

# INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

## INGENIERÍA BIOQUÍMICA

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

RESIDENCIA PROFESIONAL

“MICROPROPAGACIÓN DE *Annona muricata*”

DR. FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ MICELI

ASESOR

DR. CARLOS ALBERTO LECONA GUZMÁN

CO-ASESOR

SELENE DEL CARMEN LOPEZ MORENO

ALUMNA

12270283

No DE CONTROL

## ÍNDICE

Índice de cuadros.....	5
Índice de figuras .....	6
Resumen.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. MARCO TEÓRICO.....	10
2.1. Familia Annonaceae.....	10
2.2. <i>Annona muricata</i> .....	11
2.3. Descripción botánica.....	13
2.4. Germinación de semillas para guanábana y otras anonáceas.....	15
2.5. Cultivo de tejidos vegetales.....	15
2.6. Rutas morfogénicas.....	22
2.6.1. Embriogénesis somática.....	23
2.6.2. Organogénesis.....	26
2.6.3. Organogénesis directa.....	26
2.6.4. Organogénesis indirecta.....	26
2.7. Reguladores de crecimiento vegetales.....	27
3. JUSTIFICACIÓN .....	30
4. OBJETIVO.....	31
4.1. Objetivo general.....	31
4.2. Objetivo específico.....	31
5. MATERIALES Y METODO.....	32
5.1. Medio de cultivo.....	32
5.2. Preparación de medio MS para germinación.....	33
5.3. Material vegetal.....	35
5.4. Escarificación de semillas.....	35
5.5. Desinfección de semillas.....	36
5.6. Germinación <i>in vitro</i> .....	37

5.7.	Medio en la etapa de inducción.....	37
5.8.	Medio de enraizamiento.....	38
6.	RESULTADOS.....	40
6.1.	Respuestas de germinación <i>in vitro</i> .....	40
6.2.	Respuestas en la etapa de inducción.....	41
6.2.1.	Respuestas con ácido $\alpha$ -naptalenacetico.....	41
6.2.2.	Respuestas con 6 Bencil-Aminopurina.....	43
6.3.	Respuestas en la etapa de enraizamiento.....	44
7.	CONCLUSIÓN.....	45
8.	RECOMENDACIONES.....	46
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	47

## ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Familia Annonaceae, géneros y especies en México, según herbarios de REMID (CONABIO).....	10
Tabla 2. Descripción taxonómica de Annona Muricata (guanábana).....	13
Tabla 3. Soluciones STOCK del medio MS.....	32
Tabla 4. Cantidad de soluciones STOCK para medio MS.....	34
Tabla 5. Fuente de nitrato y carbono.....	34
Tabla 6. Cantidades de reguladores de crecimiento.....	34
Tabla 7. Reguladores de crecimiento en la etapa de inducción.....	37
Tabla 8. Condiciones de concentraciones en la etapa de enraizado.....	39
Tabla 9. Numero de germinación por semilla con o sin escarificación.....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. “Guanábana” ( <i>Annona muricata</i> ).....	11
Figura 2. Estructura vegetativa y reproductiva de la guanábana.....	14
Figura 3. Embriogénesis cigótica y somática en zanahoria ( <i>Daucus carota</i> ). [Imagen de: V.L. Dodeman, colabs., (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. <i>Journal of Experimental Botany</i> 48:1493–1509].....	25
Figura 4. Frutas seleccionados del rancho “Ascendero verde”.....	35
Figura 5. Muestreo de semillas escarificadas ruptura de testa con la ayuda de una pinza de jardinería.....	36
Figura 6. Semillas en germinación ubicadas en cámara bioclimática en completa oscuridad.....	37
Figura 7. Inducción de hipocotilo en medios enriquecidos con reguladores.....	38
Figura 8. Brotes seleccionados y puestos en medio enriquecido con ácido indolbutílico, con 2 mg/L.....	39
Figura 9. Germinación de semillas escarificadas y no escarificadas en diferentes tratamientos C, E son semillas con escarificación en concentraciones de 3 mg/L de GA3, las semillas A, B y D son semillas sin escarificación con 3 mg/L de GA3.....	41
Figura 10. Inducción de organogénesis directa e indirecta de anona muricata en medio MS suplementado con Ácido $\alpha$ -naftalenacético. A), B) y C) Organogénesis directa e indirecta de Anona muricata en medio MS suplementados con [0.5 mg/L] [1 mg/L] y [2 mg/L ] a los 60 días de inducción. D) y F) Organogénesis directa con [0.5 mg/L] Y [2 mg/L] a los 120 días de inducción. E) Organogénesis indirecta con [1 mg/L] a los 120 días de inducción. G) Organogénesis directa con [0.5 mg/L] a los 180 días de	

inducción. H) y I) con [1 mg/L] y [2 mg/L] a los 180 días de  
inducción.....42

Figura 11. Inducción de organogénesis directa de anona muricata A), B) Y C) en  
medios suplementados con con [0.5 mg/L], [1 mg/L] y [2 mg/L] 6-Bencil  
Aminopurina a los 60 días de inducción. D), E) y F) Inducción de  
organogénesis directa con [0.5 mg/L], [1 mg/L] y [2 mg/L] de 6-Bencil  
Aminopurina a los 120 días de inducción. G), H) y I) Inducción de  
organogénesis directa con [0.5 mg/L], [1 mg/L] y [2 mg/L] de 6-Bencil  
Aminopurina a los 180 días de inducción.....43

Figura 12. Brotes tomados de 0.5 mg/L BAP en 0.5 mg/L AIB.....44

Figura 13. Brotes tomados de 1 mg/L BAP en 1 mg/L AIB.....44

Figura 14. Brotes tomados de 2 mg/L BAP en 2 mg/L AIB.....44

## Resumen

*Annona muricata* conocida comúnmente como “guanábana”. En México se cultivan aproximadamente 7290 hectáreas de guanábana, distribuidas en pequeñas superficies y huertos caseros en los siguientes estados: Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Puebla. Estudios recientes han demostrado que en extractos metabólicos de esta especie, presentan compuestos con actividad anticancerígena, lo que es de significativo valor farmacéutico.

El objetivo de este trabajo consistió en analizar el efecto del ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Annona muricata*, el efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal y distintos explantes sobre las respuestas morfogénicas con la finalidad de establecer un protocolo para micropropagar la especie. Para ello fue necesario utilizar semillas de *Annona muricata* las cuales fueron desinfectadas previamente y en condiciones de esterilidad fueron sembradas en medio MS adicionado con GA<sub>3</sub> a 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mg/L y fueron evaluadas en un para conocer la respuesta germinativa. Posteriormente de 28 a 30 días se obtuvieron plántulas, se usaron hipocotilos para evaluar el efecto de BAP (6-bencil amino purina), ANA (ácido-indol acético). Los resultados obtenidos para la germinación de semillas fue de 3.0 mg/L con o sin escarificación con respecto a las otras concentraciones. En la inducción de respuestas morfogénicas en el tratamiento con BAP a 0.5 mg/L se demostró los mejores resultados con el uso de hipocotilos ya que en los explantes sembrados a esta concentración generaron mayor número de brotes vía organogénesis directa. Durante la etapa de enraizamiento el uso de AIB demostró adaptación en el medio al contabilizar brotes obtenidos en medio MS enriquecido con BAP 0.5 mg/L.

## 1. INTRODUCCIÓN

Una de las grandes aplicaciones que actualmente se está potencializando en la técnica de cultivo de tejidos, la propagación *in vitro* o micropropagación es una de las técnicas más estudiadas, con mayores avances y la que más se aplica comercialmente a un mayor número de especies, incluyendo a muchas plantas medicinales (Barba, colabs., 2001). La propagación de plantas a través de cultivo de tejidos se puede dividir en tres grandes categorías: el enfoque más común consiste en aislar los meristemos organizados como ápices o yemas axilares e inducirlos para convertirse en plantas completas, este sistema de propagación es comúnmente conocida como Micropropagación; en el segundo enfoque, los brotes adventicios se inician en las hojas, raíz y tallo o en segmentos de callos derivados de dichos órganos; el tercer sistema de propagación consiste en la inducción de embriogénesis somática en células y en cultivo de callos(Rout, colabs., 2000).

La guanábana, *Annona muricata* L. es un árbol tropical reconocido por el potencial económico y las propiedades medicinales, nutricionales del árbol. Los usos medicinales y nutricionales han sido explotados por la población debido a la gran importancia que se le da a este fruto. Se ha demostrado que las semillas tienen propiedades anticancerígenas y antifúngica en lo que resta del fruto o parte del árbol, así como algunas otras aplicaciones médicas (Pinto, colabs., 2005).

Algunos de los estudios específicos que se han realizado recientemente en la extracción de metabolitos secundarios, en *Annona muricata*, dio a conocer que partes del fruto presentan actividades antifúngica anticancerígena, lo cual significa que esta es una especie de gran interés que representa un valor a nivel farmacéutica y agroindustrial.



## 2. MARCO TEORICO

### 2.1. Familia Annonaceae

El sistema de clasificación de las angiospermas por el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group, por sus siglas en inglés) publicado en el año de 1998, consigna que las anonáceas (Annonaceae) son una familia de angiospermas del orden Magnoliales que consta de 130 géneros, con unas 2 300 especies que se distribuyen por los trópicos del Nuevo y Viejo, hasta el norte de Australia y las islas del Pacífico.

De acuerdo al Sistema Integrado de Información Taxonómica (SIIT)-CONABIO actualmente se han aceptado para México 19 géneros y 87 especies de la familia Annonaceae, pero únicamente cuatro géneros contienen especies de importancia frutícola, éstos son: *Annona*, *Rollinia*, *Uvaria* y *Asimina* producen frutos comestibles. El género *Annona* L. comprende alrededor de 120 especies, así como una serie de híbridos conocidos comúnmente como "Atemoyas".

Tabla 1. Familia Annonaceae, generos y especies en Mexico, según herbarios de REMID (CONABIO).

Género	Especies	Distribución (entidades federativas)
1. <i>Anaxagorea</i>	1. <i>A. guatemalensis</i>	Ver., Oax.
2. <i>Annona</i>	2. <i>A. globiflora</i> 3. <i>A. testudinea</i> 4. <i>A. cherimola</i> 5. <i>A. longiflora</i> 6. <i>A. macrophyllata</i> 7. <i>A. primigenia</i> 8. <i>A. reticulata</i> 9. <i>A. glabra</i> 10. <i>A. purpurea</i> 11. <i>A. diversifolia</i> 12. <i>A. lutescens</i> 13. <i>A. longipes</i> 14. <i>A. scleroderma</i> 15. <i>A. muricata</i> 16. <i>A. squamosa</i>	Ver., Hgo., Chis., Tamps., Gto. Chis. Ver., Mich., Chis., Oax., Mor., Pue., Oro., Jal., Gt o., Méx. Jal., Ver. Ver., Camp. Camp., Q. Roo., Yuc. Yuc., Jal., Mich., Pue., Q. Roo., Nay., Tab. Ver., Q. Roo., Yuc., Camp., Tab., Jal., Oax., Nay., Gro. Ver., Mich., Chis., Yuc., Jal. Mich., Gro., Yuc., Ver., Méx. Pue. Ver. Chis. Ver., Chis., Tab., Yuc., Col., Gro., Q. Roo., Nay., Mich. Yuc., Mich., Q. Roo., Camp., Ver., Oax., Jal., Nay.

De acuerdo con la bases de datos de la Red Mundial de Información sobre biodiversidad (REMIB), de las colecciones de los herbarios se definieron 14 géneros y 62 especies distribuidas en varios estados de la República Mexicana Tabla 1 con intereses, donde algunas especies de gran importancia comercial son *A. diversifolia*, *A. purpurea*, *A. cherimola* y *A. muricata*. También son importantes en algunos países. Todos tienen una cosa en común, son frutas compuestas, compuestas por secciones escamosas que crecen juntas en forma de cono de abeto.

## **2.2. *Annona muricata***



Figura 1. “Guanábana” (*Annona muricata*).

La *Annona muricata* es comúnmente conocida como guanábana (Figura 1). Pertenece a la familia Annonaceae, más del 90 % de las especies de *Annona muricata* reportadas en el mundo se localizan en la América Tropical, por lo que se considera a esta región del continente, específicamente el sur de México, Centroamérica y parte de Sudamérica, como la principal área de diversificación del género y centro de origen (Cruz y Torres, 1988; Vavílov, 1994; Moreno, 2005).

En México se cultivan aproximadamente 7290 hectáreas de guanábana, distribuidas en pequeñas superficies y huertos caseros en los siguientes estados: Nayarit, Colima, Veracruz, Tabasco, Sinaloa, Campeche, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Quintana Roo, Yucatán, Jalisco, Chiapas y Puebla (Vidal y Nieto, 1997; Cruz , *colabs.*, 2002; Evangelista-Lozano , *colabs.*, 2003; Espinosa, 2005). Es una fruta tropical muy valiosa, con gran potencial económico, dado su valor comercial y la demanda en el mercado externo, pero de las que menos se produce a escala comercial debido a la escasa información sobre su manejo, principalmente en el aspecto nutrimental y control de enfermedades. La producción es reducida debido al daño en los frutos ocasionados por perforadores y antracnosis, ineficiente polinización y desarrollo del fruto, además de la falta de programas adecuados de fertilización que tomen en cuenta el tipo de suelo (Cruz y Torres, 1988; Evangelista-Lozano , *colabs.*, 2003).

La guanábana ha sido utilizada por los nativos de América Central y del Sur como medicina. Todas las partes del árbol *A. muricata* se utilizan en medicina natural en los trópicos (Asprey y Thornton, 1955). Se utilizan para controlar la diabetes, como un sedante y se utilizan como antiespasmódico. Las hojas y los frutos verdes han sido identificados para combatir la diarrea y se utilizan como astringentes, el té preparado de las hojas se usa contra el catarro las semillas trituradas se utilizan para matar parásitos (de Feo, 1992). Las raíces y hojas de la corteza se utilizan para la diabetes y como Sedantes y antiespasmódicos (Vasques, 1990).

La mayoría de los biocompuestos activos de *A. muricata* se describen como las acetogeninas anonáceas de monotetrahidrofuranos (Wu et al, 1995a, Gleye, 1997a, b;1998; Yu et al. 1998) como: amilo-caproato, amiloide, anomuricinas - A, -B, -C, Anonuacina, annonacin - 10 - ona, annonacin - 10 - ona, annonacinas, annonain, anomurina, Anonol, aterosperminina,  $\beta$ -sitosterol, campesterol, celobiosido, ácido cítrico, citrulina, Coclaurina, coreximina, dextrosa, etanol, folacina, fructosa, gaba, galactomanano, Geranil-caproato de glucosa, gigantetrocina A-gigantetronenina, goniotalamicina, 2,4-cis-R-annonacina-A-one, 2,4-cis-iso-anonacina, 2,4-trans-10-Rannonacina-A-one, 2,4-trans-isoannonacina, ácido isocítrico, ácido lignocérico, ácido málico, Manganeso, alcohol mericílico, metanol, metilhexano, 2-enoato,

metilhexanoato, Muricapentocina, muricato- trocinas -A, -B, muricato-trocinas A y B, muricatocinas -A, -B,C, muricina, muricinina, muricoreacina, ácido mirístico, N - p - cumaroil - tiramina, Monotetrahidrofurano acetogenina, ácido p-cumárico, parafina, cloruro de potasio, Procianidina, reticulina, scyllitol, ácido esteárico, estefarina, estigmasterol, sacarosa, tanino, Xilosil-celulosa.

### 2.3. Descripción botánica

Tabla 2. Descripción taxonómica de *Annona muricata* (guanábana).

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	Magnoliidae
<b>Orden</b>	Magnoliales
<b>Tribu</b>	Unonae
<b>Subtribu</b>	Annonineae
<b>Familia</b>	Annonaceae
<b>Subfamilia</b>	Annonoidae
<b>Género</b>	<i>Annona</i>
<b>Especie</b>	<i>Annona muricata</i>

El guanábano es un árbol perennifolio y caducifolio que alcanza normalmente de 3 a 8 metros de altura con ramificaciones desde la base hábito de crecimiento erecto y follaje compacto. El sistema radical es típico o pivotante, superficial y ramificado, presenta una raíz principal y puede originar dos o tres estratos de raíces a diferentes niveles. Las hojas se arreglan en el tallo con filotaxia alterna, son simples, con borde entero, con una estípula envolvente y protectora en los ápices (Figura 2). Las flores, están a lo largo del tallo vegetativo y prácticamente pueden formarse en cualquier yema axilar.

El fruto está formado por la fusión postgénita de numerosos frutillos carnosos, tipo drupa ya que el endocarpio es fibroso y monospermo (Figura 3), ellos están agrupados alrededor de un receptáculo carnoso que en su conjunto forman un fruto agregado de tipo polidrupa (Franco, 2000). Puede pesar de 0.4 a 10 kg y presentar pulpa blanca, carnosa, algodonosa y jugosa (Pinto y Genú, 1984; Cruz y Torres, 1988). La semilla presenta testa brillante, de color café oscuro a negro y con endospermo ruminado (Ochse, colabs., 1965; Hayat y Carright, 1968). Es ovoide y aplanada, de 14 - 20 mm de largo y de 8 - 10 mm de ancho, cada fruto puede tener hasta 300 semillas. El embrión es muy pequeño (de alrededor de 1 mm de longitud), (Vidal-Hernández, colabs., 2000; Evangelista-Lozano, colabs., 2003; Fernández, 2004)

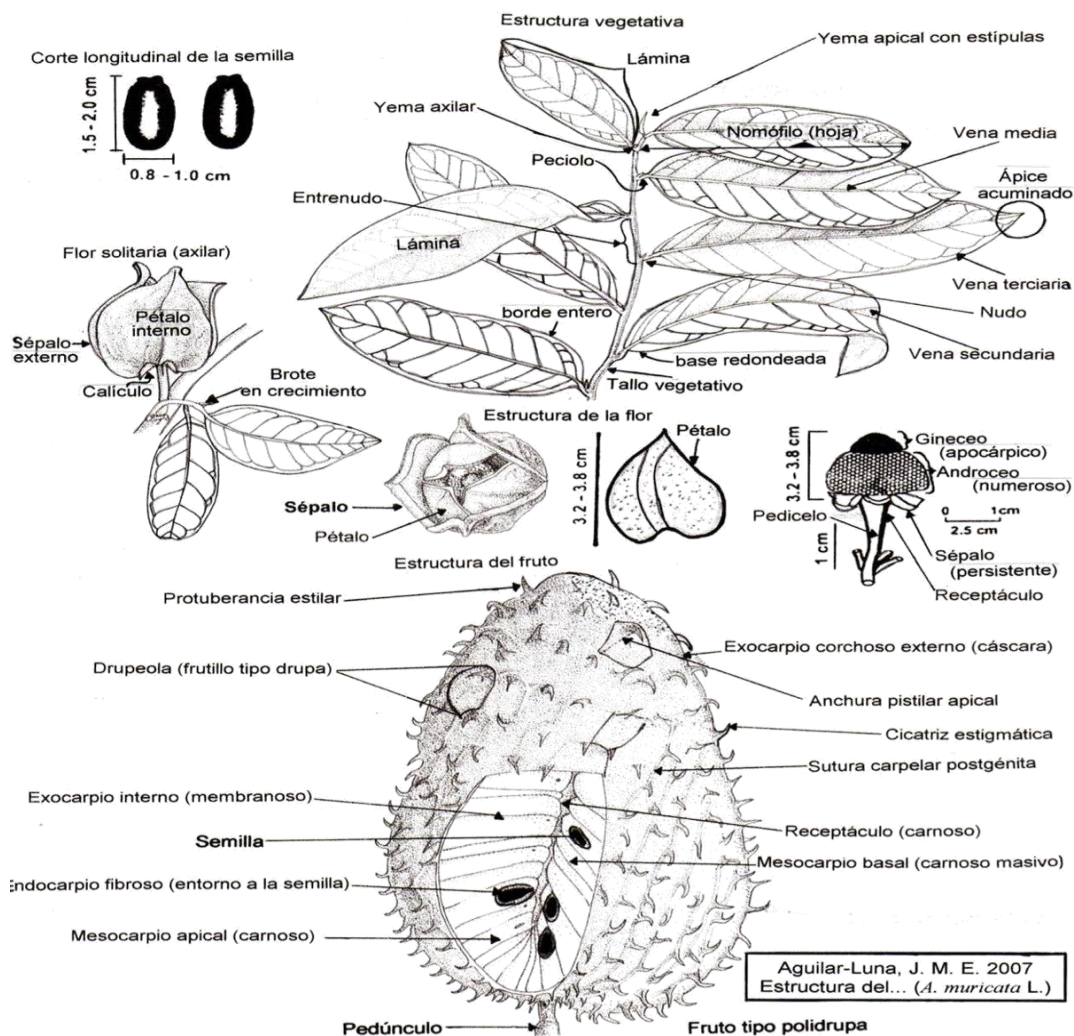


Figura 2. Estructura vegetativa y reproductiva de la guanábana.

#### **2.4. Germinación de semilla para guanábana y otras anonáceas.**

La germinación es un proceso en el cual se reanuda el crecimiento del embrión después de la fase de latencia una vez madura la semilla. Este fenómeno no se desencadena sino hasta que la semilla ha sido transportada hasta un medio favorable (Esau, 1977; Vidal y Marroquín, 2003).

La germinación se puede dividir en tres fases. En la primera fase la semilla absorbe agua mediante el proceso de imbibición y ósmosis. En la segunda fase, la absorción de agua continúa, pero se inician e incrementan procesos metabólicos como la respiración. En la tercera fase, aparece la radícula y se incrementa el crecimiento debido a la división celular. . La radícula es el primer órgano embrionario en brotar a través de la envoltura de la semilla.

En cuanto la germinación y emergencia ocurre de manera desigual e irregular a lo largo de un período de tiempo prolongado. Este patrón de germinación es atribuido a la presencia de latencia, mediante la cual, las semillas van a germinar bajo condiciones medioambientales óptimas, garantizándoles a las plántulas protección natural y mayores oportunidades de supervivencia (Baskin y Baskin, 1998).

Esta latencia se encuentra en las cubiertas seminales, de forma ser embrionica o ambas a la vez. En el primer caso se pueden aplicar tratamientos de escarificación, mientras que para el segundo, sería conveniente el de remojo en agua así como también el uso de reguladores de crecimiento (ácido giberélico), para extraer u oxidar probables inhibidores de la germinación (De Smet , colabs., 1999).

#### **2.5. Cultivo de tejidos vegetales**

Se le llama cultivo de tejidos vegetales (CTV) al conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo complejo, bajo condiciones artificiales, higiénicas y controladas.

El CTV es una herramienta invaluable para la resolución de problemas básicos y aplicados en la biología vegetal, ya que por una parte ofrece una serie de sistemas modelo ideales para la investigación fisiológica, bioquímica, genética y estructural, y por otro lado tiene una aplicación práctica en la clonación, conservación y manipulación *in vitro* de cualquier material vegetal. Otros de los pasos fundamentales para la consolidación de las técnicas de CTV lo dieron en 1962 Murashige y skoog al desarrollar un medio de cultivo (MS) que reunía las características apropiadas para ser utilizado en el cultivo de una gran variedad de tejidos de diferentes especies vegetales, dicho medio de cultivo sigue utilizándose de manera rutinaria en innumerables trabajos que se realizan actualmente (Murashige y skoog 1962).

En la actualidad, se practican varios tipos de cultivos vegetales que varían en mayor o menor grado entre ellos. A continuación se mencionan y definen los más importantes:

1. Cultivo de plantas completas. En este caso se trabaja con individuos completos, aunque cultivados bajo condiciones artificiales.
2. Cultivo de órganos. Se refiere al cultivo de órganos vegetales aislados. Los embriones aislados, ya sean maduros o inmaduros pueden ser cultivados *in vitro* con varios fines, para la obtención de desarrollo de plantas completas, o bien el generar a partir de ellos otros tipos de tejido como callo embriogénico o bien el tejido organogénico.
3. Cultivo de tejidos o segmentos de órganos. Dentro de esta categoría se encuentra el cultivo de tejido calloso. Este se refiere al mantenimiento *in vitro* de masas celulares no diferenciadas, llamadas callos o tejido calloso. Este tipo de tejido tiene innumerables aplicaciones en estudios de tipo fisiológico, bioquímico, genético, producción de compuestos secundarios, y para la generación de variación genética en los cultivos.

4. Cultivo de células. Un primer tipo de cultivo de células es el cultivo de células en suspensión. En este caso se cultivan células aisladas o pequeños acúmulos no diferenciados de células, lo cual se realiza en un medio líquido bajo agitación continua. Este cultivo es ideal para estudios fisiológicos a escala celular, para la producción *in vitro* de metabolitos de interés o bien para la selección *in vitro* de variantes deseables. Es posible también el cultivo de células gaméticas aisladas con el fin de obtener tejidos o plantas haploides.
  
5. Cocultivo. Se le da este nombre al cultivo de cualquier tejido vegetal junto con otro organismo, generalmente un microorganismo. Los tejidos vegetales cultivados *in vitro* también pueden ser inoculados con virus o infectados con nematodos y de esta manera servir como modelo para el estudio de dichos patógenos.

Hoy esta técnica tiene numerosas aplicaciones, tales como;

1. Propagación masiva de plantas, especialmente para especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción.
2. Obtención de plantas libres de virus.
3. Producción de semillas sintéticas.
4. Conservación de germoplasma (conjunto de individuos que representan la variabilidad genética de una población vegetal)
5. Obtención de metabolitos secundarios.
6. Producción de nuevos híbridos.
7. Mejora genética de plantas (incluyendo obtención de plantas transgénicas).
8. Germinación de semillas.
9. Producción de haploides.
10. Estudios fisiológicos diversos.



Con finalidad puramente descriptiva se puede clasificar los principales factores no biológicos que afectaran al desarrollo del cultivo *in vitro*, incluyendo:

#### Ambiente químico

- Composición del medio de cultivo
- pH

#### Ambiente físico

- Temperatura
- Luz y fotoperiodo
- Humedad

Dentro del proceso de micropropagación diferenciamos varias fases o etapas:

- 1: Selección y Preparación de la planta madre
- 2: Desinfección de las yemas de la planta y/o desinfección de semillas
- 3: Introducción del material seleccionado *in vitro*
- 4: Multiplicación de brotes
- 5: Enraizamiento

Esta secuencia de etapas abarca el ciclo completo de la multiplicación de plantas *in vitro*; puede ser aplicada a diferentes especies vegetales, en cada caso se podrán incluir simplificaciones o cambios de acuerdo a las características de las plantas, pero en términos generales son comunes al proceso de propagación *in vitro*.

### 1. Preparación de la planta madre

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

### 2. Desinfección del material vegetal

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia.

A efectos de obtener las condiciones de asepsia, se trabajará en cabinas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal. Estos explantes se introducirán en un tubo de cultivo conteniendo medio de iniciación para poder controlar la sanidad y la viabilidad, luego de realizar la desinfección del material con hipoclorito de sodio (agua clorada comercial), pura o diluido durante un período de 5 a 15 minutos, seguido por 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada.

### 3. Introducción del material in vitro

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro*.

#### 4. Multiplicación de los brotes

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron la fase 1 y 2 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas. El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados.

#### 5. Elección de un medio de enraizamiento de los explantes

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente plantas individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.

La siguiente lista presenta una comparación de las características de una planta en condiciones de laboratorio (*in vitro*) respecto a una planta en condiciones naturales (*in vivo*):

##### *n vitro*

- No realiza fotosíntesis
- Crecimiento en condiciones controladas
- Crecimiento en condiciones de asepsia
- Alta humedad relativa

- Estomas no funcionales
- Ausencia de pelos radiculares
- Ausencia de cera en la cutícula

*In vivo*

- Realiza fotosíntesis
- Crecimiento en condiciones no controladas
- Exposición a los patógenos y gérmenes del ambiente
- Humedad relativa variable
- Estomas funcionales
- Presencia de pelos radiculares
- Presencia de cera en la cutícula

## 2.6. Rutas morfogénicas.

La morfogénesis se define como la formación o la génesis de órganos y comprende el crecimiento y la diferenciación celular. En células o tejidos cultivados *in vitro* el proceso morfogenético puede inducirse ya que, las células vegetales son capaces bajo determinados estímulos de diferenciarse y desdiferenciarse de nuevo. Esta plasticidad celular se conoce como totipotencia celular. La respuesta morfogenética puede manifestarse siguiendo dos rutas alternativas: la organogénesis y la embriogénesis.

En la organogénesis se produce la formación de tallos, raíces u otras estructuras y en la embriogénesis se forman embriones que al germinar dan lugar a una planta. En ambos casos, el proceso se genera a partir de células somáticas. Si la respuesta primaria al estímulo morfogenético es la formación de callo antes de diferenciarse meristemas o embriones se habla de organogénesis o embriogénesis indirecta.

En algunas ocasiones se utiliza el término regeneración adventicia que hace referencia a la regeneración que se produce a partir de un lugar que no es el común en el desarrollo de una planta, por ejemplo la regeneración de una planta a partir de un segmento de hoja. Según lo comentado anteriormente, la regeneración adventicia podría incluir plantas regeneradas en un proceso organogénico o en un proceso embriogénico, sin embargo, en cultivo *in vitro* cuando se utiliza este término generalmente se hace referencia a meristemas adventicios obtenidos por la vía organogénica.

Factores que afectan los procesos morfogénicos.

Los cuatro factores principales que condicionan la obtención y el crecimiento de nuevos órganos en condiciones *in vitro* son:

- El genotipo
- Las condiciones químicas seleccionadas para realizar el cultivo
- Las condiciones físicas seleccionadas para realizar el cultivo
- El explante.

El genotipo es un factor determinante en todos los procesos morfogénicos desde la capacidad del explante para su establecimiento en condiciones *in vitro* así como también para la proliferación de callo, o la diferenciación y crecimiento de nuevos órganos. Por esta causa, no es posible generalizar metodologías o protocolos de trabajo debido a que los medios de cultivo como las condiciones de cultivo seleccionados, deben ser específicos para cada situación en particular.

#### **2.6.1. Embriogénesis somática.**

Se puede definir la totipotencia en los vegetales como la capacidad para regenerar un individuo completo a partir de una sola célula. El ejemplo de totipotencia más significativo es la embriogénesis somática. Mediante este proceso se pueden obtener embriones no cigóticos (que no se forman sexualmente) a partir de cualquier tejido vegetal.

En la embriogénesis somática se pueden distinguir cuatro etapas: inducción, proliferación, maduración y germinación (Egertsdotter, 1999; Yang y Zhang, 2007; Chitra Devi y Narmathabai, 2011).

Durante la fase de inducción, las células somáticas diferenciadas adquieren la competencia embriogénica y proliferan como células embriogénicas.

En las fases de proliferación, maduración y regeneración, las células embriogénicas muestran su competencia embriogénica y se diferencian para formar embriones somáticos (Jiménez, 2001).

Con el fin de regular eficazmente el proceso de desarrollo de la regeneración de plantas, a partir de células somáticas y a través de embriogénesis somática, es importante entender lo que ocurre durante estas fases.

El término “Células embriogénicas” se refiere a aquellas células que han completado su transición de un estado somático a uno en el que pueden producir embriones somáticos, reprogramando el ciclo celular con la ayuda de estímulos exógenos, tales como la aplicación de reguladores del crecimiento (Komamine y cols., 1992; De Jong y cols., 1993). Las células que no han completado esta transición pero que solo necesitan la aplicación de estímulos exógenos para convertirse en embriogénicas se definen como “Células competentes” (Toonen y cols., 1994).

Aún no están claros los cambios a los que tienen que someterse las células somáticas con el fin de convertirse en células embriogénicas, capaces de formar un embrión en una etapa posterior del desarrollo.

Los estudios con cultivos de zanahoria y alfalfa indicaron que la polaridad celular (Dijak y cols., 1986; Smith y Krikorian, 1990) y una primera división celular asimétrica (Bogre y cols., 1990; Komamine y cols., 1990) estaban implicadas en la iniciación de la embriogénesis somática. Los reguladores del crecimiento exógenos, probablemente modifiquen la polaridad celular al interferir con gradientes de pH o campos eléctricos alrededor de las células (Dijak y cols., 1986; Smith y Krikorian, 1990). Sin embargo, el sistema de seguimiento celular desarrollado por Toonen y cols. (1994) demostró que las células embriogénicas de zanahoria eran capaces de formar embriones somáticos después de una división simétrica o asimétrica. Esto implica que el plano correcto de división no es necesario para la embriogénesis somática. Sin embargo, la distribución asimétrica de las moléculas intracelulares o de los componentes celulares si tiene relación con el diferente destino de las células (Vroemen y cols., 1999).

En términos generales, el inicio de la embriogénesis somática implica que las células del explante cambien su patrón de expresión y generen embriones somáticos. La iniciación de la vía embriogénica está restringida a la respuesta de ciertas células que pueden activar los genes implicados en la generación de células embriogénicas (Nomura y

Komamine, 1985; Quiroz-Figueroa y cols., 2002).

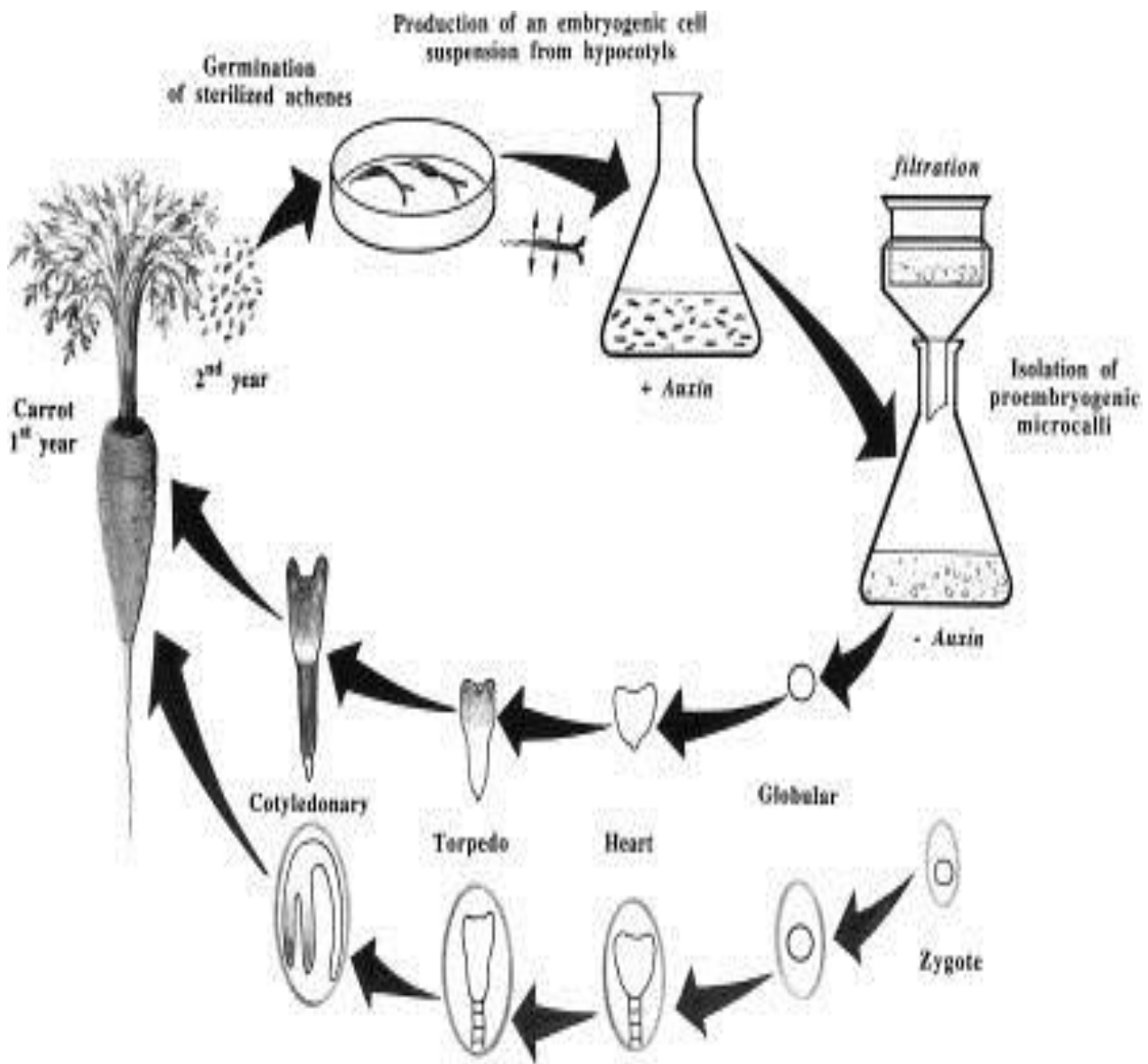


Figura 3.- Embriogénesis cigótica y somática en zanahoria (*Daucus carota*). [Imagen de: V.L. Dodeman , colabs., (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. Journal of Experimental Botany 48:1493–1509].



### **2.6.2. Organogénesis**

La organogénesis es una de las vías morfogénicas en la cual se diferencian meristemas a partir de las células o tejidos cultivados. Cuando se produce un meristemo apical su desarrollo da lugar a una planta.

La organogénesis conduce a la producción de vástagos unipolares que enraízan en etapas sucesivas, mientras que por embriogénesis somática se forman embriones bipolares a través de etapas ontogénicas similares a la embriogénesis cigótica.

La organogénesis puede darse por inducción de yemas axilares o adventicias. La inducción de yemas axilares comprende la multiplicación de yemas preformadas, usualmente sin formación de callo. La inducción de yemas adventicias comprende la inducción de tejido meristemático localizado mediante un tratamiento con reguladores de crecimiento, conduciendo a la diferenciación del primordio y desarrollo del vástago, esto último generalmente en ausencia del regulador de crecimiento que indujo la organogénesis.

### **2.6.3. Organogénesis directa**

Es la formación de estructuras bipolares o embrioides a partir de: tejidos embrionarios (óvulos, nucela, embriones cigóticos, embriones somáticos) plántulas muy juveniles (hipocotilo y cotiledones).

### **2.6.4 Organogénesis indirecta**

Multiplicación a través del cultivo de callo o indirecta se considera de menor valor la micropropagación obtenida de este modo, debido a la alta incidencia de anomalías cromosómicas producidas como aneuploidías o poliploides. Existen referencias de cultivos regenerativos de callos estables, seleccionados a partir de sectores organogénicos o embriogénicos de callos.

## 2.7. Reguladores de crecimiento vegetal

Los reguladores de crecimiento vegetal son sustancias que actúan sobre el desarrollo de las plantas y que, por lo general, son activas a concentraciones muy bajas, llevan a cabo funciones reguladoras en células determinadas, regulando el crecimiento, desarrollo o metabolismo del vegetal. Esta actividad reguladora se debe a la interacción de los RCV con receptores específicos en la célula, que al acoplarse entre sí, se activan.

Dentro de este grupo de moléculas podemos diferenciar entre las que son producidas por la planta (origen natural) y aquellas de origen sintético. Las sustancias consideradas como fitohormonas se clasifican en:

- Auxinas.
- Giberelinas.
- Citocininas.
- Ácido abscísico.
- Etileno.

### 1. Auxinas

Se denominan auxinas a los compuestos caracterizados por su capacidad de inducir elongación de células. Son sintetizadas en los ápices meristemáticos y en menor cantidad en las raíces. La auxina principal sintetizada de forma natural por las plantas es el ácido indol acético (AIA).

Auxinas naturales:

Ácido indol acético (AIA)

Ácido cloroindol-3-acético (Cl-IAA)

Auxinas sintéticas:

Ácido indol-3-butírico (IBA)

Ácido fenilacético (PAA)

Ácido naftalen acético (ANA)

Ácido 2- metoxi, 3,6-Diclorobenzoico (dicamba)

Ácido 2,4- Diclorofenoxiacético (2,4-D)

Ácido 2, 4,5-Triclorofenoxiacético (2,4,5-T)

Las auxinas inducen una gran diversidad de efectos fisiológicos, entre los más significativos destacan:

- Aumento de la extensibilidad de la pared celular.
- Participación en la diferenciación celular.
- Estimulación de foto y gravitropismo.
- Estimulación del desarrollo del fruto después de la fecundación
- Regulación de la abscisión.

## 2. Giberelinas

Las giberelinas son fitorreguladores que son sintetizados en muchas partes de la planta, pero más especialmente en áreas de crecimiento activo como los embriones o tejidos meristemáticos. A la fecha, se han identificado cerca de 112 giberelinas diferentes y se denominan sucesivamente GA1, GA2, GA3, etc (Rojas-Garcidueñas & Rovalo 1985).

El GA3 es el único de uso comercial y se conoce como ácido giberélico. Las giberelinas actúan fundamentalmente sobre el RNA desinhibiendo genes.

Esta acción está bien caracterizada con respecto a dos genes que en ausencia de giberelina están reprimidos:  $\alpha$ -amilasa y los genes para el alargamiento normal de los entrenudos del tallo. Existe un receptor para la giberelina en la capa de aleurona de la semilla. El GA3 induce la síntesis de  $\alpha$ -amilasa, que es la enzima que toma parte en la desintegración de las reservas de almidón durante la germinación de las semillas. Debido a esta función, es bien conocido su uso como promotor o inductor de la germinación en diversos tipos de plantas (Lewak & Khan 1977; Bewley & Black 1994; Baskin & Baskin 1998; Tigabu & Odén 2001).

Las giberelinas se encuentran involucradas en el control de procesos de control claves en el desarrollo de las plantas:

- Elongación de tallos
- Movilización endospermática
- Floración
- Fructificación

### 3. Citocininas

Las citocininas o citoquininas influyen en el crecimiento vegetal de varias maneras, incluidos el control de la división y diferenciación celulares, contrarrestando la dominancia apical, y retrasando el envejecimiento de las hojas. El nombre de citocininas se refiere a su papel en la división celular o citocinesis. Las citocininas se sintetizan en la raíz y se transportan a través del xilema a otros órganos de la planta, donde fomentan de manera general un estado más juvenil de desarrollo.

### 3. Justificación

La especie *Annona muricata L.*, conocida en Chiapas como guanábana, desde el punto vista comercial, sus frutos son utilizados tanto para el consumo fresco como para el procesamiento agroindustrial. Se han reportado que algunos metabolitos secundarios de esta especie poseen propiedades antioxidantes e insecticidas, lo cual representa una especie importante y de gran interés.

Por ello surgen alternativas como lo es la micropropagación *in vitro*, que permite la multiplicación masiva de especies, que nos permitirá reforestar terrenos y aumentar el número de ejemplares de la especie utilizando este método de propagación, obtener plantas mejoradas genéticamente que nos proporcionen mayores rendimientos en cuanto a la producción y extracción de metabolitos.

Sin embargo presentan latencia dificultando su germinación y propagación de esta importante especie de anonáceas. Con la finalidad de incrementar el porcentaje y disminuir el tiempo de germinación de semillas de guanábana (*Annona muricata L.*), se llevara a cabo un experimento en el que se estudie la influencia de la escarificación, y la imbibición de la semilla sobre su porcentaje y velocidad de germinación.

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo general

- Obtención de un protocolo para la micropropagación de la especie *Annona muricata*.

### 4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones del ácido Giberelico GA<sub>3</sub> sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Annona muricata*.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de BAP (6-bencil amino purina), ANA (Ácido α-naftalenacético) y 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), utilizando hipocotilos como explantes en la generación de respuestas morfogénicas.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de AIB (Ácido 3-indolbutírico), para el enraizamiento de brotes.

## 5. Materiales y Método.

### 5.1. Medio de cultivo

El medio utilizado fue MS (Murashige & Skoog, 1962), el cual se preparó por soluciones concentradas las cuales se encontraban constituidas de la siguiente manera. (Tabla 2).

Tabla 2. Soluciones STOCK del medio MS.

SOLUCIONES	CANTIDAD
<b>SOLUCION A.</b> Concentración 1000 X Volumen: 50 ml <ul style="list-style-type: none"><li>• Cloruro de calcio (<math>\text{Ca-Cl}_2\cdot 2 \text{H}_2\text{O}</math>)</li></ul>	22.0 g
<b>SOLUCION B.</b> Concentración 1000 X Volumen: 50 ml <ul style="list-style-type: none"><li>• Yoduro de potasio (KI)</li><li>• Cloruro de cobalto (<math>\text{CoCl}_2\cdot 6 \text{H}_2\text{O}</math>)</li></ul>	41.50 mg 1.25 mg
<b>SOLUCION C.</b> Concentración 400 X Volumen:50 ml <ul style="list-style-type: none"><li>• Fosfato monobásico de potasio (<math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math>)</li><li>• Ác. bórico (<math>\text{H}_3\text{BO}_3</math>)</li><li>• Molibdato de sodio (<math>\text{NaMoO}_4</math>)</li></ul>	3.400 g 0.124 g 0.005 g
<b>SOLUCION D.</b> Concentración 400 X Volumen: 50 ml <ul style="list-style-type: none"><li>• Sulfato de magnesio (<math>\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}</math>)</li><li>• Sulfato de manganeso (<math>\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}</math>)</li><li>• Sulfato de zinc (<math>\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}</math>)</li><li>• Sulfato de cobre (<math>\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}</math>)</li></ul>	7.400 g 0.340 g 0.172 g 0.50 g

<b>SOLUCION E.</b> Concentración 200 X	
Volumen: 100 ml	0.557 g
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O)</li> <li>• EDTA disódico (Na<sub>2</sub> EDTA)</li> </ul>	0.745 g
<b>SOLUCION F.</b> Concentración 100 X	
Volumen: 100 ml	20.0 mg
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicina</li> <li>• Piridoxina HCl</li> <li>• Ac. Nicotínico</li> <li>• Tiamina HCl</li> <li>• Mio inositol</li> </ul>	5.00 mg
	5.00 mg
	1.00 mg
	1.00 g

Para la solución E se disolvieron ambos componentes por separado, el cual requiere calentar. Agregar poco a poco la solución Fe a la de EDTA y aforar. Debe quedar color amarillo sin precipitados.

## 5.2. Preparación de medio MS para germinación.

En un vaso de precipitados de 1 L se colocaron 850 ml de H<sub>2</sub>O destilada, agregando en volumen indicado de las soluciones concentradas (Cuadro 2). Posteriormente, se pesó, añadió y agitó hasta disolver los compuestos que sirvieron como fuente de nitrato y carbono (Cuadro 3).

Se aforó a 1 L con H<sub>2</sub>O destilada, fueron agregados los reguladores de crecimiento vegetal (Cuadro 4) y se ajustó el pH del medio a 5.7 con NaOH o HCl 0.1 N.

Se pesó y agregó 2.5 gramos de gelificante Phytigel®, el cual se disolvió calentando. Finalmente se distribuyeron en recipientes de cultivo con 20 ml de medio y se esterizaron en autoclave a 15 lb por 15 minutos.



Tabla 3. Cantidad de soluciones STOCK para medio MS.

Solución	Volumen (ml)
A	1
B	1
C	2.5
D	2.5
E	5
F	10

Tabla 4. Fuente de nitrato y carbono

Compuestos	Cantidad (g)
Sacarosa	30
Nitrato de potasio	1.90
Nitrato de amonio	1.65

Tabla 5. Cantidades de reguladores de crecimiento

Regulador	Cantidad (mg.L <sup>-1</sup> )
<b>GA<sub>3</sub></b>	1,2,3,4

### 5.3. Material vegetal

Los Frutos fueron seleccionados del rancho de Villa Corzo Chiapas, “Ascendero verde” en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas., los frutos obtenidos, fueron utilizados para la obtención de semillas de *Annona muricata*, dichos frutos fueron seleccionados con características tales como de una buena calidad en tamaño, color y sin ningún daño ocasionado por plagas o enfermedades en el fruto.



Figura 4. Frutos seleccionados del rancho “Ascendero verde”.

### 5.4. Escarificación de la semilla

Las semillas seleccionadas fueron previamente escarificadas con una pinza ordinaria de jardinería, donde se trató de eliminar pequeñas parte de la testa que cubre al embrión, sin dañar al embrión. La ruptura de testa nada más se da en la parte superior de la semilla tratando de exponer más al embrión al colocarlo al embrión.



Figura 5. Muestreo de semillas escarificadas, ruptura de testa con la ayuda de una pinza de jardinería.

#### **5.5. Desinfección de semillas**

Se lavaron las semillas con detergente líquido comercial Axióñ® por 5 minutos en agitación constante. Posteriormente se colocaron en una solución de agua destilada con 2 gotas de tween 80 por 15 minutos manteniéndolas en agitación. Después de esto se prosiguió con la desinfección de las semillas en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Las semillas se colocaron en una solución de etanol al 90% durante 5 minutos en agitación constante, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Seguido de esto se depositaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 30% durante 15 minutos. Finalmente se enjuagaron con agua destilada estéril 3 veces.

### 5.6. Germinación *In vitro*

Las semillas previamente desinfectadas fueron colocadas en frascos Gerber con 20 ml de medio MS, suplementado con GA<sub>3</sub> (ácido giberélico) a 1.0 mg/L, 2.0 mg/L, 3.0 mg/L y 4.0 mg/L para determinar la concentración más adecuada para el proceso de germinación *in vitro*. Los frascos fueron colocados en la cámara bioclimática en condiciones de oscuridad, en un periodo de 30 días aproximadamente. Una vez que la semilla germinó se esperó a que el hipocotilo tuviera un tamaño adecuado y el frasco se transfirió a condiciones de fotoperiodo durante 15 días para posteriormente tomar el hipocotilo como explante.



Figura 6. Semillas en germinación ubicadas en cámara bioclimática en completa oscuridad.

### 5.7. Inducción

Para la inducción se utilizó medio de cultivo MS ½ suplementado con reguladores de crecimiento en distintas concentraciones como se indica en la Tabla 1.

Tabla 6. Reguladores de crecimiento en la etapa de inducción.

Regulador	Concentraciones
ANA	0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L
BAP	0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L

Se tomaron hipocotilos de aproximadamente 20 días posterior a la germinación fueron seccionados en explantes de aproximadamente 1 cm de longitud. Estos explantes fueron colocados en medios de cultivo de inducción al cual se le adiciono, 0.25 g/L de carbón activado, 100 mg/L de Ácido Cítrico y Ascórbico. El PH a 5.7 previo a la esterilización. Los frascos permanecieron en condiciones de fotoperiodo 16/horas Luz – 8 oscuridades (Figura 7).

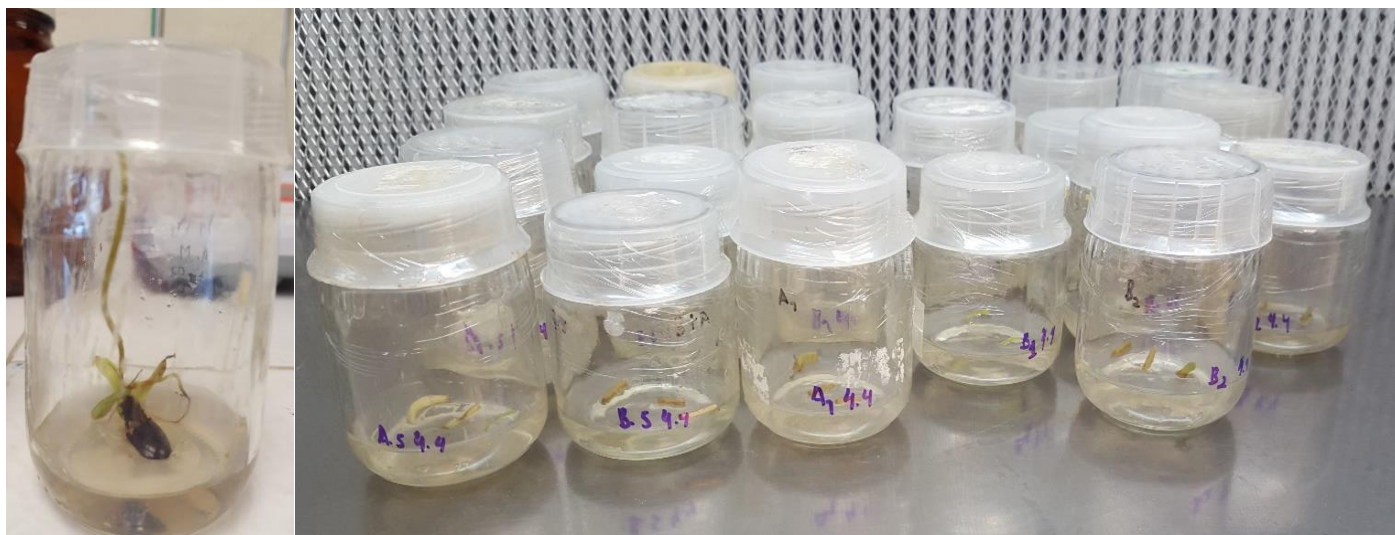


Figura 7. Inducción de hipocotilo en medios enriquecidos con reguladores.

### 5.8. Enraizamiento de brotes

Brotos generados a partir de hipocotilos inducidos se transfirieron a medio de enraizamiento con diferentes concentraciones de Ácido Indolbutilico (Figura 8), como se describe en el Tabla 2 para determinar la concentración más adecuada que estimule la formación de raíces.

Tabla 7. Condiciones de concentraciones en la etapa de enraizado.

Compuesto	Concentración
MS	$\frac{1}{2}$
AIB	0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L

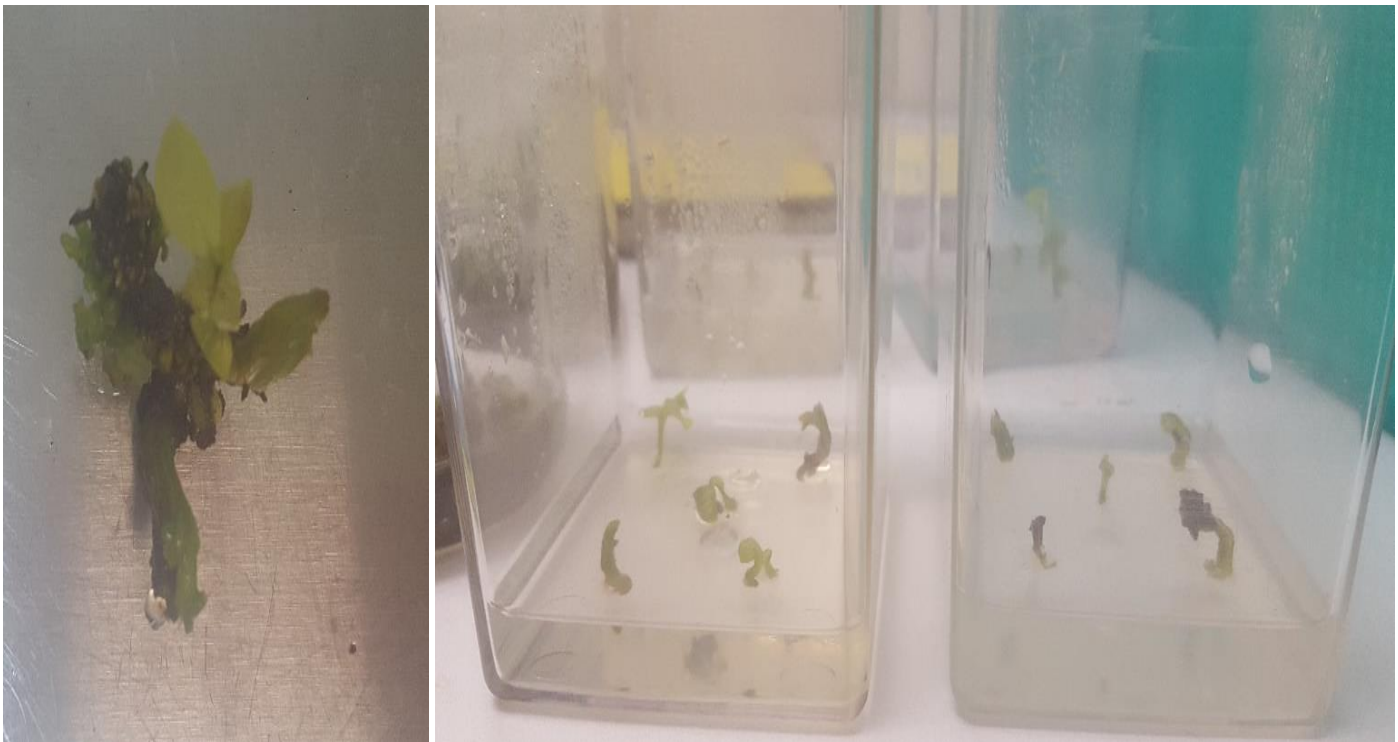


Figura 8. Brotes seleccionados y puestos en medio enriquecidos con Ácido indolbutílico, con 2 mg/L.



## 6. Resultados

### 6.1. Germinación in vitro

La germinación de las semillas de *Annona muricata* se observó a los 28 a 30 días después de la siembra en los medios suplementados con GA<sub>3</sub>. Se observó que la escarificación mecánica acelera el proceso de germinación, debido a que las semillas escarificadas emitieron radícula con respecto a las semillas no escarificadas. Al evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de GA<sub>3</sub> en la germinación de las semillas se observó que esta hormona estimula este proceso, el mayor número de germinación fue en el tratamiento suplementado con 3 mg/L con escarificación teniendo un porcentaje de 50% seguida de las concentraciones de 2 y 4 mg/L respectivamente como se representa en el Tabla 8.

Concentraciones	Escarificadas	No escarificadas
Control	0	0
1 GA <sub>3</sub>	1	1
2 GA <sub>3</sub>	3	1
3 GA <sub>3</sub>	9	6
4 GA <sub>3</sub>	4	1

Tabla 8. Numero de germinación por semilla con o sin escarificación.

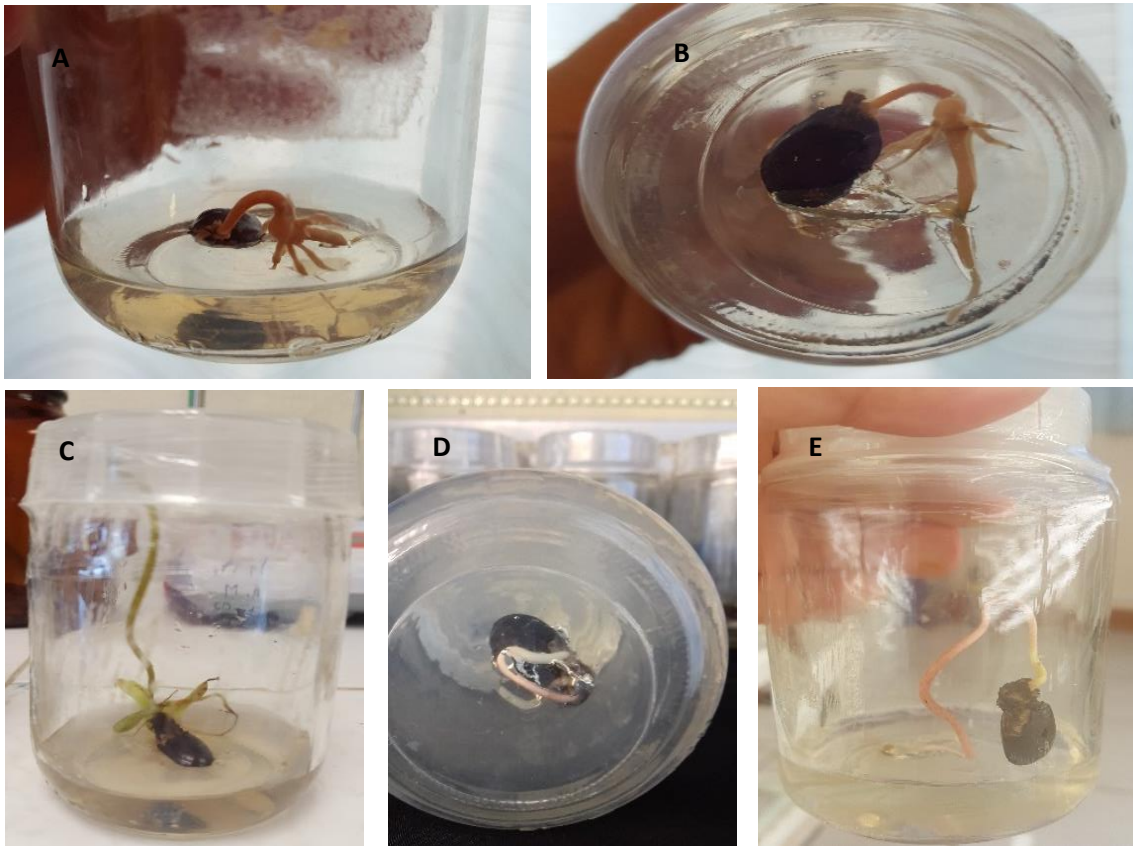


Figura 9. Germinación de semillas escarificadas y no escarificadas en diferentes tratamientos **C, E** son semillas con escarificación en concentraciones de 3 mg/L de GA<sub>3</sub>, las semillas **A, B** y **D** son semillas sin escarificación con 3 mg/L de GA<sub>3</sub>

## 6.2. Inducción

Hipocotilos inducidos en medio MS suplementado con 6-Bencil Aminopurina, Ácido  $\alpha$ -naftalenacético y Acido 2,4 diclorofenoxiacético se presentaron las siguientes respuestas correspondientes del mes de agosto 2016 como se muestra en las figuras a continuación.

### 6.2.1. Ácido $\alpha$ -naftalenacético (ANA).

En el uso de ANA en concentraciones bajas las respuestas fueron menores demostrando muerte de hipocotilo, mientras que en 1 y 2 mg/L se muestra presencia de callos y una respuesta lenta en la obtención de brotes.



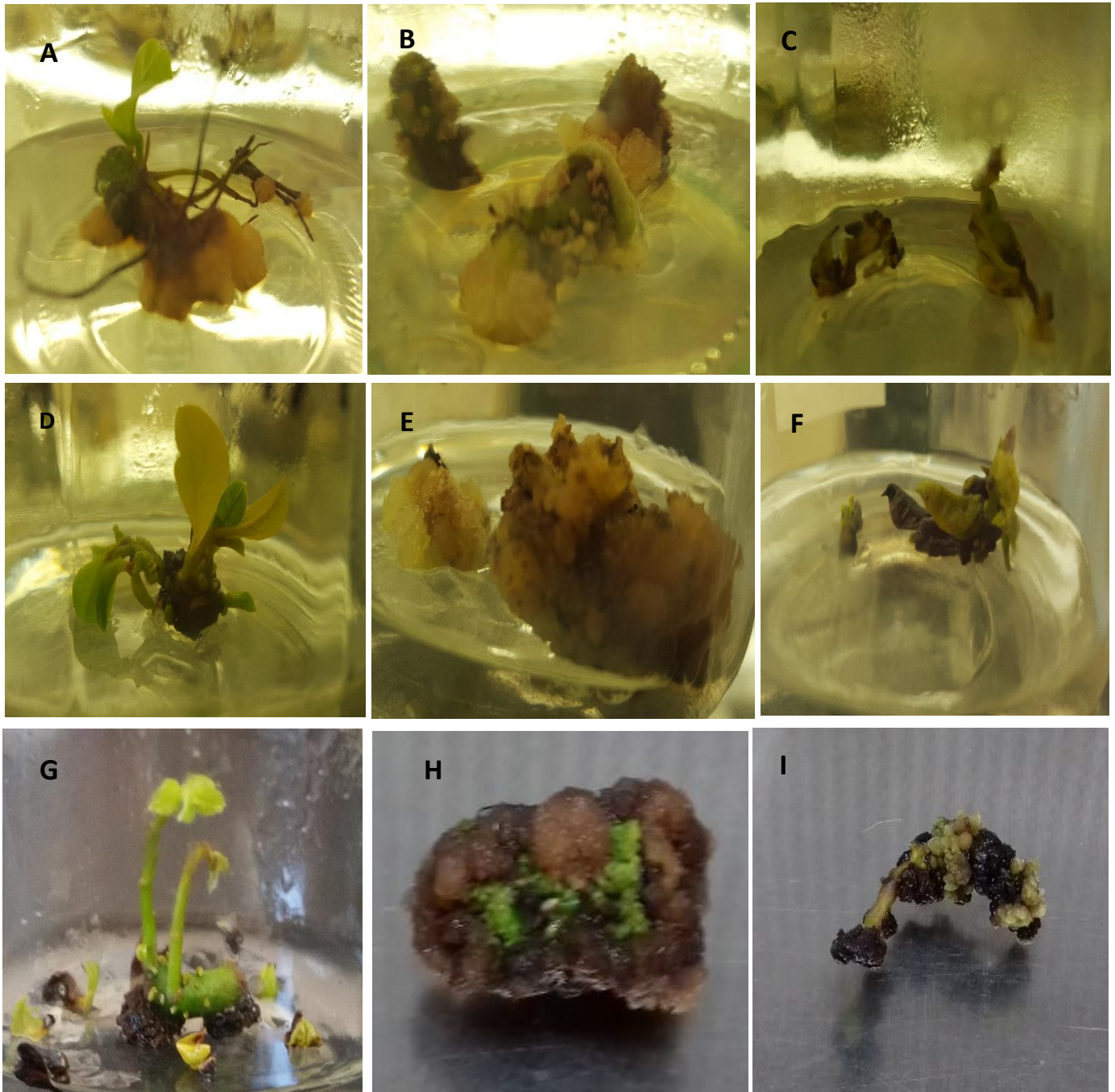


Figura 10. Inducción de organogénesis directa e indirecta de anona muricata. A), B) y C) Organogénesis directa e indirecta de *Annona muricata* en medio MS suplementados con [0.5 mg/L] [1 mg/L] y [2 mg/L] a los 60 días de inducción. D) y F) Organogénesis directa con [0.5 mg/L] Y [2 mg/L] Ácido  $\alpha$ -naftalenacético a los 120 días de inducción. E) Organogénesis indirecta con [1 mg/L] de Ácido  $\alpha$ -naftalenacético a los 120 días de inducción. G) Organogénesis directa con [0.5 mg/L] Ácido  $\alpha$ -naftalenacético a los 180 días de inducción. H) y I) con [1 mg/L] y [2 mg/L] de Ácido  $\alpha$ -naftalenacético a los 180 días de inducción en Medio MS.

### 6.2.2. 6-Bencil Aminopurina (BAP)

Las mejores respuestas en obtención de brotes se presentaron en la concentración de 0.5 mg/L de BAP, mientras que en la de 1 y 2 mg/L de BAP se presentó un poco crecimiento en brotes y oxidación lenta del hipocotilo. A continuación se mostraran resultados de obtención brotes de 2 (A, B, C) 4 (D, E, F) y 6 (G, H, I) meses.

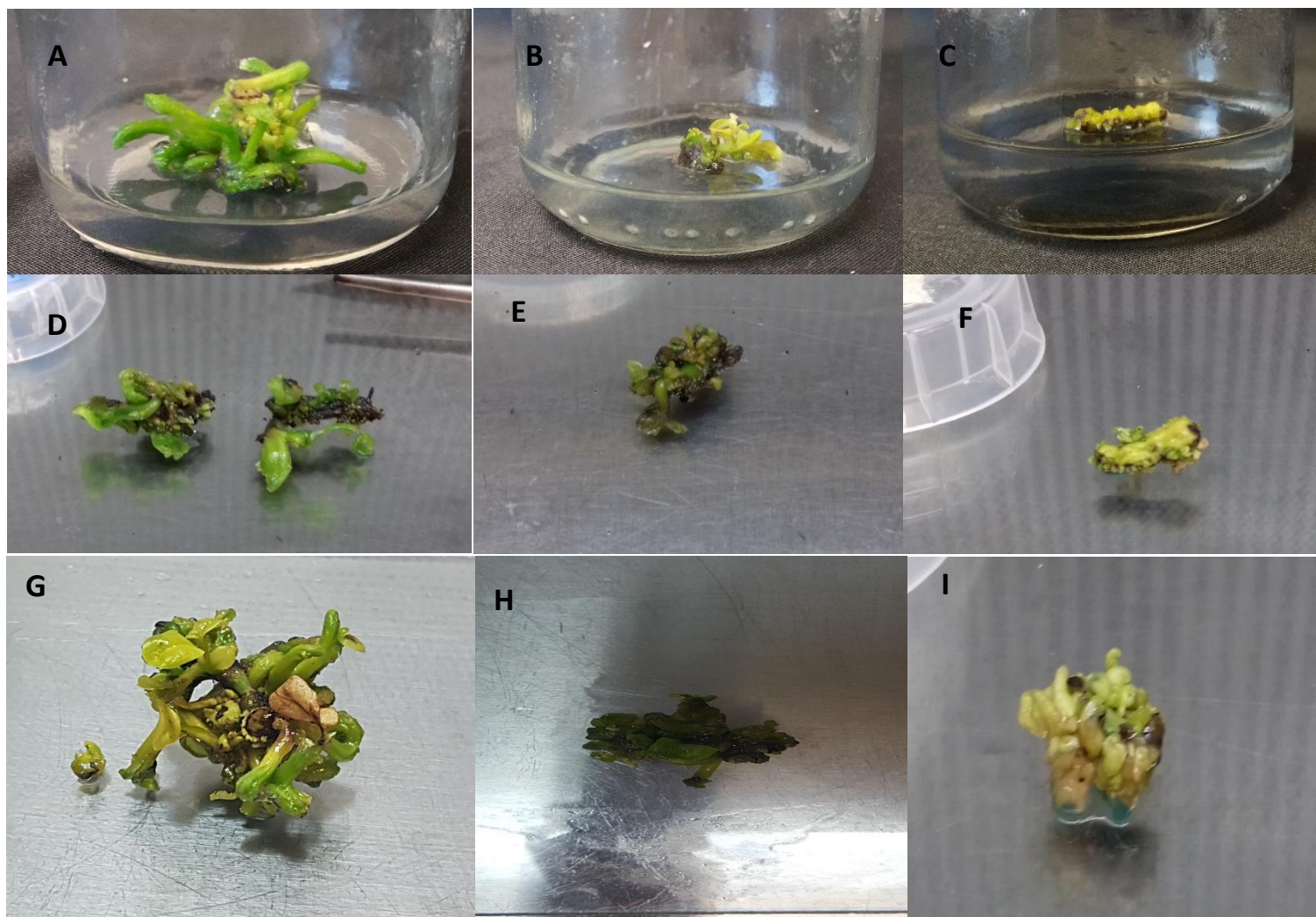


Figura 11. Inducción de organogénesis directa de anona muricata A), B) Y C) en medios suplementados con con [0.5 mg/L], [1 mg/L] y [2 mg/L ] 6-Bencil Aminopurina a los 60 días de inducción. D), E) y F) Inducción de organogénesis directa con [0.5 mg/L], [1 mg/L] y [2 mg/L ] de ] 6-Bencil Aminopurina a los 120 días de inducción. G), H) y I) Inducción de organogénesis directa con [0.5 mg/L], [1 mg/L] y [2 mg/L ] de ] 6-Bencil Aminopurina a los 180 días de inducción.



### 6.3. ENRAIZAMIENTO

Se está evaluando el efecto de Ácido 3-indolbutírico en tres diferentes concentraciones para la formación de raíces en brotes de anona muricata, como se presenta en la figuras a continuación.

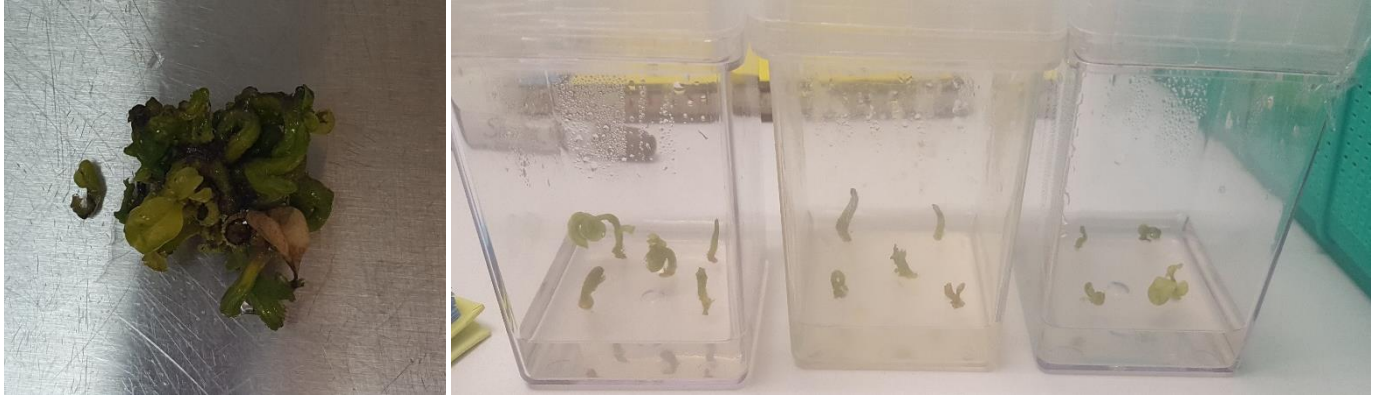


Figura 12. Brotes tomados de 0.5 mg/L BAP, colocados en 0.5 mg/L AIB.

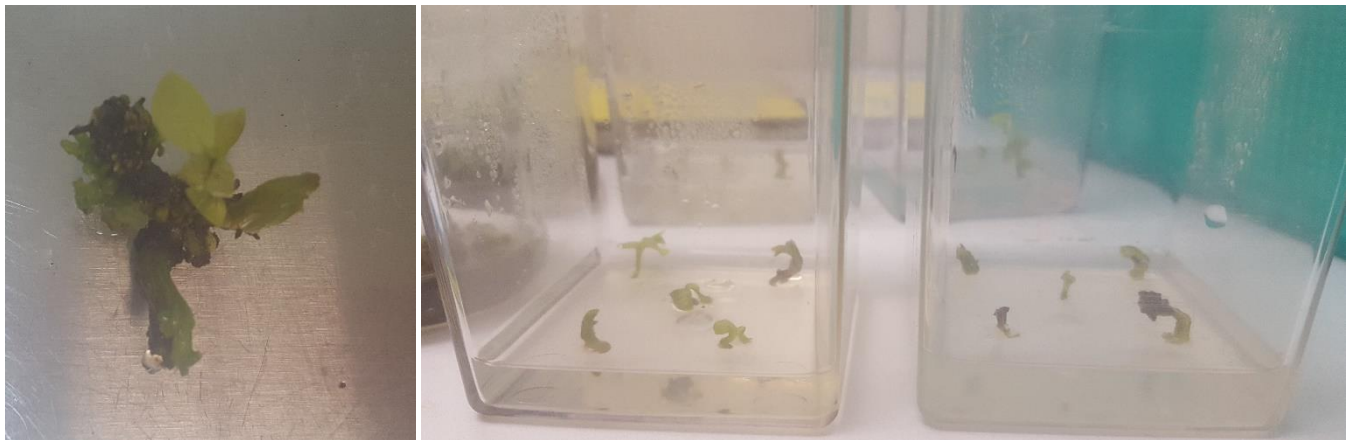


Figura 13. Brotes tomados de 0.5 mg/L BAP, colocados en 1 mg/L AIB.



Figura 14. Brotes tomados de 0.5 mg/L BAP, colocados en 2 mg/L AIB.

## 7. CONCLUSIÓN

De las diferentes concentraciones en medios de estudio en la germinación y en el uso de la escarificación, los mejores resultados se observaron en medios enriquecidos con 3 mg/L de GA<sub>3</sub>, la germinación fue presente de 28 a 30 días después de la colocación en medios, cabe señalar que el uso de escarificación en semillas en el caso de 3mg/L fueron casi idénticas al realizar o no la escarificación mecánica. De acuerdo a la inducción en respuestas de organogénesis directa los mejores resultados se han obtenido utilizando como medio de inducción el de Murashige y Skoog, siempre en presencia de auxinas y citoquininas. Las mejores respuestas se obtuvieron utilizando BAP en bajas concentraciones presentado los mejores brotes en crecimiento y cantidad. Los explantes inductores fueron hipocotiledones. Para aumentar la eficiencia de organogénesis, fue necesario, a partir del primer mes de inducción y en todos los casos, traspasar los callos a un nuevo medio. Los brotes obtenidos se desarrollaron normalmente y para su germinación y transformación en plántulas es necesario la presencia de ácido indolbutílico en el medio.

## **8. RECOMENDACIONES**

Para un mejor análisis es recomendable hacer un análisis de la viabilidad de la semilla en uso, y así poder tener mejor repuestas en la germinación y menor tiempo además de una selección rigurosa del frutos en donde se obtendrán las semillas, también es recomendable analizar el efecto de hormonas de manera combinada para evaluar el efecto en las respuestas morfogénicas de los explantes, posteriormente también el uso de la hormona AIA en la etapa de enraizamiento. Como un dato importante es recomendable que los cultivos en las dos últimas etapas se han considerado un tiempo en oscuridad, antes de exponer a luz.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Asprey GF and Thornton P (1955) Medicinal plants of Jamaica. *West Indian Med.* 4: 69- 92.
2. Baskin, C.C. y J.M. Baskin. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 14, 1-16.
3. Baskin, C.C. y J.M. Baskin. 2001. *Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination.* Academic Press, San Diego, CA.
4. Bejoy, M., Hariharan, M. (1992). In vitro plantlet differentiation in *Annona muricata*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 31: 245-247.
5. de Feo V (1992) Plantas medicinales y magicas del norte de los Andes Peruanos. *Fitoterapia* 63: 417-440.
6. Encina, C.L., Barceló-Muñoz, A., Herrero-Castaño, A., Pliego-! Alfaro F. (1994) *In Vitro* Morphogenesis of *Annona cherimola* Mill. *Bud Explants. J. Hortic. Sci.*69: 1053-1059.
7. Encina, C.L., Díaz ,J.A., Botella, J.R. (2001) Ripening related ACC synthase from cherimoya (*Annona cherimola* Mill). GenBank # AF443280.
8. Encina, C.L., (2004) *Annona* spp. Atemoya, Cherimola, Soursop and Sugar Apple. In: *Biotechnology of Fruit and Nut Crops* R.E Litz (Ed.) CAB International. Wallingford-Oxon. UN. pp. 74-88.
9. Gleye C, Duret P, Laurens A, Hocquemiller R and Cave A (1998) Cismonotetrahydrofuranacetogins from the roots of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products* 61: 576-579.
10. Gleye C, Raynaud S, Hocquenmiller R, Laurens A, Fourneau C, Serani L, Laprevote O, Roblot F, Leboeuf M, Fournet A, Dearias AR, Figadere B and Cave A (1998b) Muricadienin, muridienins and chatenaytrienins, the early precursors of annonaceous acetogenins. *Phytochemistry* 47: 749-754.
11. Gleye C, Laurens A, Hocquemiller R and Cave A, Laprevote O and Serani L (1997a) Isolation of mantecristin, a key metabolite in biogenesis of acetogenins from *Annona muricata* and its structure elucidation by using tandem mass spectrometry. *Journal of Organic Chemistry* 7: 510-513
12. Lemos, E.E.P., Blake J. (1996) Micropropagation of Juvenile and Mature *Annona muricata* L. *J.Hortic. Sci,* 71 : 395-403.
13. Litz, R.E., Witjaksono., Raharjo S., Efendi D., Pliego-Alfaro F. and Barceló-Muñoz A.(2005) *Persea americana* Avocado. In: Litz, R.E. (Ed.). *Biotechnology Fruit and NutCrops.* Wallingford, UK, CAB International. pp. 326-347.
14. Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

15. Smith MK and Drew RA (1990) Growth and yield characteristics of dwarf off-types recovered from tissue-cultured banana. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 30: 575-578
16. Pinto, A.C., Cordeiro, M.C.R., De Andrade S.R.R., Ferreira F. R., De Filgueiras H.A., AlvesR.E., Kinparaet D. I. *Annona* species. (2005) International Center for Underutilised Crops. University of Southampton, Southampton, UK. 283.
17. Vidal-Valverde C, Herranz J, Blanco I and Rojas-Hidalgo E (1983) Dietary fiber of spanish fruits. *Fruits* 47: 1840-1845
18. Wu F, Zeng L, Gu ZM, Zhao GX, Zhang Y, Schwedler JT and Mclaughlin JL (1995b) Muricatocins A and B, two new bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products* 58: 902-908
19. Wu FE, Gu ZM, Zeng L, Zhang Y, Mclaughlin JL and Sastrodihardjo S (1995a) Two new cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins, annomuricins a and b, from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products* 58: 830-836
20. Wu FE, Zeng L, Gu ZM, Zhao GX, Zhang Y, Schwedler JT and Mclaughlin JL (1995c) New bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins, annomuricin c and muricatocin c, from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products* 58: 909-915.
21. Wu FE, Zhao GX, Zeng L, Zhang Y, Schwedler JT, Mclaughlin JL and Sastrodihardjo S(1995d) Additional bioactive acetogenins, annomutacion and (2,4-trans and cis)-10r-annonacin-a-ones, from the leaves of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products* 58: 1430-1437.
22. Yu JG, Gui HQ, Luo XZ and Sun L (1998) Murihexol, a linear acetogenin from *Annona muricata*. *Phytochemistry* 49: 1689-1692.
23. Zobayed, S.M., Armstrong J., Armstrong W. (2002) Multiple shoot induction and leaf and flower bud abscission of *Annona* cultures as affected by types of ventilation. *Plant Cell Tiss. Org.*69: 155-165.