

Establecimiento aséptico de brotes laterales de *Annona* spp.¹

Aseptic establishment of *Annona* spp. lateral shoots

A. Rincón², R. Ortega², J. Urdaneta², S. León de Sierralta³, B. Bracho⁴ y M. Ramírez⁵

Resumen

Con el propósito de desarrollar un método de desinfección superficial para el establecimiento de brotes laterales de *Annona muricata* y *A. glabra* se evaluó el uso de pretratamientos con fungicida y antibiótico en plantas donantes adultas con seis años de edad provenientes del campo (CENFRUZU-CORPOZULIA). Se despuntaron y defoliaron seis ramas por planta para inducir brotación, se cubrieron con mallas para blanqueo, de las cuales tres se asperjaron con Ridomil® y rifampicina a razón de 2 g L⁻¹ y 300 mg L⁻¹, respectivamente; cinco y un día antes de la recolección. Al desinfectar superficialmente, los explantes se colocaron en Ridomil® y luego en rifampicina, después del tratamiento con cloro comercial. El diseño experimental fue totalmente al azar, con arreglo factorial 2² y cinco repeticiones. A los 14 días de cultivo, se midió el porcentaje de contaminación (PC) y de supervivencia (PS). El PC fue de 0 % en ambas especies y el PS mostró diferencias (P<0,001) entre pretratamientos, 10 y 8 % con aplicación y 55 y 28 % sin aplicación para *A. glabra* y *A. muricata*, respectivamente. Los resultados indican que el pretratamiento no es requerido.

Palabras clave: pretratamientos, planta donante del campo, *in vitro*.

Abstract

In order to develop a surface disinfection method for the *in vitro* establishment of lateral shoots of *Annona muricata* and *A. glabra*, pretreatments with fungicides and antibiotics on field-grown six year old mature plants were eva-

Recibido el 29-04-1999 ● Aceptado el 16-09-1999

1 Trabajo financiado parcialmente por CONDES-LUZ bajo el Proyecto 01458-98.

2 Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. La Universidad del Zulia (LUZ).

3 Departamento de Química. Facultad de Agronomía. LUZ. Apartado 15205. Maracaibo, Zulia 4005. Venezuela.

4 Departamento de Estadística. Facultad de Agronomía. LUZ. Apartado 15205. Maracaibo, Zulia 4005. Venezuela.

5 Departamento de Botánica. Facultad de Agronomía. LUZ. Apartado 15205. Maracaibo, Zulia 4005. Venezuela

luated at CENFRUZU-CORPOZULIA. Six canes per plant were defoliated and the shoot tip removed to induce bud break, the canes were covered with polythene sheeting to reduce irradiance. A Spray of 2 g L⁻¹ of Ridomil® and 300 mg L⁻¹ of rifampicine was applied to the canes 5 days and 1 day before harvesting. When surface disinfected, the explants were treated with Ridomil® and the rifampicine after treatment with the hypochlorite solution. The experimental design was completely randomized with a factorial array of 2² and five repetitions. Observations on percentage of contamination (PC) and survival (PS) were recorded. The PC was 0 % for both species, but for the PS the ANOVA showed differences (P<0,01) between methods, 10 and 8 % of PS using pretreatment and 55 % and 28 % without pretreatment for *A. glabra* and *A. muricata*, respectively. The results revealed that the pretreatment was not required.

Keys word: pretreatments, field grown stock plants, *in vitro* .

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 (*Annona 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 (2).

Las especies de *Annona* se han propagado normalmente por semilla y los métodos convencionales de propagación vegetativa son muy lentos. El método de *propagación in vitro* sería de gran utilidad para la multiplicación de estas especies y el mejoramiento genético, el cual ha sido difícil (3).

Existe información relacionada con la regeneración *in vitro* de algunas especies de *Annona*, entre ellas *A. muricata*, para la cual se ha utilizado material juvenil (3, 5) y adulto (5), sin

embargo, el material adulto que se ha evaluado ha sido recolectado de invernadero.

El desarrollo de una técnica que permita propagar *in vitro* material adulto recolectado en el campo facilitaría el proceso de selección y multiplicación de plantas elitescas. Para ello es prioritario establecer una metodología efectiva que permita el establecimiento aséptico de explantes viables.

El establecimiento *in vitro* de explantes provenientes del campo depende entre otros factores del control de microorganismos contaminantes y del oscurecimiento. El uso de desinfectantes tradicionales, poda y sombreado en guanábano (1) y guayabo (6, 8, 9) permitió el establecimiento de material adulto proveniente del campo.

Este trabajo describe una metodología para el establecimiento aséptico de brotes laterales de plantas adultas de *A. muricata* y *A. glabra* recolectados en el campo.

Materiales y métodos

Se seleccionaron cuatro plantas adultas de *Annona muricata* L. y *A. glabra* L. de seis años, ambas especies pertenecen al orden Ranales y a la familia Annonaceae (Avilán, 1992), cultivadas en el Campo Experimental del Centro Frutícola del Zulia (CENFRUZU-CORPOZULIA) ubicado en la altiplanicie de Maracaibo a 66 m.s.n.m. (LN 11° 00'; LO 72° 00'), zona de vida bosque muy seco tropical.

En cada planta se seleccionaron de cinco a seis ramas que se defoliaron y despuntaron en el segundo nudo, del ápice a la base, para inducir la brotación de yemas laterales. Las ramas se cubrieron con una malla que permitió el paso del 26,66 % de luz, la cual hizo un efecto de sombreamiento y permitió el intercambio gaseoso. Transcurridos 15 días, en cada árbol se tomaron de manera aleatoria de dos a tres ramas, se asperjaron con Ridomil-MZ® [N-(2,6-dimetilfenil)-N-(metoxiacetil)-alaninametil éster] y rifampicina (antibiótico) a una dosis de 2 g L⁻¹ y 300 mg L⁻¹ y se identificaron. Las aspersiones se hicieron 5 y 1 día antes de la recolección del material vegetal en ambas especies (8).

Se colectaron los cinco primeros brotes laterales de cada rama, éstos se sumergieron en solución antioxidante SIGMA (ácido cítrico y ácido ascórbico) hasta el momento de la desinfección superficial, para lo cual se empleó la descrita por Ramírez (9) con algunas modificaciones. Se utilizaron los ápices de los brotes como explantes, colocándolos por 10 min en agua jabonosa, seguidamente se

sumergieron por 5 min en cloro comercial al 50% v/v (hipoclorito de sodio al 5,25 i.a) y se enjuagaron tres veces con agua bidestilada-esterilizada. Seguidamente se expusieron en Ridomil® (2 g L⁻¹) y finalmente en rifampicina (300 mg L⁻¹) durante 20 min cada uno.

Los explantes se sembraron en tubos de ensayo (150 mm x 25 mm) con 10 mL de medio nutritivo líquido de Murashige y Skoog (7) modificado (Sigma M0153, mitad de la concentración de los macronutrientes), complementado 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 a 121°C y 1,1 kg cm⁻² por 15 min. La temperatura de la incubadora fue de 25°C y el fotoperíodo de 12 horas luz con una intensidad luminosa de 19 mmol m⁻² s⁻¹.

Se utilizó un diseño experimental totalmente al azar con 5 repeticiones y un arreglo factorial 2² correspondiente a dos especies y dos pretratamientos. La unidad experimental estaba constituida por 5 explantes. Las variables respuestas correspondieron a porcentaje de contaminación y supervivencia evaluadas a los 14 días después de la siembra. El análisis estadístico se realizó utilizando el procedimiento para datos desbalanceados (10), transformándolos mediante la raíz cuadrada del porcentaje en decimal más uno, por no seguir una distribución normal y así lograr el ajuste de la normalidad.

Resultados y discusión

El porcentaje de contaminación fue 0 % en ambas especies, por lo que se considera que la aplicación de Ridomil® y rifampicina en plantas madres de *A. muricata* y *A. glabra* cultivadas en el campo posiblemente no es necesaria si se realiza una buena desinfección en el laboratorio (9), coincidiendo con lo reportado por Somarribas *et al.* (11), quienes señalaron que la contaminación ocurre usualmente por una inadecuada manera de trabajar en condiciones asépticas o por el uso de una insuficiente desinfección superficial del explante y por la presencia de microorganismos endógenos.

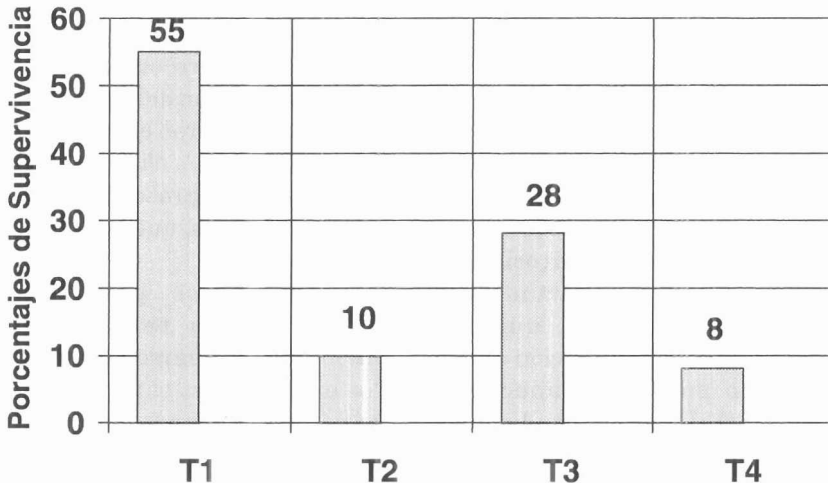
Lemos y Blake (5) obtuvieron explantes asépticos de *A. muricata* utilizando segmentos nodales tomados de plantas madres cultivadas en invernaderos, lo que confiere una situación diferente a la de este experimento.

Como se observa en la figura 1 los porcentajes promedio de supervivencia son bajos en forma general, sin embargo son considerablemente más altos para aquellas plantas o ramas que no fueron tratadas en el

campo con Ridomil. Esto podría atribuirse, entre otros factores a la posible oxidación del material. Jordan *et al.* (4) reportaron el mismo problema en el cultivo de *A. cherimola* haciendo referencia a la presencia de fenoles y polifenoxidasas, que son comunes en estas especies.

Los bajos porcentajes de supervivencia también podrían atribuirse al tiempo de inmersión de los explantes en el fungicida, ya que se notó un quemado en los explantes, coincidiendo con lo observado en guayabo cuando se utilizó Ridomil® (9). El hipoclorito de sodio posiblemente condicionó la acción del fungicida.

Al evaluar el porcentaje de supervivencia de los explantes, el análisis estadístico arrojó diferencias ($P < 0,01$) entre los pretratamientos, no siendo así para el efecto especie y la interacción especie-pretratamiento. Estas diferencias se presume que se deban a una disminución de los porcentajes de supervivencia de los explantes tratados en el campo, lo cual podría atribuirse a un tipo de toxicidad del fungicida o la mezcla de éste con el antibiótico.



T1 = *Annona glabra* sin aplicación. T3 = *Annona muricata* sin aplicación.
T2 = *Annona glabra* con aplicación. T4 = *Annona muricata* con aplicación.

Figura 1. Porcentajes de supervivencia de explantes de *Annona muricata* L. y *A. glabra* L. tratados y no tratados en el campo con Ridomil®

Conclusiones y recomendaciones

La aspersión con Ridomil® y rifampicina a plantas madres de *A. muricata* y *A. glabra* para las condiciones de este experimento no fue necesaria en la obtención de explantes asépticos.

Para la obtención de explantes asépticos de *A. muricata* y *A. glabra*, bajo las condiciones de realización de este experimento, no se justifica la aplicación de aspersiones a las plantas madres con Ridomil® y rifampicina.

Las dosis de hipoclorito de sodio y fungicida utilizadas en el laboratorio

posiblemente afectan el porcentaje de supervivencia de los explantes.

Se sugiere no hacer aplicaciones de Ridomil® y rifampicina en el campo.

Estudiar el efecto de soluciones antioxidantes sobre la oxidación de explantes de *Annona spp.*

Realizar estudios para evaluar el efecto de diferentes dosis de hipoclorito de sodio, Ridomil® y rifampicina, y la utilización de otros fungicidas para la desinfección superficial de los explantes.

Literatura citada

- 1-. Albornoz, L.; L. Fernández, S. León de S. 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 oscurecimiento en el cultivo de *Annona muricata* L. En Memorias: VI Jornadas Científico Técnicas de la Facultad de Agronomía (L.U.Z.).
- 2-. Avilán, L.; F. Leal, y D. Batista. 1992. Manual de Fruticultura. Editorial América C.A. Caracas. Venezuela. 1469 p.
- 3-. Bejoy, M. and M. Hariharan. 1992. *In vitro* plantlet differentiation in *Annona muricata* L. Plant Cell Tissue and Organ Culture 31: 245-247.
- 4-. Jordan, M.; M. Obando, L. Inturriaga, A. Goreux y J. Velozo. 1993. Organogenesis and regeneration of some andean and Fruit species. Acta Horticulturae: 336.
- 5-. Lemos, B. and J. Blake. 1996. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. Journal of Horticultural Science 72: 395-403.
- 6-. León de Sierralta, S. , L., Arenas de Moreno y Z., Vilorio. 1997. Efecto de la exposición solar de las plantas donantes en la iniciación del cultivo *in vitro* de guayabo (*Psidium guajava* L.). Revista de la Facultad de Agronomía. (L.U.Z.) 14 (1): 43-53.
- 7-. Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473 – 493.
- 8-. Ramírez, M.; S. León de S., M. Marín y A. Nava. 1997. Efecto del tipo de explante y tratamientos a plantas madres en el cultivo *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava* L. En Memorias VI Congreso Nacional de Fruticultura, Barquisimeto, Venezuela. p.76.
- 9-. 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. 132 p.
- 10-. SAS, Institute, Inc. 1987. SAS (Statistical Analysis System) The Institute INC, Cary, NC, USA.
- 11-. Somarribas, G.; J. Sandoval, y L. Müller. 1991. Propagación vegetativa del Chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Fases de establecimiento. Turrialba. 41: 538-544.