PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE LA ESPECIE FRUTÍCULA DE LA COSTA CARIBE: GUANÁBANO (*Annona muricata*) A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES

ROSANA GARCÍA DE LA ROSA
CARMEN MARÍA RAMÍREZ RUZ
TANYA MARIA SIERRA ORTEGA

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA
SINCELEJO
2005

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE LA ESPECIE FRUTÍCULA DE LA COSTA CARIBE: GUANÁBANA (*Annona muricata*) A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES

ROSANA GARCÍA DE LA ROSA
CARMEN MARÍA RAMÍREZ RUZ
TANYA MARIA SIERRA ORTEGA

Trabajo presentado como requisito para optar el título de **Biólogo con énfasis en Biotecnología.**

Director:
JAVIER DARÍO BELTRÁN Ph. D.

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA
SINCELEJO
2005

Nota de aceptación

_____
_____
_____

_____
Jurado

_____
Jurado

_____
Jurado

Sincelejo, Diciembre 28 de 2005

DEDICATORIA

A Dios, por iluminarme y ayudarme a cumplir uno de los grandes proyectos de mi vida: ser profesional.

A mis padres, por su apoyo incondicional.

A mi tía Sara y a mami, por colaborarme cuando lo necesitaba.

A mis hermanas Claudia, Piedad y Martha por su ayuda y comprensión.

A todos mis familiares por contribuir de alguna manera a mi realización profesional.

A mis amigas Tanya y Carmen por su amistad incondicional.

A mis amigos que estuvieron siempre allí brindándome su amistad y ayuda durante mi formación profesional y aportaron un granito de arena para culminar esta etapa en mi vida.

A Elson por estar conmigo y alegrarme en los momentos de desánimo y por cambiar un poco mi vida.

Rosana.

A Dios todopoderoso por ser el guía y amigo que nunca me falla.

A mis padres y hermanos por estar siempre a mi lado brindándome amor, comprensión y su apoyo.

Al resto de mi familia por colaborarme de una u otra manera para la realización de este proyecto.

A Rosana y Carmen por ayudarme a hacer realidad este sueño.

A mis amigos por brindarme su amistad, respeto y cariño.

Tanya.

A Dios y a la Virgen por iluminarme y darme la fortaleza para seguir este sendero de mi vida.

A mis padres y abuelos por creer en mí y siempre estar allí brindándome todo su amor y apoyo incondicional.

A mi tía y su esposo por darme su mano y buen consejo en los momentos difíciles.

A Carlos Andrés mi hermanito quien siempre a estado allí al igual que mis primos queridos Albertico, Yisneyli, Maria Rosario y Johandris y al resto de mis familiares.

A miguel mi ángel por toda su dulzura y amor y por motivarme a culminar esta etapa de mi vida.

A Rosana, Tanya, Katia y Edilsa por ser mis amigas incondicionales y confidentes con las que pasé muy felices y gratos momentos.

A todas aquellas personas que aportaron algo para mi formación profesional.

Carmen María.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sucre por darnos todo el conocimiento adquirido y mucho más de lo esperado.

Al Doctor Javier Darío Beltrán por su orientación y apoyo en el transcurso de la investigación.

Al estadístico Norbey Marín por su colaboración en el procesamiento de los datos y a Miguel Ángel Barrios Murillo por su ayuda en el procesamiento e interpretación de los datos.

A los biólogos, Rafael ortega, Maria José Baquero, Eduardo Hernández y Giovanni Montes por sus sugerencias en la metodología del proyecto.

A Katia, Giovanni, Edilsa, Cesar, Shirley, Libardo, Eden, Tovio, José, Gina, Roger, Alberto, María Luisa, Humberto, Norma, Beatriz, Ember, Harold, Sehuanes, Rocío, Paola, Rosa, Marisella y Gloria por su amistad incondicional y por darnos ánimos para continuar con este proyecto.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma aportaron su granito de arena en la realización y revisión de este trabajo.

“Sólo los autores son responsables de las ideas expuestas en este trabajo”

(Artículo 12, Resolución 023 de 2000)

CONTENIDO

		Pag.
INTRODUCCIÓN		**16**
1.	**OBJETIVOS**	**19**
1.1	**OBJETIVO GENERAL**	**19**
1.2	**OBJETIVOS ESPECIFICOS**	**19**
2.	**ESTADO DEL ARTE**	**20**
2.1	**ASPECTOS GENERALES DE LA ESPECIE FRUTICULA GUANÁBANO (*Annona muricata*)**	**20**
2.1.1	Anonáceas	**20**
2.1.2	Guanábano	**22**
2.1.2.1	Descripción Botánica	**22**
2.1.2.2	Propagación	**23**
2.1.2.3	Requerimientos Ecológicos	**23**
2.1.2.4	Plagas y enfermedades	**24**
2.1.2.5	Usos	**26**
2.2	**MICROPROPAGACIÓN**	**27**
2.3	**APLICACION**	**29**
2.4	**FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MICROPROPAGACIÓN**	**30**
2.4.1	Plantas madres	**30**
2.4.2	El explante	**30**
2.4.3	Factores físicos	**30**
2.4.4	Medios de cultivo	**31**
2.4.4.1	Soporte	**31**
2.4.4.2	Componentes minerales	**32**
2.4.4.3	Componentes orgánicos	**34**
2.4.4.3.1	Azúcares	**34**
2.4.4.3.2	Vitaminas	**34**
2.4.4.3.3	Aminoácidos	**35**

2.4.4.3.4 Productos orgánicos estimulantes **35**
2.4.4.4 Reguladores de crecimiento **36**
2.4.4.4.1 Auxinas **36**
2.4.4.4.2 Giberelinas **37**
2.4.4.4.3 Citoquininas **37**
2.5 BIOTECNOLOGIA EN *Annona muricata* 38
3. METODOLOGIA 40
3.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA 40
3.2 OBTENCIÓN DE PLANTAS MADRES 40
3.3 SELECCIÓN DE LOS EXPLANTES 41
3.4 FASE DE DESINFECCIÓN 41
3.5 FASE DE INICIACIÓN 42
3.6 FASE DE MULTIPLICACIÓN 42
4. DISEÑO EXPERIMENTAL 44
4.1 POBLACIÓN 44
4.2 NÚMERO DE REPETICIONES 44
4.3 UNIDAD EXPERIMENTAL 44
4.4 INDICADORES 45
5. RESULTADOS Y DISCUSION 46
5.1 ETAPA *IN VIVO* 46
5.1.1 Establecimiento de plantas madres en condiciones semicontroladas. **46**
5.2 ETAPA *IN VITRO* 48
5.2.1 Fase de desinfección de explantes de *Annona muricata.* **48**
5.2.2 Fase de iniciación **52**
5.2.3 Fase de multiplicación **56**
6. CONCLUSIONES 60
7. RECOMENDACIONES 62
8. BIBLIOGRAFÍA 63
ANEXOS 66

LISTA DE CUADROS

Pág

Cuadro 1. Estudios *in vitro* de *annona sp.* **21**

Cuadro 2. Patógenos comunes de *Annona muricata* en Colombia. **25**

Cuadro 3. Etapas de la micropropagación. **29**

Cuadro 4. Tratamientos de desinfección a diferentes concentraciones de NaOCl y diferentes tiempos (min.) de exposición de segmentos nodales de *A. muricata.* **41**

Cuadro 5. Tratamientos ensayados en el establecimiento de segmentos nodales de *A. muricata* con diferentes concentraciones de BAP. **42**

Cuadro 6. Tratamientos de la etapa de multiplicación con combinaciones de BAP e IBA . **43**

Cuadro 7. Indicadores de la etapa de desinfección. **45**

Cuadro 8. Indicadores de la etapa de establecimiento. **45**

Cuadro 9. Indicadores de la etapa de multiplicación. **45**

Cuadro 10. Yemas de *A. muricata* obtenidas de estacas mantenidas en invernáculo. **46**

Cuadro 11. Porcentaje de contaminación fúngica, bacteriana, necrosis y desinfección obtenidos en la etapa de desinfección en explantes de A. *muricata*. **49**

Cuadro 12. Promedio de explantes con brotes, número y longitud del brote a los 60 días de evaluación. **52**

Cuadro 13. Número promedio de nudos, hojas y longitud del brote en medio suplementado con BAP e IBA. **56**

LISTA DE FIGURAS

Pág

Figura 1. Distribución geográfica de *Annona muricata*. **22**

Figura 2. Estacas de *Annona muricata* en invernáculo**.** **47**

Figura 3. Estacas de *Annona muricata* con brotes a los 30 días**.** **47**

Figura 4. Porcentaje de desinfección de explantes de *Annona muricata*. **49**

Figura 5. Explantes de *A. muricata* sin necrosis y libre de contaminantes. **50**

Figura 6. Efecto del NaOCl frente al porcentaje de desinfección y necrosis en los diferentes tratamientos. **51**

Figura 7. Explantes de *A. muricata* distribuidos en bloques completamente al azar en etapa de iniciación. **53**

Figura 8. Explantes de *Annona muricata* en etapa de iniciación. **53**

Figura 9. Longitud y número de brotes promedio en explantes de *A. muricata* en la etapa de establecimiento. **54**

Figura 10. Explantes de *A. muricata* con T1 y T2 en la etapa de iniciación. **55**

Figura 11. Explante de *A. muricata* con T0 en la etapa en la etapa iniciación. **55**

Figura 12. Efecto de la combinación de BAP e IBA en la fase de multiplicación en la longitud, número de nudo y hojas en segmentos nodales de *A. muricata.* **57**

Figura 13. Efecto de diferentes combinaciones de B AP e IBA en explantes de *A. muricata* en la fase de multiplicación: a. A6 a A0 y b. A1 a A5. **58**

.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Composición nutricional en 100 gr. de porción de *A. muricata.* **67**

ANEXO 2. Composición de medios de cultivo**.** **68**

ANEXO 3. Análisis de varianza y prueba de LDS de las variables dependientes evaluadas en la etapa de iniciación. **69**

ANEXO 4. Análisis de varianza y prueba de LDS de las variables dependientes evaluadas en la etapa multiplicación. **72**

RESUMEN

El guanábano *(Annona muricata)* es un árbol frutal que tiene un gran potencial por su producción y valor nutritivo, debido a su delicioso sabor se consume como fruta fresca en forma de helados, conservas, bebidas, postres y jaleas. Tradicionalmente se propaga por semillas y material vegetativo, pero estos métodos son lentos, por lo cual se propone la utilización de la técnica de cultivo *in vitro* empleando segmentos nodales para la obtención de un número masivo de plantas de esta especie.

Los segmentos nodales fueron obtenidos de estacas mantenidas en invernáculo bajo condiciones semicontroladas, estos fueron establecidos en medio de cultivo Nitsch – Nitsch modificado sometiéndolos a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (1% y 2%) con tiempo de exposición de 5 y 10 min para su desinfección obteniéndose un 85.7 % de explantes no contaminados con NaOCl al 1% por 10 minutos y sin necrozamiento. En la etapa de iniciación los explantes se sembraron en el mismo tipo de medio suplementando con BAP en tres concentraciones (4.4μM, 8.8μM y 16μM) observándose un 100% de explantes con brotes en todos los tratamientos.

En la fase de multiplicación se ensayaron 10 tratamientos empleando una combinación de BAP (4.4μM, 8.8μM y 16μM) e IBA (1.2μM, 2.4μM y 4.8μM) evidenciándose que alrededor de los 60 días los explantes de *A. muricata* sembrados en el tratamiento 16 μM de BAP y 1.2 μM de IBA registraron en promedio 6.2 nudos, 7.5 hojas y 2.95 de altura convirtiéndose este en el mejor tratamiento. Todo esto demuestra la potencialidad de cultivo de tejidos en la propagación *in vitro* del guanábano.

ABSTRACT

The Soursop is a fruit tree that has a great potential by its production and nutritious value; due to his delicious flavor it is consumed like fresh fruit, in form of ice creams, conserves, drinks, desserts and jellies. Traditionally it is propagate by seeds or vegetative material but these methods are slow, it is for that reason that was tried the technique of in vitro cultures employee nodals segments for the propagation of this specie. The nodals segments were obtained from stakes maintained under semicontrolled conditions, these were established in the Nistch - Nistch medium culture modified previus disinfection treatment with different concentrations from NaOCl (1% and 2%) with time of exposition 5 and 10 min obtaining a 85.7% of explants no contaminate with the treatment 1% NaOCl and without necrosis. The explants in the iniciation step was disin seeded in the same type of medium suplemented with three different BAP concentrations (4.4μM, 8.8μM and 16μM) being observed a 100 % of budding explants in all treatments. In stage multiplication has assesed ten treatments using a combination of BAP (4.4μM, 8.8μM and 16μM) and IBA (1.2μM, 2.4μM and 4.8μM) demonstrating almost of 60 days in the treatment BAP 16μM - IBA 1.2 μM the explants of *A. muricata* has presented a average number of 6.2 knots, 7.5 leaves and 2.95 length become in the treatment major, all this show the potentiality of culture tissues in the *in vitro* propagation of Soursop.

INTRODUCCIÓN

La Guanábana, es una de las frutas tropicales con mayor aceptación en el mercado mundial por sus propiedades alimenticias y excelente sabor, es líder en el mercado nacional de procesados, segundo en jugo después de la naranja, es de digestión fácil, con una relación entre azúcares y acidez aceptable, con un larga vida como pulpa congelada para exportación. Tiene además un gran potencial para la extracción de bioproductos por las propiedades medicinales terapéuticas tanto de la fruta como de otras partes de la planta y su adaptación a diferentes condiciones edafoclimáticas (Toro, 2001).

Colombia es un país privilegiado en cuanto a su ubicación geográfica, ya que esta le brinda una variedad de pisos térmicos que propician diversidad en cuanto a fauna, flora y suelos que son aptos para el desarrollo de la agricultura. Esto contribuye a que la economía de nuestro país se deba en parte a la producción y comercialización de cultivos agrícolas tales como: granos, hortalizas, tubérculos y en menor escala frutas, presentando una importancia considerable en los momentos actuales, cuando el interés político-económico del Estado tiene como fundamento la producción de frutas con fines de exportación e industrialización.

El departamento de Sucre se encuentra en una posición privilegiada en la Región Caribe, encontrándose allí la despensa agrícola de potencial más grande: como es la región de la Mojana con zonas agroecológicas potencialmente aptas para el cultivo de frutas; sin embargo, se nota un reducido número de hectáreas cultivadas sin tecnología adecuada que permita la obtención de excedentes para el mercado externo que puedan competir en calidad con producción de otras regiones y países y aprovechar

óptimamente los recursos, limitándose en la mayoría de los casos a cultivos de patios o pequeños cultivos semitecnificados por lo que no existe un sistema de producción definido como tampoco intensivo de frutales; situación que afecta directamente a la especie *A. muricata* de la cual se registró en el año de 1992 un porcentaje reducido en la producción de cultivo de 56,4%, importancia 22,9 % y comercialización 5%, lo que representa una producción indiferente frente a otros frutales (Diagnóstico frutícula del Dpto. de Sucre, 1993).

El desarrollo de técnicas biotecnológicas ha contribuido al mejoramiento de plantas y al aumento de producción de cultivos comerciales proyectándose con éxito en la agricultura, la industria y el medio ambiente. El área de la Biotecnología vegetal en particular la técnica de cultivo *in vitro* ha venido implementándose en árboles frutales en muchos países obteniéndose muy buenos resultados para esta especie (*Annona muricata*) (Drew, 1997). La aplicación de la técnica de cultivo de tejidos permitirá la obtención de una alta propagación de plántulas, con óptimas características de rendimiento y sanidad, es por ello que la aplicación de la misma empleando segmentos nodales será de gran utilidad, ya que con la estandarización de ella se obtendrá un gran número de plantas que el campesino o agricultor puede utilizar para el establecimiento de nuevos cultivos masivos que más tarde podrían ser comercializados y exportados en forma de pulpa congelada, fruta fresca, helados y jaleas, contribuyendo así con la economía de la región y del país y la generación de empleo.

Otro aspecto a considerar para la implementación de esta técnica está relacionado con el carácter recalcitrante de esta especie, es decir, que las semillas presentan un periodo prolongado para su germinación y más aún son muy susceptibles al ataque de plagas y enfermedades ocasionadas por hongos, bacterias y virus.

Por otro lado el hecho de existir pocos reportes sobre estudios a fines con micropropagación para esta especie frutal le da un carácter novedoso y útil para nuestra región.

Con base en lo anterior, consideramos que la propagación *in vitro* podría ser útil como tecnología complementaria para obtener un número masivo de plantas frutales como el Guanábano (*Annona muricata*) libre de patógenos y de este modo ayudar al establecimiento de huertas comerciales competitivas en el ámbito nacional y como segunda alternativa puede contribuir al comienzo de un proceso de forestación frutícula necesaria en particular para el Departamento de Sucre y en especial para la Costa Caribe.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la metodología de micropropagación *In vitro* del Guanábano (*Annona muricata*) a partir de segmentos nodales.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener y seleccionar el mayor número de explantes de *Annona muricata* mediante el empleo de la propagación por estacas.

- Establecer el proceso de desinfección de los explantes de *Annona muricata* mediante la estandarización de la concentración óptima de Hipoclorito de Sodio (NaOCl).

- Determinar las concentraciones óptimas de los reguladores de crecimiento: auxinas Ácido indolbutírico (IBA) y citoquininas Bencilaminopurina (BAP), que suplementaran el medio de cultivo en las etapas de establecimiento y multiplicación.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 ASPECTOS GENERALES DE LA ESPECIE FRUTÍCULA GUANÁBANA (*Annona muricata*).

2.1.1 Annonáceas

La familia de las Anonáceas comprende más de 130 géneros con más de 2000 especies agrupadas taxonómicamente, distribuidas en los trópicos y subtrópicos (Watson y Dallwitz, 1992). Sólo 17 géneros se encuentran en áreas tropicales y cuatro producen frutos comestibles: *Annona, Rollinia, Uvaria y Ansiminea.*

El género Annona comprende alrededor de 120 especies de las cuales las más importantes son *Annona cherimola Mill., Annona muricata L., Annona squamosa L. y Annona reticulata L.* (Bridg, 2000).

La propagación *In vitro* de Annona sp. ha sido llevada a cabo por muchos investigadores quienes reportan ciertas limitaciones como la selección del explante, fenolización, eliminación de contaminantes endógenos y exógenos, baja tasa de multiplicación y aclimatación, entre otros. (Cuadro 1).

Cuadro 1. Estudios *in vitro* de *Annona sp*

Especies	**Explante**	**Organos Regenerados**	**Autor**	**Pais**
Annona spp.	Mesocarpo endospermo	Callos Brotes, raices	Bapat y Narayanaswamy, 1977	India
A. cherimola	peciolos	Brotes, raices	Jordan, 1988	Chile
	hipocotilos	Brotes, raices	Jordan *et al.* 1991	
	Embriones cigoticos	Brotes	Jordan *et al.* 1992	
	Yemas	Brotes	Tazzari *et al.* 1990	Italia
	Yemas	Brotes	Bridg, 1993b	Colombia
A. muricata	Yemas	Brotes, raices	Encina *et al.* 1994	España
	Hipocotilo	Brotes enraizados	Bejoy *et al.* 1992	India
	hipocotilos	Yemas adventicias, brotes y raices	Lemos and Blake, 1998	Brasil
A. squamosa	entrenudos	Brotes, raices	Lemos and Blake, 1996	
	anteras	haploides	Fair *et al.* 1983	India
	Hoja	Brotes	Nair *et al.* 1984	
	endospermo	Botes, raices	Sreelata *et al.* 1986	
	endospermo	Brotes	Nair *et al.* 1986	

Fuente: Bridg, 2000

2.1.2 Guanábano: Nombre científico *Annona muricata*.

El guanábano es un árbol originario de América tropical, que crece espontáneamente desde el sur de México hasta el Brasil y del cual se presume que tuvo su centro de origen en Colombia o en el Brasil, pertenece al orden ranales, familia Anonáceas, género *Annona* y especie *muricata* (Becerra, 1989) (Figura 1).

Figura 1. Distribución Geográfica de *Annona muricata.*

Fuente: Bridg. 2000.

2.1.2.1 Descripción Botánica

Es un árbol de 3 a 11 metros de altura ramificado en su base y copa que se desarrolla generalmente en forma cónica, su raíz tiene un sistema radicular poco profunda y además de superficial es fibroso, las ramitas son redondeadas, arrugadas, ásperas de color café rojizo, sin pubescencia, con muchas lenticelas redondeadas; las hojas son biseriadas de pecíolo corto, oblongas – ovaladas y enteras, con la base aguda o cuneiforme, ápice cortamente acuminado, coriáceas de color verde oscuro y brillante por el haz,

color verde amarillento y opaco en el envés, tienen seis a doce pares de nervios laterales débilmente prominentes, las hojas son de color rojizo y pubescentes en la yema (Becerra, 1989); las flores son regulares, pediceladas, de olor fuerte, portadas en ramitas cortas axilares de 1 a 2 flores; el pedicelo está cubierto densamente de pelos cortos y es de 0.5 – 2.5 cm. de largo, brácteas pequeñas, tres sépalos más o menos libres, de color verde oscuro, de forma ovada triangular; el fruto es ovoide, elipsoide o acorazonado, de 5 a 20 cm. de largo y 9 a 12 cm. ancho y coriácea, la pulpa que corresponde a un 85% del fruto con un alto valor nutricional (anexo1) es blanca, cremosa, carnosa, jugosa y subácida, las semillas son numerosas y se encuentran escondidas en la pulpa, son ovoides, comprimidas, brillantes, de color café oscuro de 2 cm. de largo y lisas (Bridg, 2000).

2.1.2.2 Propagación

En Colombia como en otros países tropicales, los huertos nativos de *Annona muricata* son provenientes de plantaciones de semilleros viejo; es propagada por semillas, pero la variación entre árboles individuales es grande; la germinación de las semillas no tiene mayores problemas y toma entre 15 – 30 días si la humedad es baja (aproximadamente 60%) y la temperatura está por encima de 12ºC (Bridg, 2000).

En huertas productivas las plantas seleccionadas de *A. muricata* son propagadas por injertos para mantener clones selectos ya sea por escudete o parche, púa de costado o en rizomas de la misma especie.

2.1.2.3 Requerimientos Ecológicos

El medio ambiente para su cultivo parece ser de 0 a 1000 m de altura sobre el nivel del mar, temperatura media de 29 ºC y baja entre 18 y

20 ºC, requiere un clima tropical estable, es una planta muy sensible al enfriamiento.

Los suelos pueden ser de arenosos hasta arcillosos con nivel freático mínimo de 1,50 m, no es exigente en suelos, pero son preferibles los mejor drenados con retención de humedad como los francoarenosos (Toro, 2001)

Las zonas caracterizadas por poseer cultivos de esta especie en Sucre son Ovejas, Sampués, San Onofre, Tolú, Sincé, Sincelejo, La Mojana y parte del San Jorge (Diagnóstico frutícula del Dpto. de Sucre, 1993).

2.1.2.4 Plagas y enfermedades

Chinche de encaje (*Corithaica sp*): vive en el envés de la hoja, alimentándose de la savia; perforador de semillas y frutas (*Bephrata maculicollis*): la larva hace galerías para encontrar la semilla, los frutos se pasman y momifican; la escama hemisférica o globosa; la polilla de la guanábana (*Theclaortygnus*): daña las flores impidiendo la polinización; chinche negro del cacao (*Antiteuchus tripterus*): frutos manchado con negro parcial o totalmente; chinche de encaje del algodonero (*Crythuchagossyppi*): el follaje se torna plateado; antracnosis (*Colletotrichom gloesporioides*): manchas negras sobre hojas, flores y fruto; secamiento de las ramas (*diplodia sp*); manchas de las hojas (*Scoletotrichum sp*): invade las hojas con manchas necróticas; roya (*Plakopsora cherrmoliae*): causa defoliaciones prematura. (Becerra, 1989). (Cuadro 2).

Cuadro 2: Patógenos Comunes de *Annona muricata* en Colombia.

Órgano	Patógeno
Hojas – ramas	*Aconophora concolor, Aleurodicus giganteus, Aphis gossypii, Aphis spiraecola, Colapsis* spp., *Colletotrichium gloesporioides, Corticum salmolicolor, Corythucha ossypii, Diabrotica* spp., *Empoasca* spp., *Empocasca* spp., *Eriophyes Annonae, Hylesia* spp., *Leucoptera* spp., *Phylephedra* spp., *Sabulodes* spp., *Saissetia coffeae, Salenaspidus articulatos, Scolecotrichum spp., Tetranychus mexicanus, Toxoptora aurantii*
Corteza – tallo	*Atta* spp., *Colletotrichium gloesporioides, Cratosomus bombina, Nasotiternes corniger, Trachyderes interruptus.*
Flores	*Cercospora Annonae, Ciclocephala signata, Colletotrichium gloesporioides, Tecla ortignus, Toxoptora aurantii.*
Fruta	*Antiteuchus hediondus, Antiteuchus tripterus, Bephratelloides maculicollis, Cratosomus inaequalis, Cerconota annonella, Colletotrichium gloesporioides, Rhizopus stolonifer, Toxoptora aurantii.*
Raíz	*Armillaria mellea, Fomes lamaoensis, Phytophtora spp., Rhizocthonia spp.*

Fuente: Bridg, 2000.

2.1.2.5 Usos

El principal uso de esta fruta es para la alimentación; su pulpa algodonosa muy rica en jugo es utilizada por las amas de casa en la preparación de refrescos, helado, ensaladas, postres y batidos. También se consume como fruta fresca.

En medicina, la pulpa es empleada como cataplasma para el alivio de contusiones, las raíces son útiles en el combate de la epilepsia. En algunas partes las hojas son utilizadas como somníferas y el cocimiento de frutos maduros es usado para curar los catarros. Los frutos verdes desecados y pulverizados, por su contenido de taninos y sustancias astringentes son insecticidas y ameto-catárticos. Los frutos por su alto contenido de pectina pueden ser utilizados en la industria de alimentos como fuente adicional de pectina para conserva.

Muchos compuestos bioactivos y fitoquímicos se han encontrado en corteza, hojas, semillas, raíz y tallo de *Annona muricata*, presentando actividades hipotensiva, antipasmódica, anticonvulsiva, vasodilatadora, relajante de músculo liso, cardiodepresivas, antibacterial, antifúngica, antiparasitaria como el caso de la malaria, insecticida (alcaloides como anonina, muricina y muricinina), antidepresiva y citotoxicidad contra células cancerígenas (acetogeninas) (Morton, 1987).

La madera es apta para la elaboración de pipas para fumar. La pulpa se utiliza en la elaboración de vinos, mermeladas, concentrados y néctares (Becerra, 1989).

2.2 MICROPROPAGACIÓN

El cultivo de tejidos y células de plantas *in vitro* es definido como la capacidad para regenerar y propagar plantas a partir de células simples, tejidos y órganos bajo condiciones estériles y condiciones ambientales controladas (Bridg, 2000). El cultivo *in vitro* es a menudo usado como un sistema modelo en el estudio de varios problemas fisiológicos, bioquímicos, genéticos y estructurales relacionados con las plantas. Existen varias formas para promover la regeneración *in vitro* de un material de plantas seleccionadas, entre las cuales tenemos:

- Cultivo de plantas a partir de plantas de semillero o plantas adultas.
- Cultivo de embriones a partir de embriones aislados maduros o inmaduros.
- Cultivo de órganos a partir de órganos aislados de la planta.
- Cultivo de tejidos o cultivo de callos a partir de tejidos originados de explantes de órganos de la planta.
- Cultivo de células en suspensión a partir de cultivo de células aisladas o agregados muy pequeños dispersos en medio líquido.
- Cultivo de protoplastos.
- Cultivo de anteras.

Algunos usos de la técnica de cultivo *in vitro* son:
Mejoramiento genético, obtención de plantas libres de virus u otros patógenos, conservación de germoplasma y micropropagación.

La micropropagación es una técnica que busca reproducir los factores que se dan en el campo a través de la clonación, la cual permite que las plantas manejen su misma información genética y se conserve su material vegetal. En la actualidad se aplica con éxito en especie hortícola, ornamentales y más

recientemente en especie leñosas y frutales, desarrollándose en esta última a consecuencia de la alta heterocigocidad que se presenta cuando se propaga sexualmente. Las tasas de multiplicación que se obtienen a través de la propagación por yemas, injertos o esquejes son muy bajas, además tienden a diseminar enfermedades.

Esta presenta algunas ventajas con respecto a los sistemas de propagación convencionales entre las que podemos mencionar:

- Propagación de un gran número de especies difíciles de multiplicar.
- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo, y reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente grandes cantidades de plantas y de una variedad de la que existan pocos individuos en un espacio pequeño, a bajo costo y en tiempos económicamente costeables.
- Mayor control de contaminación sobre el material que se propaga.

La Micropropagación comprende varias etapas:

Establecimiento, Multiplicación, Enraizamiento y Preparación del inóculo o explante para su traslado al suelo (Roca y Mroginski, 1991) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Etapas de la micropropagación.

ETAPA	DESCRIPCIÓN	OBJETIVO	ACTIVIDAD
0	Selección y adaptación de plantas madres.	Reducción de contaminantes endógenos.	Definición de la planta madre y obtención de explantes.
I	Establecimiento	Promoción del cultivo *in vitro* aséptico.	Selección del explante, eliminación de contaminantes exógenos y nueva adaptación *in vitro*.
II	Multiplicación	Embriogénesis celular somática, incremento de yemas y desarrollo de brotes adventicios.	Promoción de organogénesis de células o tejidos in vitro y rápida diferenciación-multiplicación de nuevos brotes.
III	Enraizamiento	Promoción de regenerantes *in vitro*.	La rizogenésis de los nuevos brotes *in vitro* es estimulado bajo condiciones ex vivo e in vitro.
IV	Aclimatación	Estimulación del metabolismo autotrófico.	Endurecimiento de estructuras.

Fuente: Bridg, 2000.

2.3 Aplicación

La micropropagación ha sido útil para la rápida liberación inicial de nuevas variedades previa a la multiplicación por métodos convencionales. También es usada para promover el almacenamiento de germoplasma para el

mantenimiento de plantas libres de enfermedades bajo condiciones ambientales semicontroladas y a largo plazo a través de la crioconservación.

Mundialmente existe mucho interés para promover el desarrollo de una tecnología *in vitro* que permita la propagación y producción de plantas leñosas, semileñosas, ornamentales, comestibles, industriales y medicinales de alto valor comercial. Aquellas especies que están peligro de extinción, pueden tener prioridad en términos de conservación de germoplasma (Bridg, 2000).

2.4 FACTORES DETERMINANTES PARA LA MICROPROPAGACION

Existen diferentes factores que determinan el éxito de los sistemas de micropropagación entre los cuales tenemos:

2.4.1 Plantas madres

Son las plantas de las que se extraen los segmentos necesarios para el cultivo *in vitro*. El estado fisiológico de estas plantas influye significativamente, en el establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia (Roca y Mroginski, 1991).

2.4.2 El explante

Deben seleccionarse explantes saludables, de tejido meristemàtico u órganos no muy especializados; no se deben utilizar explantes ni muy viejos ni muy jóvenes.

2.4.3 Factores físicos

Existen dos factores fundamentales como la temperatura y la luz. La temperatura de incubación depende de la especie, aunque en la mayoría de las plantas la

temperatura oscila entre 26±2 ºC. La luz es importante en la morfogénesis y su papel en la diferenciación involucra varios componentes como son la intensidad, el fotoperíodo y la calidad (Roca y Mroginski, 1991).

2.4.4 Medio de cultivo

Los medios de cultivo constituyen un elemento fundamental para el cultivo *in vitro* de células, tejidos, protoplastos, anteras y para lograr el desarrollo de embriones, embrioides, la organogénesis, la micropropagación, etc. Los medios de cultivo tienen una serie de componentes generales y específicos cuya presencia y concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización. Así, los medios los medios de cultivos pueden ser líquidos o tener un soporte sólido, tienen sustancias minerales, vitaminas, aminoácidos, fitohormonas, azúcares, etc. También pueden contener por ejemplo extractos naturales, según su finalidad y debe quedar claro que no todos llevan un complemento completo de todos los factores (González, 2002).

2.4.4.1 Soporte

Los medios de cultivo pueden ser sólidos y líquidos. En este último caso también puede utilizarse como soporte papel de filtro o perlas de cristal.
Los medios sólidos o semisólidos según la concentración del soporte, llevaran distintos componentes que tienden a solidificar y mantener el material cultivado en la superficie. Entre las sustancias más utilizadas se encuentra el agar, este solidifica el medio y forma un complejo coloidal con débil poder de retención iónica.

El agar presenta algunos inconvenientes; el principal consiste en ofrecer una aireación insuficiente que puede afectar el crecimiento de algunos tejidos.

Por otra parte, la composición del agar es variable y, a veces, mal definida y podría aportar oligoelementos que actúan favorablemente sobre el crecimiento.

La concentración óptima de agar es variable con el origen comercial del agar utilizado y el objetivo del cultivo. En algunos medios de cultivo se añade al soporte una cantidad de carbón activado en dosis variables entre 0,5 - 5,0 g/L. Normalmente el aporte del carbón al medio favorece el crecimiento de los tejidos sobre todo, en el cultivo de ápices y anteras.

En general, el efecto del carbón activado puede deberse a:

a) efecto favorable sobre el crecimiento de raíces o de rizoides debido al oscurecimiento del medio.
b) Efecto favorable sobre el crecimiento debido a la adsorción de sustancias inhibidoras excretadas por el explante o aportadas por el medio de cultivo.
c) Efecto inhibidor sobre el crecimiento debido a la adsorción de reguladores de crecimiento (auxinas, citoquininas) contenidas en el medio o de compuestos fenólicos u otros compuestos producidos durante la esterilización en autoclave.

2.4.4.2 Componentes Minerales

Los componentes esenciales para la vida de las plantas se dividen en:

- Macroelementos: se utilizan en grandes cantidades: carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio y magnesio.
- Oligoelementos o microelementos: aunque son necesarios en menor cantidad, juegan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como

activadores o constituyentes de las coenzimas. Los principales microelementos son: hierro, cobre, zinc, manganeso, molibdeno, cobalto y boro.

Las exigencias minerales varían con la especie, la naturaleza del tejido y su estado fisiológico, pero, además, también varían con el método de cultivo y el tipo de organogénesis estudiado. Por ejemplo, los meristemos y, en forma general, los tejidos con actividad metabólica elevada, pueden presentar importantes necesidades en potasio.

El medio MS se ha empleado de una manera muy general para todos los tipos de cultivo *in vitro.* Además, puede afirmarse que ha sido la utilización del medio MS junto con el empleo de fitohormonas apropiadas (citoquininas y auxinas), lo que ha permitido el éxito de los trabajos sobre organogénesis en cultivo *in vitro.* El medio MS está caracterizado, principalmente, por un contenido muy fuerte de nitrógeno (60 meq/L aprox.) del cual 1/3 está aportado en forma reducida (NH_4^+) y por una concentración igualmente elevada en potasio.

Los microelementos resultan indispensables para el crecimiento, interviene como activadores de sistemas enzimáticos. Se suministran al medio de cultivo bien con el objetivo de evitar cualquier carencia o se suministran a concentraciones más elevadas con el objetivo de provocar una activación del crecimiento. El medio MS emplean (Mn, Zn y B) en concentraciones elevadas sin toxicidad aparente, otros resultan tóxicos a bajas concentraciones (Cu, Ni).

2.4.4.3 Componentes orgánicos

Dentro de los componentes orgánicos de los medios de cultivo tenemos azúcares, vitaminas, aminoácidos, productos orgánicos estimulantes y reguladores del crecimiento.

2.4.4.3.1 Azúcares:

Los tejidos y células cultivadas *"in vitro"* son ampliamente heterótrofos con respecto al carbono debido a la ausencia o insuficiencia de asimilación clorofílica. Luego, resulta indispensable añadir azúcares a los medios de cultivo, siendo los dos más utilizados la sacarosa y la glucosa.

La concentración óptima del azúcar en los medios de cultivo varía entre 20 – 80 g/L, en dependencia del tipo de cultivo, material vegetal, etc. Los azúcares presentan una acción metabólica y energética.

2.4.4.3.2 Vitaminas:

Las vitaminas favorecen el crecimiento de los tejidos en cultivos *in vitro* y no se excluye que la falta de alguna de ellas pueda ser un factor limitante de los fenómenos de organogénesis.

La tiamina (0.1 – 1.0 mg/L) tiene un efecto claro en los medios de cultivo. También se han señalados efectos favorables para el ácido nicotínico, la piridoxina y la riboflavina sobre el crecimiento de los cultivos.

El compuesto que mas frecuentemente se añade a los medios de cultivo es el meso-inositol (myo-inositol), se emplea en concentraciones entre 50 – 500

mg/L y su efecto se evidencia sobre la proliferación de tejidos y sobre la activación de la organogénesis.

El ácido ascórbico (1 – 10 mg/L) y el ácido cítrico (50 –100 mg/L) se utilizan en ocasiones no como vitaminas sino como antioxidantes para evitar el oscurecimiento de determinados tejidos.

2.4.4.3.3 Aminoácidos:

El aporte de aminoácidos favorece la proliferación de callos, aunque cuando más se acude a los mismos es en las experiencias sobre la organogénesis y en la multiplicación vegetativa *in vitro.* Las mezclas de aminoácidos parecen también presentar efectos sinérgicos estimulando fuertemente la proliferación de callos y la organogénesis. Los efectos obtenidos mediante el aporte de aminoácidos parecen muy variables según la especie y el tipo de morfogénesis estudiada. Hasta el momento no es posible establecer una regla general.

2.4.4.3.4 Productos orgánicos estimulantes:

En los medios de cultivo con frecuencia se han utilizados numerosos productos o extractos naturales de composición variable y no bien definida, con distintos resultados. Entre estos productos pueden citarse:

- Extracto de levadura (0.5 – 1.0 g/L)
- Hidrolizado de caseína (0.5 – 3.0 g/L)
- Peptona
- Agua de coco (5 – 15 %)
- Albumen inmaduro de maíz

- Jugo de plátano, tomate y de naranja
- Extractos de diversos hongos
- Savia de la vid o de abedul, etc.

2.4.4.4 Reguladores del crecimiento:

Los reguladores del crecimiento y el desarrollo de las plantas actualmente se agrupan en cinco categorías: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno. Además de estas sustancias naturales (reguladores endógenos) existen numerosos productos de síntesis que pueden utilizarse como reguladores del crecimiento en el cultivo *in vitro*.

En los métodos de propagación *in vitro* se emplean ampliamente las auxinas; en la organogénesis y las aplicaciones a la multiplicación vegetativa está ampliamente ligada a la utilización conjunta de auxinas y citoquininas. La importancia de las giberelinas en cultivo *in vitro* está mucho más restringida. El ácido abscísico (ABA) y los compuestos que desprenden etileno se utilizan con menor frecuencia en casos más específicos.

2.4.4.4.1 Auxinas:

Son compuestos que tienen un núcleo indólico, éste se sintetiza a partir del aminoácido Triptófano. La principal auxina es el ácido 3-indolacético (AIA) y el ácido 3- indol butírico (AIB), aunque son auxinas relativamente débiles. Otros compuestos sintéticos pueden comportarse como auxinas muy débiles (ácido fenilacético) o fuertes: ácido naftalenacético (ANA), el ácido 3 naftoxiacético (NOA), etc. El 2,4 D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) es una auxina muy fuerte.

El efecto de las auxinas está estrechamente ligado al alargamiento celular, que se explica por sus efectos sobre la celulosa – sintetasa, el aumento de la plasticidad parietal y el aumento de la absorción de agua. Las auxinas también tienen un efecto marcado sobre la división celular (citocinesis).

Otros efectos auxínicos son: inducen la rizogénesis, pero a su vez indirectamente “inhiben” el crecimiento de las raíces; intervienen en la dominancia apical de las yemas, en el desarrollo del fruto (transformación de las paredes del ovario para formar las paredes del fruto).

2.4.4.4.2 Giberelinas:

Las giberelinas provocan el alargamiento celular; eliminan el enanismo de las plantas; estimulan la germinación de la semilla de cereales mediante la inducción de la producción de la α – amilasa; inducen la floración de plantas de días largos; eliminan la dormancia de las yemas y semillas; intervienen en la tuberización.

2.4.4.4.3 Citoquininas:

Las citoquininas son derivados purínicos, en especial derivados de la adenina. En cultivos de tejidos, el BAP y las citoquininas sintéticas Kinetina y Thidiazuron (TDZ) son las más frecuentemente usadas.

Las citoquininas estimulan la división celular (cariocinesis) en cultivo de tejidos vegetales y tienen un efecto sinérgico en este sentido con las auxinas. Se han reportado otros efectos de las citoquininas, por ejemplo: estimulan el alargamiento celular de discos de hojas etioladas; inducen la formación de órganos en una gran variedad de cultivos de tejidos *in vitro* (morfogénesis); controlan la formación de proplastidios en cloroplastos; mantienen la

maquinaria de síntesis de proteínas mediante la regulación de la síntesis del RNA; retrasan la senescencia entre otros (González, 2002).

2.5 BIOTECNOLOGIA EN *Annona muricata.*

En la actualidad la propagación *in vitro* de árboles frutales es un campo que está adquiriendo gran auge debido a la importancia que representa en cuanto a la rápida multiplicación de estos árboles, lo cual influye directamente con el equilibrio de los ecosistemas como en el caso de las prácticas reforestales; así mismo, en el sustento alimenticio de la población y explotación comercial.

Muchos estudios son los que se han realizado empleando la técnica de propagación *in vitro*; Bridg, 2000 utilizó brotes de estacas de Guanábana (*Annona muricata y Annona cherimola*) los cuales se establecieron en un medio de cultivo Nitsch - Nitsch (1.969), observándose una deficiencia de Nitrógeno, de modo que esta concentración de Nitrógeno fue modificada tomando como referencia la concentración utilizada de dicho elemento en el medio MS, generándose una mejor respuesta la cual fue más eficiente por parte de *Annona cherimola* estableciéndose así un protocolo de micropropagación reproducible de esas especies que preserve su estabilidad genética.

En Colombia, Cabra, 2002 en la corporación Biotec del Valle del Cauca está trabajando en la propagación *in vitro* de Guanábano (*Annona muricata)* utilizando un medio de cultivo suplementado con un regulador de crecimiento y soluciones antibióticas para controlar la contaminación por hongos y bacterias.

Lemos y Blake (1.996) obtuvieron brotes adventicios a partir de explantes internodales de plantas maduras de *Annona muricata* en medio Nitsch – Nitsch.

En 1.998 fue desarrollado un sistema completo de Micropropagación de Guanábana (*A. muricata*) usando el medio WPM (Woody Plant Medium) obteniendo de 4 a 5 brotes por explante en cortes nodales de hipocótilos suplementando el medio con BAP (Lemos y Bake, 1998).

Rincón et al., 1999 desarrollaron un método de desinfección superficial para el establecimiento de brotes laterales de *Annona muricata y Annona glabra,* evaluaron el uso de Ridomil® y Rifampicina en plantas donantes y explantes, encontrando que no era necesario la desinfección de las plantas madres para la obtención de explantes asépticos.

Ramírez et al., 2002 evaluaron el efecto del hipoclorito de sodio para el establecimiento *in vitro* de explantes de *A. muricata* encontrando que NaOCl al 1% durante 5 o 10 minutos mostró el mas alto porcentaje de explantes viables pero no controló los microorganismos contaminantes presentes en los explantes.

Velásquez et al., 2004 evaluaron el efecto del sombreamiento y tiempo de crecimiento de brotes laterales con el fin de incrementar la viabilidad de explantes de *Annona muricata* obteniendo un 58, 44% cuando los brotes no sombreados fueron recolectados a los ocho (8) días después de la poda.

3. METODOLOGÍA

3.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

La presente investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Sucre - Sincelejo, cuya posición geográfica en Colombia es 9° 18' de latitud norte y 75° 23' de longitud oeste del meridiano de Greenwich; con una altitud de 212 metros s.n.m. y temperaturas que oscila entre 27±3ºC con una pluviosidad media anual de 1580 milímetros (IGAC, 1998).

3.2 OBTENCIÓN DE PLANTAS MADRES

Los explantes de la especie frutal Guanábano (*Annona muricata*) fueron obtenidas a partir de grupos de 8 estacas, tomadas de árboles silvestres en producción ubicados en los municipios de Corozal, Chapinero y Ovejas pertenecientes al Departamento de Sucre.

Las estacas con un tamaño aproximado entre 20 – 30 cm de alto y 1 – 3,5 cm de diámetro, previamente lesionadas en la parte inferior en forma de cruz con 2 – 3 cm de profundidad, fueron tratadas con solución de Benomil® (metil-1-butilcrbamoilbencimidazol2-ilcarbamato) al 2% durante 5 minutos (Rincón et al., 1999).

Posteriormente las estacas fueron establecidas en el invernáculo con condiciones asépticas y ambientales semicontroladas (luz, humedad y temperatura) en frascos estériles que contienen 150 ml de agua estéril.

Semanalmente se realizó la observación respectiva a las estacas evaluándose el número de nudos y brotes en las estacas.

3.3 SELECCIÓN DE LOS EXPLANTES

Los explantes fueron seleccionados partiendo de segmentos nodales con una longitud de 1-2 cm.

3.4 DESINFECCIÓN DE LOS EXPLANTES

Los explantes cortados fueron lavados con detergente en polvo y Tween 20 y enjuagados tres veces; luego, se introdujeron unos 10 segundos aproximadamente en alcohol al 70% y por último se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1 y 2 % durante 5 y 10 minutos (cuadro 4), se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril según Rodríguez, 2002 modificado, con la posterior siembra en medio Nitsch – Nitsch.

Se evalúo en esta etapa el número de explantes contaminados por bacterias, hongos y el necrozamiento, cada ocho días por un periodo de un mes.

Cuadro 4. Tratamientos de desinfección a diferentes concentraciones de NaOCl y diferentes tiempos (min.) de exposición de segmentos nodales de *A. muricata.*

Tratamientos	**M0**	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**
Concentración de NaOCl (%)	0	1	1	2	2
Tiempo (min.)	0	5	10	5	10

3.5 INICIACIÓN

Los explantes de *A. muricata* previamente cortados y desinfectados a partir de segmentos nodales se establecieron en medio Nitsch–Nitsch modificado (1.969) (anexo 2), suplementado con el regulador de crecimiento BAP (citoquinina) en concentraciones de 4.4 μM, 8.8 μM y 16 μM (cuadro 5) (Bridg, 2000).

La evaluación respectiva en esta etapa se realizó semanalmente teniendo en cuenta como criterios de evaluación el número de explantes que brotan por cada tratamiento, el número de brotes por cada explante y la longitud del brote.

Cuadro 5. Tratamientos ensayados en el establecimiento de segmentos nodales de *A. muricata* con diferentes concentraciones de BAP (μM).

Tratamientos	**T0**	**T1**	**T2**	**T3**
Concentración de Bencilaminopurina (BAP)	0	4.4	8.8	16

3.6 MULTIPLICACIÓN

En esta etapa, los segmentos nodales iniciados se sembraron en medio Nitsch – Nitsch modificado (1969) suplementado con una combinación entre los reguladores de crecimiento BAP (4.4, 8.8 y 16μM) e IBA (1.2, 2.4 y 4.8μM) (Cuadro 6).

Semanalmente fueron evaluados los siguientes aspectos: número de nudos, número de hojas y altura de los explantes.

Cuadro 6. Tratamientos de la etapa de multiplicación con combinaciones de BAP (μM) e IBA (μM) .

Tratamientos	**A0**	**A1**	**A2**	**A3**	**A4**	**A5**	**A6**	**A7**	**A8**	**A9**
Concentración de Bencilaminopurina (BAP)	0	4.4	4.4	4.4	8.8	8.8	8.8	16	16	16
Concentración de Ácido indolbutírico (IBA)	0	1.2	2.4	4.8	1.2	2.4	4.8	1.2	2.4	4.8

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental que se utilizó en este trabajo fué el de bloques completamente al azar en cada una de las diferentes etapas con un total de 7 repeticiones para la etapa de desinfección y 5 repeticiones para las etapas de iniciación y multiplicación (Hurtado y Meriño, 2.000). Se analizaron los datos mediante el programa estadístico SAS®.

El análisis de varianza (ANOVA) se utilizó para hacer el análisis respectivo de los datos y la prueba LDS se aplicó para la separación de las medias.

4.1 POBLACIÓN

El número de explantes utilizados en este trabajo fue de 315 distribuidos así:

Etapa de desinfección: 105
Etapa de iniciación: 60
Etapa de multiplicación: 150

4.2 NÚMERO DE REPETICIONES

Se realizaron siete (7) repeticiones por tratamiento para la etapa de desinfección, cinco (5) para la etapa de iniciación y multiplicación.

4.3 UNIDAD EXPERIMENTAL

Como unidad experimental se utilizó un explante por frasco.

4.4 INDICADORES

Cuadro 7. Indicadores de la etapa de desinfección.

Indicadores/ Variable dependiente	Variable independiente
Nº explantes contaminados por hongos	Concentración de NaOCl Tiempo de exposición de explantes
Nº explantes contaminados por bacterias	
Nº explantes necrozados	

Cuadro 8. Indicadores de la etapa de establecimiento.

Indicadores/ Variable dependiente	Variable independiente
Nº de Explantes que brotan	Concentración de BAP
Longitud de los brotes por explante	
Nº de brotes por explante	

Cuadro 9. Indicadores de la etapa de multiplicación.

Indicadores/ Variable dependiente	Variable independiente
Nº de nudos por brote	Concentración de BAP e IBA
Longitud del brote	
Nº de hojas por brote	

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ETAPA IN VIVO:

5.1.1 Establecimiento de plantas madres en condiciones semicontroladas.

Las estacas de *Annona muricata* mantenidas bajo condiciones semicontroladas en invernáculo con humedad relativa de 60 %, temperatura 27 ºC e intensidad lumínica de 66 $\mu m.m^{-2}s^{-1}$ (Figura 2), iniciaron la formación de brotes alrededor de los ocho (8) días; al cabo de los 60 días las estacas (8) tenían en promedio 6 brotes y un total de 82 nudos. Esta producción de nudos fue significativamente alta durante los primeros 30 días (Figura 3), obteniéndose casi la totalidad de las nudos (74) mientras que en los siguientes 30 días el rendimiento se redujo un 90% (Cuadro 10).

Cuadro 10. Nudos de *A. muricata* obtenidas de estacas mantenidas en invernáculo.

Número de días	10	20	30	40	50	60
Número de nudos	28	54	74	77	79	82

Figura 2. Estacas de *A. muricata* en invernáculo.

Figura 3. Estaca de *A. muricata* con brotes a los 30 días.

El procedimiento de lavado y desinfección aplicado a las estacas con solución al 2% de detergente comercial y Benomil® (metil-1-butilcarbamoilbencimidazol2-ilcarbamato) respectivamente permitió observar una mínima contaminación fúngica exógena, registrándose un alto grado de asepsia.

En nuestro trabajo el inicio de brotación de las estacas se observó a los ocho días, mientras que Bridg (2000) reporta que las plantas de semillero desfoliadas sometidas a condiciones de invernadero de 25 ± 5ºC de temperatura, 70% de humedad y mantenidas en sustrato cuarzo arena empleadas como plantas madres presentaban brotación trascurridos treinta días.

5.2 ETAPA *IN VITRO*

5.2.1 Fase de desinfección de explantes de *A. muricata*

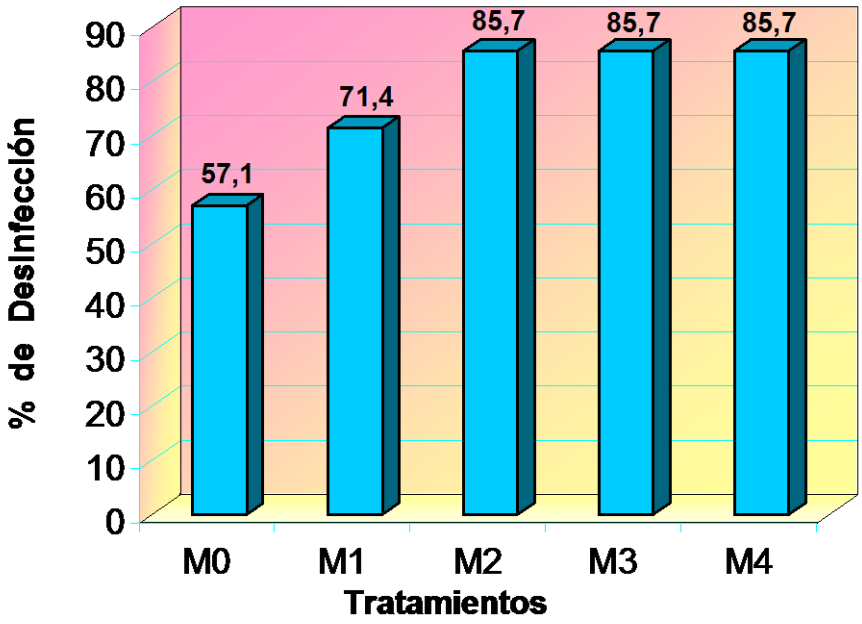
Las variables de porcentajes de contaminación por hongos, por bacterias, porcentaje de necrosis y porcentaje de desinfección evaluadas con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) e intervalos de tiempo arrojaron los siguientes datos:

Cuadro 11. Porcentaje de contaminación fúngica, bacteriana, necrosis y desinfección obtenidos en la etapa de desinfección en explantes de A. *muricata*.

Tratamientos	[ ] % NaOCl	Tiempo min.	%Cont Hongo	% Cont. Bacteria	% Necrosis	% Desinfección
M0	0	0	28,6	14,3	0	57,1
M1	1	5	14,3	14,3	0	71,4
M2	1	10	14,3	0	0	85,7
M3	2	5	0	14,3	0	85,7
M4	2	10	14,3	0	28,6	85,7

Los tratamientos M2, M3 y M4 presentaron el mismo valor en lo que respecta al porcentaje de explantes de *A. muricata* desinfectados (85,7%), la contaminación presente correspondió a un explante por tratamiento ya sea por hongo y/o por bacteria, mientras que el M0 presento el valor mas bajo de desinfección (57,1%) seguido por M1con un porcentaje de 71,4% (Figura 4).

Figura 4. Porcentaje de desinfección de explantes de *Annona muricata*.



En general, los valores de porcentajes de desinfección obtenidos en todos los tratamientos pueden ser considerados como altos, atribuido en parte al empleo de agentes químicos para lavado como solución de detergente comercial, solución de Tween 20 y etanol al 70%.

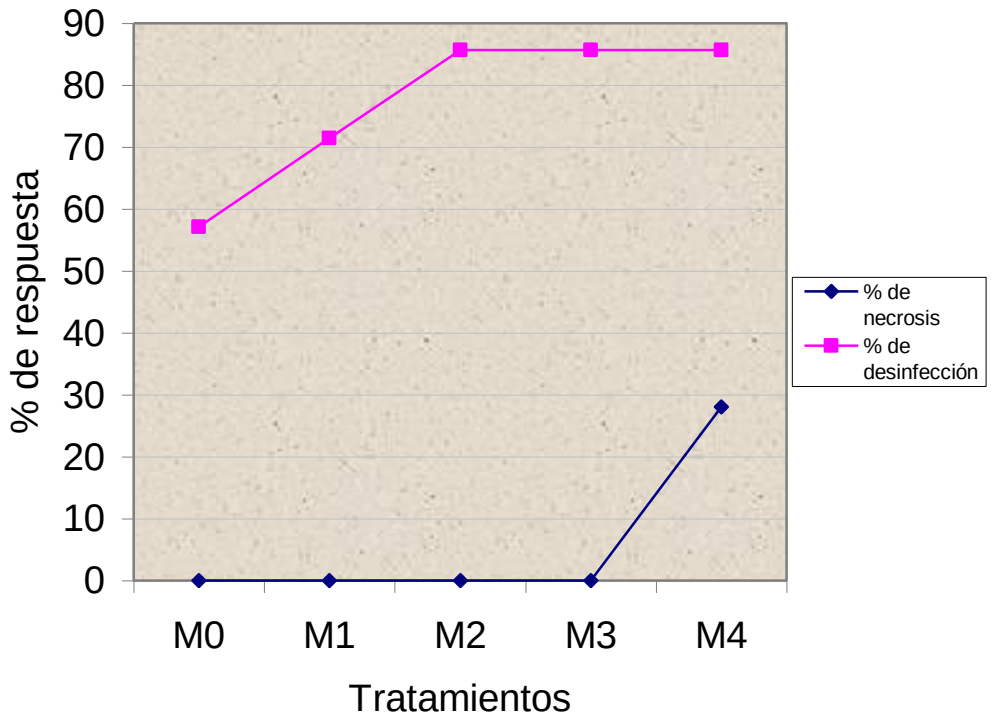
La contaminación por hongo se observó en el medio de cultivo más no en el explante, en contraste, la contaminación por bacterias, se localizaba en la parte basal del explante por lo que se recurrió al empleo de una solución de antibiótico de Rifampicina 3% según Velásquez, et al., 2004 para prevenir la presencia del agente contaminante.

La supervivencia de los explantes sometidos a los tratamientos M1, M2 y M3 fue óptima, ya que las concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) no afectaron al material vegetal dando como resultado al igual que M0 un 0% de necrosis y observándose el inicio del nuevo brote a los ocho días de sembrado en el medio de cultivo básico Nitsch – Nitsch (1969). Los explantes en el tratamiento M4 presentaron un porcentaje de necrosis de 28,6%, por lo que la supervivencia de estos se ve limitada por la alta concentración de NaOCl y el tiempo de exposición (figura 5).

Figura 5. Explante de *A. muricata* sin necrosis y libre de contaminantes.

Comparando los porcentajes de desinfección y necrosis obtenidos en esta fase, el tratamiento M2 (NaOCl 1% 10 min.) es considerado como el más adecuado ya que se obtiene un alto grado de explantes sanos (85,7 %) sin necrozamiento (Figura 6); además al ser la concentración más baja se disminuye los costos.

Figura 6. Efecto del NaOCl frente al porcentaje de desinfección y necrosis en los diferentes tratamientos.



Estos resultados superan a los obtenidos por Ramírez et al. (2002) quienes al emplear NaOCl al 1 % durante 10 minutos obtuvieron 55% de explantes necrozados y un 28 % de explantes asépticos. De igual manera con Bridg (2000) los cuales reportan como mejor tratamiento NaOCl al 3% por 15 minutos con un 45% de cultivos asépticos y 48 % de necrosis. En Ambos estudios el control presento contaminación en su totalidad.

5.2.2 Fase de iniciación

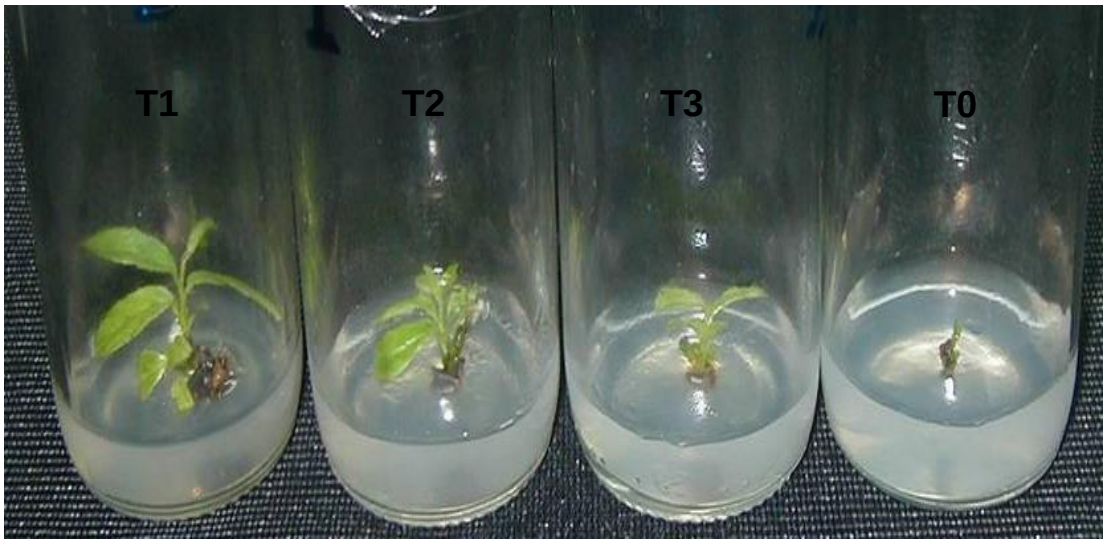
Al establecer los explantes desinfectados en el medio Nitsch-Nitsch (1969) suplementado con regulador de crecimiento Bencilaminopurina (BAP) a diferentes concentraciones y distribuidos en bloques completamente al azar (Figura 7) se observó que a los 10 días de sembrado todos los explantes presentaban brotación, indicando la ruptura de latencia de las yemas. A los 60 días de evaluados el número promedio de brotes desarrollados en los explantes fue de 1.2, y alcanzaron una longitud promedio de 0.52 cm con presencia de nudos y hojas (figura 8). En el cuadro 12 se muestran los resultados promedios obtenidos en la fase de iniciación.

Cuadro 12. Promedio de explantes con brotes, número y longitud del brote a los 60 días de evaluación.

Tratamientos	Concentración de BAP (µM)	Explantes con brotes	Número de brotes	Longitud del brote (cm)
T0	0	1	1	0.32
T1	4.4	1	1.4	0.62
T2	8.8	1	1.4	0.59
T3	16	1	1	0.56

Figura 7. Explantes de *A. muricata* distribuidos en bloques completamente al azar en etapa de iniciación.

Figura 8. Explantes de *A. muricata* en etapa de iniciación.

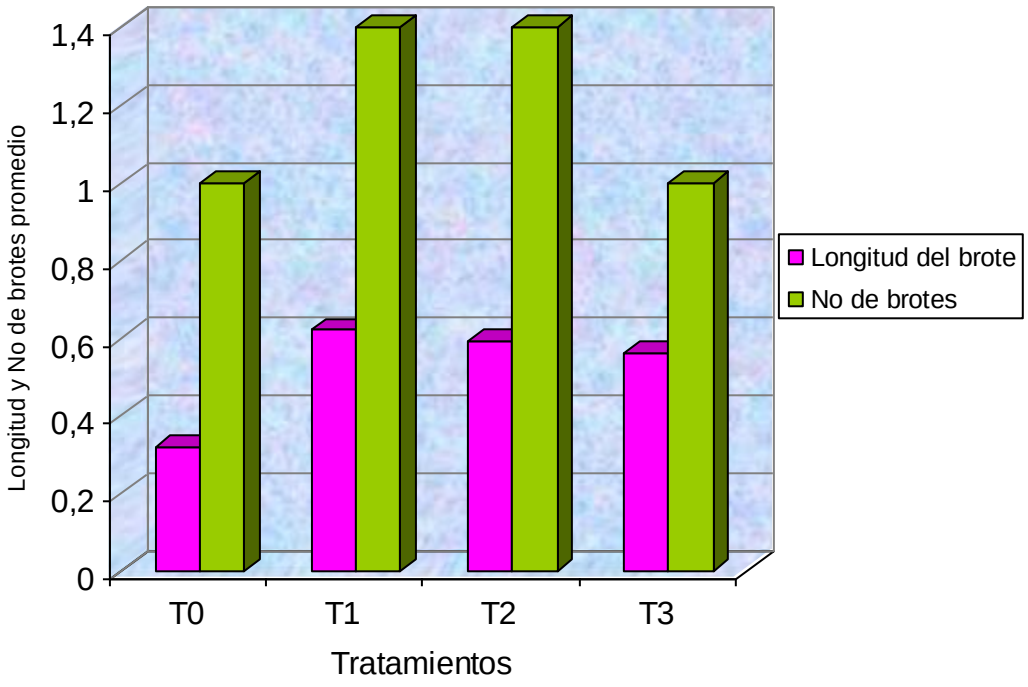


El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los tratamientos empleados para cada una de las variables dependientes (Nº de brotes por explante y longitud del brote) a un nivel de significancia (α) de 0.05

y un coeficiente de variabilidad (C.V.) de 46.2 y 58.72 respectivamente (Anexo 3).

Correlacionando las variables de longitud y número de brotes promedio (Figura 9), los tratamientos T1 (4.4 µM) y T2 (8.8 µM) exhibieron el mejor comportamiento con respuestas similares 0.62 cm, 1.4 brotes y 0,59 cm, 1.4 brotes respectivamente (Figura 10), y el control T0 presentó la más baja respuesta ante estas variables (0.32 cm y 1 brote) (Figura 11); debido a que T1 indujo un mayor crecimiento que T2 y representa a la concentración de regulador más baja utilizada (4.4 µM), lo que contribuiría con la reducción en costos, se sugiere utilizar en la etapa de establecimiento esta concentración de regulador de crecimiento.

Figura 9. Longitud y número de brotes promedio en explantes de *A. muricata* en la etapa de establecimiento.



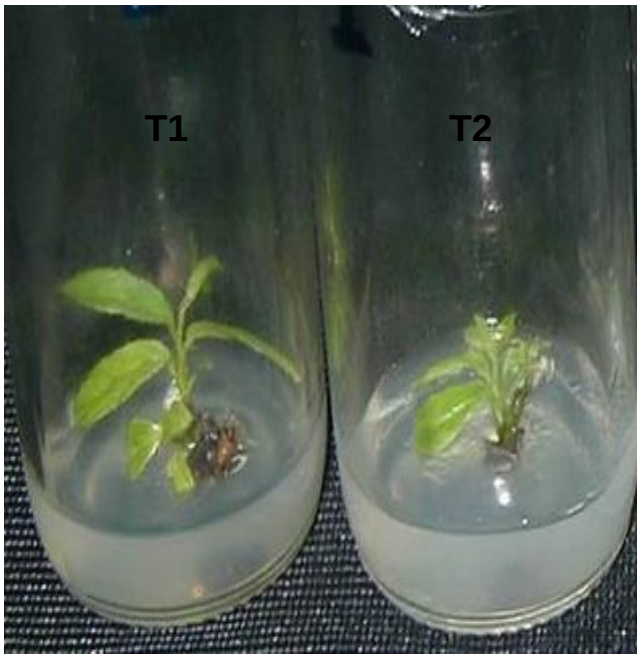


Figura 10. Explantes de *A. muricata* con T1 y T2 en la etapa de iniciación.

Figura 11. Explante de *A. muricata* con T0 en la etapa de iniciación.

Si bien es cierto que el suministro de citoquininas como BAP al medio de cultivo favorece el rompimiento de la latencia que presentan las yemas promoviendo la división celular (www.alaquairum.com/hormonas_vegetativo.htm) en nuestro caso no es estrictamente necesario su empleo para ello, pero si es requerida para lograr un mayor crecimiento y desarrollo.

En relación a los resultados de Bridg (2000) los nuestros fueron similares en número de brotes (1.4), pero en términos de explantes con brotes nosotros obtuvimos un 100% y Bridg obtuvo un 19.4%, quién utilizó una concentración de BAP 8.8 µM, Nitsch – Nitsch (1969), Gelrite 3gr/l y sucrosa 30g/l.

5.2.3 Fase de multiplicación

En la etapa de multiplicación las variables evaluadas fueron número de nudos, longitud del brote y número de hojas en explantes de *A. muricata* por un periodo de 60 días donde los promedios máximos alcanzados para cada una de las variables correspondieron a 6.2 nudos, 3.1cm y 7.5 hojas (Cuadro 13).

Cuadro 13. Número Promedio de nudos, hojas y longitud del brote en medio suplementado con BAP e IBA.

Tratamientos	[ ] de BAP (µM)	[ ] de IBA (µM)	N° de nudos	N° de hojas	Longitud del brote (cm.)
A0	0	0	3	3.6	2.1
A1	4.4	1.2	4	5.4	2.2
A2	4.4	2.4	4	6.2	2.8
A3	4.4	4.8	5.2	6.8	3.1
A4	8.8	1.2	2	3.3	0.8
A5	8.8	2.4	4	5.5	2.5
A6	8.8	4.8	5.7	7.2	2.8
A7	16	1.2	6.2	7.5	2.95
A8	16	2.4	5.3	6.6	2.6
A9	16	4.8	2.6	3.0	1.2

A un nivel de significancia (α) de 0,05 para las diferentes variables se presentó diferencias significativas entre los tratamientos registrándose valores de coeficiente de variabilidad de 29.60 para la variable número de nudos, 29.93 para longitud y 32.93 para número de hojas (Anexo 4).

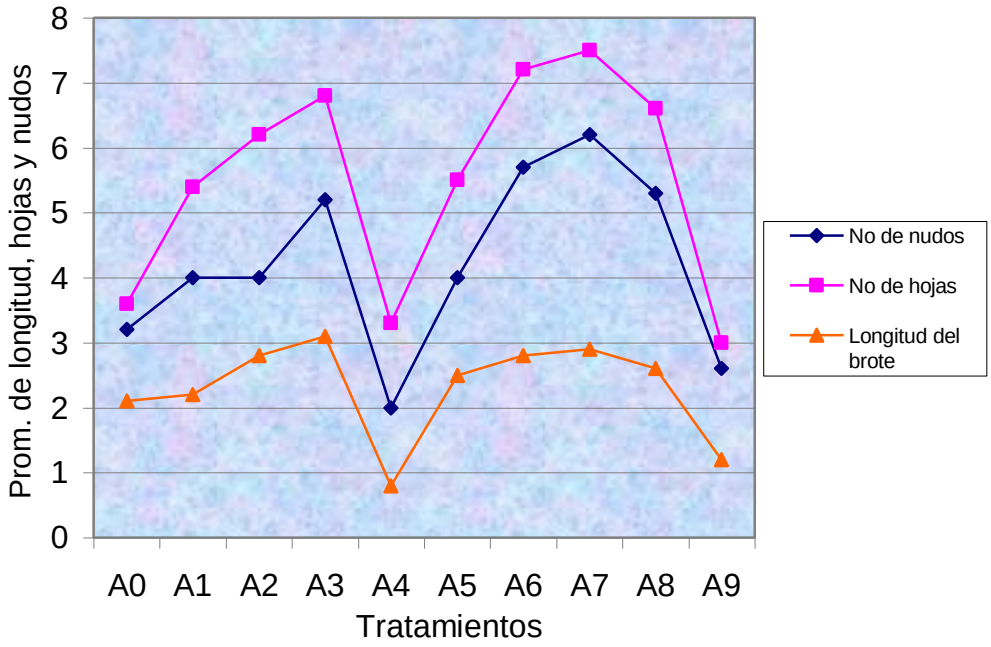
Según el test LDS para la variable número de nudos los tratamientos con las medias mas altas en su orden fueron A7, A6, A8 y A3 siendo

estadísticamente iguales, ya que se encuentran dentro del mismo grupo, mostrando diferencia significativa con el resto de tratamientos.

Para la variable número de hojas y longitud del brote, los tratamientos A1, A2, A3, A5, A6, A7 y A8 no presentaron diferencias significativas, pero si con los demás tratamientos A0, A4 y A9.

El comportamiento gráfico fue semejante para las tres variables evaluadas en la etapa de multiplicación (Figura 12).

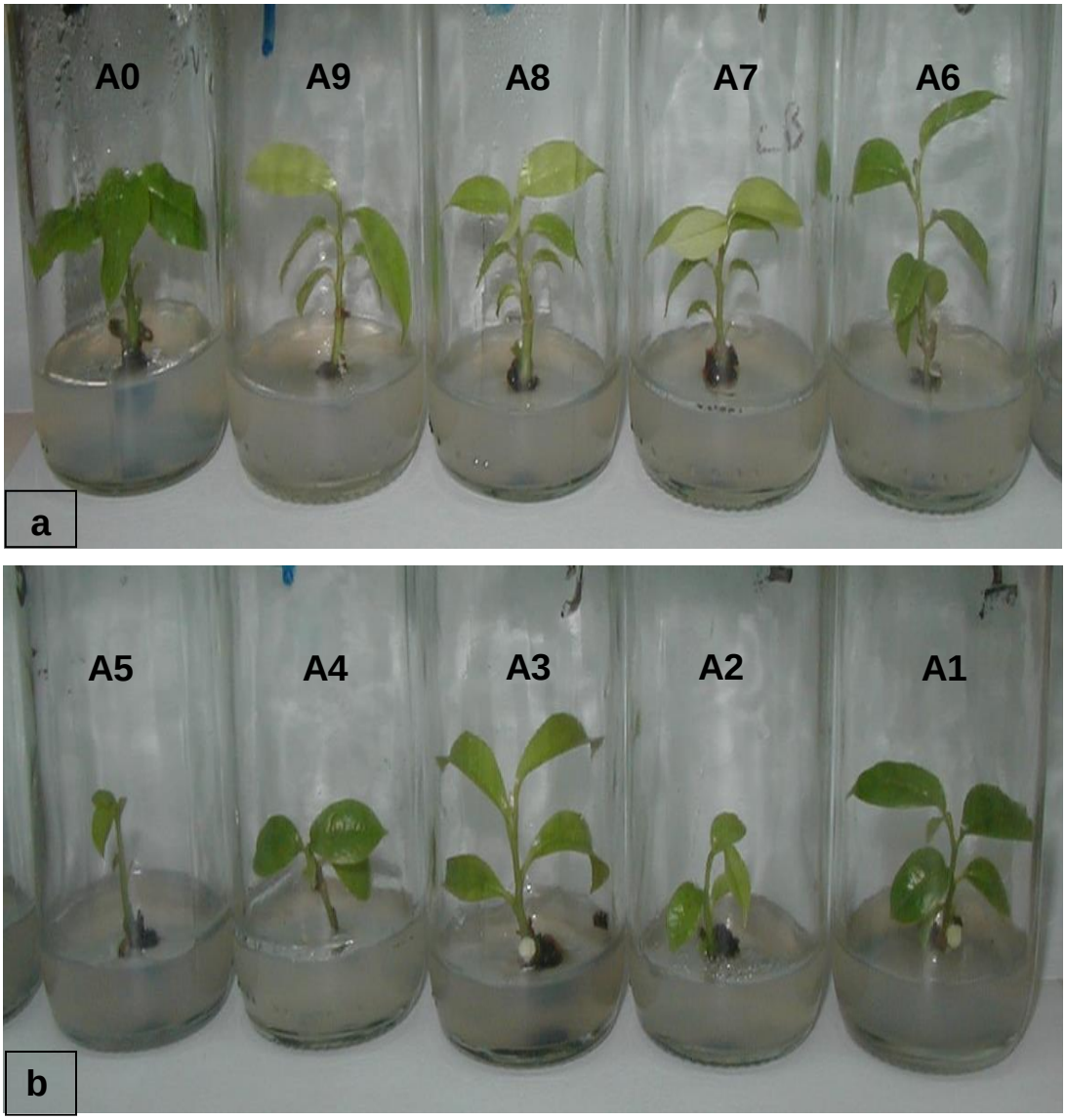
Figura 12. Efecto de la combinación de BAP e IBA en la fase de multiplicación en la longitud, número de nudo y hojas en segmentos nodales de *A. muricata.*



Los picos máximos se obtuvieron con el tratamiento A7 (BAP 16 µM e IBA 1.2 µM) en las variables número de nudos (6.2) y número de hojas (7.5); en la longitud, A3 (BAP 4.4 µM e IBA 4.8 µM) supero el valor de A7 pero con

una diferencia insignificante de 0.15 cm por lo que se sugiere el A7 para el desarrollo de esta fase, ya que el proceso de multiplicación requiere el mayor número de segmentos nodales posibles con el fin de obtener una alta tasa de plántulas (Figura 13).

Figura 13. Efecto de diferentes combinaciones de BAP e IBA en explantes de *A. muricata* en la fase de multiplicación: **a.** Tratamientos A6 a A0 y **b.** Tratamientos A1a A5.



El cambio de los explantes de *A. muricata* del medio de iniciación suplementado con BAP al medio de multiplicación con este mismo regulador en combinación con IBA produjo un aumento en la altura del brote, número de nudos y de hojas por lo que se podría inferir que ambas son requeridas para el cultivo *in vitro* posiblemente por el sinergismo entre citoquininas y auxinas. Sin embargo, esta actividad sinérgica es dependiente de la concentración en que se encuentren estos reguladores actuando negativamente a mayores concentraciones de auxinas y citoquininas como en los tratamientos A9 ((BAP 16 µM e IBA 4.8 µM) y positivamente a mayor proporción de citoquinina y menor de auxina como el tratamiento A7 (BAP 16 µM e IBA 1.2µM).

La tasa de multiplicación obtenida en esta etapa fue de 7.2 después de 60 días con una temperatura promedio de 25±3 ºC, con una intensidad lumínica de 50 ± 5 $\mu m.m^{-2}s^{-1}$ durante 12 horas / luz y una humedad relativa del 45 al 60 %.

6. CONCLUSIONES

- El establecimiento de estacas en invernáculo bajo condiciones ambientales semicontroladas como temperatura de 27ºC, intensidad lumínica de 66 $\mu m.m^{-2}s^{-1}$ y humedad 60% son adecuadas para la inducción masiva de brotes de *A. muricata en* promedio 6 brotes y 10,25 nudos por estacas convirtiéndolo en un método eficaz y ventajoso, asegurando así la disponibilidad de yemas para la siembra *in vitro*.

- El empleo de agentes de lavado y desinfectantes como fungicidas, detergente en polvo, Tween 20, etanol y NaOCl permiten la obtención de explantes libres de contaminantes exógenos.

- El tratamiento de los explantes de *A. muricata* con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% durante 10 minutos fue efectivo para la obtención de material libre de contaminantes sin producir necrozamiento con un 85.7% de explantes desinfectados.

- En la etapa de iniciación el tratamiento T1 (BAP 4.4 µM) es considerado como el óptimo para el desarrollo de esta fase, ya que garantiza un mayor crecimiento de los explantes y además reduce los costos por ser la menor concentración de regulador de crecimiento.

- La combinación de BAP 16 µM con IBA 1.2 µM fue el que exhibió la mejor respuesta en cuanto a longitud, número de nudos y número de hojas con una tasa de multiplicación 7.2 facilitando el manejo del material vegetal y garantizando un mayor número de plántulas.

- En síntesis, la combinación del establecimiento *in vivo* para la inducción de brotes junto con el establecimiento *in vitro* permite una alta producción de explantes para la propagación masiva de esta especie.

7. RECOMENDACIONES

- Hacer uso de soluciones de fungicidas en diferentes concentraciones previo a la siembra *in vitro* de los explantes de A. muricata adjunto al protocolo de desinfección para minimizar aun más el porcentaje de explantes contaminados (14,3%).

- Ensayar en etapa de iniciación un rango más reducido del regulador de crecimiento BAP, al igual que emplear otras citoquininas como kinetina, zeatina, entre otras, con el fin de determinar si existe una mejor respuesta en cuanto al rompimiento de la latencia.

- Probar distintas concentraciones de BAP en la fase de multiplicación en combinación con la auxina IBA y otros reguladores de crecimiento que promuevan el desarrollo de múltiples brotes.

- Utilizar el ácido giberélico (GA_3) en la etapa de multiplicación para lograr un mayor alargamiento de los entrenudos.

- Estandarizar una metodología que induzca la rizogénesis y aclimatación de plántulas de *A. muricata* que permita completar la optimización de la técnica de propagación *in vitro.*

- Implementar sistemas de diagnóstico para comprobar el estado fitosanitario de las *vitroplantas* de *A. muricata*.

8. BIBLIOGRAFÍA

Becerra, L. (1989). Fruticultura tropical.

Bridg, H. (2000). Micropropagation and determination of the *in vitro* stability of *Annona cherimolla Mill.* and *Annona muricata L.* Humboldt University of Berlin, Germany. Págs. 1 – 120. Disponible en internet: http://www.dochost.rz.hu-berlin.de/dissertationen/bridg-hannia-2000-03-24

Cabra, J. (2002). Guanábana al laboratorio. AUPEC. Cali, Colombia. AUPEC@mafalda.univalle.edu.co.

Diagnóstico frutícula del departamento de Sucre (1993) Grupo sistema de producción CRECED Sabanas de Sucre, Sincelejo. Págs. 32 – 35.

Drew, R. A. (1997) The Application of Biotechnology to the Conservation and Improvement of Tropical and Subtropical Fruit Species (FAO Consultant). Seed and Plant Genetic Resources Service Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. Estados Unidos. Págs. 42 – 45.

González, S. (2002).Tema 5: MEDIOS DE CULTIVO. Facultad de Biología. Departamento de Biología Vegetal Universidad de la Habana. Cuba. Págs. 67 – 88.

En Internet: www.alaquairum/hormonas_vegetales.htm

Hurtado, D. V y Meriño, M. E. (2.000). Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas. México Págs. 232.

INSTITUTO GEOGRAFICO AGUSTÍN CODAZZI (IGAC). Estudio General de Suelos y Zonificación de Tierras Departamento de Sucre. 1998. 124 p.

Lemos, E. E.P. y Blake J. (1996). Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. Journals of Horticultural Science, 71(3): 395 -403.

Lemos E. Bake D. (1998). Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explants of *Annona muricata*. Plant Growth Regulation, 25 (2): 105 -112.

Morton, J. (1987) Soursop. *Fruits of Warm Climates*. Miami FL: 75-80.

Nitsch JP and Nitsch C (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87.

Ramírez M. Villalobos, A. Urdaneta y S. León de Sierralta (2002). *In vitro* establishment of adult explants of soursop*(Annona muricata* L.) treated with Sodium hypochlorite. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 19: 48-55.

Rincón, A. Ortega, R. Urdaneta, J. León de Sierralta S., B. Bracho y Ramírez M.(1999). Establecimiento aséptico de brotes laterales de *Annona* spp. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 16 Supl. 1: 76-81

Roca, W. M & Mroginski, L. A. (1991). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. (Eds): Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT. Cali, Colombia. 20-35 p.

Rodríguez, C. (2002). Cultivo *In vitro* de Ñame *(Dioscorea alata* cv "pico de botella") a partir de segmentos nodales. Tesis de grado. Facultad de Educación y Ciencias. Programa de biología con Énfasis en Biotecnología. Universidad de Sucre. Sincelejo. Pags 47

Toro, J. (2001). Aspectos claves para el manejo agronómico del guanábano y zonificación especializada para el cultivo. Corporación Biotec. CIAT. Cali, Colombia. Págs. 1 – 11.

Velásquez, M, González, A., Mata, F. León De Sierraalta, S. Esparza, D. Ramírez, M (2004). Tipo de sombreamiento y tiempo de crecimiento de brotes laterales sobre la viabilidad de explante de A. muricata L. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 21: 12 – 18.

Watson, L. and Dallwitz, MJ. (1992). The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification and Information Retrieval.Version:19th august 1999. Disponible en internet: http://www.biodiversity.uno.edu/delta/angio/www/annonace.htm .

A N E X O S

Anexo 1: Composición nutricional en 100 g de porción de *A. muricata*.

Componente	Concentración	
Calorías	53.1 - 61.3	kcal
Humedad	82.8	g
Carbohidratos	14.63 - 15.63	g
ceniza	0.63 - 60.0	g
Grasa	0.31 - 0.97	g
Fibra cruda	0.79 - 1.63	g
Proteína	1.0 - 1.22	g
Calcio	10.3 - 22.0	mg
Potasio	45.8	mg
Magnesio	23.9	mg
Sodio	23.0	mg
Hierrro	0.47 - 0.64	mg
Fósforo	26.0 - 27.0	mg
Almidón	1.62	
Vitamina A	0.0 - 20.0	UI
Tiamina (B1)	0.06 - 0.11	mg
Riboflavina (B2)	0.05 - 0.07	mg
Niacina	1.28 - 22.00	mg
Acido ascórbico	29.6	mg
Aminoácidos		
Triptófano	11.0	mg
Metionina	7.0	mg
Lisina	60.0	mg

Fuente: Morton (1987).

Anexo2: Composición de medios de cultivo.

COMPOSICION	Concentración en mg/l
	NN
KNO_3	-
NH_4NO_3	720
$Ca(NO_3)_2 *4H_2O$	-
$MgSO_4 * 7H_2O$	185
$CaCl_2 *2H_2O$	219.9
K_2SO_4	-
KH_2PO_4	68
H_3BO_3	10
$MnSO_4 * 4H_2O$	18.94
Na_2 EDTA $*2H_2O$	37.3
$ZnSO_4 * 7H_2O$	10
$Na_2 MoO_4 * 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 * 5H_2O$	0.025
$CoCl_2 * 6 H_2O$	-
KI	-
$FeSO_4 * 7H_3O$	27.8
Glicina	2.0
Myo-inositol	100
Ácido nicotínico	5.0
Piridoxina-HCl	0.5
Tiamina	0.5
Biotina	0.05
Ácido fólico	0.5

Fuente: Bridg, 2000.

ANEXO 3. Análisis de varianza y prueba de LDS de las variables dependientes evaluadas en la etapa de iniciación.

1. Análisis de Varianza

1.1 Variable No. de brotes por explante

- **Diseño**

En bloques al azar

- **Hipótesis**

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 =$…… μ_{10}

H_1: al menos un par difiere

- **Prueba de supuestos**
  - **Normalidad:** los datos se distribuyen normalmente (p = 0.1937)
  - **Homogeneidad de varianzas:** las varianzas son homogéneas (p = 0.0401).
  - **Independencia:** está garantizada por el diseño.

- **C.V.**

El estudio fue bien conducido (C.V = 46.27)

- **Diferencia de medias:**
  - **t Tests (LSD)**

Error: 0,3083 gl: 12

Tratamiento	Medias	n	
4	1,00	5	A
3	1,00	5	A
2	1,40	5	A
1	1,40	5	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

- **Tabla ANOVA:** Variable: # de brotes por explante

F.V	G.L	C.M.	F	*Pr >F*
Tratamientos	3	0.27	0.86	0.4859
Error	12	0.31		
Total	15			

2. Análisis de Varianza

2.1. Longitud promedio del brote

- **Diseño**

  En bloques al azar

- **Hipótesis**

  Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 =$…… μ_{10}

  H_1: al menos un par difiere

- **Prueba de supuestos**

  - **Normalidad:** los datos se distribuyen normalmente (p=0.2321)
  - **Homogeneidad de varianzas:** las varianzas son homogéneas (p=0.2275)
  - **Independencia:** está garantizada por el diseño

- **C.V.**

  El estudio fue bien conducido (C.V= 58.72).

- **Diferencia de medias:**
  - **t Tests (LSD)**

Error: 0,0941 gl: 12

Tratamiento	Medias	n	
4	0,32	5	A
3	0,56	5	A
2	0,59	5	A
1	0,62	5	A

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05).

- **Tabla ANOVA:** Variable: longitud brote

F.V	G.L	C.M.	F	*Pr >F*
Tratamientos	3	0.09	1.00	0.4262
Error	12	0.09		
Total	15			

ANEXO 4. Análisis de varianza y prueba de LDS de las variables dependientes evaluadas en la etapa multiplicación.

3. Análisis de Varianza

3.1. Variable Nudos

➢ **Diseño**

En bloques al azar

➢ **Hipótesis**

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 =$…… μ_{10}

H_1: al menos un par difiere

➢ **Prueba de supuestos**

- **Normalidad:** los datos se distribuyen normalmente (p=0.81541)
- **Homogeneidad de varianzas:** las varianzas son homogéneas (p=0.3412)
- **Independencia:** está garantizada por el diseño

➢ **C.V.**

El estudio fue bien conducido (C.V= 29.60481).

- **Diferencia de medias:**
  - **t Tests (LSD)**

t Grouping		Mean	N	trata
	A	6.2500	4	7
	A			
B	A	5.7500	4	6
B	A			
B	A	5.3333	3	8
B	A			
B	A	5.2000	5	3
B				
B	C	4.2500	4	5
B	C			
B	C	4.0000	4	2
B	C			
B	C	4.0000	5	1
	C			
D	C	3.2000	5	10
D	C			
D	C	2.6667	3	9
	D			
D		2.0000	3	4

- **Tabla ANOVA:** Variable: # de nudos

F.V	G.L	C.M.	F	*Pr >F*
Tratamientos	9	6.8435	4.17	0.0014
Error	30	1.6394		
Total	39			

4. Análisis de Varianza

4.1. Longitud del brote

- **Diseño**

En bloques al azar

➢ **Hipótesis**

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 =$…… μ_{10}

H_1: al menos un par difiere

➢ **Prueba de supuestos**

- **Normalidad:** los datos se distribuyen normalmente (p=0.41013)
- **Homogeneidad de varianzas:** las varianzas son homogéneas (p=0.1543)
- **Independencia:** está garantizada por el diseño

➢ **C.V.**

El estudio fue bien conducido (C.V= 29.93753).

➢ **Diferencia de medias:**

- **t Tests (LSD)**

t Grouping			Mean	N	trata
	A		3.1400	5	3
	A				
B	A		2.9500	4	7
B	A				
B	A		2.8250	4	2
B	A				
B	A		2.8000	4	6
B	A				
B	A		2.6000	3	8
B	A				
B	A		2.5000	4	5
B	A				
B	A	C	2.2400	5	1
B		C			
B		C	2.0800	5	10
		C			
	D	C	1.2667	3	9
	D				
	D		0.8667	3	4

➢ **Tabla ANOVA:** Variable: longitud brote

F.V	G.L	C.M.	F	*Pr >F*
Tratamientos	9	1.8906	3.68	0.0034
Error	30	0.5140		
Total	39			

5. Análisis de Varianza

5.1. Variable Número de Hojas

➢ **Diseño**

En bloques al azar

➢ **Hipótesis**

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 =$…… μ_{10}

H_1: al menos un par difiere

➢ **Prueba de supuestos**

- **Normalidad:** los datos se distribuyen normalmente (p=0.91892)
- **Homogeneidad de varianzas:** las varianzas son homogéneas (p=0.4683)
- **Independencia:** está garantizada por el diseño

➢ **C.V.**

El estudio fue bien conducido (C.V = 32.93232).

- **Diferencia de medias:**
  - **t Tests (LSD)**

t	Grouping		Mean	N	trata
	A		7.500	4	7
	A				
	A		7.250	4	6
	A				
	A		6.800	5	3
	A				
	A		6.667	3	8
	A				
B	A		6.250	4	2
B	A				
B	A	C	5.500	4	5
B	A	C			
B	A	C	5.400	5	1
B		C			
B		C	3.600	5	10
		C			
		C	3.333	3	4
		C			
C			3.000	3	9

- **Tabla ANOVA:** Variable: # de hojas

F.V	G.L	C.M.	F	*Pr >F*
Tratamientos	9	10.3962	3.06	0.0102
Error	30	3.4011		
Total	39			