al 70% durante un minuto y posteriormente se colocaron en diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0%), durante 15 minutos. Transcurrido este periodo se efectuaron tres enjuagues con la solución antioxidante descrita anteriormente.



Figura 1. Plantas de *Annona muricata* L. procedentes de semillas en casa de cultivo después de ocho meses (A). Rama de la planta mostrando los cuatro primeros segmentos nodales a partir de la yema terminal (B).

Cada segmento nodal se colocó en un tubo de cultivo (15.0 x 2.5cm) que contenía 10ml de medio de cultivo en estado semisólido (2.5 g l<sup>-1</sup> de Phytigel), el cual estaba compuesto por las sales de Murashige y Skoog (1962) (Duchefa), 0.5 mg l<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina, 25 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y el pH se ajustó a 5.7 antes de la esterilización en autoclave.

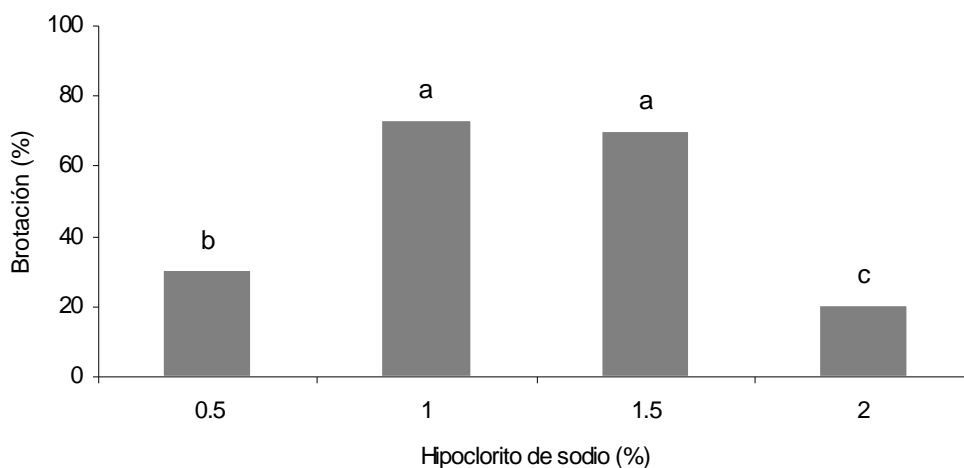
Los tubos de cultivo con material vegetal se colocaron en cámara de crecimiento con oscuridad total durante 7 días y posteriormente se trasladaron a una cámara de luz solar con densidad de flujo de fotones fotosintética (FFF) de aproximadamente 50.0-62.5  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  y 28.0  $\pm$  2.0 °C. Después de 15 y 25 días de cultivo se evaluó por observación visual y se comprobó mediante observaciones microscópicas, el número de explantes con presencia de contaminación microbiana (hongos filamentosos, bacterias y levaduras), el número de explantes con brotación de su yema axilar y se midió la longitud (cm) de los brotes desde la inserción con el segmento hasta el ápice de la última hoja emitida. A los 30 días de cultivo, el material vegetal se transfirió a un nuevo medio de cultivo con igual composición.

Los datos experimentales se procesaron con el paquete computacional SPSS (del inglés, *Statistical Package for the Social Sciences*) versión 18.0 sobre Windows. Se les comprobó los supuestos de distribución normal y heterogeneidad de varianzas. La comparación de los valores medios se efectuó mediante la prueba Mann-Whitney para un 0.05% de significación.

## RESULTADOS

Durante los primeros 15 días de cultivo, los explantes no mostraron contaminación ocasionada por hongos en ninguno de los tratamientos. Sin embargo, el 3.8% de los segmentos se contaminaron con bacterias en el tratamiento con hipoclorito de sodio al 0.5%. Durante este periodo, se observó un oscurecimiento en los extremos del segmento nodal y de la fracción del peciolo que permaneció en el explante, posiblemente como consecuencia de afectaciones por el proceso de desinfección superficial. A pesar de ello, el 73.0% de los segmentos exhibió la brotación de su yema axilar cuando se utilizó hipoclorito de sodio al 1.0%, sin diferencias significativas con la concentración de 1.5% (Fig. 2). La brotación de los explantes en estos tratamientos se caracterizó por un aumento del tamaño de la yema axilar, dado por su engrosamiento, discreta elongación y mantenimiento del color verde (Fig. 3A).

A los 25 días de cultivo, en los explantes se observó el desarrollo del brote a partir de la yema axilar y las primeras hojas habiadas de color verde intenso (Fig. 3B). El 62.7% de los brotes presentaron una longitud entre 0.8 y 1.5cm, mientras que los brotes restantes mostraron una longitud inferior al 0.5cm. No se observó en la base de los segmentos nodales el oscurecimiento del medio de cultivo como resultado de la exudación de compuestos fenólicos.



Barras con letras distintas indican diferencias significativas entre las medias según la prueba Mann-Whitney, para  $p \leq 0.05$

Figura 2. Efecto de la desinfección con hipoclorito de sodio de segmentos nodales de *Annona muricata* L. sobre la brotación, a los 15 días de cultivo.

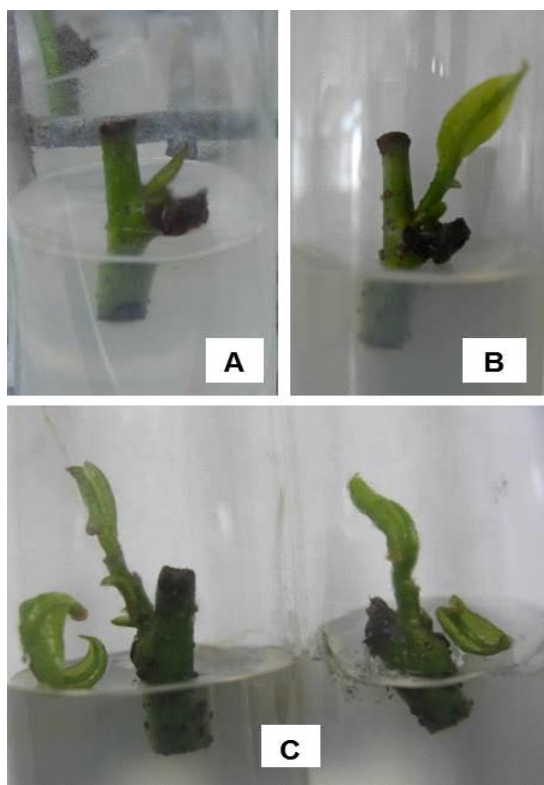


Figura 3. Yema axilar brotada en segmento nodal de *Annona muricata* L., a los 15 días de cultivo (A). Brote a los 25 días de cultivo (B). Brotes donde se observa la abscisión de las hojas después de la transferencia a medio de cultivo fresco (C).

Los brotes continuaron su crecimiento después de la transferencia a medio de cultivo fresco; pero con el incremento del

tiempo de cultivo se observó una disminución de su calidad fisiológica por la abscisión de las hojas. Hasta ese momento, las hojas se

mantenían de color verde y en el tallo solo permanecieron las hojas cercanas a la yema apical (Fig. 3C).

## DISCUSIÓN

El principal método de regeneración de plantas *in vitro* en especies leñosas lo constituye la vía organogénica, a partir del cultivo de yemas axilares presentes en los segmentos nodales de las ramas. Sin embargo, su iniciación o establecimiento *in vitro* es afectado por la incidencia de contaminación por hongos, bacterias o ambos, así como por la oxidación fenólica de los explantes (Hernández y González, 2010).

Diferentes autores, han confirmado esta problemática durante el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas adultas de *Annona muricata* L. y para reducir estas afectaciones han dirigido sus investigaciones al efecto del tipo de explante (Rivero *et al.*, 2001), a la estrategia de desinfección superficial (Ramírez-Villalobos *et al.*, 2002) y al efecto del sombreado de planta donante para la reducción de la oxidación fenólica (Velázquez *et al.*, 2004). Sin embargo, los resultados no han sido del todo satisfactorios. Por ejemplo, Rivero *et al.* (2001) observaron un incremento en la contaminación por hongos (81.91%) en la medida que los segmentos nodales se encontraban más distantes de la yema apical de la rama. Además, describen la presencia de oxidación fenólica en los diferentes tipos de segmentos. Estos autores obtuvieron a los 28 días de cultivo una brotación del 26.67% en el tercer y cuarto segmento.

Igualmente, los resultados de Ramírez-Villalobos *et al.* (2002) mostraron altos porcentajes de contaminación por hongos y bacterias (56.0 y 78.0 %, respectivamente) con viabilidad de los explantes entre 22.0 y 50.0%, dependiendo del tiempo de desinfección. Por ello, concluyeron que el hipoclorito de sodio no controló los microorganismos contaminantes presentes en los explantes procedentes de plantas adultas cultivadas en el campo.

Es posible que la causa fundamental de estos resultados esté relacionada con la utilización de yemas de árboles adultos de *Annona muricata* L., las cuales tienen problemas para su desarrollo *in vitro*, lo que se explica por la

edad de los árboles fuente de explantes. Al respecto, se considera como factor determinante en el éxito de la propagación *in vitro* de especies leñosas el estado fisiológico de la planta donante, el cual aumenta con la utilización de explantes jóvenes (Dodds, 1983) y disminuye en la medida que la planta donante se aleja de su fase juvenil. Por ello, algunos protocolos han implementado métodos para inducir revigorización al material vegetal en estado fisiológico avanzado y rejuvenecimiento al adulto que presenta un mayor desarrollo ontogénico (Fraga *et al.*, 2002).

La planta adulta de *A. muricata* presenta cambios progresivos como la pérdida de capacidad morfogénica y de su totipotencialidad, así como en los niveles hormonales. Además, *in vitro* el tejido vegetal de la planta adulta tiende a permanecer latente, a desarrollar callo y morir (Acosta *et al.*, 2011). Por ello, Ferreira de Santana *et al.* (2011) consideraron que todavía hay algunos factores que puede interferir seriamente en los procesos de organogénesis *in vitro* de especies de *Annona*, especialmente en términos de inducción de brotes en segmentos nodales.

En *A. muricata*, estos resultados constituyen el primer informe donde se obtienen altos porcentajes de desarrollo de brotes axilares (73.0%) a partir de segmentos nodales establecidos, con baja incidencia de contaminación microbiana. Después de establecidos los cultivos, una de las dificultades que se presentaron en este estudio fue la disminución de la calidad fisiológica de las plantas por la abscisión de las hojas de los explantes. En este sentido, Bring (2000) consideró que podría estar relacionado con el cierre hermético de los recipientes, lo cual provoca poco intercambio gaseoso con el exterior y trae como resultado la falta de O<sub>2</sub> y la acumulación de gases como el CO<sub>2</sub> y etileno. Estos aspectos serán considerados en estudios posteriores.

## CONCLUSIONES

En este estudio se logró el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas jóvenes de *Annona muricata* L. En el 73.0% de los segmentos nodales se produjo la brotación de la yema axilar cuando se utilizó hipoclorito de sodio al 1.0%. Además, se observó el desarrollo

de los brotes, con una longitud entre 0.8 y 1.5cm, así como de las hojas. Sin embargo, la posterior abscisión de estas evidenció la importancia de estudiar las condiciones de cultivo durante la fase de multiplicación.

## REFERENCIAS

- Acosta, MA, Peña EJ, Castro D (2011) Evaluación de medios de cultivo para la producción *in vitro* de *Annona muricata* L. mediante la técnica de microinjertación seriada. *Acta Agronómica* 60(2): 140-146
- Badrie, N, Schauss A (2010) Soursop (*Annona muricata* L.) Composition, nutritional values, medicinal uses, and toxicology. *Bioactive Foods in Promoting Health*: 621-643
- Barros-Neto, JD (2008) Conservação de polen de *Annonas* comerciais Dissertação. Mestrado em Agricultura tropical e subtropical. Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 78p.
- Bring, H (2000) Micropropagation and determination of the *in vitro* stability of *Annona cherimola* Mill. and *Annona muricata* L. Berlin, Humboldt-University. Landwir tschaftlich-Gär tnerische Fakultät, Diss. [En línea] Disponible en: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/bridg-hannia-2000-03-24/HTML/bridg-ch1.html>. Consultado 23 de junio de 2012
- Cordeiro, MCR, Pinto ACQ, Andrade SMR (2005) Uses *Annonas* species. En: Pinto, ACQ (Eds) *Annona* species, pp. 41-47. International Centre for Underutilised Crops University of Southampton, Southampton
- Dodds, JH (1983) Tissue culture of trees. AUI. Publishing. West port. Connecticut
- Fraga, M, Cañal M, Aragonés A, Rodríguez R (2002) Factors involved in *Pinus radiata* D. Don. micrografting. *Ann. For. Sci.* 59: 51-157
- Ferreira de Santana, JR, Paiva R, Valéria de Souza A, Muniz de Oliveira L (2011) Effect of different carbon sources on the *in vitro* multiplication of *Annona* sp. *Ciênc. Agrotec.* 35(3): 487-493
- Hernández Y, González ME (2010) Efectos de la contaminación microbiana y la oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de árboles frutales. *Cultivos Tropicales* 31(4): 58-69
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology plant* 13: 473-479
- Pinto, ACQ, Cordeiro MCR, Andrade SEM, Ferreira FR, Filgueiras HÁC, Alves RE, Kimparas DI (2005) *Annona* species, International Center for Underutilised Crops, University of Southampton, Southampton. 268 p.
- Ramírez-Villalobos, M, Urdaneta A, León de Sierralta S (2002) Establecimiento *in vitro* de explantes adultos del guanábano (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. *Rev. Fac. Agron.* 19: 48-55
- Rivero, GC, Ramírez MC, de Sierralta SL (2001) Tipo de explante en el establecimiento *in vitro* del guanábano (*Annona muricata* L.). *Rev. Fac. Agron.* 18: 258-265
- Rodríguez-Dopazo, A, Farrés-Armenteros E, Placeres-Gafas J, Peña-González O, Fornaris LM, Mullen L, Ramos J, Hernández-Espinosa D (2010) Una mirada al manejo del cultivo de la guanábana (*Annona muricata* L.). *Revista CitriFrut.* 27(1): 64-68
- Soares, EJ, Martins ABG (2003) Clonagem de quatro espécies de *Anonaceae* potenciais como porta-enxertos. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25(2): 286-289
- Velázquez, M, González A, Mata F, León de Sierralta S, Esparza D, Ramírez M (2004) Tipo de sombreamiento y tiempo de crecimiento de brotes laterales sobre la viabilidad de explantes de *Annona muricata* L. *Rev. Fac. Agron.* 21: 12-18

Recibido: 18-7-2013

Aceptado: 19-9-2013