

## ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE SEGMENTOS NODALES DE GUANABANA (*Annona muricata* L.) EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL SAPECHO - BOLIVIA

### In vitro establishment of nodal segments of Guanabana (*Annona muricata* L.) at the Sapecho Experimental Station - Bolivia

Marco Antonio Echenique Quezada<sup>1</sup>; Gaby Mollo Ayra<sup>2</sup>

#### RESUMEN

La guanábana (*Annona muricata* L.) es una especie frutal de creciente demanda e interés por las industrias agropecuaria y farmacéutica, el fruto posee propiedades alimenticias, excelente sabor y contenido de calcio, fósforo, vitaminas y fibras. Además de poseer sustancias como las acetogeninas con actividad citotóxicas en células cancerígenas. Este cultivo está limitado por su método de propagación por semillas. El empleo del cultivo de tejidos in vitro para la propagación masiva de árboles promisorios, constituye una alternativa que permitirá incrementar la disponibilidad de plantas para el desarrollo de plantaciones en campo. El trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Sapecho, situada en el municipio de Palos Blancos del departamento de La Paz, con el objetivo de establecer in vitro segmentos nodales de plantas adultas de guanabana, utilizando diferentes concentraciones del hipoclorito de sodio (2%, 5%, 8%) y tiempos de exposición (5 min y 10 min.), en la desinfección de los explantes. A los 21 días de cultivo se evaluó la contaminación total (hongos, bacterias), presencia de oxidación fenólica y sobrevivencia de explantes. Como resultado se observó que al utilizar el hipoclorito de sodio al 2% y 10 min de exposición e hipoclorito de sodio al 5% con tiempo de exposición de 5 min disminuyó la presencia de hongos. El hipoclorito de sodio al 8% y tiempo de exposición de 10 min, disminuyó la presencia de bacterias. Las concentraciones de hipoclorito de sodio al 5 y 8% con tiempos de 10 y 5 min respectivamente presentaron menor cantidad de explantes oxidados. El hipoclorito de sodio al 5% por 10 min registró una tasa de sobrevivencia de 30% de los explantes. Los resultados obtenidos indican que el hipoclorito de sodio no controló la presencia de microorganismos contaminantes, debido a la complejidad y el estado fisiológico de las plantas que influye significativamente en el establecimiento in vitro de segmentos nodales de guanábana.

**Palabras clave:** *Annona muricata*, concentración, segmentos nodales, Establecimiento, in vitro.

#### ABSTRACT

Soursop (*Annona muricata* L.) is a fruit species of increasing demand and interest by the agricultural and pharmaceutical industries, the fruit has nutritional properties, excellent taste and content of calcium, phosphorous, vitamins and fibers. In addition to possessing substances such as acetogenins with cytotoxic activity in cancer cells. This crop is limited by its seed propagation method. The use of in vitro tissue culture for the massive propagation of promising trees is an alternative that will increase the availability of plants for the development of field plantations. The work was carried out in the Plant Biotechnology Laboratory of the Sapecho Experimental Station, located in the municipality of Palos Blancos in the department of La Paz, with the aim of establishing in vitro nodal segments of adult Guanabana plants, using different concentrations of the hypochlorite of sodium (2%, 5%, 8%) and exposure times (5 min and 10 min.), in the disinfection of the explants. At 21 days of culture, total contamination (fungi, bacteria), presence of phenolic oxidation and explant survival were evaluated. As a result, it was observed that when using 2% sodium hypochlorite and 10 min of exposure and 5% sodium hypochlorite with an exposure time of 5 min, the presence of fungi decreased. Sodium hypochlorite at 8% and exposure time of 10 min, decreased the presence of bacteria. The concentrations of sodium hypochlorite at 5 and 8% with times of 10 and 5 min, respectively, presented fewer oxidized explants. Sodium hypochlorite at 5% for 10 min recorded a survival rate of 30% of the explants. The results obtained indicate that sodium hypochlorite did not control the presence of contaminating microorganisms, due to the complexity and physiological state of the plants, which significantly influences the in vitro establishment of nodal segments of soursop.

**Keywords:** *Annona muricata*, concentration, nodal segments, establishment, in vitro.

<sup>1</sup> Docente Investigador, Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia. manmaeq@gmail.com

<sup>2</sup> Unidad Académica Campesina Carmen Pampa. Universidad Católica Boliviana San Pablo, Bolivia. gabymolay@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

La guanábana (*Annona muricata* L.) es un árbol frutal originaria de las regiones tropicales de América del Sur y se encuentra dispersa en Mesoamérica y las Antillas (Pinto et al., 2005). Es una de las frutas tropicales con mayor aceptación en el mercado mundial por sus propiedades alimenticias y excelente sabor, es de fácil digestión, con una relación entre azúcares y acidez aceptable. Tiene además un gran potencial para la extracción de bioproductos por las propiedades medicinales terapéuticas tanto de la fruta como de otras partes de la planta (Toro, 2001).

Bolivia tuvo una superficie cultivada hasta el año 2013 de 21.8 hectáreas con una producción aproximada de 4.3 toneladas y un rendimiento de 1.23 toneladas por hectárea (INE, 2015). El municipio de Palos Blancos cuenta con una superficie cultivada de chirimoyas alrededor de 0.11 hectáreas, utilizadas para el autoconsumo (PTDI Palos Blancos, 2016).

La propagación de la guanábana puede ser efectuada por vía semilla y por propagación vegetativa. El primer caso es muy común, pero no es recomendable, porque las plantas obtenidas presentan variaciones de altura, rendimientos, calidad de la fruta, entre otras, además de iniciar la producción tardíamente. La propagación vegetativa sería la más indicada por proporcionar plantas uniformes, y con inicios de producción temprana. En ésta existen varios métodos como el acodado aéreo, estaquillado, injertación y cultivos de tejidos in vitro (Pinto y Silva, 1994).

El cultivo in vitro como técnica, consiste en cultivar asépticamente una porción aislada de la planta bajo condiciones de ambiente controlado (Roca y Mroginski, 1991). Esta técnica tiene posibilidades de ser aplicada en el género *Annona* a fin de obtener grandes cantidades de plantas sanas en menor tiempo (Rincón et al., 1999). Existen investigaciones relacionadas con la micropropagación in vitro del cultivo de la guanábana (Bejoy y Hariharan, 1992), donde se reportan ciertas limitaciones como, la selección del explante, oxidación fenólica, eliminación de contaminantes endógenos y exógenos, baja tasa de multiplicación y aclimatación, entre otros (García y Ramírez, 2005).

Teniendo en cuenta los aspectos anteriormente descritos, esta investigación tuvo como objetivo establecer in vitro segmentos nodales de plantas

adultas de guanabana, utilizando diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (2%, 5%, 8%) y tiempos de exposición (5 min y 10 min.) en la desinfección de segmentos nodales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación de la zona de estudio

La investigación fue desarrollada en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Sapecho, dependiente de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés, ubicado a 2 km de la localidad de Sapecho a 276 km de la ciudad de La Paz, Provincia Sud Yungas, municipio de Palos Blancos, altitud de 430 m s.n.m., latitud Sur 15° 33' 27.59", longitud Oeste 67° 20' 05.10", con temperaturas media anual de 28°C y una precipitación anual promedio de 1800 mm. (PDM Palos Blancos, 2012).

### Metodología

La investigación realizada fue descriptiva, evaluándose el comportamiento de los explantes en diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) y el tiempo óptimo de exposición para la desinfección. El medio de cultivo que se utilizó en la fase de establecimiento fue el planteado por Murashige y Skoog (1962) + 0.5 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina + 1.5 mg L<sup>-1</sup> AIB (Ácido 4-indol-3-butírico) + 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 6 g L<sup>-1</sup> de agar. El pH del medio se ajustó a 5.7, estos medios de cultivo se dispensó en tubos de ensayo de (150 mm x 26 mm) en una cantidad de 10 ml de medio de cultivo (M.S.), antes de esterilizarlo en autoclave a 121°C y 1.1 kg cm<sup>-2</sup> por 20 min.

Se seleccionaron brotes terminales de árboles cultivados en campo de la Estación Experimental Sapecho, observando las características fenotípicas de la planta, producción y estado fitosanitario, estos brotes fueron enjuagados con agua destilada, para luego colocarlos en una solución antioxidante (ácido cítrico, 100 mg L<sup>-1</sup>), hasta el traslado al laboratorio, donde permanecieron hasta la desinfección superficial de los explantes. La desinfección del material vegetal se la realizó lavando los brotes con detergente comercial, para luego enjuagarlos tres veces con agua destilada estéril, se procedió al corte de cada segmento nodal con su yema axilar, aproximadamente 2 cm de longitud, estos se introdujeron en recipientes que contenían etanol al 70% durante un minuto y posteriormente se colocaron los explantes en los tratamientos. Luego se

los colocó en una solución con fungicida Benlate 2 g L<sup>-1</sup> y bactericida Biocep 2 ppm durante 5 min, los explantes fueron lavados con agua destilada estéril tres veces. Para el establecimiento in vitro y las condiciones de incubación, dentro de la cámara de flujo laminar se realizó una segunda desinfección con etanol al 70% durante 30 segundos e hipoclorito de

sodio al 1% durante un minuto, para luego realizar el enjuague con agua estéril en tres oportunidades, antes de realizar la siembra al medio de cultivo, se sumergió en una solución antioxidante ácido cítrico (100 mg L<sup>-1</sup>) durante diez segundos. Los segmentos nodales sembrados fueron de 0.8 a 1.0 cm de longitud, cada uno con su yema axilar desprovistos de hojas.



Figura 1. Desinfección (Izq.), disección (Cent.) y establecimiento de los segmentos nodales de Guanabana (Der.).

Una vez realizada la siembra de los explantes, los frascos fueron colocados en la cámara de crecimiento a 28±2°C, humedad relativa menor a 70% y fotoperiodo de 16 horas de luz y ocho de oscuridad. Los datos obtenidos se los analizó bajo un diseño completamente al azar con arreglo bi factorial (Vicente, s.f.) de 3x2 (3 concentración de NaOCl x 2 tiempos de exposición), con cuatro repeticiones por tratamiento (Tabla 1); cada unidad experimental estuvo conformada por 10 explantes.

Los hongos se detectaron por medio de la presencia de micelio y las bacterias a través de los exudados presentes en la base de éste y la oxidación fenólica se manifiestan por el cambio de color de los medios de cultivo y cambio de color de los segmentos nodales de un color amarillento a uno pardo en la base y a lo largo del segmento nodal sembrado, el explante viable es aquel que presenta un color verde.

Tabla 1. Descripción de los tratamientos.

Tratamientos	Factor A	Factor B
	Concentración NaOCl	Tiempo de exposición (min)
T1	2%	5
T2	2%	10
T3	5%	5
T4	5%	10
T5	8%	5
T6	8%	10

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la comparación de medias de los distintos tratamientos, se utilizó la prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS), con un nivel de significancia de 0.05 y 0.01. Los análisis estadísticos, se obtuvieron con el paquete estadístico InfoStat v. 11.

Las concentraciones de hipoclorito de sodio presentaron diferencias significativas (p<0.05) sobre los porcentajes de contaminación total, contaminación por hongos, oxidación y sobrevivencia de explantes. El tiempo de exposición presentó diferencias significativas solamente en la contaminación por bacterias (p<0.05). La interacción de hipoclorito de sodio por el tiempo de exposición, presentó diferencias significativas, en los porcentajes de contaminación total, bacterias y oxidación fenólica (p<0.05). Las diferencias entre el porcentaje de contaminación total por efecto de la concentración de NaOCl y la interacción AxB, indicaron que ambos factores no fueron independientes en el porcentaje de contaminación total en los segmentos nodales. Los tiempos de exposición no influyeron en el porcentaje de contaminación total.

Después de 21 días de cultivo se evaluaron por observación visual las variables: porcentaje de contaminación total (hongos, bacterias), presencia de oxidación y sobrevivencia de explantes.

En la Figura 2, se aprecia en la primera variable que los menores porcentajes se registraron cuando se combinó hipoclorito de sodio al 2% y 5% con 10 y 5 min de

exposición, asimismo el uso de hipoclorito de sodio al 8% por 5 min alcanzó el máximo valor de contaminación total, 80% por hongos y bacterias.

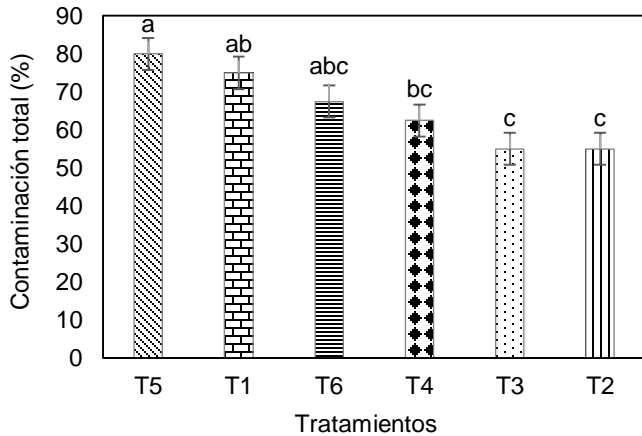


Figura 2. Porcentaje de contaminación total de los segmentos nodales de Guanabana por tratamientos de desinfección.

Las diferencias entre el porcentaje de contaminación por hongo por efecto de la concentración de NaOCl fueron altamente significativas ( $p < 0.01$ ). Los tiempos de exposición y la interacción AxB, indican que ambos factores son independientes en el porcentaje de

contaminación por hongo. La Figura 3 muestra que la segunda variable obtuvo menores porcentajes cuando se combinó hipoclorito de sodio al 2% y 5% con 10 y 5 min de exposición, asimismo el uso de hipoclorito de sodio al 8% por 10 min alcanzó el máximo valor de contaminación de 47.5% a causa de los hongos.

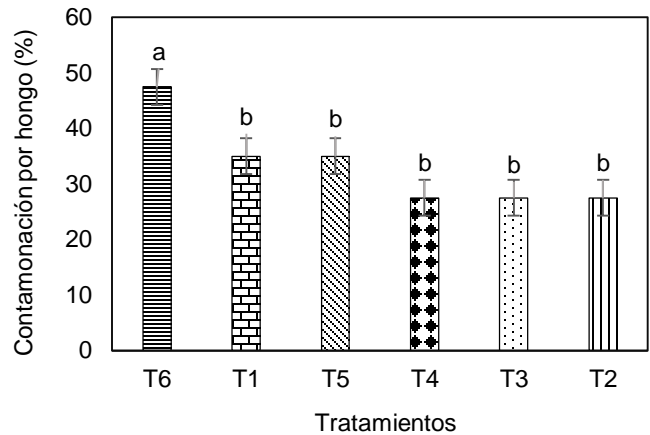


Figura 3. Porcentaje de contaminación por hongos en los segmentos nodales de guanabana por tratamientos de desinfección.

La Figura 4 muestra los segmentos nodales contaminados por hongos y por oxidación.



Figura 4. Segmentos nodales contaminados (Izq.), hongos (Cent.), oxidación (Der).

No existieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el porcentaje de contaminación por bacteria por efecto de la concentración del NaOCl. Hubo diferencias altamente significativas entre los tiempos de exposición y la interacción AxB ( $p < 0.01$ ) indicando que ambos factores no son independientes en el porcentaje

de contaminación por bacterias. En la Figura 5, se aprecia en la tercera variable que los menores porcentajes fueron cuando se combinó hipoclorito de sodio al 8% con 10 min de exposición, asimismo el uso de hipoclorito de sodio al 8% por 5 minutos alcanzó el máximo valor de contaminación de 45% por bacterias.

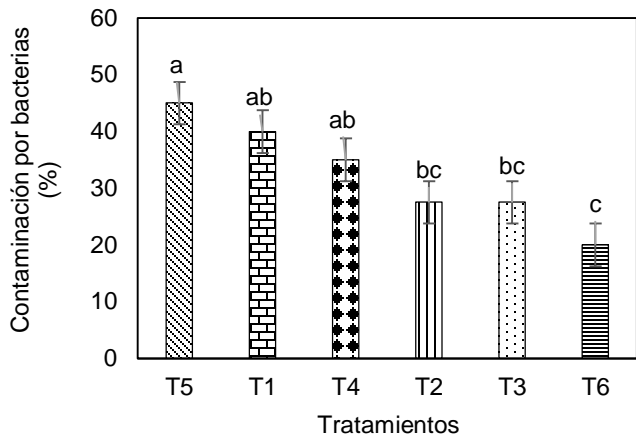


Figura 5. Porcentaje de contaminación de bacterias de los segmentos nodales de guanagana por tratamientos de desinfección.

Las diferencias entre el porcentaje de oxidación por efecto de la concentración de NaOCl y la interacción AxB, indican que ambos factores no son independientes en el porcentaje de oxidación ( $p < 0.05$ ). Los tiempos de exposición no influyen en el porcentaje de oxidación. La Figura 6 muestra, en la cuarta variable, que los menores porcentajes ocurrieron cuando se combinó hipoclorito de sodio al 5% y 8% con 10 y 5 min de exposición, asimismo el uso de hipoclorito de sodio al 2% por 10 min alcanzó el máximo valor 27.5% de oxidación.

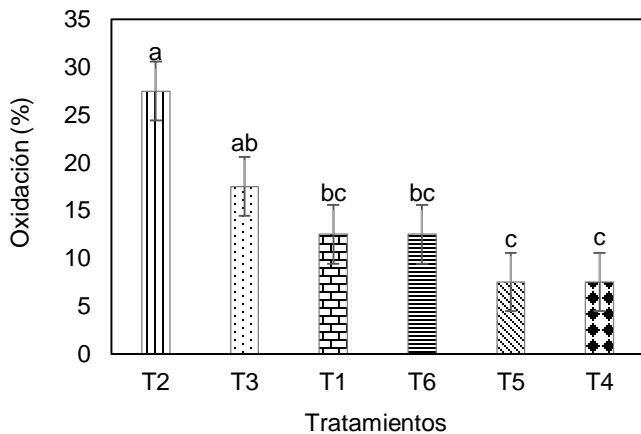


Figura 6. Porcentaje de oxidación de los segmentos nodales de *A. muricata* por tratamientos de desinfección.

Las diferencias entre la sobrevivencia por efecto de la concentración de NaOCl son altamente significativas ( $p < 0.01$ ). Los tiempos de exposición no influyeron en el porcentaje de sobrevivencia de los explantes, además que la interacción AxB muestra que ambos factores son independientes en el porcentaje de

sobrevivencia. La Figura 7 muestra en la quinta variable que los mayores porcentajes fueron cuando se combinó hipoclorito de sodio al 5% con 10 y 5 min de exposición, asimismo el uso de hipoclorito de sodio al 2% y 8% por 5 min alcanzaron los menores valores con 12.5% de sobrevivencia.

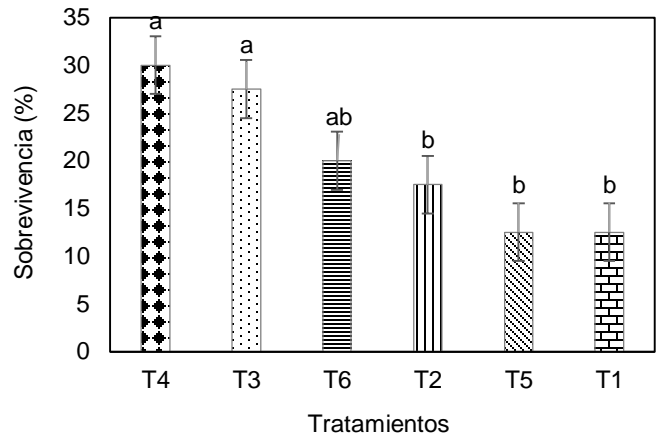


Figura 7. Porcentaje de sobrevivencia de los segmentos nodales de guanabana por tratamientos de desinfección.

Los explantes viables se muestran en la Figura 8.

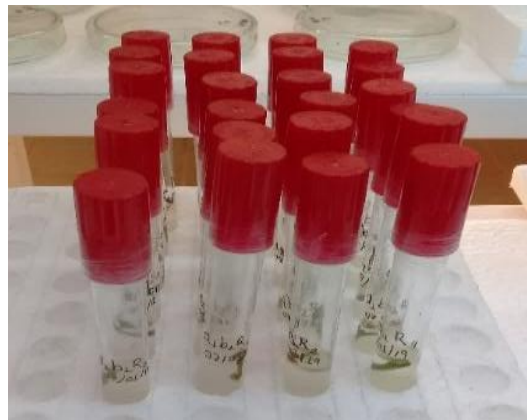


Figura 8. Explantes viables de guanábana.

Al comparar los resultados con otros trabajos realizados en guanábana, se encontró que muy pocos indican la contaminación, sobrevivencia y oxidación fenólica de los explantes durante su establecimiento in vitro. Experiencias con material adulto cultivado directamente en el campo han reflejado bajos porcentajes de explantes vivos (Rincón et al., 1999). Esta respuesta se asemeja con investigaciones realizadas donde se reportan una alta contaminación, entre ellos: guayabo con 80% (Ramirez y Salazar, 1997) y 100% de contaminación (Viloria, 1993).

Se evaluó el efecto del hipoclorito de sodio en el establecimiento in vitro de explantes de *Annona muricata* encontrando que el NaOCl al 1% durante 5 o 10 minutos mostraron el más alto porcentaje de explantes viables pero no controló los microorganismos contaminantes presentes en los explantes (Ramírez et al. 2002).

## CONCLUSIONES

El estado fisiológico de las plantas, influye significativamente en el establecimiento in vitro de los segmentos nodales de guanabana. El tratamiento con el cual se logró la mejor desinfección y mayor porcentaje de sobrevivencia de los segmentos nodales de guanabana fue con la aplicación del NaOCl al 5% durante 10 minutos.

El hipoclorito de sodio al 2% y 10 min de exposición e hipoclorito de sodio al 5% con tiempo de exposición de 5 min disminuyó la presencia de hongos. Cuando se aumentan las concentraciones de NaOCl y el tiempo de exposición, se disminuye el porcentaje de contaminación bacteriana, reflejándose un mayor efecto bactericida del en los segmentos nodales de guanabana

Al utilizar concentraciones altas de NaOCl, se debe bajar el tiempo de exposición de los explantes, debido a que el efecto del desinfectante puede ocasionar lesiones y mostrar oxidación en los segmentos nodales de guanábana. El uso del hipoclorito de sodio, es una alternativa para la desinfección del material vegetal en las concentraciones y tiempos de exposición adecuados.

## BIBLIOGRAFÍA

Bejoy, M; Hariharan, M. 1992. In vitro plantlet differentiation in *Annona muricata*. Plant Cell Tissue and Organ Culture (en línea). Consultado 12 may. 2020. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00036231>

Garcia R; Ramirez C. 2005. Propagación in vitro de la especie frutícola de la costa del caribe: guanabano (*Annona muricata*) a partir de segmentos nodales. Tesis Lic. Sincelejo, Colombia. Universidad de Sucre. 76 p.

INE (Instituto Nacional de Estadística). 2015. Censo agropecuario 2013. Estado Plurinacional de Bolivia. La Paz, Bolivia. 143 p.

Murashige, T; Skoog. F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth And Bioassay With Tobacco Tissue Cultures (en línea). *Physiología Plantarum* 15: 473-497. Consultado 13 ene. 2020. Disponible en [http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu\\_audu\\_kulturas\\_MAG/literatura/03\\_Murashige%20Scoog1962.pdf](http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/03_Murashige%20Scoog1962.pdf)

PDM (Plan de Desarrollo Municipal) Palos Blancos. 2012. Gobierno Autónomo Municipal de Palos Blancos. Consultora Iniciativa. La Paz, Bolivia. 429 p.

Pinto, A; Cordeiro M; Andrade, S; Ferreira F; Filgueiras, H; Alves, R; Kimparas, D. 2005. *Annona* species, International Center for Underutilised Crops, University of Southampton, Southampton. 268 p.

Pinto, A; Silva, E. 1994. Graviola para exportação: Aspectos técnicos da produção. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Desenvolvimento Rural-SRD. Programa de Apoio à Produção e Exporta. EMBRAPA-SPI. Brasilia, DF.41 p.

PTDI (Plan Territorial de Desarrollo Integral) Palos Blancos. 2016. Centro de Capacitación para el Desarrollo (CECAD). Gobierno Autónomo Municipal de Palos Blancos. La Paz, Bolivia. 319 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 (en línea). *Revista de la Facultad de Agronomía* 19(1): 48-55. Consultado 24 abr. 2020. Disponible en [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0378-78182002000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0378-78182002000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=es)

Ramírez, M; Salazar, E. 1997. Establecimiento in vitro de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.) (en línea). *Revista Facultad de Agronomía*. 14: 497-506 pp. Consultado 24 abr.2020. Disponible en <https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/26150>

Rincón, A; Ortega, R; Urdaeta, J; León de Sierralta, B; Bracho, L; Ramirez, M. 1999. Establecimiento aséptico de brotes laterales de *Annona spp.* (en línea). Revista Facultad de Agronomía 16(1): 76-81. Consultado 22 abr. 2020. Disponible en <https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/26309>

Roca, W; Mroginski; L. 1991. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. En: p. 1-17. 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.

Toro, J. 2001. Aspectos claves para el manejo agronómico del guanábano y zonificación especializada para el cultivo. Corporación Biotec. CIAT. Cali, Colombia. 68 p.

Vicente, J. s.f. Guía Metodológica de diseños experimentales. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia. 221 p.

Viloria, Z. 1993. Cultivo in vitro de nudos de guayabo (*Psidium guajava* L). Fase I. Trabajo de Ascenso. Maracaibo, Venezuela. Universidad del Zulia. 35 p.

Artículo recibido en: 28 de abril 2020

Aceptado en: 22 de junio 2020