



Evaluación de medios de inducción *in vitro* a callo vegetal en explantes foliares de *Annona diversifolia* Safford (Magnoliales: Annonaceae)

Evaluation of *in vitro* induction means to plant callus in foliar explants of *Annona diversifolia* Safford (Magnoliales: Annonaceae)

Huilhuinic Ángel Orantes-Ramos¹, Yanira Elizabeth López-Ventura²

RESUMEN

Con el propósito de inducir la formación *in vitro* de callos vegetales en explantes foliares de *Annona diversifolia* (*A. diversifolia*) se evaluó el uso de seis tratamientos de inducción a callo vegetal en explantes de ejemplares adultos con tres años de edad provenientes de condiciones de vivero (CAPOSA S.A. de C.V.). La incubación fue en condiciones de oscuridad a una temperatura de 24-26°C. El diseño experimental fue totalmente al azar con tres repeticiones de diez unidades experimentales por tratamiento. No se indujo la formación de callos vegetales en ningún tratamiento. Los porcentajes de contaminación (PC), oxidación (PO) y sobrevivencia (PS), se midieron semanalmente durante un período de cinco semanas. Los PO y PS, muestran diferencias significativas al nivel del 1% ($F > 5.064$). El tratamiento f (medio B5 al 100% (Gamborg et al. 1968) + 2,4-D (2 mg/ L) + Kin (1 mg/L)) basado en Gómez et al. (2006), obtuvo un PO de 53.33% y un PS de 46.66% durante la semana cinco. Los resultados indicaron que este tratamiento fue el más adecuado para prolongar la sobrevivencia en condiciones de laboratorio.

Palabras Clave: *Annona diversifolia*; callogénesis; contaminación; oxidación; sobrevivencia, *in vitro*.

ABSTRACT

In order to induce the formation of *in vitro* plant calluses in foliar explants of *Annona diversifolia* (*A. diversifolia*), the use of six plant callus induction treatments in explants of three-year-old adult specimens from nursery conditions was evaluated (CAPOSA SA. de C.V.). The incubation was in darkness conditions at a temperature of 24-26°C. The experimental design was completely randomized with three repetitions of ten experimental units per treatment. No callus formation was induced in any treatment. The percentages of contamination (PC), oxidation (PO) and survival (PS), were measured weekly during a period of five weeks. The PO and PS, show significant differences at

1 Programa Jóvenes Talento El Salvador, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad de El Salvador.
2 Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad de El Salvador.

the level of 1% ($F > 5.064$). The treatment f (100% B5 medium (Gamborg et al., 1968) + 2,4-D (2 mg / L) + Kin (1 mg / L)) based on Gómez et al. (2006), obtained a PO of 53.33% and a PS of 46.66% during week five. The results indicate that the treatment was the most adequate to prolong survival in laboratory conditions.

Keywords: *Annona diversifolia*; callus induction; contamination; oxidation; survival, *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

En El Salvador, algunas especies del género *Annona*, tales como *Annona cherimola*, *Annona squamosa* y *Annona glabra* se encuentran en peligro de extinción (Cruz y Deras 2000). *Annona diversifolia* es la especie de mayor interés comercial de su género en el país debido a sus frutos comestibles (Cruz 2002). A pesar de ello, su distribución ocurre mayoritariamente en estado silvestre y semicultivados (Cruz 2002; Irigoyen 2004; Orellana 2005).

La distribución de *A. diversifolia* es mayor en El Salvador debido al amplio intervalo altitudinal que resiste, volviendo su cultivo más viable que la mayoría de las especies de frutales de importancia comercial (Cruz y Deras 2000). Además, presenta resistencia a diferentes intervalos latitudinales, permitiendo su establecimiento en Estados Unidos y Canadá (Castro 2007). Asimismo, se ha demostrado su productividad y resistencia (Otero et al. 2006). A pesar de ello, los cultivos de esta especie no cuentan con un manejo técnico (Irigoyen 2004; Orellana 2005), y la exportación de sus frutos es baja debido a que se considera un cultivo nostálgico (CIEX 2018).

Existen múltiples dificultades en la reproducción de *A. diversifolia*, entre ellos está su variable tasa de germinación entre un 30% a 80% (Cruz & Deras 2000). Para solventar esta dificultad, se recomienda el almacenamiento de su germoplasma entre 7 a 12 meses con un 90% de germinación o su reproducción por material vegetativo vía injerto sobre *A. muricata* (Cruz 2002). El primer caso es común

en El Salvador (Irigoyen 2004); sin embargo, no es recomendable porque las plantas obtenidas presentan variaciones fenotípicas que afectan su rendimiento y calidad de fruto, además de iniciar su producción tardíamente (Ramírez et al. 2002). El segundo caso es recomendado por Cruz (2002), debido a que proporciona plantas uniformes y con inicios de producción temprana; sin embargo, éste método no es el más fácil, debido al largo tiempo de desarrollo de los patrones (Ramírez et al. 2002). El método de inducción a callo vegetal sería de gran utilidad para la multiplicación de esta especie y su mejoramiento genético.

Existen registros sobre el establecimiento y regeneración *In vitro* de otras especies del género *Annona* (López et al. 2014), utilizando ejemplares jóvenes y adultos procedentes del campo. En el mismo contexto, se han documentado esfuerzos para el establecimiento de *A. diversifolia* procedentes de condiciones de vivero (Orantes y López 2018). No se han registrado estudios relacionados a la inducción a callo vegetal en explantes de esta especie.

El desarrollo de una técnica que permita inducir callogénesis a partir de material vegetativo de *A. diversifolia*, facilitaría el proceso de selección y multiplicación de plantas elitelicas. La callogénesis de los explantes, depende del tratamiento de inducción. El uso de diferentes reguladores de crecimiento ha permitido esta respuesta fisiológica en múltiples especies de plantas leñosas (Vacca et al. 2015; Rodríguez et al. 2014; Landaverde et al. 2002; Gómez et al. 2006).

La presente investigación describe un estudio

preliminar de la aplicación de tratamientos de inducción a callo vegetal en *A. diversifolia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

La siembra se realizó en el laboratorio del Centro Nacional de Investigaciones Científicas de El Salvador (CICES) (13°43'04.9"N 89°12'06.7"O), y la incubación en el Laboratorio de Cultivo *In vitro* de Células y Tejidos Vegetales de la Escuela de Biología (13°43'12.0"N 89°12'17.8"O). Ambos laboratorios ubicados en el recinto de la Universidad de El Salvador, Sede Central.

Obtención de material vegetativo de *Annona diversifolia*

Se seleccionaron plantas de *A. diversifolia* de tres años de edad, cultivadas en el vivero CAPOSA S.A. de C.V., ubicado en San Salvador (13°42'37.9"N 89°12'12.6"O). Se seleccionaron y cortaron hojas jóvenes, las cuales se depositaron en una solución antioxidante que contenía ascorbato (100 mg/L) + citrato (150 mg/L) hasta el momento de la aplicación del pretratamiento de desinfección superficial.

Tipo de explante y condiciones de incubación

De acuerdo al protocolo descrito por Orantes y López (2018), el material vegetal utilizado consistió en segmentos de hojas de aproximadamente 1 cm², sin nervadura central, extremos, porciones basales y apicales. Cada explante, se cultivó en frascos de vidrio con un diámetro de 4.5 cm y 6.7 cm de altura, sellados con papel aluminio. Dichos frascos contenían 30 mL de medio de medio de inducción a callo vegetal gelificado con phytigel (2.2 g/L). Los medios fueron esterilizados en un autoclave durante 20 min con 15 lb/pulg² de presión, y a una temperatura de 121°C. La incubación fue en condiciones de oscuridad, al interior de una caja de plástico. La temperatura dentro de la

caja, fue de 24-26°C. El período de incubación para toma de datos, fue de cinco semanas.

Desinfección superficial

Se aplicó el tratamiento de desinfección superficial descrito por Orantes y López (2018) para explantes foliares de *A. diversifolia*. Este consistió en un lavado con agua jabonosa durante 10 min, un enjuague con agua corriente durante 5 min, y una inmersión en alcohol etílico al 70% durante 10 seg. A continuación, las hojas fueron colocadas en una solución de citrato (0.5%), esterilizada hasta el momento de la aplicación del tratamiento de desinfección bajo condiciones asépticas al interior de una cámara de flujo laminar.

El tratamiento de desinfección aplicado consistió en una inmersión en hipoclorito de sodio (5.25%) por 5 min; seguido de 3 enjuagues con agua destilada esterilizada; una inmersión en Ridomil (20 g/L) por 10 min; y una inmersión en Tetraciclina (0.6 g/L) por 10 min).

Evaluación de medios de inducción a callo vegetal

Se evaluaron seis medios de inducción a callo vegetal propuestos por diferentes autores (cuadro 1). Los medios a y b fueron implementados por Vacca *et al.* (2015) en *Pterogyne nitens* Tul. Los medios c y d, fueron los utilizados por Rodríguez *et al.* (2014), en *Ugni molinae*. El medio e fue el sugerido por Landaverde *et al.* (2002), en *Coffea arabica*. El medio f, fue el descrito por Gómez *et al.* (2006), para inducir callogénesis en *Eucalyptus globulus*.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE DATOS

Se utilizó un diseño completamente al azar. Se evaluaron seis tratamientos con tres repeticiones cada uno. La unidad experimental utilizada fue un explante sembrado en un

Cuadro 1. Composición de tratamientos de inducción al callo vegetal, aplicados a explantes foliares de *A. diversifolia*.

T	Medio base	Suplementos	pH
a	MS basal	Hidrocalseína (500 mg/L). Picloram (0.87 mg/L).	7.0
b	MS basal	Hidrocalseína (500 mg/L). Picloram (0.69 mg/L).	7.0
c	MS basal	2,4-D (1 mg/L). BAP (1 mg/L).	5.8
d	MS basal	ANA (0.5 mg/L).	5.8
e	MS basal (50%)	Tiamina-HCl (1 mg/L). Myo inositol (100 mg/L). Ácido nicotínico (1 mg/L). Pyridoxina (400 mg/L). Glicina (400 mg/L). Extracto de malta (100 mg/L). Hidrocalseína (0.5 mg/L). 2,4-D (1 mg/L). AIB (1 mg/L).	5.8
f	B5	2,4-D (2 mg/L). Kin (1 mg/L).	7.0

Notas Cuadro 1. Los medios MS basal (Murashige y Skoog 1962) y B5 se utilizaron al 100% de su composición salina a excepción del tratamiento e.

frasco de vidrio con medio de cultivo. Cada repetición estuvo conformada de diez unidades experimentales por tratamiento.

Los resultados se analizaron con el programa "WPS Spreadsheets a2l, Linux version", y consistió en un análisis de varianza (ANDEVA) con una sola causa conocida de variabilidad correspondiente al tratamiento de inducción a callo vegetal.

RESULTADOS

Tanto los medios de inducción a callo vegetal como las condiciones de incubación, no permitieron inducir la callogénesis en los explantes foliares. Debido a ello, los parámetros evaluados fueron los porcentajes correspondientes a la contaminación, oxidación, y sobrevivencia de explantes. La toma de datos se realizó semanalmente por un período de cinco semanas.

Contaminación de explantes

Los porcentajes de contaminación fueron diversos entre los tratamientos de inducción utilizados (Fig. 1). Sus máximos valores se obtuvieron a partir de la quinta semana. Los porcentajes de contaminación muestran diferencias significativas al nivel del 10% ($F > 2.394$) únicamente durante la quinta semana.

En la figura 1 se observa que los tratamientos que presentaron el menor porcentaje de contaminación fueron el c y f (0.00%); sin embargo, los porcentajes de oxidación de c fueron más altos que los de f (Fig. 2). El porcentaje de contaminación más alto fue del d (26.66%), seguido por el a. La contaminación en d, se observó en el medio de cultivo a partir de las regiones periféricas del frasco.

Sobrevivencia de explantes

Los porcentajes de sobrevivencia de los

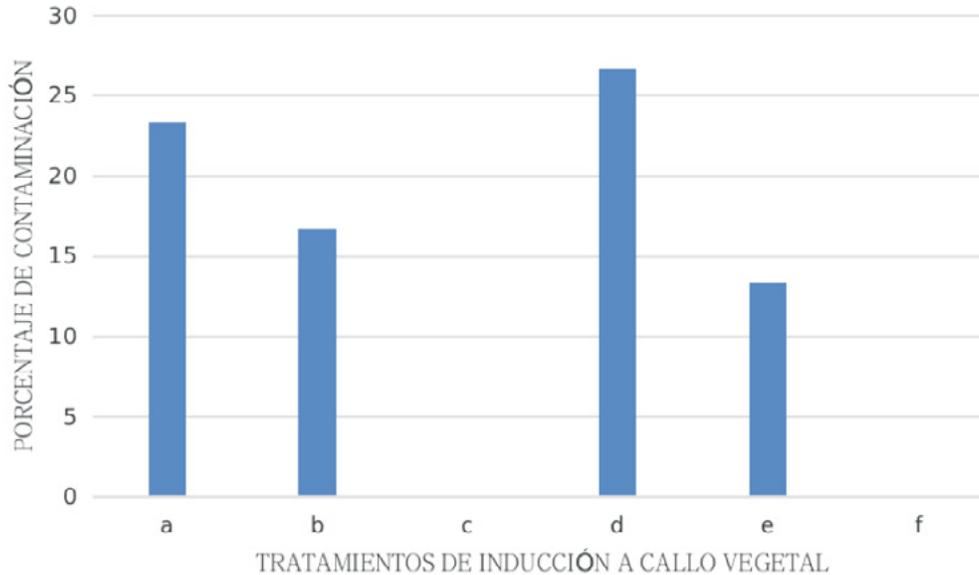


Figura 1. Efecto de los tratamientos de inducción a callo vegetal sobre el porcentaje de contaminación de explantes foliares de *A. diversifolia* después de cinco semanas.

explantes fueron diversos entre los tratamientos utilizados. Además, sus valores mostraron una tendencia a disminuir cada semana (Fig. 2) conforme incrementaron los porcentajes de oxidación. Los valores mínimos de explantes sobrevivientes se obtuvieron durante la semana cinco. Los porcentajes de sobrevivencia muestran diferencias significativas al nivel del 1% ($F > 5.064$), durante las últimas cuatro semanas. Los porcentajes de explantes de oxidación muestran diferencias significativas al nivel del 1% ($F > 5.064$), durante la semana dos, tres y cuatro, mientras que durante la quinta semana, presentan diferencias significativas al nivel del 5% ($F > 3.106$).

En la figura 2 se observa que el tratamiento de inducción a callo vegetal que obtuvo mayor porcentaje de sobrevivencia durante las cinco semanas, fue f (46.66%). La mayoría de tratamientos mostraron un descenso considerable de explantes sobrevivientes a partir de la cuarta semana. Los tratamientos b y e (Fig. 2) presentaron los porcentajes más bajos de explantes sobrevivientes a partir de la tercera semana. Durante la quinta semana,

únicamente los tratamientos d y f, mostraron explantes sobrevivientes.

DISCUSIÓN

Para el diseño experimental que sustenta la presente investigación, ninguno de los tratamientos de inducción a callo vegetal permitió la obtención de callos vegetales, a pesar que dichos medios y condiciones de incubación han sido descritas como aptas para inducir callogénesis en diferentes especies (Landaverde *et al.* 2002; Gómez *et al.* 2006; Rodríguez *et al.* 2014; Vacca *et al.* 2015). De acuerdo a Velásquez *et al.* (2004), esta respuesta negativa obedece a la imposibilidad de detener la oxidación ocasionada por la presencia de tirosinasas y polifenoxidasas que son comunes en el metabolismo. Estas actúan sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos a quinonas que son fitotóxicas, sustancias que a su vez pueden polimerizarse y afectar proteínas vegetales, inhibiendo el crecimiento y viabilidad de los explantes. Dicho fenómeno se observa como un ennegrecimiento progresivo,

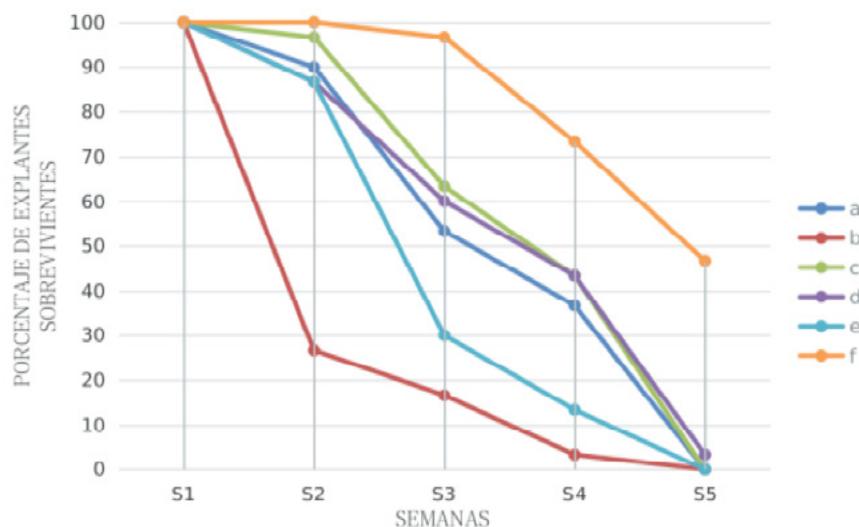


Figura 2. Efecto de los tratamientos de inducción a callo vegetal sobre el porcentaje de sobrevivencia de explantes foliares de *A. diversifolia*.

tal como ocurrió en los explantes sembrados.

De acuerdo a Marks y Simpson (1990), al colocar células y tejidos vegetales en condiciones de oscuridad, se reduce considerablemente la oxidación. Esto ocurre debido a que muchas de las enzimas responsables de ella, se inactivan. En virtud de ello, las condiciones de incubación aplicadas, implicaron oscuridad total. Además, se utilizaron las soluciones antioxidantes descritas por Landaverde *et al.* (2002), Dipré *et al.* (2012), Orantes y López (2018).

Contrario a lo ocurrido en otros estudios (Landaverde *et al.* 2002; Gómez *et al.* 2006; Rodríguez *et al.* 2014; Vacca *et al.* 2015); los antioxidantes, condiciones de incubación y medios, no detuvieron la oxidación de los explantes. Probablemente, como citan Lemos y Blake (1996), al suplementar los medios de cultivo con carbón activado y galactosa, la oxidación de explantes se detenga, tal y como ocurrió en *A. muricata*, puesto a que su fisiología es similar a la de *A. diversifolia*. Por otro lado, de acuerdo a Dipré *et al.* (2012), al utilizar explantes jóvenes de plantas germinadas *In vitro* bajo condiciones de oscuridad, es posible obtener callos vegetales en algunas especies

del género *Annona*, sin ocurrir oxidación.

Contaminación de explantes

Los porcentajes de contaminación obtenidos son bajos (0.00-23.33% durante la cuarta semana). Estos a su vez son parecidos a los obtenidos en estudios de otras especies de *Annona* (Rincón *et al.* 1999). Las diferencias significativas en los promedios de contaminación durante la quinta semana, posiblemente se deben a contaminación externa en el área de incubación. Esto se evidencia debido a que el crecimiento de las colonias de hongos no inicia directamente del explante.

Sobrevivencia de explantes

Los porcentajes de explantes sobrevivientes y oxidados muestran diferencias significativas entre tratamientos de inducción. De acuerdo a Velásquez *et al.* (2004), Orantes y López (2018), los porcentajes de oxidación presentados por todos los tratamientos, a excepción del b, durante la segunda semana, son considerados bajos. Además, los porcentajes de explantes sobrevivientes en todos los tratamientos a excepción del b, son mayores que el reportado por Ramírez *et al.* (1999), Ramírez *et al.* (2002),

Landaverde *et al.* (2002), Rincón *et al.* (1999), y Velásquez *et al.* (2004). Esto confirma que el protocolo de desinfección utilizado, facilita obtener explantes foliares sobrevivientes de *A. diversifolia*, en medios de diferente composición, durante los primeros catorce días.

Los porcentajes de oxidación, se acrecentaron cada semana dependiendo del tratamiento de inducción utilizado. Los tratamientos con MS basal (tratamientos a-e), presentaron mayores porcentajes de oxidación que el tratamiento f (46.66% durante la quinta semana), en el cual se utilizó como base el medio B5. Según Azofeifa (2009), la composición del medio de cultivo es un factor que altera la oxidación de los explantes.

De forma general, los medios que implementan el MS basal al 100% de su composición salina, generan mayor oxidación; sin embargo, en tratamiento e se obtuvo un alto porcentaje de oxidación a pesar de usar MS basal al 50%.

De acuerdo a Azofeifa (2009), la diferencia en los porcentajes de oxidación obtenidos implementando MS basal al 50% (como en tratamiento e que obtuvi 0.00% de sobrevivencia durante la semana cinco), podría atribuirse a la composición de los suplementos adicionales, especialmente al extracto de malta, el cual contiene sacarosa.

Los carbohidratos tienden a hidrolizarse y formar 5-hidroximetil-2-furaldehído (HMF), durante el autoclavado, un factor inhibidor del desarrollo de los tejidos vegetales (Azofeifa 2009; Fernández *et al.* 2015). Ya que el tratamiento f contiene menor cantidad de sacarosa, probablemente este factor tendría menor efecto sobre el explante, lo cual podría explicar el bajo porcentaje de oxidación. Además la composición del tratamiento f, tiene como base el B5, el cual contiene en general, menor cantidad de sales que el MS basal.

CONCLUSIONES

Los tratamientos de inducción *in vitro* a callo vegetal evaluados, no indujeron la formación de callos a partir de explantes foliares procedentes de ejemplares adultos en *A. diversifolia*, debido a la imposibilidad de detener la oxidación de los mismos.

La composición de los medios de inducción tiene un efecto sobre los porcentajes de oxidación.

El tratamiento de inducción que utilizó como base el medio B5, redujo considerablemente los niveles de oxidación en explantes foliares procedentes de ejemplares adultos en *A. diversifolia*.

AGRADECIMIENTOS

Al personal del Centro Nacional de Investigaciones Científicas de El Salvador (CICES), quienes apoyaron activamente la etapa experimental de la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azofeifa A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana*, 20(1): 153-175.
- Castro J., (2007). Cultivo de la anona (*Annona cherimola*, Mill). *Ministerio de Agricultura y Ganadería*, Costa Rica.
- Centro de Tramites de Importaciones y Exportaciones de El Salvador. (2018). Exportaciones anonas frescas registradas en CIEX El Salvador.
- Cruz E. (2002). Cultivo de anona. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). El Salvador.
- Cruz E. y Deras H. (2000). Colecta y establecimiento de anonáceas en El

- Salvador. *Agronomía Mesoamericana* 11(2), 91-95.
- Dipré D., Chavarría Y., Mejía A., Castillo M., Vega B., Vega W. (2012). Multiple direct organogenesis in soursop (*Annona muricata* L.). *Electronic Journal of Biotechnology*.
- Fernández C., Díaz M., González L. (2015). Enraizamiento *in vitro* de embriones cigóticos de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart. *Colombia forestal* 19(1), 67-78.
- Gamborg, O., Miller, R., Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151-158.
- Gómez C., Uribe m., Ríos D., Sánchez-Olate M. (2006). Inducción de callo embriogénico en *Eucalyptus globulus* Labill. *Interciencia* 31(10), 734-738.
- Irigoyen J. (2004). *Guía técnica del cultivo de la anona. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura*, El Salvador: Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- Landaverde V., López A., Vásquez T. (2002). Estudio de inducción a callo embriogénico en variedades comerciales de café (*Coffea arabica*) de El Salvador (Tesis de pregrado). Universidad de El Salvador, El Salvador.
- Lemos E. y Blake J. (1996). Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. *Journal of Horticultural Science* 71, 395-403.
- López C., Carmona E., Arana A., González I. (2014). Biotechnology applied to *Annona* species: A review. *Rev. Bras. Frutic.* 36 017-021.
- Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Marks T. y Simpson S. (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.
- Orantes H. y López Y. (2018). Evaluación de métodos de desinfección para el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Annona diversifolia* Safford (Magnoliales: Annonaceae). *Comunicaciones científicas y tecnológicas* 4(2), 396-404.
- Ramírez M., León de Sierralta S., Urdaneta A. (1999). Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 16, 243-255.
- Ramírez 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. (LUZ)* 19, 48-55.
- Rincón A., Ortega R., Urdaneta J., León de Sierralta S., Bracho B., Ramírez M. (1999). Establecimiento aséptico de brotes laterales de *Annona spp.* *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 1,76-81.
- Rodríguez M., Latsague M., Chacón M., Astorga P. (2014). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocotilo y hoja de *Ugni molinae*. *Bosque* 35(1), 111-118.
- Orellana M. (2005). Caracterización de materiales genéticos de Anona (*Annona diversifolia*) en los municipios de Berlin y Mercedes Umaña, Departamento de Usulután (Tesis de pregrado). Universidad de El Salvador, El Salvador.
- Otero M., Becerril A., Castillo A., Michel A., Ariza R., Barrios A., Rebolledo A. (2006). Producción de ilama (*Annona diversifolia* Saff.) en el trópico seco de guerrero, México. *Chapingo Serie Horticultura* 12(2), 137-143.

- Vacca M., Avilés Z., Bonomo M., Díaz L. (2015). Efecto del picloram en la inducción de embriogénesis somática de *Pterogyne nitens* Tul. "tipa colorada". *International Journal of Innovation and Applied Studies* 11(3), 771-777.
- Velásquez M., González A., Mata F., León de Sierralta S., Esparza D., Ramírez M. (2004). Tipo de sombreado y tiempo de crecimiento de brotes laterales sobre la viabilidad de explantes de *Annona muricata* L. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 21, 12-18.