

## ARTÍCULO ORIGINAL

### DESDIFERENCIACIÓN DE TEJIDO ENDOSPÉRMICO DE *Annona muricata* L. “GUANÁBANA” UTILIZANDO 2,4-D Y BAP

#### DEDIFFERENTIATION OF ENDOSPERMIC TISSUE OF *Annona muricata* “SOURSOP” USING 2,4-D AND BAP

**Julio Chico-Ruiz\*, Yajaira Reyna-Cabanillas, Cristhian Tejada-Grados & Alfredo León-Alayo**

*Laboratorio de Experimentación Vegetal. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo (UNT), Av. Juan Pablo II s/n. Ciudad Universitaria, Trujillo, PERÚ. \*jchico@unitru.edu.pe // https://orcid.org/0000-0002-7287-321X. Autor para correspondencia.*

#### RESUMEN

Los reguladores del crecimiento inducen cambios en las células y órganos vegetales y una de ellos es la dediferenciación. La guanábana presenta inconvenientes en su propagación convencional por lo cual debe ser investigado en condiciones *in vitro*. Por eso el interés de dediferenciar el tejido endospermico de *Annona muricata* utilizando 2,4-D y BAP. Se introdujo el explante en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) que contenía 2,4-D (5 ppm) y después de 10 días se cambió el explante a un medio que contenía BAP (10 ppm). A los 30 días no hubo variación en su peso fresco, pero si se observó divisiones celulares. Se concluye que si es posible inducir la dediferenciación en el tejido endospermico de guanábana.

**Palabras clave:** *Annona muricata*, auxina, citoquinina.

#### ABSTRACT

Growth regulators induce changes in plant cells and organs and one of them is dedifferentiation. Soursop has drawbacks in its conventional propagation, which is why it must be investigated under *in vitro* conditions. Hence the interest in dedifferentiating the endosperm tissue of *Annona muricata* using 2,4-D and BAP. The explant was introduced into Murashige and Skoog's (1962) culture medium containing 2,4-D (5 ppm) and after 10 days the explant was changed to a medium containing BAP (10 ppm). At 30 days there was no variation in its fresh weight, but cell divisions were observed. It is concluded that it is possible to induce dedifferentiation in the endospermic tissue of soursop.

**Keywords:** *Annona muricata*, auxin, cytokinin.

**Historial del artículo:** Recibido: 30 de julio de 2021. Aceptado: 22 de setiembre de 2021. Publicado online: 30 de diciembre de 2021.

**Citación:** Chico-Ruiz, J.; Y. Reyna; C. Tejada-Grados & A. León-Alayo. 2021. Desdiferenciación de tejido endospermico de *Annona muricata* L. “guanábana” utilizando 2,4-D y BAP. Sagasteguiana 9(2): 89-94.

#### INTRODUCCIÓN

Las estrategias utilizadas en el mejoramiento del crecimiento vegetal, teniendo como base el uso de los reguladores del crecimiento, ha permitido controlar de manera específica los procesos celulares. Estos reguladores potencializan el proceso de cultivo, *in vitro* o *ex vitro*, en los organismos vegetales y así poder eliminar muchas de las problemáticas que se presentan en los cultivos como la presencia de fitopatógenos microbianos, entomopatógenos, cambios ambientales, cambios en el medio de cultivo, entre otros.

El proceso celular en la que inciden los reguladores es la diferenciación, la cual comprende los cambios morfológicos y fisiológicos que permiten la especialización de las células y la formación de los diferentes tejidos y órganos de la planta. Sin embargo, en condiciones de laboratorio *in*

vitro, ese mecanismo se puede volver a diferenciar (desdiferenciar) en el cual pierden su destino celular y reinician la división celular (Taiz & Zeiger, 2002) para obtener un nuevo tejido, sea de cualquier planta o de cualquier órgano de la planta, la única condición es que se inicie de células vivas (Azcon-Bieto, 2013; Sheres, 2001).

Para lograr este mecanismo in vitro se necesitan los reguladores del crecimiento, las cuales se deben añadir a los medios de cultivo; según los requerimientos de los diferentes medios y los objetivos que se persigan. Así las auxinas, sus principales puntos de acción se encuentran a nivel celular, donde tienen la capacidad de dirigir e intervenir en los procesos de división, elongación y diferenciación celular (Garay-Arroyo et al., 2014; Vanneste & Friml, 2009) y las citoquininas que tienen la capacidad de estimular e inducir una alta proliferación y división celular (Yong et al., 2009).

El guanábano (*Annona muricata* Linnaeus), Annonaceae, es un árbol tropical cuyo centro de origen se encuentra en Colombia y Brasil y crece entre los 0-1000 m.s.n.m. (Guapacha, 2006). Esta especie produce un fruto de interés alimenticio e industrial y se puede propagar por semilla, estacas, acodo o por injerto (Cabra et al., 2002). Las semillas del guanábano son lisas, de color marrón o crema y de forma elipsoidal a ovoide con endospermo blanquecino. La propagación por semilla y de otras especies de Annonaceae resulta difícil y errática por cuanto la germinación y emergencia ocurre de manera desigual e irregular a lo largo de un período de tiempo prolongado (Leyva et al., 2018; Acosta et al., 2011).

Se revisaron algunas experiencias in vitro como las realizadas en hojas mediante la organogénesis (Ferreira et al., 2011), micropropagación por segmentos nodales según García-Aguila et al., (2012); Echenique & Mollo (2020); Rivero et al., (2001); Ramírez et al., (2002). Con lo expuesto es nuestro interés propagarlo in vitro, mediante la regeneración, para ello primero es necesario conocer la respuesta del explante, por ello nos propusimos evaluar la desdiferenciación del tejido endospermico de guanábana cuando se utiliza 2,4-D y bencil amino purina (BAP).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Como material biológico utilizamos 100 semillas de guanábana obtenidas de aproximadamente 10 frutos maduros provenientes de la ciudad de Huaranchal, provincia de Otuzco, región La Libertad. El medio nutritivo que se utilizó fue el de Murashige y Skoog, (1962, MS), suplementado con sacarosa (3%) y agar-agar (3%); el pH varió entre 5.5 – 6.5. Extraído el endospermo e introducido en secciones longitudinales (Fig. 1a), un primer tratamiento fue con 2,4-D (1 ppm) y después de 10 días en oscuridad, el explante fue trasladado a un segundo tratamiento que tenía BAP a 10 ppm y adecuado con un fotoperiodo de 16:8. Se evaluó el desarrollo del tejido a los 30 días, observando cortes histológicos al micrótopo. Para ello los explantes, primero, fueron fijados en solución AFA (40% de formaldehído, 10% de ácido acético glacial y 50% etanol) y luego fueron tratadas con una serie de alcoholes que varió del 30 % al 100% para finalmente ser embebidas en parafilm. Los cortes transversales se hicieron con un micrótopo (el grosor y el ángulo de la cuchilla fue de 7µm y 11° respectivamente) y para la coloración se utilizó cristal violeta. Las observaciones microscópicas fueron fotografiadas con ayuda de un microscopio Olympus que tenía acoplado una cámara digital. Se registró el peso fresco del explante y el nuevo tejido formado (meristemoides). Los pesos se procesaron aplicando promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, utilizando para ello el programa InfoStat con  $p < 0.05$ .

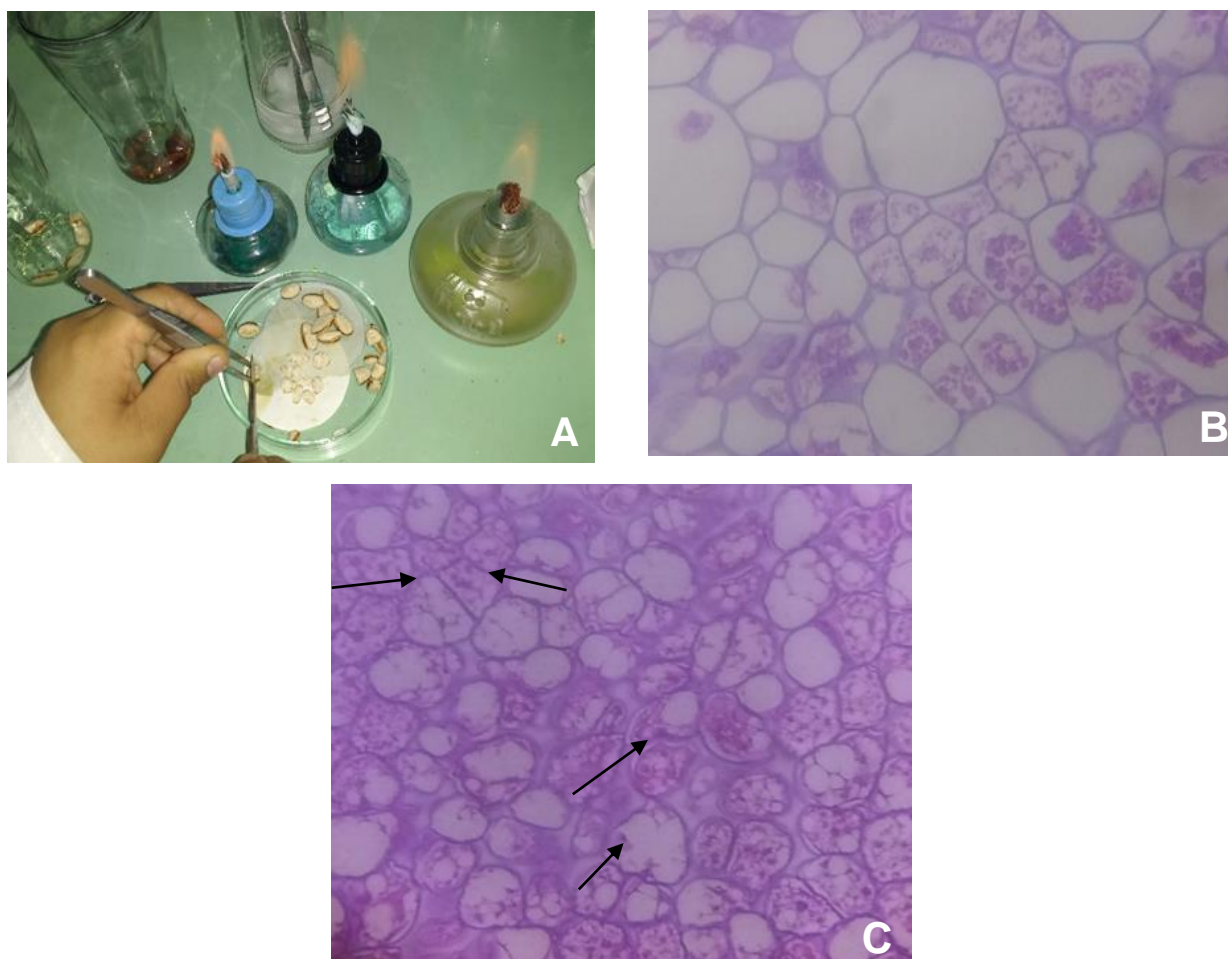
## RESULTADOS

En la Tabla 1 apreciamos los valores promedios de los pesos del endospermo de “guanábana” en fresco, antes y después del tratamiento. No hay diferencias significativas en los tejidos porque no se observaron callos y el proceso de división celular recién comenzaba según se observa en Fig. 1.

**Tabla 1.** Valores promedios de los pesos del endospermo de *Annona muricata* "guanábana", antes y después del tratamiento con 2,4-D y BAP

	P <sub>x</sub>	P <sub>y</sub>
Promedio	0,05979	0,04431
DE	0,01464	0,01092
CV	24,5	24,7

P<sub>x</sub>= peso fresco de endospermo    P<sub>y</sub>= peso fresco después de tratamientos



**Fig. 1.** A. Obtención de los endospermos de semillas de guanábana, B. Células normales del endospermo, C. Células en división del endospermo. Corte histológico, coloreado con cristal violeta (B y C).

En la figura 1A observamos microscópicamente un corte histológico del tejido endospermico la cual presenta células grandes poliédricas con citoplasma denso en la cual está la materia orgánica almacenada (carbohidratos, proteínas y aceites), según Solís-Fuentes et al., (2010), en la Fig. 1C se resalta el crecimiento del tejido meristemático con células pequeñas, citoplasma extendido en toda la célula y en división (flechas). El tratamiento con 10 mg/L de BAP estimuló desarrollo del tejido meristemático y se generaron a partir de los quince días de estar expuestos en BAP.

## DISCUSIÓN

Los cambios en los tejidos se deben a la adquisición de características celulares similares a las de las células meristemáticas y al desarrollo de una morfología de células diferenciadas. Estos

cambios en la morfología celular han sido tomados como evidencia del proceso de desdiferenciación. Por otro lado, estos cambios en la estructura celular no necesariamente equivalen a un regreso a un estado fundamentalmente embrionario o a una etapa de desarrollo temprana en el linaje usual de la célula (Rueda, 2019).

Se debe considerar además que la concentración endógena de auxinas en el explante es de gran importancia, así explantes con altos niveles endógenos de auxinas muestran una mayor inducción generalmente a la respuesta in vitro. Y si le agregamos más auxina, en este caso el 2,4-D debemos esperar cambios que inicien la desdiferenciación (Finet & Jaillais, 2012). Actualmente el 2,4-D es la auxina más utilizada por su fuerte actividad, contribuye no sólo a la eficiencia de la embriogénesis somática, sino que también induce estrés y esto es lo que promueve la desdiferenciación. Se ha corroborado que la mitad de los factores de transcripción están relacionados con el estrés que ocasiona el 2,4-D durante la iniciación de la embriogénesis somática en *Arabidopsis thaliana* (Fhér, 2015; Normanly, 2010; Tanaka et al., 2006). A estos cambios se hace necesario la combinación con una citocinina para romper el balance hormonal endógeno y estimular una mayor formación de callo (Urrea et al., 2001). En este proceso, las células se vuelven competentes para responder ante cualquier estímulo organogénico o embriogénico (Olmos et al., 2004).

La experiencia demostró que el tejido es competente a los cambios (desdiferenciación), por lo cual se hace necesario ensayar con más combinaciones de auxina-citoquinina.

## CONCLUSIONES

Se demostró que con los reguladores del crecimiento utilizados se puede desdiferenciar el tejido endospermico de guanábana y además las células, de este tipo de explante, son competentes para el cambio de ruta, ya establecidas, en estas células somáticas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, R.; A. Peña & R. Castro.** 2011. Evaluación de medios de cultivo para la producción in vitro de *Annona muricata* mediante la técnica de microinjertación seriada. *Acta Agronómica*, 60(2): 140-146.
- Azcón-Bieto, J. & M. Talón.** 2013. Fundamentos de Fisiología Vegetal. 3ra ed.. Barcelona.McGraw Hill Interamericana. 669 p.
- Cabra, J.; M. Sánchez & A. Schoonhoven.** 2002. Taller Guanábana para Colombia y el mundo. *Revista Optimización de la cadena productiva*, 1: 7-16.
- Echenique, M. & G. Mollo.** 2020. Establecimiento in vitro de segmentos nodales de guanabana (*Annona muricata* L.) en la Estación Experimental Sapecho – Bolivia. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, La Paz, 7(1): 62-68.
- Fehér, A.** 2015. Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(4): 385–402.
- Ferreira, de S. J.; R. Paiva; L. Muñiz; F. Nepamucino & G. Silveira.** 2011. Organogenesis in three species of *Annona* (Annonaceae). *Sitientibus Série Ciências Biológicas*, 11(1): 82-88.
- Finet, C. & Y. Jaillais.** 2012. Auxology: when auxin meets plant evo-devo. *Dev Biol* 369:19-31.
- Garay-Arroyo, A.; M. de la Paz Sánchez; B. García-Ponce; E. Álvarez-Buylla & C. Gutiérrez.** 2014. La Homeostasis de las Auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *REB Rev Educ bioquímica* 33(1):13–22. Available from: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-19952014000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952014000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

- García-Águila, L., J. Álvarez; Y. Alvarado-Capó; M. González; M. La O; D. Mirabal & C. Romero.** 2012. Establecimiento in vitro de segmentos nodales de plantas jóvenes de *Annona muricata*. *Biología Vegetal* 12(4): 229 – 234.
- Guapacha, A.** 2006. Monografía sobre el aprovechamiento de compuestos activos de la Guanábana (*Annona muricata* L.). *Universidad Tecnológica de Pereira*. 3-10.
- Leiva, S.; G. Gayoso & L. Chang.** 2018. *Annona muricata* L. “guanábana” (Annonaceae), una fruta utilizada como alimento en el Perú prehispánico. *Arnaldoa* 25(1): 127-140. doi: <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.251.25108>.
- Murashige, T & F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 472-497.
- Normanly, J.** 2010. Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001594:1-19.
- Olmos, S.; L. Graciela & E. Galdeano.** 2004. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. En: *Biología y mejoramiento vegetal*, eds. Viviana Echenique, Clara Rubinstein y Luis Mroginski, pp. 161-172. Buenos Aires: Ediciones INTA.
- Ramírez- Villalobos, M.; A. Urdaneta & S. León.** 2002. Establecimiento in vitro de explantes adultos del guanábano (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. *Rev. Fac. Agron.*, 19: 48-55.
- Rivero, M.; V. Ramírez & L. De Sierralta.** 2001. Tipo de explante en el establecimiento in vitro del guanábano (*Annona muricata* L.). *Rev. Fac. Agron.*, 18: 258-265.
- Rueda, N.** 2019. Actualización de los conceptos asociados con la regeneración celular en plantas. Monografía. Universidad Santander. Colombia. 87 p. <https://repositorio.udes.edu.co/bitstream/001/1063/1/Actualizaci%C3%B3n%20de%20los%20conceptos%20asociados%20con%20la%20regeneraci%C3%B3n%20celular%20en%20plantas.pdf>
- Scheres, B.** 2011. The role of position and lineage plant cell identity. *Plant Physiol.* 135, 112-114
- Solís-Fuentes, J.; C. Amador-Hernández; M. Hernández-Medel & M. Durán-de-Bazúa.** 2010. Caracterización fisicoquímica y comportamiento térmico del aceite de “almendra” de guanábana (*Annona muricata*, L). *Grasas Aceites* 61: 58-66.
- Taiz, L. & E. Zeiger.** 2002. *Plant Physiology*. 3rd ed. Sunderland. Sianuer Associates. USA. 675 p.
- Tanaka, H.; P. Dhonukshe; P. Brewer & J. Friml.** 2006. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell Mol Life Sci* 63:2738-2754.
- Urrea, A.; N. Veitía & I. Bermúdez.** 2001. Selección in vitro de callos de papa (*Solanum tuberosum*) var. Diacol Capiro empleando el filtrado crudo de *Phytophthora infestans* (mont) De Bary. *Actualidades Biológicas*, 23 (74): 5-13.
- Vanneste, S. & J. Friml.** 2009. Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136:1005- 1016.
- Yong, J.; L. Ge; Y. Ng & S. Tan.** 2009. The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water. *Molecules* 14(12):5144–64.

