

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



Universidad de El Salvador
Hacia la libertad por la cultura

TRABAJO DE GRADUACIÓN:
**ESTABLECIMIENTO ASÉPTICO Y EVALUACIÓN DE MEDIOS
DE INDUCCIÓN A CALLO VEGETAL EN EXPLANTES
FOLIARES DE *Annona diversifolia* Safford (FAM.
ANNONACEAE).**

PRESENTADO POR:
HUILHUINIC ANGEL ORANTES RAMOS

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, MAYO DE 2018

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



Universidad de El Salvador

Hacia la libertad por la cultura

TRABAJO DE GRADUACIÓN:
**ESTABLECIMIENTO ASÉPTICO Y EVALUACIÓN DE MEDIOS
DE INDUCCIÓN A CALLO VEGETAL EN EXPLANTES
FOLIARES DE *Annona diversifolia* Safford (FAM.
ANNONACEAE).**

PRESENTADO POR:
HUILHUINIC ANGEL ORANTES RAMOS

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

DOCENTE ASESORA:
M.Sc. YANIRA ELIZABETH LÓPEZ VENTURA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



Universidad de El Salvador
Hacia la libertad por la cultura

TRABAJO DE GRADUACIÓN:
**ESTABLECIMIENTO ASÉPTICO Y EVALUACIÓN DE MEDIOS
DE INDUCCIÓN A CALLO VEGETAL EN EXPLANTES
FOLIARES DE *Annona diversifolia* Safford (FAM.
ANNONACEAE).**

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

TRIBUNAL CALIFICADOR:

M.Sc. Yanira Elizabeth López Ventura _____

M.Sc. Zoila Virginia Guerrero Mendoza _____

Licda. Ana Maricela Mejía Villacorta _____

CIUDAD UNIVERSITARIA, MAYO DE 2018

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

RECTOR

M.Sc. ROGER ARMANDO ARIAS

VICERRECTOR ACADÉMICO

Dr. MANUEL DE JESÚS JOYA

VICERRECTOR ADMINISTRATIVO

Ing. NELSON BERNABÉ GRANADOS

SECRETARIO GENERAL

MSc. CRISTOBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ

FISCAL GENERAL

Lic. RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARÍN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DECANO

Lic. MAURICIO HERNAN LOVO CORDOVA

VICEDECANO

Lic. CARLOS QUINTANILLA

DIRECTORA ESCUELA DE BIOLOGÍA

M. Sc. ANA MARTHA ZETINO CALDERON

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme lo necesario para lograr el objetivo. A mi pareja Jennifer por ayudarme durante todo el desarrollo de la investigación, especialmente durante el desarrollo de las prácticas de laboratorio, y darme ánimos cuando pensé que no podría seguir avanzando. A mi hermano Tonatiuh, por ayudarme en muchos aspectos de la investigación desde la perspectiva teórica y práctica. A mis padres por permitirme estudiar la carrera que me encanta y apoyarme desde antes que yo naciera. A mi asesora por la paciencia y ayuda durante el desarrollo del trabajo. A la Dra. Ivette, por permitirme renacer en el ámbito académico como un buen estudiante. Al Dr. Ayala, por mostrarme el camino que relaciona la química con la biología. A los docentes de la Escuela de Biología por darme las bases para investigar y estudiar debidamente.

Al personal del Centro Nacional de Investigaciones Científicas de El Salvador (CICES), quienes estuvieron muy atentos durante el desarrollo de las etapas de la investigación. A mis compañeros de la Universidad, por brindarme ideas y perspectivas diferentes sobre la investigación, especialmente a aquellos que me ayudaron durante las etapas de laboratorio. A mis compañeros y estudiantes del Programa Jóvenes Talento, a quienes aprecio mucho y con quienes desarrollamos juntos nuestra inteligencia y experiencia, compitiendo con otros países en el ámbito de las ciencias biológicas. Al personal del Centro Interactivo para el Aprendizaje de Ciencias, Sede La Libertad (CIAC-LL), a quienes les debo muchos permisos, y desarrollo de expresión. A los docentes del Plan Nacional de Formación que han recibido clases conmigo, por todo su apoyo y ánimos que elevaron muchísimo mi autoestima.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 2. OBJETIVOS..... | 5 |
| 2.1. General..... | 5 |
| 2.2. Específicos..... | 5 |
| 3. MARCO TEÓRICO..... | 6 |
| 3.1. Antecedentes..... | 6 |
| 3.2. Origen y distribución de <i>Annona diversifolia</i> | 7 |
| 3.3. Descripción de la planta..... | 8 |
| 3.4. Fotografías de <i>Annona diversifolia</i> | 10 |
| 3.5. Importancia alimenticia..... | 11 |
| 3.6. Manejo post cosecha..... | 12 |
| 3.7. Importancia ecológica..... | 14 |
| 3.8. Importancia médica..... | 15 |
| 3.9. Importancia económica..... | 17 |
| 3.10. Propagación..... | 19 |
| 3.11. Micropropagación <i>In vitro</i> | 20 |
| 3.11.1. Desinfección superficial..... | 21 |
| 3.11.2. Medios de cultivo..... | 23 |
| 3.11.3. Condiciones o características químicas y físicas del cultivo <i>In vitro</i> | 25 |
| 3.11.4. Callogénesis..... | 25 |
| 3.11.5. Oxidación de explantes..... | 28 |
| 3.11.6. Diseños experimentales en cultivo <i>In vitro</i> | 30 |
| 3.11.7. Análisis de datos en experimentos de cultivo <i>In vitro</i> | 32 |
| 4. HIPOTESIS..... | 33 |
| 5. METODOLOGÍA..... | 34 |
| 5.1. Ubicación..... | 34 |

| | |
|--|----|
| 5.2. Obtención de material vegetativo de <i>Annona diversifolia</i> | 35 |
| 5.3. Tipo de explante y condiciones de incubación..... | 35 |
| 5.4. Etapa de desinfección superficial..... | 36 |
| 5.5. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal..... | 39 |
| 5.6. Diseño experimental y análisis de datos..... | 42 |
| 6. RESULTADOS..... | 44 |
| 6.1. Etapa de desinfección superficial..... | 44 |
| 6.1.1. Contaminación de explantes..... | 44 |
| 6.1.2. Supervivencia de explantes..... | 47 |
| 6.2. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción al callo vegetal..... | 49 |
| 6.2.1. Contaminación de explantes..... | 49 |
| 6.2.2. Supervivencia de explantes..... | 52 |
| 7. DISCUSIÓN..... | 56 |
| 7.1. Etapa de desinfección superficial..... | 56 |
| 7.1.2. Contaminación de explantes..... | 56 |
| 7.1.3. Supervivencia de explantes..... | 59 |
| 7.2. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción al callo vegetal..... | 62 |
| 7.2.1. Contaminación de explantes..... | 63 |
| 7.2.2. Supervivencia de explantes..... | 63 |
| 8. CONCLUSIONES..... | 66 |
| 9. RECOMENDACIONES..... | 67 |
| 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 69 |
| 11. ANEXOS..... | 75 |

ÍNDICE DE TABLAS

| N° TABLA | TÍTULO | PÁG. |
|-----------------|--|-------------|
| 1 | Regiones anoneras por departamento..... | 8 |
| 2 | Comparación de aspectos bromatológicos entre el fruto maduro de <i>A. diversifolia</i> y las cuatro frutas dulces más consumidas en el mundo durante el período 1970-2010..... | 11 |
| 3 | Productos elaborados a partir del fruto maduro de <i>A. diversifolia</i> | 13 |
| 4 | Registro de ingresos por exportación del fruto de anona (<i>A. diversifolia</i>) en el período 2001-2014..... | 18 |
| 5 | Tratamientos de desinfección superficial implementados en explantes foliares de <i>A. diversifolia</i> | 38 |
| 6 | Composición de tratamientos de inducción al callo vegetal, aplicados a explantes foliares de <i>A. diversifolia</i> | 41 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| N° FIGURA | TÍTULO | PÁG. |
|------------------|---|-------------|
| 1 | Ejemplar de <i>A. diversifolia</i> | 10 |
| 2 | Semillas de <i>A. diversifolia</i> | 10 |
| 3 | Sistema radical típico de plantas de la familia annonaceae..... | 10 |
| 4 | Hojas de <i>A. diversifolia</i> | 10 |
| 5 | Flores de <i>A. diversifolia</i> | 10 |
| 6 | Frutos de <i>A. diversifolia</i> | 10 |
| 7 | Distribución de ejemplares de la familia Annonaceae a nivel mundial..... | 14 |
| 8 | Ubicación de la Universidad de El Salvador, Sede Central..... | 34 |
| 9 | Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal, frascos de vidrio con medio de cultivo..... | 36 |
| 10 | Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal, cajas de plástico utilizadas para incubar..... | 36 |
| 11 | Etapa de desinfección superficial, siembra en condiciones asépticas..... | 37 |
| 12 | Etapa de desinfección superficial, desinfección de explantes en condiciones asépticas..... | 37 |
| 13 | Explante foliar de <i>A. diversifolia</i> , luego de aplicar tratamiento 1..... | 39 |
| 14 | Etiqueta de frascos con explantes foliares de <i>A. diversifolia</i> , luego de aplicar tratamiento 5..... | 39 |

| N° FIGURA | TÍTULO | PÁG. |
|------------------|---|-------------|
| 15 | Generando condiciones asépticas al interior de cámara de flujo laminar..... | 40 |
| 16 | Inmersión de explantes foliares de <i>A. diversifolia</i> en soluciones desinfectantes, bajo condiciones asépticas..... | 40 |
| 17 | Delimitación de explantes foliares de <i>A. diversifolia</i> | 40 |
| 18 | Siembra de los explantes foliares de <i>A. diversifolia</i> en tratamientos de inducción a callo vegetal..... | 40 |
| 19 | Desarrollo de la fase experimental..... | 42 |
| 20 | Efecto de los tratamientos de desinfección superficial sobre promedio de contaminación en explantes foliares de <i>A. diversifolia</i> despues de cuatro semanas..... | 45 |
| 21 | Efecto de los tratamientos de desinfección superficial sobre porcentaje de contaminación en explantes foliares de <i>A. diversifolia</i> despues de cuatro semanas..... | 46 |
| 22 | Explante foliar de <i>A. diversifolia</i> sembrado en MS basal al 50%, luego de aplicar tratamiento 1, después de una semana de siembra..... | 46 |
| 23 | Explante foliar de <i>A. diversifolia</i> sembrado en MS basal al 50%, luego de aplicar tratamiento 4, repetición C, después de tres semanas de siembra..... | 46 |
| 24 | Explante foliar de <i>A. diversifolia</i> sembrado en MS basal al 50%, luego de aplicar tratamiento 3, después de una semana de siembra..... | 47 |

| N° FIGURA | TÍTULO | PÁG. |
|------------------|--|-------------|
| 25 | Explante foliar de <i>A. diversifolia</i> sembrado en MS basal al 50%, luego de aplicar tratamiento 6, después de una semana de siembra..... | 47 |
| 26 | Efecto de los tratamientos de desinfección superficial sobre el promedio de sobrevivencia de explantes foliares de <i>A. diversifolia</i> | 48 |
| 27 | Efecto de los tratamientos de desinfección superficial sobre el porcentaje de sobrevivencia de explantes foliares de <i>A. diversifolia</i> | 48 |
| 28 | Efecto de los tratamientos de inducción a callo vegetal sobre el promedio de contaminación de explantes foliares de <i>A. diversifolia</i> despues de cinco semanas..... | 50 |
| 29 | Efecto de los tratamientos de inducción a callo vegetal sobre el porcentaje de contaminación de explantes foliares de <i>A. diversifolia</i> despues de cinco semanas..... | 51 |
| 30 | Explante foliar de <i>A. diversifolia</i> sembrado en tratamiento de inducción a, repetición 1, después de una semana de siembra..... | 52 |
| 31 | Explante foliar de <i>A. diversifolia</i> sembrado en tratamiento de inducción a, repetición 1, después de una semana de siembra..... | 52 |
| 32 | Efecto de los tratamientos de inducción a callo vegetal sobre el promedio de sobrevivencia de explantes foliares de <i>A. diversifolia</i> | 53 |

| N° FIGURA | TÍTULO | PÁG. |
|------------------|--|-------------|
| 33 | Efecto de los tratamientos de inducción a callo vegetal sobre el porcentaje de sobrevivencia de explantes foliares de <i>A. diversifolia</i> | 53 |
| 34 | Explante foliar de <i>A. diversifolia</i> sembrado en tratamiento de inducción b, repetición 1, después de dos semanas de siembra..... | 55 |
| 35 | Explante foliar de <i>A. diversifolia</i> sembrado en tratamiento de inducción b, repetición 1, después de tres semanas de siembra..... | 55 |
| 36 | Explante foliar de <i>A. diversifolia</i> sembrado en tratamiento de inducción d, repetición 1, después de cuatro semanas de siembra..... | 55 |
| 37 | Explante foliar de <i>A. diversifolia</i> sembrado en tratamiento de inducción f, repetición 1, después de cuatro semanas de siembra..... | 55 |

RESUMEN

El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo *In vitro* de Células y Tejidos Vegetales de la Escuela de Biología, y en el laboratorio del Centro Nacional de Investigaciones Científicas de El Salvador (CICES). Ambos laboratorios, ubicados en la ciudad universitaria “Dr. Fabio Castillo Figueroa”, Campus Central.

La investigación se dividió en dos etapas. La primera consistió en determinar un método de desinfección superficial para el establecimiento *In vitro* de explantes foliares procedentes de ejemplares adultos de *Annona diversifolia* (*A. diversifolia*). La segunda etapa consistió en evaluar los efectos de diferentes medios de inducción al callo vegetal en los explantes anteriormente descritos. Los ejemplares utilizados proceden del vivero CAPOSA S.A. de C.V., ubicado en San Salvador.

Durante la primera etapa de la investigación, se evaluó el efecto de seis tratamientos de desinfección superficial basados en trabajos de diferentes autores. Las siembras se realizaron en medios MS basal (1962) a la mitad de concentración salina, solidificado con phytigel (2.2 g/L), y con un pH ajustado a 5.8. Durante la segunda etapa de la investigación, se evaluó el efecto de seis medios de cultivo de inducción al callo vegetal propuestos por diferentes autores.

La incubación en ambas etapas fue en condiciones de oscuridad, al interior de una caja de plástico. La temperatura fue de 24-26°C y la toma de datos durante los periodos de incubación fue semanal. Dicho período, durante la primera etapa, fue de cuatro semanas, y en la segunda fue de cinco semanas.

Los resultados de la primera etapa, indican que el tratamiento de desinfección superficial más adecuado fue el que consistió de hipoclorito de sodio (5.25%) por 5 min; seguido de 3 enjuagues con agua destilada esterilizada; una inmersión en Ridomil (20 g/L) por 10 min; y una inmersión en Tetraciclina (0.6 g/L) por 10 min), ya que permitió obtener mayor promedio de explantes sobrevivientes. Al implementar el tratamiento propuesto por Rincón *et al* (1999) junto a los antioxidantes descritos por Landaverde *et al* 2002 y Dipré *et al* (2012), se obtuvo mayor sobrevivencia. Durante la segunda etapa, se evidenció que los medios de cultivo para inducción al callo vegetal, no promovieron la callogénesis; sin embargo, sus efectos alteraron los promedios de oxidación de los explantes. El tratamiento que presentó mayor cantidad de explantes sobrevivientes fue el que estuvo constituido por: medio B5 al 100% (Gamborg *et al* 1968) + 2,4-D (2 mg/ L) + Kin (1 mg/L). Este medio fue descrito por Gómez *et al* (2006) para inducir callogénesis en tejido foliar de *Eucalyptus globulus*.

1. INTRODUCCIÓN

Los cultivos *In vitro* de tejidos vegetales fueron desarrollados a partir de la investigación de botánicos y fisiólogos vegetales desde 1950. Su estudio debe su origen a la investigación sobre hormonas que controlan el crecimiento y desarrollo vegetal. Actualmente se ha convertido en una herramienta que facilita producción en masa de plantas. Esto es especialmente útil en plantas cuya reproducción sexual es dificultosa como es el caso de la *A. diversifolia*.

Para generar un establecimiento aséptico de tejidos vegetales, se debe desarrollar al menos una investigación que evalúe el efecto de diversos tratamientos de desinfección superficial aplicados al explante de interés. Luego de determinar el tratamiento óptimo, se debe investigar la repuesta del explante ante condiciones que estimulen la regeneración vegetativa *In vitro* (Ramírez *et al* 2002; Landaverde *et al* 2002).

La familia Annonaceae tiene cerca de 800 especies leñosas. Su género más importante es *Annona*, con al menos 60 especies (González *et al* 1976). Este género presenta algunas especies de gran valor comercial debido principalmente a su importancia médica y alimenticia. La corteza de muchas de estas especies es aromática, estimulante y astringente; las semillas pueden actuar como vermícidas, o bien, como insecticidas; las hojas frescas contienen propiedades analgésicas por lo que muchas de estas especies han sido utilizadas en la medicina tradicional (Gutiérrez 2016). El polvo seco de algunas frutas no maduras y semilla se utiliza para combatir ectoparásitos (Pandey & Barve 2011). Entre ellos, las semillas de *Annona cherimola* (*A. Cherimola*) se utilizan contra parásitos externos del humano (Kelly *et al* 2000).

En cuanto a la importancia alimenticia, los frutos más aceptados de las plantas del género *Annona* a nivel internacional son la *Annona muricata* (*A. muricata*) y la chirimoya (*A. cherimola*) (Castro 2007); sin embargo, a nivel nacional, el fruto de la anona (*A. diversifolia*) tiene mayor valor comercial que el resto de plantas de su género debido a su excelente sabor y colores llamativos (Cruz 2002).

En El Salvador, existen nueve especies del género *Annona*, las cuales se encuentran en estado silvestre y semicultivada. *A. diversifolia* es la especie de mayor interés comercial en El Salvador y soporta condiciones de suelos arcillosos y pedregosos, requiriendo clima cálido de 24-37°C. Su tasa de germinación es variable de 30-80% y con un almacenamiento de previo 7 a 12 meses, tiene un 90% de germinación. Además los métodos de propagación por injertos requieren el desarrollo de los patrones, obteniendo ingresos por cosecha a partir del tercer año (Irigoyen 2004). De acuerdo a López *et al* (2014), actualmente no existen estudios para el establecimiento *In vitro* de *A. diversifolia*, sino únicamente de las especies del género *Annona* con mayor importancia comercial internacional; sin embargo, muchas plantas de este género tienen posibilidades de establecerse y multiplicarse *In vitro* (Ramírez *et al* 2002). La presente investigación es un estudio preliminar del establecimiento *In vitro* de *A. diversifolia*.

2. OBJETIVOS

2.1. General:

Inducir la formación de callos vegetales de *A. diversifolia*, a partir de tejido foliar como explante.

2.2. Específicos:

- Establecer un método de desinfección de hojas para iniciar el cultivo *In vitro* de *A. diversifolia*.
- Determinar un medio de cultivo óptimo para inducir la callogénesis de *A. diversifolia*, a partir de tejido foliar como explante.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Antecedentes

El estudio y generación de técnicas de micropropagación *In vitro* se remonta hace más de 120 años. Según Hurtado & Merino (1987), los primeros registros sobre la elaboración y experimentación con medios de cultivo para tejidos vegetales, son los de J. Von Sachs y W. Knop en 1860. Las técnicas de micropropagación contemporáneas, superan las técnicas tradicionales de propagación vegetativa en plantas leñosas, logrando resultados exitosos en la regeneración de bosques (Celestino *et al* 2005; Moncaleán 2015).

Los primeros registros de investigaciones sobre establecimiento *In vitro* en plantas del género *Annona*, datan de George & Sherrington (1984); Tazzari *et al* (1990); y Encina (1992) en explantes de *A. cherimola*. Luego, los aportes de Bejoy & Hariharan (1992); y Lemos & Blake (1996) contribuyeron al desarrollo de técnicas de micropropagación en *A. muricata* y *Annona squamosa* (*A. squamosa*). Esto incluyó la implementación de un exitoso protocolo para el establecimiento *In vitro* de explantes adultos en *A. muricata*, el cual utilizó enjuagues por largos períodos de tiempo y la adición de carbón activado en el medio de cultivo, reduciendo la oxidación (Lemos & Blake 1996).

No existen estudios sobre el establecimiento *In vitro* para *A. diversifolia*; sin embargo, según López *et al* (2014), se comenzarán a aplicar nuevas técnicas de establecimiento y micropropagación a las siguientes especies de Annonaceae: *Annona senegalensis*, *A. scleroderma*, *A. montana*, *A. reticulata*, *A. glabra*, *A. diversifolia* y *Rollinia sp.* Algunos autores, han descrito tratamintos de desinfección superficial, cuyos

resultados muestran eficiencia en el establecimiento aséptico de explantes adultos (Landaverde *et al* 2004; Ramírez *et al* 2002; Rincón *et al* 1999; Ramírez *et al* 1999). Además existen medios de cultivo eficientes para la inducción al callo vegetal, aplicables a plantas leñosas utilizando múltiples explantes (Vacca *et al* 2015; Rodríguez *et al* 2014; Landaverde *et al* 2002; Gómez *et al* 2006).

En El Salvador no se han realizado investigaciones sobre el establecimiento *In vitro* o callogénesis en especies del género *Annona*; sin embargo, si las hay para otras especies de importancia comercial como el café (Landaverde *et al* 2002; Mejía 2004). Los estudios realizados a plantas de la familia Annonaceae, se encuentran encaminados principalmente a caracterización morfoagronómica y estudios bromatológicos de sus frutos (Cruz & Deras 2000). Otras investigaciones son principalmente bibliográficas con el objetivo de incrementar la producción agrícola de frutos y plantas (Cruz 2002; Irigoyen 2004).

A nivel internacional, se han realizado investigaciones para verificar las condiciones óptimas en cultivos intensivos de *A. diversifolia* (Otero *et al* 2006); aplicaciones médicas de esta especie (González *et al* 2006; González *et al* 2012); y estudios de incorporación a la dieta de frutos procedentes de plantas Annonaceae, tal es el caso de la *A. Cherimola* (Cruz & Deras 2000).

3.2. Origen y distribución de *Annona diversifolia*

A. diversifolia (Fig. 1) es originaria de Mesoamérica. Esta planta se desarrolla en laderas de montañas y distribuye naturalmente en las cordilleras del pacífico de México, Guatemala y El Salvador con una altitud aproximada de 600 msnm (Orellana 2005; Cruz & Deras 2000). Esta

especie se introdujo en países del caribe, Colombia, Filipinas y Estados Unidos (Orellana 2005; Cruz & Deras 2000). Según Orellana (2005), en El Salvador, *A. diversifolia* se distribuye en zonas caracterizadas por poseer sus ejemplares silvestres o bien, cultivados en patios y áreas marginales, sin manejo técnico. Estas zonas se denominan franjas o regiones anoneras y se distribuyen por departamento (tabla 1).

Tabla 1. Regiones anoneras por departamento (Orellana 2005).

| Departamentos | Municipios abarcados por la región |
|-----------------------|--|
| Ahuachapán | Tacuba-Cara Sucia-Guaymango |
| Santa Ana-La Libertad | El Congo-El Resbaladero-El Conacaste-Ciudad Arce-San Pablo Tacachico |
| La Libertad | Mizata-Chiltiupán-La Libertad-Asuchío |
| Usulután | Berlín-Mercedes Umaña-Estanzuelas |
| San Salvador | Tonacatepeque-Guazapa |
| Cabañas | Ilobasco-Jutiapa-El Guayabo |

3.3. Descripción de la planta

La familia Annonaceae tiene cerca de 800 especies leñosas. Su género más importante es *Annona*, con al menos 60 especies (González *et al* 1976). *Annona diversifolia* es una planta con semillas cilíndricas (Fig. 2) cuya longitud oscila de 1.5-2.5 cm y su diámetro es aproximadamente de 1.0 cm. Estas semillas se encuentran rodeadas por una cubierta seminal dura color café brillante. Dicha cubierta se origina a partir de los tegumentos de rudimento seminal. En algunos casos estas semillas pueden presentar hasta dos cubiertas seminales. La cubierta externa se llama testa, y la interna endopleura (Orellana 2005).

Su sistema radical (Fig. 3) es holorrizo y su raíz es pivotante, volviéndola resistente a suelos pedregosos. Su tallo es pequeño (4 a 8 m), de crecimiento erecto. Sus hojas (Fig. 4) son ovaladas, glabras con pecíolo, coriáceas y de color verde grisáceo. Las flores (Fig. 5) tienen 3 pétalos externos de 2 a 5 cm de largo y 3 internos, el color de sus antófilas va desde rosado a rojo púrpura. Su fruto es estacional y tiene aproximadamente 12 cm de longitud con pulpa blanca (Fig. 6) o rojiza (Orellana 2005).

3.4. Fotografías de *Annona diversifolia*



Figura 1. Ejemplar de *A. diversifolia*.



Figura 2. Semillas de *A. diversifolia*.



Figura 3. Sistema radical típico de plantas de la familia annonaceae. La raíz pertenece a una planta joven de *A. muricata*. Foto: Instituto Brasileiro de Florestas.



Figura 4. Hojas de *A. diversifolia*.



Figura 5. Flores de *A. diversifolia*. Foto: Irigoyen (2004).



Figura 6. Frutos de *A. diversifolia*. Foto: Irigoyen (2004).

3.5. Importancia alimenticia

A. diversifolia es la especie que produce el fruto comestible más fino y exquisito por su sabor sobre el resto de plantas de su género (Cruz 2002). Su fruto maduro tiene gran importancia nutricional, puesto que en algunos aspectos obtenidos a partir de su análisis bromatológico (tabla 2), supera a algunos de los cuatro frutos dulces más consumidos en el mundo durante el período 1970-2010 (anexo 1), como se detalla a continuación.

Tabla 2. Comparación de aspectos bromatológicos entre el fruto maduro de *A. diversifolia* y las cuatro frutas dulces más consumidas en el mundo durante el período 1970-2010.

| SP \ AS | % H | % P | % G | % C | % FC | Autor |
|---|--------|-------|-------|-------|-------|---|
| Banano (<i>Musa paradisiaca</i>) | 7.1% | 3.3% | 2.7% | 4.7% | 14.5% | Juárez-García y col., 2006, Citados por Aguilar 2008. |
| Melón (<i>Curcumis melo</i>) | 92.4% | 0.6% | 0% | 0.40% | 1% | Moreiras <i>et al</i> /2013. |
| Manzana (<i>Malus domestica</i> Borkh Var. Golden delicious) | 84.93% | 0.22% | 0.10% | 0.33% | 9.40% | Escobar <i>et al</i> /2015. |
| Naranja (<i>Citrus cinensis</i> Var. Bahia) | 83.60% | 1.4% | 0.33% | 1.05% | 3.30% | Morillas & Delgado 2012. |
| Anona (<i>Annona diversifolia</i>) | 79.6% | 1.31% | 0.01% | 1.26% | 0.97% | Cruz & Deras 2000 |

Abreviaturas, tabla 2. AS = Aspectos bromatológicos; SP = Especie; % H = Porcentaje de humedad; % P = Porcentaje de proteínas; % G = Porcentaje de grasa % C = Porcentaje de cenizas; % FC = Porcentaje de fibra cruda.

Con respecto a los estudios bromatológicos (tabla 2), el contenido protéico de la pulpa de *A. diversifolia* supera al del melón (Moreiras *et al* 2013) y al de la manzana variedad Golden delicious (Escobar *et al* 2015), dos de las frutas más consumidas del mundo durante el período 1970-2010 (Del Greco 2010). Su contenido de grasas es inferior a tres de las cuatro frutas más consumidas en el mundo, siendo inferior únicamente el del melón. El porcentaje de cenizas indica la cantidad de minerales presentes (ORT 2009), por tanto la pulpa de *A. diversifolia* solamente es superada por el banano en este aspecto. Además esta especie contiene la menor cantidad de fibra cruda, lo cual indica la presencia de pocos carbohidratos no digeribles (ORT 2009).

El fruto maduro de *A. diversifolia*, se consume principalmente en fresco (Irigoyen 2004; Orellana 2005); Sin embargo, es de carácter estacional y su cosecha ocurre durante el período agosto-septiembre. Además su fruto naturalmente se apertura durante la maduración, dejando expuesto un segmento de la pulpa (Fig. 6). Debido a estos factores, se han generado dos procesos para conservar los frutos.

3.6. Manejo post cosecha

El primer método de conservación consiste en colocar los frutos maduros sobre papel cortado para protegerlos de magullamientos y ventilarlos simultáneamente. El fruto se sumerge en una solución clorada para eliminar hongos y bacterias que pueden encontrarse en la pulpa expuesta naturalmente al ambiente durante la maduración. Posteriormente el fruto se almacena a temperatura ambiente y se prolonga su vida útil hasta 10 días (Irigoyen 2004).

El segundo método para conservar el fruto es lavarlo con una solución clorada y luego retirar la cáscara. Seguidamente el fruto se sumerge 10 min en una solución de Bisulfito de Sodio o Metasulfito de Sodio (0.45 ml/L), para estabilizar el color y reducir la oxidación. Posteriormente, la fruta se empaca en bolsas plásticas y se coloca en refrigeración a una temperatura de 7-10° C (Irigoyen 2004).

El fruto maduro de *A. diversifolia*, es de exquisito sabor y su consumo principal es en fresco (Cruz 2002; Irigoyen 2004; Orellana 2005), tiene un gran potencial para procesamiento agroindustrial (Orellana 2005; Irigoyen 2004). Debido a ello se ejecutan pruebas para generar productos alimenticios a partir de dicho fruto (Irigoyen 2004). Algunas pruebas dieron origen a nuevos productos alimenticios elaborados a partir de *A. diversifolia* (tabla 3).

Tabla 3. Productos elaborados a partir del fruto maduro de *A. diversifolia* (Orellana 2005; Irigoyen 2004).

| Nombre del producto | Período de conservación y temperatura. | Ingredientes |
|------------------------------|--|--|
| Pulpa de Anona esterilizada. | 1-2 años a temperatura ambiente. | Pulpa colada, Sacarosa y Gelatina sin sabor. |
| Yogurt. | Desconocido. | Pulpa de Anona esterilizada. |
| Paleta. | Desconocido. | Pulpa de Anona esterilizada. |
| Sorbete. | Desconocido. | Pulpa de Anona esterilizada. |
| Mermelada de Anona. | 1- 2 años a temperatura ambiente. | Pulpa, sacarosa, gelatina sin sabor y ácido cítrico. |

La importancia nutricional del fruto de *A. diversifolia* resalta al compararse con algunas de las frutas más consumidas del mundo (tabla 2). Además, cabe destacar la existencia de métodos para conservación de su fruto fresco y la generación de nuevos productos alimenticios (Irigoyen 2004; Orellana 2005). Estos factores, junto a los bajos requerimientos agronómicos de la planta, son de suma importancia como incentivo para potenciar su cultivo y producción.

3.7. Importancia ecológica

Algunas especies del género *Annona*, tales como *A. muricata* y *A. diversifolia*, son de significativa importancia en la conservación y restauración de los ecosistemas (González 2013). El gran número de especies y taxas en la familia Annonaceae, y sus consecuentes dificultades para la clasificación, no permiten detallar la variedad en cuanto a flores, frutos y morfología del polen, hábitat, preferencias de hábitat y aspectos de la polinización. Esta variabilidad contribuye a explicar su aparente capacidad para ocupar un amplio rango de nichos ecológicos. Según González (2013), estudios en el Amazonas han permitido afirmar que la familia Annonaceae está entre las cinco familias de plantas más importantes en términos de diversidad y abundancia de especies (Fig. 7).



Figura 7. Distribución de ejemplares de la familia Annonaceae a nivel mundial (González 2013).

En El Salvador, algunas especies del género *Annona*, tales como: *A. reticulata*, *A. purpurea*, *A. cherimola*, *A. squamasa*, *A. glabra* y *A. holosericea*, se encuentran en peligro de extinción. Con ello también se encuentran en peligro características importantes que pueden ser aprovechadas para la preservación de estas especies de alto valor genético y cultural. Por diversas situaciones los recursos fitogenéticos están en peligro de extinción, debido a la falta de atención y la importancia acerca de la forma de incrementarlos y conservarlos, a tal grado de formar parte importante de los programas de investigación y como fuente de material genético, para trabajos de selección y propagación vegetativa (Cruz & Deras 2000).

3.8. Importancia médica

Los tejidos y órganos de algunas plantas del género *Annona*, presentan distintas propiedades biológicas; la corteza de muchas de estas especies es aromática, estimulante y astringente; las semillas pueden actuar como vermícidas, o bien como insecticidas; las hojas frescas contienen propiedades analgésicas por lo que muchas de estas especies han sido utilizadas en la medicina tradicional (Gutiérrez *et al* 2016).

El fruto de algunas plantas del género *Annona* es considerado beneficioso para trastornos cardíacos, el hipertiroidismo de la diabetes y cáncer. La raíz es considerada un purgante drástico. La infusión de sus hojas en algunas especies, se consideran eficaces en caso de prolapso anal en niños, las hojas machacadas son olfateadas en caso de histeria y desmayos, también se aplican en úlceras y heridas. Los frutos maduros de esta planta se aplican a tumores malignos para acelerar la supuración. El polvo seco de algunas frutas no maduras y semilla se utiliza para combatir ectoparásitos (Pandey & Barve 2011). Entre ellos, las semillas de *A.*

cherimola se utilizan contra parásitos externos del humano (Kelly *et al* 2000). El polvo de algunas semillas, se utiliza como veneno de pescado y como medicamento para combatir infecciones en heridas del ganado (Pandey & Barve 2011).

Las plantas del género *Annona* presentan alcaloides como metabolitos secundarios. Entre ellos se encuentra la liriodenina uno de los más abundantes en *A. lutescens*. Este metabolito participa en el metabolismo del nitrógeno así como en la defensa contra hongos fitopatógenos. En este rubro, los extractos acuosos de *A. lutescens* también han mostrado actividad antibacteriana contra bacterias Gramnegativas como *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Shigella flexneri* y el Grampositivo *Staphylococcus aureus*, todas causantes de infecciones gastrointestinales (Gutiérrez 2016). Los flavonoides pueden estar presentes o ausentes como metabolitos; cuando están presentes, se encuentran en forma de quercetina con propiedades analgésicas y antiagregantes (Gutiérrez 2016).

Tradicionalmente, se le han atribuido a extractos de *A. diversifolia*, propiedades anticonvulsivas. Esto fue puesto a prueba por González *et al* (2006). En dicha investigación se demostró que los extractos de *A. diversifolia*, reducen la gravedad de convulsiones inducidas en ratones, reforzando y justificando su empleo ante la epilepsia. Además los extractos etanólicos y acuosos de tallos y hojas de *A. muricata*, *A. diversifolia* y *A. lutescens*, presentan actividad larvicida tiempo dependiente, sobre larvas de *Anastrepha ludens* (González *et al* 2012).

3.9. Importancia económica

La principal causa de la importancia económica en plantas del género *Annona* son sus frutos dulces comestibles. Los más aceptados a nivel internacional son los de guanaba (*A. muricata*) y chirimoya (*A. cherimola*) (Castro 2007); sin embargo, en El Salvador, el fruto de la anona (*A. diversifolia*) tiene mayor aceptación, debido a su excelente sabor y colores llamativos. Por ello, tiene mayor valor comercial a nivel local que el resto de plantas de su género y permite ingresos adecuados al productor, ya que su precio oscila entre 0.60 y 1.15 USD (Cruz 2002).

A pesar de su importancia comercial, los cultivos de *A. diversifolia*, se encuentran a nivel de traspatio dispersos en el país, o bien, aglomerados en áreas denominadas “Zonas productoras de anona” (Cruz 2002), “Zonas anoneras” (Irigoyen 2004) o “Regiones anoneras” (Orellana 2005) como se muestra en la tabla 1. Aunque no se aplique un manejo técnico de los cultivos, estas áreas son las responsables de la mayor parte de la producción a nivel nacional (Cruz 2002; Irigoyen 2004).

El fruto de *A. diversifolia* posee un mercado estacional alto a nivel nacional. Los valores más altos se alcanzan en los meses previos (julio) y posteriores (octubre), a la cosecha que ocurre entre agosto y septiembre. A nivel internacional existen limitantes que dificultan la exportación del fruto fresco, debido a la presencia de mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) en frutos aperturados (Orellana 2005; Irigoyen 2004); sin embargo, de acuerdo al Centro de Trámites de Importaciones y Exportaciones de El Salvador (CIEX), el fruto de la anona, se ha exportado a Guatemala, Canadá y Estados Unidos (Tabla 4).

Tabla 4. Registro de ingresos por exportación del fruto de anona (*A. diversifolia*) en el período 2001-2014, (CIEX 2018).

| Nº. | Año | Codigo Arancelario | Nombre Producto | País Destino | Peso Neto Kgs. | Valor Fob USD |
|------------|------------|---------------------------|------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
| 1 | 2001 | 08109020 | ANONAS FRESCAS | GUATEMALA | 3,000.00 | 400.00 |
| 2 | 2005 | 08109020 | ANONAS FRESCAS | CANADA | 137.70 | 199.00 |
| 3 | 2010 | 08109020 | ANONAS FRESCAS | CANADA | 1.81 | 12.00 |
| 4 | 2012 | 08109020 | ANONAS FRESCAS | ESTADOS UNIDOS | 22.27 | 149.98 |
| 5 | 2014 | 08109020 | ANONAS FRESCAS | CANADA | 46.00 | 90.00 |
| | Sum. | | | | 3,207.78 | 850.98 |

De acuerdo a la tabla 4, se han obtenido ingresos de 850.98 USD por exportación de fruto de anona en el período 2001-2014. Las limitantes de exportación generalmente se superan con la ayuda de tratamientos sanitarios y de conservación como los mencionados por Irigoyen (2004). A pesar de estos esfuerzos, el fruto de la anona es considerado un cultivo nostálgico, puesto que es consumido principalmente por salvadoreños residentes en los países de destino de exportación; sin embargo, a pesar de los bajos ingresos por exportación, algunos documentos indican que a partir del tercer año de siembra es posible obtener ingresos de 120.52 USD por manzana cultivada al realizar una adecuada inversión inicial (Anexo 2).

Actualmente no se cuenta con cifras precisas sobre los ingresos obtenidos a partir del consumo local del fruto de *A. diversifolia*, o de los productos derivados del mismo (Irigoyen 2004). Además, como se observa en la tabla 4, la exportación del fruto de anona es descontinuada y su último registro data del año 2014 (CIEX 2018). Probablemente, esto se

deba a la ausencia de un manejo sistematizado para su producción y comercio (Cruz 2002; Irigoyen 2004; Orellana 2005). Debido al gran potencial de producción con manejo técnico que presenta *A. diversifolia* y a la existencia de zonas productoras (tabla 1), su cultivo es impulsado por el Programa Nacional de Frutales de El Salvador desde el año 2004 (Irigoyen 2004).

Para impulsar la producción de *A. diversifolia*, el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA), produjo el “Boletín Anona”. Este documento contiene un cuadro detallado donde se indica que los costos de producción durante el año de establecimiento de 625 plantas injertadas de *A. diversifolia* sobre *A. muricata*, es de 1449.94 USD (Cruz 2002). La obtención de plantas injertadas por unidad es de 1.14 USD, generando un total de 712.15 USD (anexo 2). Irigoyen (2004), indica que a partir del tercer año de producción, se obtienen mayor cantidad de ingresos que costos de producción.

3.10. Propagación

Tradicionalmente, *A. diversifolia* se propaga de forma sexual y asexual. La primera es por semilla y la segunda es por vía vegetativa. La propagación por semilla es el método más utilizado históricamente por los agricultores; sin embargo, las semillas suelen tener bajo porcentaje de germinación, y su inicio de cosecha se realiza tardíamente. Las plantas obtenidas por semilla presentan gran variabilidad genética y suelen tener mayor altura.

El método de propagación más recomendable para *A. diversifolia* según Cruz (2002), es el injerto sobre *A. muricata*, reduciendo el tiempo de espera por germinación. Este requiere ejemplares desarrollados que

cargarán con el injerto y varetas que son los segmentos de la planta los cuales se trasladarán al patrón (Cruz & Deras 2002). Debido a ello, es un método difícil y retardado (Ramírez *et al* 2002).

3.11. Micropropagación *In vitro*.

La propagación *In vitro* consiste en cultivar fragmentos de una planta, bajo condiciones de esterilidad, en presencia de nutrientes y fitohormonas. El cultivo ofrece la multiplicación vegetativa, la cual es el único procedimiento para reproducir a gran escala los genotipos sobresalientes, cuya reproducción sexual es dificultosa (Landaverde *et al* 2002). Los métodos de micropropagación de tejidos *In vitro*, se han aplicado a algunas Annonaceae como la *A. cherimola*, y por ende, se pueden aplicar con éxito a otras *Annona spp.* para superar las dificultades de reproducirlas en forma tradicional. La mayoría de los protocolos de micropropagación y regeneración en plantas del género *Annona*, se desarrollaron utilizando el cultivar Fino de Jete en España (López *et al* 2014).

Entre los primeros estudios de micropropagación en plantas del género *Annona*, destaca el desarrollo de un método de micropropagación con material juvenil en *A. cherimola* (Encina, 1992; Encina *et al* 1994). Luego se utilizaron estos resultados y métodos como referencia de un sistema de micropropagación exitoso para material adulto de chirimoya seleccionado por sus rasgos agronómicos de élite (Padilla 1997). Este método de micropropagación mostró un 50% de enraizamiento y una excelente tasa de aclimatación (Padilla & Encina, 2004). Otros intentos de propagar *in vitro* *A. cherimola* fallaron debido a la contaminación sistémica permanente de los cultivos (Tazzari *et al* 1990). Después del primer éxito con la micropropagación de *A. cherimola* y luego de los estudios de Bejoy

& Hariharan (1992), Lemos & Blake (1996), se registraron resultados similares micropropagando otras dos especies importantes de Annonaceae: *A. muricata* y *A. squamosa*. Por lo que se sabe, solo estas tres especies del género *Annona* se micropropagaron con éxito antes de 1996 (Rasai *et al* 1995), junto con el híbrido *A. cherimola* x *A. squamosa* (Nair *et al* 1984). Actualmente, no existen estudios sobre el establecimiento *In vitro* para *A. diversifolia*; sin embargo, según López *et al* (2014), se comenzarán a aplicar nuevas técnicas de establecimiento y micropropagación a las siguientes especies de Annonaceae: *Annona senegalensis*, *A. scleroderma*, *A. montana*, *A. reticulata*, *A. glabra*, *A. diversifolia* y *Rollinia sp.*

3.11.1. Desinfección superficial

Las plantas normalmente se encuentran contaminadas por microorganismos que no son patógenos bajo condiciones normales; sin embargo, cuando el tejido o el órgano es cultivado *In vitro* el crecimiento de los microorganismos limita el desarrollo de las células. Los que trabajan con tejidos adultos de plantas que crecen en el campo, señalan que el porcentaje de contaminación es alto, haciéndose necesaria la estricta desinfección superficial. Evidencias indican que se dan diferentes respuestas entre especies, tipo de órgano o tejido y aún dentro de una rama, ya que los ápices son más fácilmente dañados por los desinfectantes que las yemas axilares. Diversos productos químicos pueden emplearse para la desinfección, pero deben usarse preferentemente aquellos que sean fácilmente removidos, para no provocar daños al tejido (Landaverde *et al* 2002).

Para la desinfección del material vegetativo, se utiliza comúnmente Hipoclorito de Calcio (del 6 -12 %) o Hipoclorito de Sodio (del 2- 5%). Las sales de Calcio son menos tóxicas, sin embargo, el Hipoclorito de Calcio

reacciona con el CO₂ de la atmósfera, por lo tanto es químicamente inestable (Landaverde *et al* 2002). Ramírez *et al* 2002 experimentó los efectos de diversas concentraciones de hipoclorito de sodio en ápices y segmentos nodales de *A. muricata*, obteniendo explantes viables, incluso en altas concentraciones.

También se recomienda la adición de un detergente (2 a 4 gotas de tween - 20) para romper la tensión superficial y permitir que el explante esté en mejor contacto con el químico. Es difícil obtener una desinfección superficial que no dañe el tejido. En realidad cuando el explante es muy sensible como los brotes apicales. Se recomienda mejor no usar desinfectante. No se puede generalizar sobre el tipo de desinfectante o la concentración de este a utilizar debido a que cada especie y tipo de explante es un caso particular lo que resalta la importancia de experimentar con diferentes métodos utilizando un número reducido de explantes (Landaverde *et al* 2002).

La concentración más liviana de desinfectante que sea efectiva contra la contaminación de determinado explante es la más adecuada, si es más diluida que esta, no se eliminarán los microorganismos y si es más concentrada se dañará el explante. Para facilitar la limpieza del explante es importante considerar que los brotes nuevos sean más limpios que los viejos, materiales que crecen en el invernadero son más limpios que los que se encuentran en el campo. Entre más pequeño sea el explante a introducir al cultivo, menor será la contaminación a eliminar, sin embargo, el tamaño debe ser tal que facilite el establecimiento del tejido. Otra recomendación que se ha formulado es el uso de antioxidantes si se observa coloración café en el explante durante el proceso de desinfección (Landaverde *et al* 2002).

Algunos autores, han descrito tratamintos de desinfección superficial, cuyos resultados muestran eficacia en el establecimiento aséptico de explantes adultos (Landaverde *et al* 2004; Ramírez *et al* 2002; Rincón *et al* 1999; Ramírez *et al* 1999). En el caso de Lemos & Blake (1996), al utilizar enjuagues por largos períodos de tiempo en explantes adultos de *A. muricata*, junto a carbón activado en el medio, se anularon los efectos de la oxidación.

3.11.2. Medios de cultivo

Es el medio que contiene todos los materiales para el desarrollo del tejido vegetal. Se han descrito diversos medios de cultivo que lograron regeneraciones, utilizando explantes jóvenes y viejos procedentes de plantas bajo condiciones de invernadero, o bien, de campo (Bejoy & Hartman 1992; Lemos & Blake 1996; Landaverde *et al* 2002; Gómez *et al* 2006; Ramírez 2002; Rodríguez *et al* 2014; Vacca *et al* 2015). Según Hurtado & Merino (1997), el medio de cultivo debe contener los siguientes ingredientes:

- **Mezcla de sales inorgánicas:** Sustancias iónicas inorgánicas de importancia principalmente para mantener el equilibrio hídrico del tejido. De acuerdo a Karp (2011), muchas sales se implementan junto a cofactores de proteínas y coenzimas para su funcionamiento correcto.

- **Compuestos orgánicos:** Carbohidratos, fitohormonas o reguladores de crecimiento, y vitaminas. Entre los carbohidratos más comunes utilizados, se encuentra la sucrosa, sacarosa y galactosa. De acuerdo a Solomon *et al* (2013), las fitohormonas pueden ser auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno, ácido abscísico y brasinosteroides. Entre las más comunes en cultivo *In vitro* de tejidos y células vegetales, se encuentra el picloram, el

ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), bencilaminopurina (BAP), ácido naftalenoacético (ANA), y kinetina (Kin). Entre las vitaminas más comunes, se encuentra el inositol, tiamina, pyridoxina, ácido nicotínico y el aminoácido glicina.

- **Complejos naturales:** Preparaciones de composición definida con origen natural. Entre estas destaca el agua de coco, jugo de tomate, jugo de naranja y extracto de malta.

- **Materiales inertes de soporte:** Gelificantes y sustancias que brindan consistencia. Entre estas, se encuentra el agar-agar y el phytagel.

El medio más utilizado es el MS basal (Murashige & Skoog 1962), el cual ha sufrido variaciones de acuerdo a la técnica de regeneración a utilizar. Otro medio comunmente utilizado es el B5 (Gamborg *et al* 1968). Las variaciones en composición, ocurren principalmente en la composición de fitohormonas, surgiendo medios modificados para callogénesis y embriogénesis de algunas especies (Bejoy & Hartman 1992; Hurtado & Merino 1997; Ramírez 2002; Rodríguez 2014).

La composición del medio de cultivo tiene efectos significativos en la respuesta del explante. En algunos casos, los medios de cultivo pueden reducir o anular los efectos de la oxidación. Esto ocurre principalmente debido a la adición de sustancias adsorbentes al medio, la reducción en la concentración de sales y azúcares, o bien, la implementación de medios líquidos. Además, ciertas combinaciones de hormonas son efectivas para generar la respuesta regenerativa esperada (Azofeifa 2009).

3.11.3. Condiciones o características químicas y físicas del cultivo *In vitro*

Las plantas jóvenes o en desarrollo con tejidos meristemáticos y crecimiento vegetativo vigoroso son la mejor fuente de explantes. Aunque en una misma planta se puede encontrar tanto crecimiento juvenil como adulto, el primero se caracteriza por ser activo y por la ausencia de estructuras reproductoras, mientras que el adulto es más lento y presenta estructuras sexuales para la reproducción de la planta. Además, las plantas adultas pueden haber acumulado mayor cantidad de microorganismos en sus tejidos y contener menos células meristemáticas, necesarias para establecer los cultivos *In vitro* (Calva & Ríos 1999; Seabrook 1980; Street 1977, citados por Calva & Pérez 2005).

Para combatir los microorganismos del explante, y a su vez protegerlo de los efectos oxidativos, se han descrito una gran serie de estrategias que incluyen trabajar en condiciones asépticas bajo una cámara de flujo laminar, utilizar antimicóticos y antibióticos en la desinfección (Rincón *et al* 1999; Ramírez *et al* 1999), suministrar sustancias adsorbentes al medio de cultivo y utilizar enjuagues por largos períodos de tiempo (Azofeifa 2009).

3.11.4. Callogénesis

Las respuestas del explante dependen en gran medida de las condiciones de incubación. Debido a ello, deben controlarse las condiciones ambientales de luz, temperatura y humedad. Además se requiere un control de las condiciones fisicoquímicas y nutricionales del medio de cultivo (Landaverde *et al* 2002). La incubación del explante en condiciones de oscuridad y niveles variables de reguladores de crecimiento,

suelen conducir al desarrollo de una masa celular amorfa denominada callo vegetal (Vacca *et al* 2015; Rodríguez *et al* 2014; Landaverde *et al* 2002; Gómez *et al* 2006). Este proceso de transformación del explante, es denominado callogénesis.

Existen una serie de medios cuya composición promueve la callogénesis. Estos son denominados medios de inducción al callo vegetal. Se han descrito una serie de medios de inducción, los cuales han sido muy eficientes en diversas especies. De acuerdo a los resultados de Vacca *et al* (2015), suplementar el medio MS basal con diferentes concentraciones de picloram, promueve la callogénesis de *Pterogyne nitens* Tul en un período inferior a dos meses. En otros casos, se suplementa el medio MS basal con diversas concentraciones de 2,4-D y BAP, o bien, ANA, reportando eficiencia en la callogénesis de *Ugni molinae* (Rodríguez *et al* 2014). En otras investigaciones, se implementan medios de composición compleja que alternan extractos naturales y hormonas para inducir callogénesis en especies de importancia comercial (Landaverde *et al* 2002).

Otros medios de inducción, utilizan como base el medio B5, obteniendo resultados exitosos, en especies como *Eucalyptus globulus* (Gómez *et al* 2006). La importancia de la callogénesis radica en la diferenciación de sus células, implementando otras clases de medios de cultivo. Los callos obtenidos deben subcultivarse para su mantenimiento y propagación, o bien, inducir su diferenciación para formar órganos (organogénesis), embriones (embriogénesis) o pasarse a un medio de cultivo líquido para obtener células y pequeños agregados en suspensión (Calva & Pérez 2005).

En las plantas silvestres, el tejido calloso se forma naturalmente en respuesta a daños mecánicos sufridos por influencia del ambiente, o por invasión de tejidos por ciertos microorganismos; sin embargo, en cultivos *in vitro*, el tejido calloso se induce mediante la influencia de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal adicionadas al medio de cultivo, combinadas con requerimientos ambientales específicos. Entre estos, destaca la incubación en condiciones de oscuridad y un intervalo de temperatura establecido (Yeoman 1970, Tempé y Schell 1985, Crozier *et al.* 2000, citados por Calva & Pérez 2005).

El éxito en la inducción y establecimiento de cultivos de callos, y en consecuencia la subsiguiente regeneración a tejidos y plantas, son función de la calidad del explante usado, que a su vez depende de la planta madre o del tejido del que se inició el cultivo. De cualquier forma, para el inicio de los cultivos se prefieren utilizar tejidos que contengan células meristemáticas (Calva & Pérez 2005).

La variabilidad genética entre y dentro de los cultivos se refleja primero en la morfología de los callos y posteriormente en los cultivos en suspensión o sistemas de cultivo con los que se trabaje. Algunos autores (Wareing & Al Chalabi 1985; Petiard & Bariaud 1985, citados por Calva & Pérez 2005) opinan que este fenómeno puede ser consecuencia de la alta frecuencia de división celular que tiene lugar en los cultivos *in vitro*. Otros indican que también pueden ser causadas por alteraciones o cambios de factores epigenéticos originados por la forma en que se establecen los cultivos. Así, hay estudios donde se observa que callos establecidos a partir de diferentes órganos pero de una misma planta varían en apariencia y presentan características únicas (Petiard y Bariaud 1985, Holden *et al.* 1988, citados por Calva & Pérez 2005). Pero más aún, callos procedentes de un mismo explante también difieren en su morfología y

características intrínsecas como color, friabilidad, dureza, tamaño, grado de diferenciación (Calva & Pérez 2005).

3.11.5. Oxidación de explantes

La oxidación en células y tejidos vegetales es un proceso natural que suele ocurrir como respuesta a lesiones de órganos vegetales. Esta se visualiza como un ennegrecimiento progresivo que se origina en la zona lesionada. En experimentos de regeneración *In vitro* en plantas del género *Annona* se ha observado el efecto del ennegrecimiento, por la presencia de dos clases de enzimas: fenoles y polifenoxidasas comunes en el metabolismo de oxidación que pueden limitar el enraizamiento, y disminuir la viabilidad de los explantes y su respuesta morfogénica (Velásquez *et al* 2004). Para comprender la fisiología de la oxidación en células y tejidos vegetales, es necesario abordar la temática bajo la perspectiva bioquímica.

La oxidación es el proceso a través del cual un átomo, o grupo de átomos, pierde uno o más electrones (se oxida) y los cede a otro (el cual se considera reducido). En sustratos orgánicos, la oxidación y reducción involucra la participación de átomos de carbono enlazados en forma covalente a otros átomos (Karp 2011). La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Azofeifa 2009).

La mayoría de radicales libres se producen a partir del metabolismo del oxígeno y se les llama especies de oxígeno reactivo o intermediarios de oxígeno reactivo (ROS). Estas son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico y típicamente resultan de la excitación del O_2 para formar el oxígeno singulete (1O_2) o también mediante la transferencia de uno, dos o tres electrones al O_2 para formar el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el radical hidroxilo ($HO\cdot$) respectivamente. En las células vegetales, éstos se forman constantemente durante las reacciones redox de varias vías metabólicas; la incompleta reducción del oxígeno o de la oxidación del agua en el cloroplasto o la mitocondria, en la cadena de transferencia de electrones tanto de la fotosíntesis como de la respiración, en la β -oxidación de los ácidos grasos, oxidación del glicolato, del NADPH, oxalato y de las xantinas (Karp 2011).

Los ROS también se pueden generar en otros organelos celulares, como los peroxisomas y los lisosomas, a consecuencia de los cortes realizados en los explantes (Karp 2011). Adicionalmente, el $O_2^{\cdot-}$ puede reaccionar con el óxido nítrico para formar su radical ($NO\cdot$). Este y otras formas oxidantes del óxido nítrico; dióxido de nitrógeno ($NO_2\cdot$), peróxido nítrico ($ONOO^-$), nitrosil catión (NO^+), etc., reciben en conjunto el nombre de especies reactivas de nitrógeno (RNS). El estrés ocasionado por ROS se le conoce como estrés oxidativo y el originado por RNS como estrés nitrosativo (Azofeifa 2009).

En condiciones normales de crecimiento la producción de ROS en la célula es baja: $240 \mu M/s$ $O_2^{\cdot-}$ y $0,5 \mu M/s$ de H_2O_2 en los cloroplastos. En situación de estrés, el nivel de $O_2^{\cdot-}$ en la célula se incrementa entre los $240-720 \mu M/s$ y entre los $5-15 \mu M/s$ de H_2O_2 en los cloroplastos. La producción de especies reactivas puede ser activada por inductores específicos (como parte del metabolismo normal de la planta) o también por mecanismos no

específicos, por ejemplo en respuesta a un tipo de estrés. Minutos después de la estimulación inicial ocurre, en respuesta, una producción elevada de especies reactivas de oxígeno (Azofeifa 2009).

La célula vegetal sometida a un estrés reacciona produciendo mayores niveles de ROS y, o RNS; los cuales generan una reacción en cascada, cuando el electrón libre se transfiere de una molécula a otra. Una de las consecuencias que trae consigo es la acción de enzimas oxidasas, frecuentemente nombradas como polifenol oxidasas (PPOs), fenolasas y tirosinasas, así como de las peroxidasas (POX). Las cuales son liberadas, sintetizadas o están presentes en ciertos sustratos y en condiciones oxidativas cuando los tejidos son lesionados o se encuentran senescentes. En muchos casos, la oxidación se ha relacionado directamente con el acúmulo de PPO y decrecimiento de putrescina, espermidina, y espermina de los tejidos. Los sustratos para estas enzimas, que pueden variar entre los diferentes tejidos, son comúnmente la tirosina o los fenoles. Estas enzimas normalmente se encuentran compartimentalizadas, por ejemplo: PPO en cloroplastos, POX en peroxisomas, o se ubican en las membranas subcelulares y los sustratos son almacenados dentro de la vacuola. La enzima y el sustrato entran en contacto cuando la célula sufre algún daño, estrés o se encuentra senescente y, generalmente, da como resultado la muerte del explante (Azofeifa 2009).

3.11.6. Diseños experimentales en cultivo *In vitro*

Las diferentes respuestas producidas por un explante en cultivo *In vitro* son debido a diferencias genéticas y ambientales. Algunas veces estos factores se encuentran fuera del control razonable del experimentador; sin embargo, el reconocimiento de estas causas de variabilidad, indica que es indispensable utilizar al menos dos unidades

experimentales tratadas similarmente para medir el error experimental. Este es la medida de variabilidad que se encuentra fuera del control del investigador. Debido a ello, es indispensable aplicar un tratamiento estadístico a una colección de datos experimentales. Esto permite realizar estimación sin sesgo del efecto de los tratamientos sobre el explante y evaluar las diferencias entre los tratamientos mediante pruebas de significancia (Izquierdo & López 1991).

Las pruebas de significancia se basan en la medida del error experimental y valoran la probabilidad de que las diferencias entre los tratamientos ocurran únicamente por efecto del azar, es decir, la parte no controlada del experimento. Existen tres principios en el diseño de un experimento sobre cultivo de tejidos vegetales: Repeticiones, aleatorización y control local. Las repeticiones proveen un estimado del error experimental y permiten una medida más precisa del efecto de los tratamientos. La naturaleza del material experimental y las condiciones físicas son el principal factor que rige el número de repeticiones en experimentos de biotecnología vegetal (Izquierdo & López 1991).

La aleatorización consiste en la asignación de los tratamientos a las unidades experimentales, de tal forma que todas tengan una oportunidad equitativa de recibir el tratamiento. El control local debe restringir la aleatorización del diseño experimental, ejecutándose bajo el “sistema de bloques”, que consiste en la asignación sistemática de repeticiones en bloques de forma que las repeticiones de cada tratamiento reciban los efectos del factor considerado. El diseño completamente al azar o aleatorizado es uno de los más utilizados en la experimentación *In vitro* (Izquierdo & López 1991).

3.11.7. Análisis de datos en experimentos de cultivo *In vitro*

Para responder las preguntas planteadas en las hipótesis, es indispensable realizar un análisis estadístico de los datos obtenidos durante el experimento. Muchos de éstos, tienen como objetivo, determinar el efecto que sobre alguna variable dependiente “Y” tienen distintos niveles de algún factor “X” (variable independiente y discreta) (Terrádez & Ángel sin año). El factor puede ser un constituyente del medio o un factor ambiental. Para determinar la relación que existe entre un tratamiento y la respuesta del explante, es indispensable realizar un análisis de varianza a partir de los datos obtenidos durante el experimento, correspondientes a la variable respuesta (Izquierdo & López 1991).

El análisis de la variancia (cuya sigla en inglés es ANOVA: ANAlisys Of VAriance) es un procedimiento creado por R. A. Fischer en 1925, que consiste en una descomposición de la variabilidad total en partes, atribuibles a causas conocidas y al azar, para terminar finalmente comparando la magnitud de las partes mediante una prueba de F de homogeneidad de variancias (Terrádez & Ángel sin año). El ANOVA se utiliza para contrastar la hipótesis nula, la cual indica que las medias de distintas poblaciones coinciden (Benítez *et al* 2002).

Al realizar el análisis de datos provenientes de distintos tratamientos, se debe poner a prueba la igualdad de medias poblacionales. Para ello, se aplica el ANOVA con una sola causa conocida de variabilidad. Este análisis se realiza en base a los siguientes valores calculados de acuerdo a los datos obtenidos: Media aritmética de los valores obtenidos (μ), la suma de cuadrados de los desvíos con respecto a la media o suma de cuadrados total (SCT). Este último es un indicador de variabilidad que permite tener una medida de la misma (Benítez *et al* 2002).

Si el tratamiento aplicado para establecimiento *In vitro* es la causa conocida de variabilidad, se debe identificar si las medias aritméticas de los datos obtenidos en los tratamientos, correspondientes a distintos valores del tipo de tratamiento, son iguales o diferentes (Benítez *et al* 2002; Izquierdo & López 1991). Mediante un test de homogeneidad de variancias (F) se puede poner a prueba la hipótesis que la variancia debida a la causa conocida A es igual a la del error experimental que en este caso particular, los tratamientos no han producido variabilidad adicional a la debida a causas desconocidas y englobadas bajo el nombre de error experimental (Benítez *et al* 2002).

4. HIPÓTESIS

- Es posible desinfectar hojas de *A. diversifolia* para iniciar su cultivo *In vitro*, utilizando diferentes combinaciones de agentes desinfectantes.
- Es posible inducir callogénesis de *A. diversifolia*, a partir de tejido foliar como explante, aplicando diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento.

5. METODOLOGÍA

5.1. Ubicación

La siembra de la etapa de desinfección superficial y las incubaciones se realizaron en el Laboratorio de Cultivo *In vitro* de Células y Tejidos Vegetales de la Escuela de Biología. Su ubicación geográfica es: 13°43'12.0"N 89°12'17.8"O. La siembra de la etapa de evaluación de medios de inducción a callo vegetal, se realizó en el laboratorio del Centro Nacional de Investigaciones Científicas de El Salvador (CICES), ubicado en el Centro de Investigación y desarrollo en Salud (CENSALUD). Su ubicación geográfica es: 13°43'04.9"N 89°12'06.7"O. Ambos laboratorios se encuentran ubicados en la ciudad universitaria “Dr. Fabio Castillo Figueroa”, Campus Central. Esta se encuentra ubicada al Final 25 Avenida Norte, San Salvador (Fig. 8).

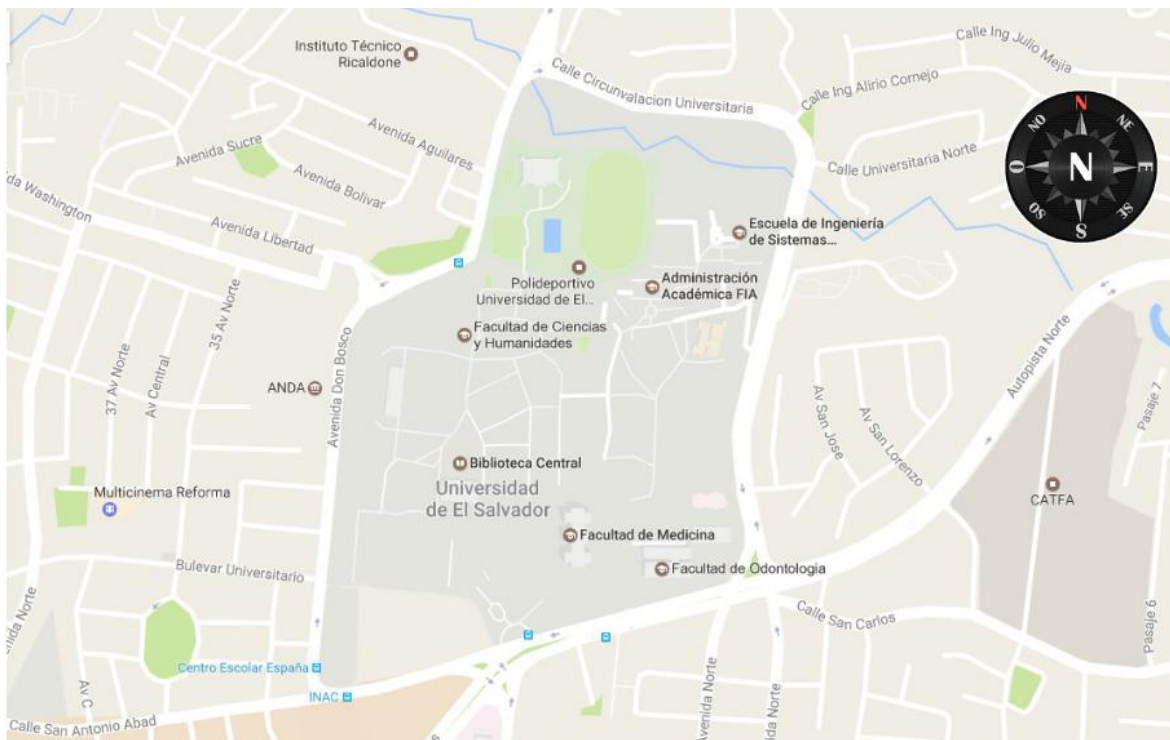


Figura. 8. Ubicación de la Universidad de El Salvador, Sede Central. Fuente: Pagina oficial UES: <https://goo.gl/paFwMv>. Visitado 13/02/2018.

5.2. Obtención de material vegetativo de *Annona diversifolia*

Se seleccionaron plantas de *A. diversifolia* de tres años de edad (consideradas adultas en este tipo de estudios), cultivadas en el vivero CAPOSA S.A. de C.V., ubicado en la ciudad de San Salvador (13°42'37.9"N 89°12'12.6"O). Las plantas fueron trasladadas al Laboratorio de Cultivo *In vitro* de Células y Tejidos Vegetales, a partir de estas plantas, se seleccionaron y cortaron hojas jóvenes, las cuales se depositaron en una solución antioxidante que contenía ascorbato (100 mg/L) + citrato (150 mg/L) hasta el momento de la aplicación del pretratamiento de desinfección superficial.

5.3. Tipo de explante y condiciones de incubación

El material vegetal utilizado en ambas etapas de la investigación consistió en segmentos de hojas de aproximadamente 1 cm², sin nervadura central, extremos, porciones basales y apicales. Cada explante, se cultivó en frascos de vidrio con un diámetro de 4.5 cm y 6.7 cm de altura, sellados con papel aluminio (Fig. 9). Dichos frascos contenían 30 ml de medio de cultivo esterilizado. Este, durante la etapa de desinfección superficial, consistió en MS basal a la mitad de concentración de sales (anexo 3), gelificado con phytigel (2.2 g/L), y con un pH ajustado a 5.8. El medio fue esterilizado en un autoclave durante 20 min con 15 lb/pulg² de presión, y a una temperatura de 121°C. La incubación fue en condiciones de oscuridad, al interior de una caja de plástico negro (Fig. 10). La temperatura dentro de la caja, fue de 24-26°C. El período de incubación y toma de datos, durante la etapa de desinfección superficial, fue de cuatro semanas. El de la etapa de evaluación de medios de inducción a callo vegetal, fue de cinco semanas.



Figura 9. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal, frascos de vidrio con medio de cultivo. UES 2017.



Figura 10. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal, cajas de plástico utilizadas para incubar. En su interior se encuentran explantes foliares de *A. diversifolia* sembrados. UES 2017.

5.4. Etapa de desinfección superficial

Se aplicó un pretratamiento de desinfección superficial a las hojas seleccionadas. Este consistió en un lavado con agua jabonosa durante 10 min, un enjuague con agua corriente durante 5 min, y una inmersión en alcohol etílico al 70% durante 10 seg. A continuación, las hojas fueron colocadas en una solución de citrato (0.5%), esterilizada hasta el momento de la aplicación del tratamiento de desinfección (Modificado de Landaverde *et al* 2002). Posteriormente, los explantes en solución, fueron llevados al interior de una cámara de flujo laminar bajo condiciones asépticas (Figs. 11 y 12). En dichas condiciones se aplicaron seis tratamientos de desinfección superficial (tabla 5) más una inmersión en citrato (0.5%) por 1 min (Dipré *et al* 2012).

Los tratamientos de desinfección superficial utilizados en la presente investigación están basados en trabajos de diferentes autores. El pretratamiento y el tratamiento **1**, son una modificación de los implementados por Landaverde *et al* (2002) y (Dipré *et al* 2012). Los tratamientos **2** y **3**, están basados en el trabajo de Ramírez *et al* (2002). El tratamiento **4**, es una modificación del utilizado por Rincón *et al* (1999). Los tratamientos **5** y **6**, son los sugeridos por Ramírez *et al* (1999).



Figura 11. Etapa de desinfección superficial, siembra en condiciones asépticas. Para contribuir a generar condiciones asépticas de siembra, se roció la cámara con etanol al 70% y se colocó un mechero de alcohol. UES 2017.



Figura 12. Etapa de desinfección superficial, desinfección de explantes en condiciones asépticas. A la izquierda se presenta la disección de la hoja previa a la siembra. A la derecha se muestran los explantes inmersos en solución desinfectante. UES 2017.

Tabla 5. Tratamientos de desinfección superficial implementados en explantes foliares de *A. diversifolia* Safford. UES 2017.

| T | Paso 1 | Paso 2 | Paso 3 | Paso 4 |
|----------|---|---|---|---|
| 1 | Inmersión en Hipoclorito de calcio (10%) por 20 min. | Inmersión en Hipoclorito de calcio (8%) por 10 min. | Inmersión en 3 enjuagues con agua destilada esterilizada. | - |
| 2 | Inmersión en Hipoclorito de sodio (1%) por 5 min. | Inmersión en 3 enjuagues con agua destilada esterilizada. | - | - |
| 3 | Inmersión en Hipoclorito de sodio (0.5%) por 10 min. | Inmersión en 3 enjuagues con agua destilada esterilizada. | - | - |
| 4 | Inmersión en Hipoclorito de sodio (5.25%) por 5 min. | Inmersión en 3 enjuagues con agua destilada esterilizada. | Inmersión en Ridomil (20 g/L) por 10 min. | Inmersión en Tetraciclina (0.6 g/L) por 10 min. |
| 5 | Inmersión en benomil (2 g/L) + tetraciclina (0.2 g/L) por 15 min. | Inmersión en etanol (70%) por 1 min. | Inmersión en 3 enjuagues con agua destilada esterilizada. | - |
| 6 | Inmersión en etanol (70%) por 1 min. | Inmersión en benomil (2 g/L) + tetraciclina (0.2 g/L) por 15 min. | Inmersión en 3 enjuagues con agua destilada esterilizada. | - |

Luego de aplicar los tratamientos de desinfección superficial y la inmersión en citrato (0.5%), se delimitaron los explantes sobre trozos de papel bond esterilizados, y se realizaron las siembras (Fig. 13). Cada frasco se rotuló (Fig. 14) con el número de tratamiento (del 1 al 6) y el número de repetición (a, b ó c). Los datos fueron tomados semanalmente en una tabla de frecuencia (anexo 4).



Figura 13. Explante foliar de *A. diversifolia*, luego de aplicar tratamiento **1** (Hipoclorito de calcio (10%) por 20 min; Hipoclorito de calcio (8%) por 10 min; tres enjuagues con agua destilada esterilizada). Este se encuentra sembrado en MS basal al 50%. Se observa tonalidad amarillenta. Etapa de desinfección superficial UES 2017.



Figura 14. Etiqueta de frascos con explantes foliares de *A. diversifolia*, luego de aplicar tratamiento **5** (benomil (2 g/L) + tetraciclina (0.2 g/L) por 15 min; etanol (70%) por 1 min; tres enjuagues con agua destilada esterilizada). Estos fueron sembrados en MS basal al 50%. Etapa de desinfección superficial. UES 2017.

5.5. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal

Luego de culminar la etapa de desinfección superficial, se seleccionó el método con mayor promedio de explantes sobrevivientes, y se procedió a aplicarlo en la siguiente etapa a explantes procedentes de plantas con las características previamente mencionadas (Figs. 15 y 16). Estos fueron sembrados bajo condiciones asépticas (Figs. 17 y 18) en seis medios de inducción a callo vegetal (tabla 6).

Los medios de cultivo de inducción al callo vegetal utilizados en la presente investigación, están basados en investigaciones de diferentes autores. Estos fueron descritos como eficientes en la generación de callos, en sus respectivos trabajos. Los medios **a** y **b** fueron los implementados por Vacca *et al* (2015) en la callogénesis de *Pterogyne nitens* Tul. Los medios **c** y **d**, fueron los utilizados por Rodríguez *et al* (2014), en la

callogénesis de *Ugni molinae*. El medio e fue el sugerido por Landaverde *et al* (2002), para generar callos a partir de tejido foliar de *Coffea arabica*. El medio f, fue el descrito por Gómez *et al* (2006), para inducir callogénesis en tejido foliar de *Eucalyptus globulus*.



Figura 15. Generando condiciones asépticas al interior de cámara de flujo laminar. Se irradió el interior de la cámara con luz UV, por 20 min. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.



Figura 16. Inmersión de explantes foliares de *A. diversifolia* en soluciones desinfectantes, bajo condiciones asépticas. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

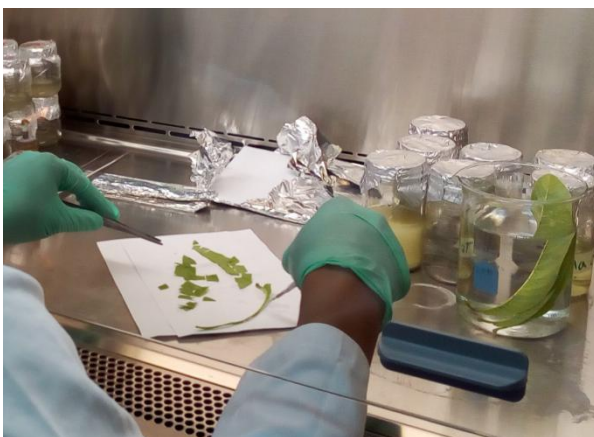


Figura 17. Delimitación de explantes foliares de *A. diversifolia*. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.



Figura 18. Siembra de los explantes foliares de *A. diversifolia* en tratamientos de inducción a callo vegetal. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

Tabla 6. Composición de tratamientos de inducción al callo vegetal, aplicados a explantes foliares de *A. diversifolia*. UES 2017.

| T | Medio de cultivo base | Suplementos adicionales | pH |
|---------------|---|-------------------------------|-----|
| a | MS basal al 100% de sus sales. | Hidrocalseina (500 mg/L). | 7.0 |
| | | Picloram (0.87 mg/L). | |
| b | MS basal al 100% de sus sales. | Hidrocalseina (500 mg/L). | 7.0 |
| | | Picloram (0.69 mg/L). | |
| c | MS basal al 100% de sus sales. | 2,4-D (1 mg/L). | 5.8 |
| | | BAP (1 mg/L). | |
| d | MS basal al 100% de sus sales. | ANA (0.5 mg/L). | 5.8 |
| e | T1B modificado (MS basal al 50% de sales, sin FeEDTA ni 2IP (anexo 5)). | Tiamina-HCl (1 mg/L). | 5.8 |
| | | Myo inositol (100 mg/L). | |
| | | Ácido nicotínico (1 mg/L). | |
| | | Pyridoxina (400 mg/L). | |
| | | Glicina (400 mg/L). | |
| | | Extracto de malta (100 mg/L). | |
| | | Hidrocalseina (0.5 mg/L). | |
| | | 2,4-D (1 mg/L). | |
| AIB (1 mg/L). | | | |
| f | Medio B5 al 100% de sus sales (anexo 3). | 2,4-D (2 mg/ L). | 5.8 |
| | | Kin (1 mg/L). | |

Cada frasco se rotuló con el literal de tratamiento (del **a** al **f**) y el número de repetición (1, 2 ó 3). Estos se colocaron al interior de una caja de plástico negro y se trasladaron al laboratorio de Cultivo *In vitro* de Células y Tejidos Vegetales, donde permanecieron en condiciones de incubación durante cinco semanas. Los datos fueron tomados semanalmente en una tabla de frecuencia (anexo 6).

5.6. Diseño experimental y análisis de datos

Se utilizó un diseño completamente al azar en ambas etapas de la investigación. Se evaluaron seis tratamientos con tres repeticiones. La unidad experimental fue un explante sembrado en un frasco de vidrio con medio de cultivo. Cada repetición estuvo conformada de diez unidades experimentales por tratamiento (Fig. 19).

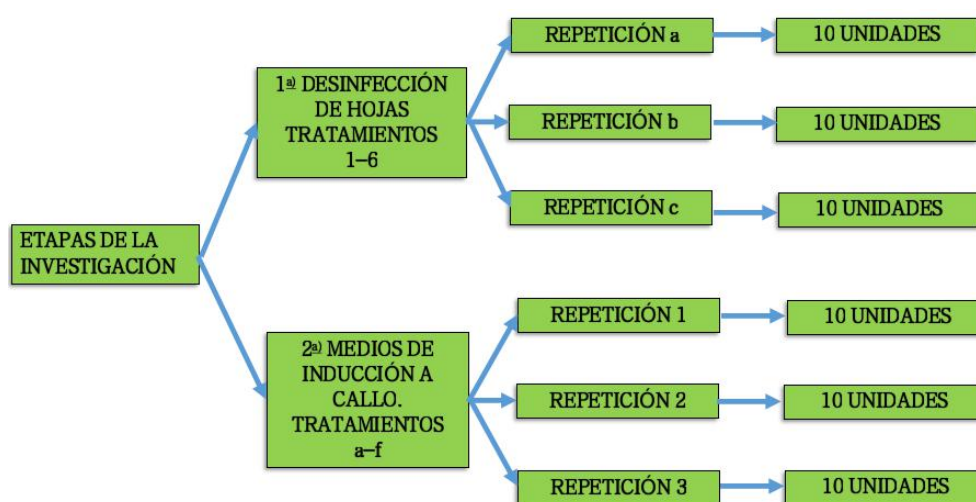


Figura 19. Desarrollo de la fase experimental. 1ª) etapa: Desinfección superficial de explantes foliares. 2ª) etapa: Inducción a callo vegetal. Cada etapa consistió en la evaluación de 6 tratamientos de 10 unidades experimentales y 3 repeticiones, haciendo un total de 180 unidades experimentales por etapa. UES 2017.

El modelo matemático utilizado fue:

$$\mu_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

μ_{ij} = Variable aleatoria respuesta. Sus valores dependieron del efecto del tratamiento:

- Explante contaminado (EC)
- Explante oxidado (EO)
- Explante sobreviviente (ES).

μ = Media experimental.

T_i = Efecto del tratamiento.

E_{ij} = Error experimental.

Los resultados se analizaron con el programa “WPS Spreadsheets a21, Linux version”, y consistió en un análisis de varianza (ANOVA) con una sola causa conocida de variabilidad. Durante ambas etapas de la investigación se analizaron los siguientes parámetros: Promedio de explantes oxidados, promedio de explantes contaminados, y promedio de explantes sobrevivientes. También se presentan los datos porcentuales de los promedios. En cada etapa se tomaron datos semanalmente. Los resultados se presentan en gráficas y figuras para comparar los efectos de los tratamientos sobre los explantes en estudio.

6. RESULTADOS

6.1. Etapa de desinfección superficial

Durante esta etapa, se evaluaron los promedios correspondientes a la contaminación, oxidación, y sobrevivencia de los explantes.

6.1.1. Contaminación de explantes

Los resultados por tratamiento fueron diferentes (Figs. 20 y 21). Sus máximos valores se obtuvieron a partir de la segunda semana, y se mantuvieron durante el resto del período de medición (anexos 7 y 8). Los promedios de contaminación, muestran diferencias estadísticamente significativas al nivel de significancia del 1% ($F > 5.064$, anexo 9).

En la figura 20, se observa que el tratamiento que obtuvo menor contaminación fue el **1** (Fig. 22); sin embargo, sus promedios de oxidación fueron los más altos. El tratamiento **4** (Fig. 23), obtuvo el segundo menor promedio de contaminación. Los promedios de contaminación más altos, se presentaron en el tratamiento **3** (Fig. 24), seguido por el **6** (Fig. 25).

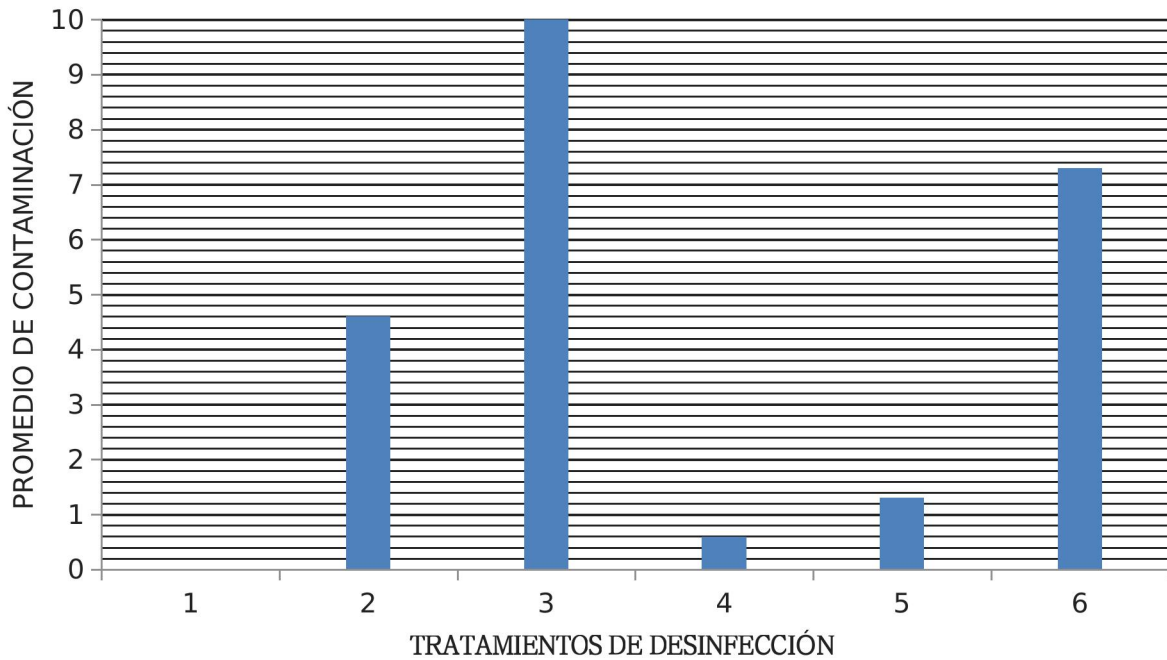


Figura 20. Efecto de los tratamientos de desinfección superficial sobre promedio de contaminación en explantes foliares de *A. diversifolia* después de cuatro semanas. Etapa de desinfección superficial. UES 2017.

Tratamientos de desinfección:

| | | |
|--|---|--|
| T1 = Hipoclorito de calcio (10%) por 20 min; Hipoclorito de calcio (8%) por 10 min; tres enjuagues con agua destilada esterilizada. | T3 = Hipoclorito de sodio (0.5%) por 10 min; tres enjuagues con agua destilada esterilizada. | T5 = benomil (2 g/L) + tetraciclina (0.2 g/L) por 15 min; etanol (70%) por 1 min; tres enjuagues con agua destilada esterilizada. |
| T2 = Hipoclorito de sodio (1%) por 5 min; tres enjuagues con agua destilada esterilizada. | T4 = Hipoclorito de sodio (5.25%) por 5 min; tres enjuagues con agua destilada esterilizada; Ridomil (20 g/L) por 10 min; Tetraciclina (0.6 g/L) por 10 min. | T6 = etanol (70%) por 1 min; benomil (2 g/L) + tetraciclina (0.2 g/L) por 15 min; tres enjuagues con agua destilada esterilizada. |

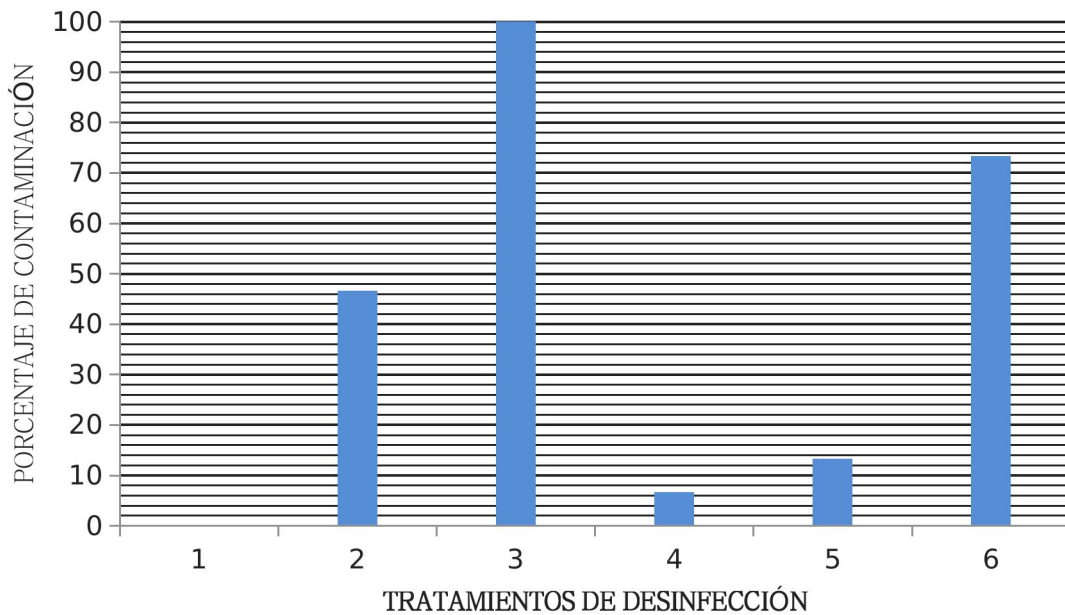


Figura 21. Efecto de los tratamientos de desinfección superficial sobre porcentaje de contaminación en explantes foliares de *A. diversifolia* después de cuatro semanas. Etapa de desinfección superficial. UES 2017.

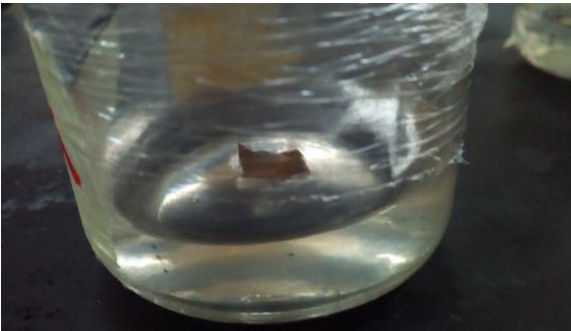


Figura 22. Explante foliar de *A. diversifolia* sembrado en MS basal al 50%, luego de aplicar tratamiento **1**, después de una semana de siembra. Se observa tejido amarillento. Etapa de desinfección superficial. UES 2017.

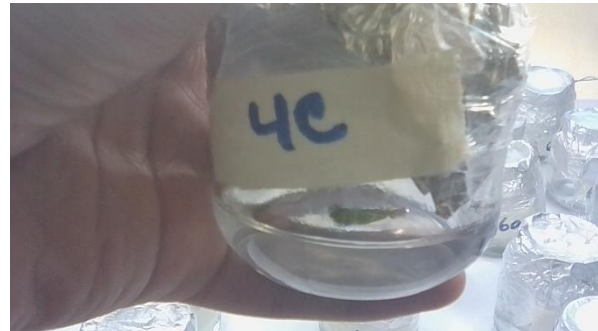


Figura 23. Explante foliar de *A. diversifolia* sembrado en MS basal al 50%, luego de aplicar tratamiento **4**, repetición **C**, después de tres semanas de siembra. Se observa tejido sin daño aparente. Etapa de desinfección superficial. UES 2017.

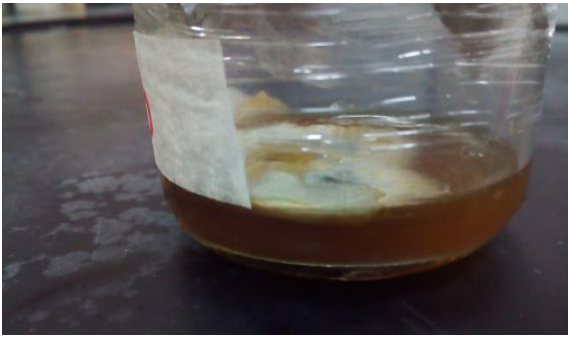


Figura 24. Explante foliar de *A. diversifolia* sembrado en MS basal al 50%, luego de aplicar tratamiento **3**, después de una semana de siembra. Se observa contaminación. Etapa de desinfección superficial. UES 2017.



Figura 25. Explante foliar de *A. diversifolia* sembrado en MS basal al 50%, luego de aplicar tratamiento **6**, después de una semana de siembra. Se observa contaminación. Etapa de desinfección superficial. UES 2017.

6.1.2. Supervivencia de explantes

Los promedios de supervivencia de los explantes fueron diversos entre los tratamientos utilizados (anexos 10 y 11). Además, sus valores mostraron una tendencia a disminuir cada semana (Figs. 26 y 27) conforme incrementaron los promedios de oxidación (anexos 12 y 13). Los valores mínimos de explantes sobrevivientes, se obtuvieron durante la cuarta semana. Los promedios de explantes sobrevivientes muestran diferencias estadísticamente significativas al nivel de significancia del 1% ($F > 5.064$) durante las cuatro semanas (anexos 14-17), al igual que los promedios de explantes oxidados (anexos 18-21).

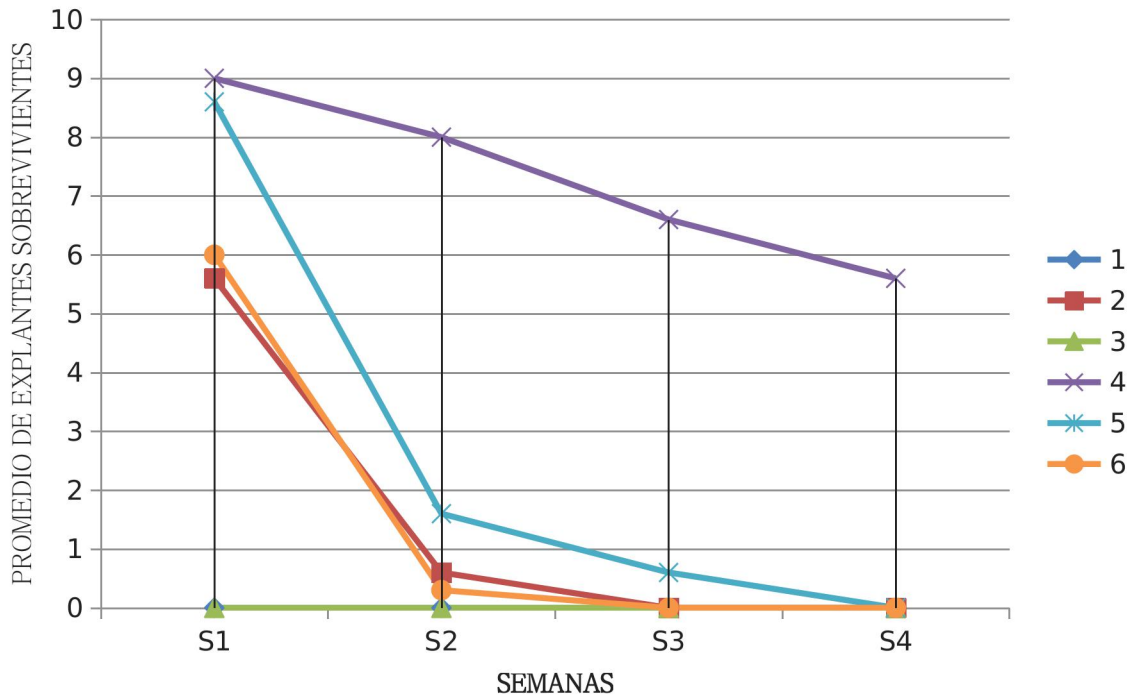


Figura 26. Efecto de los tratamientos de desinfección superficial sobre el promedio de sobrevivencia de explantes foliares de *A. diversifolia*. Etapa de desinfección superficial. UES 2017.

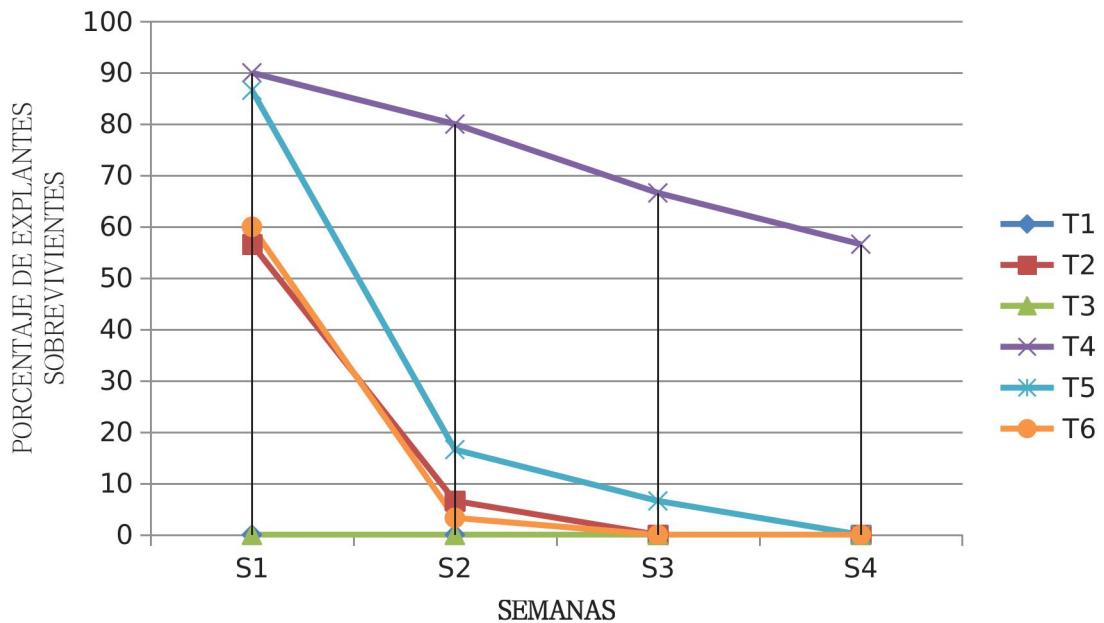


Figura 27. Efecto de los tratamientos de desinfección superficial sobre el porcentaje de sobrevivencia de explantes foliares de *A. diversifolia*. Etapa de desinfección superficial. UES 2017.

En la figura 26 se observa que el tratamiento que presentó el promedio mayor (5.6) de explantes sobrevivientes durante las cuatro semanas, fue el **4**. Debido a ello, se elaboró un protocolo de desinfección superficial para el establecimiento aséptico de explantes foliares de *A. diversifolia* (anexo 22). Los demás tratamientos muestran un descenso considerable de explantes sobrevivientes a partir de la segunda semana (anexos 10 y 11). Durante la cuarta semana, únicamente el tratamiento **4** presentó explantes sobrevivientes. Los tratamientos **1** y **3**, presentaron los promedios más bajos de explantes sobrevivientes (promedio de 0.0), a partir de la primera semana.

6.2. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal

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

6.2.1. Contaminación de explantes

Los promedios de contaminación fueron diversos entre los medios utilizados (Figs 28 y 29). Sus máximos valores se obtuvieron a partir de la quinta semana (anexos 23 y 24). Los promedios de contaminación muestran diferencias estadísticamente significativas al nivel de significancia del 10% ($F > 2.394$) únicamente durante la quinta semana (anexo 25).

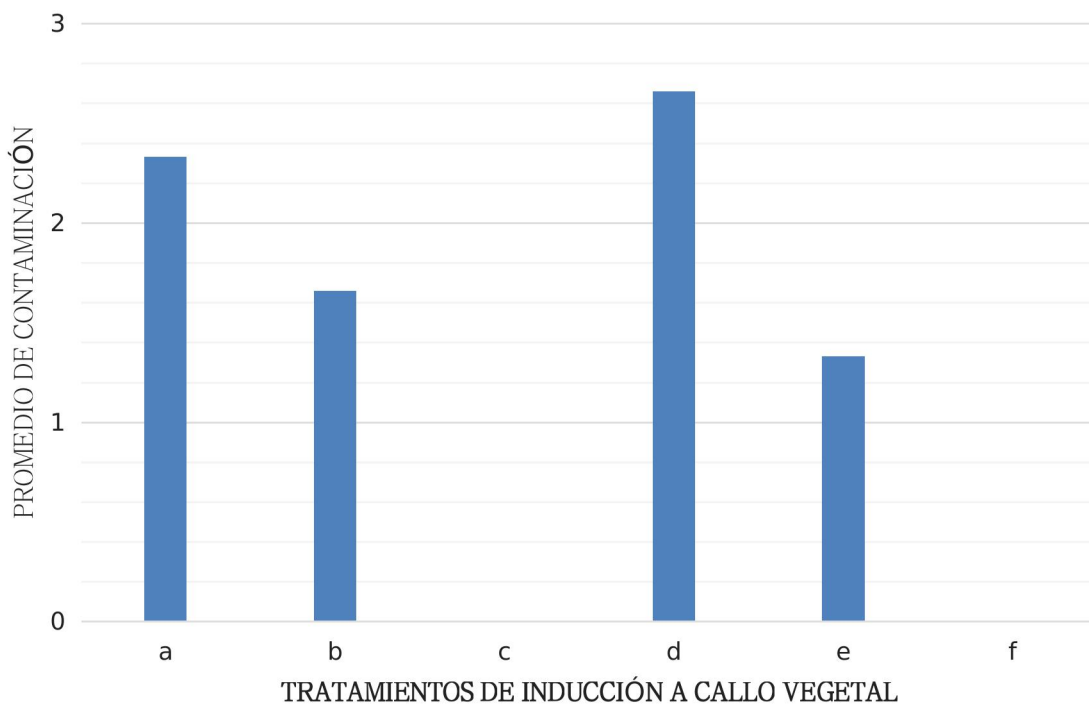


Figura 28. Efecto de los tratamientos de inducción a callo vegetal sobre el promedio de contaminación de explantes foliares de *A. diversifolia* después de cinco semanas. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017. **Composición de medios de inducción a callo vegetal:**

| | | |
|---|--|--|
| a = MS basal al 100% + Hidrocaseína (500 mg/L)+ Picloram (0.87 mg/L). | c = MS basal al 100% + 2,4-D (1 mg/L) + BAP (1 mg/L). | e = MS basal al 50% + Tiamina-HCl (1 mg/L) + Myo inositol (100 mg/L) + Ácido nicotínico (1 mg/L) + Pyridoxina (400 mg/L) + Glicina (400 mg/L) + Extracto de malta (100 mg/L) + Hidrocaseína (0.5 mg/L) + 2,4-D (1 mg/L) + AIB (1 mg/L). |
| b = MS basal al 100% + Hidrocaseína (500 mg/L) + Picloram (0.69 mg/L). | d = MS basal al 100% + ANA (0.5 mg/L). | f = Medio B5 al 100% + 2,4-D (2 mg/L) + Kin (1 mg/L). |

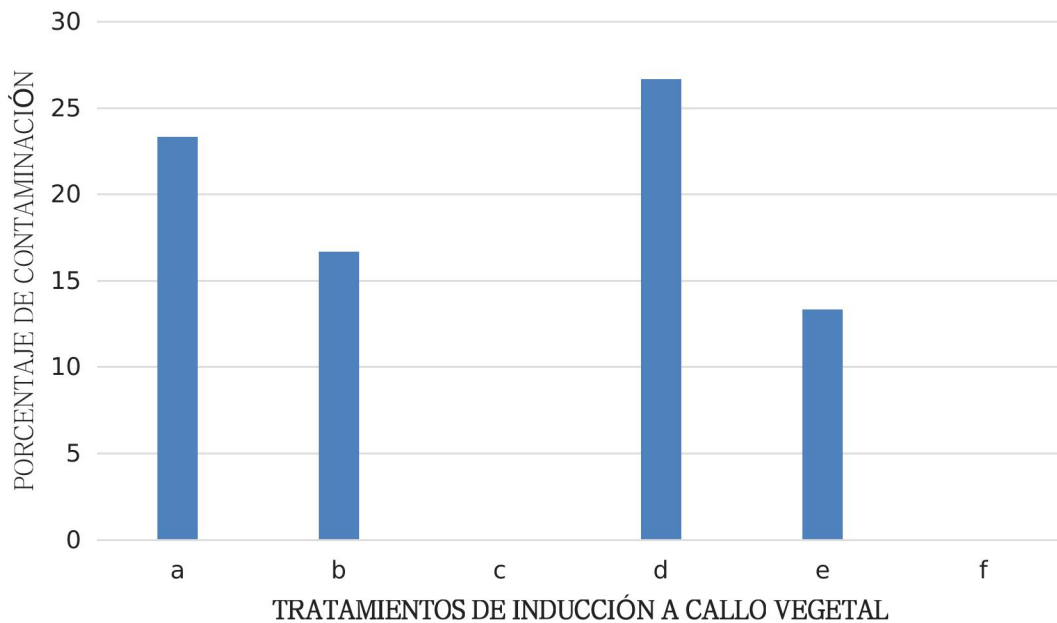


Figura 29. Efecto de los tratamientos de inducción a callo vegetal sobre el porcentaje de contaminación de explantes foliares de *A. diversifolia* después de cinco semanas. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

En la figura 28 se observa que los tratamientos que presentaron el menor promedio de contaminación fueron el **c** y **f** (promedio de 0.0); sin embargo, los promedios de oxidación de **c** fueron más altos que los de **f**. El promedio de contaminación más alto fue del **d** (2.66), seguido por el **a** (Figs. 30 y 31). La contaminación en **d**, se observó en el medio de cultivo a partir de las regiones periféricas del frasco.

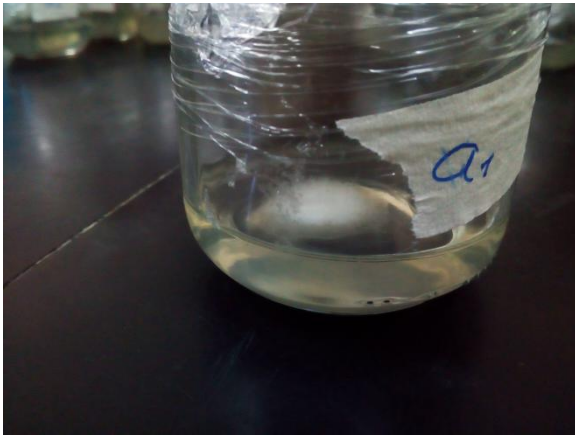


Figura 30. Explante foliar de *A. diversifolia* sembrado en tratamiento de inducción a callo vegetal **a**, repetición **1**, después de una semana de siembra. Se observa contaminación originada a partir del explante. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

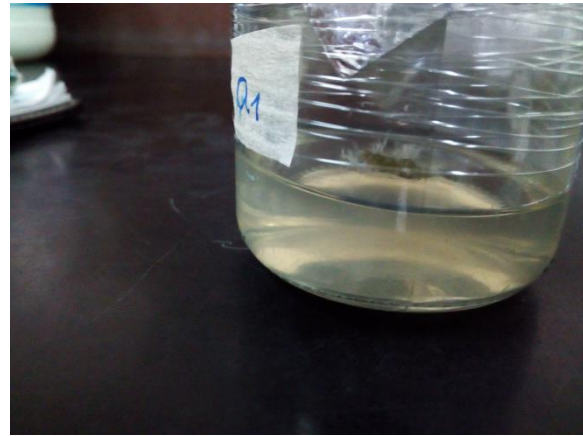


Figura 31. Explante foliar de *A. diversifolia* sembrado en tratamiento de inducción a callo vegetal **a**, repetición **1**, después de una semana de siembra. Se observa contaminación originada a partir del explante. En este caso, se expandió primero hacia arriba y luego a los laterales. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

6.2.2. Supervivencia de explantes

Los promedios de supervivencia de los explantes fueron diversos entre los tratamientos utilizados (anexos 26 y 27). Además, sus valores mostraron una tendencia a disminuir cada semana (Figs. 32 y 33) conforme incrementaron los promedios de oxidación (anexos 28 y 29). Los valores mínimos de explantes sobrevivientes se obtuvieron durante la semana cinco. Los promedios de explantes sobrevivientes muestran diferencias estadísticamente significativas al nivel de significancia del 1% ($F > 5.064$), durante las últimas cuatro semanas (anexos 30-33). Los promedios de explantes oxidados muestran diferencias significativas al nivel del 1% ($F > 5.064$), durante la semana dos, tres y cuatro (anexos 34-36), mientras que durante la quinta semana, presentan diferencias estadísticamente significativas al nivel de significancia del 5% ($F > 3.106$) (anexo 37).

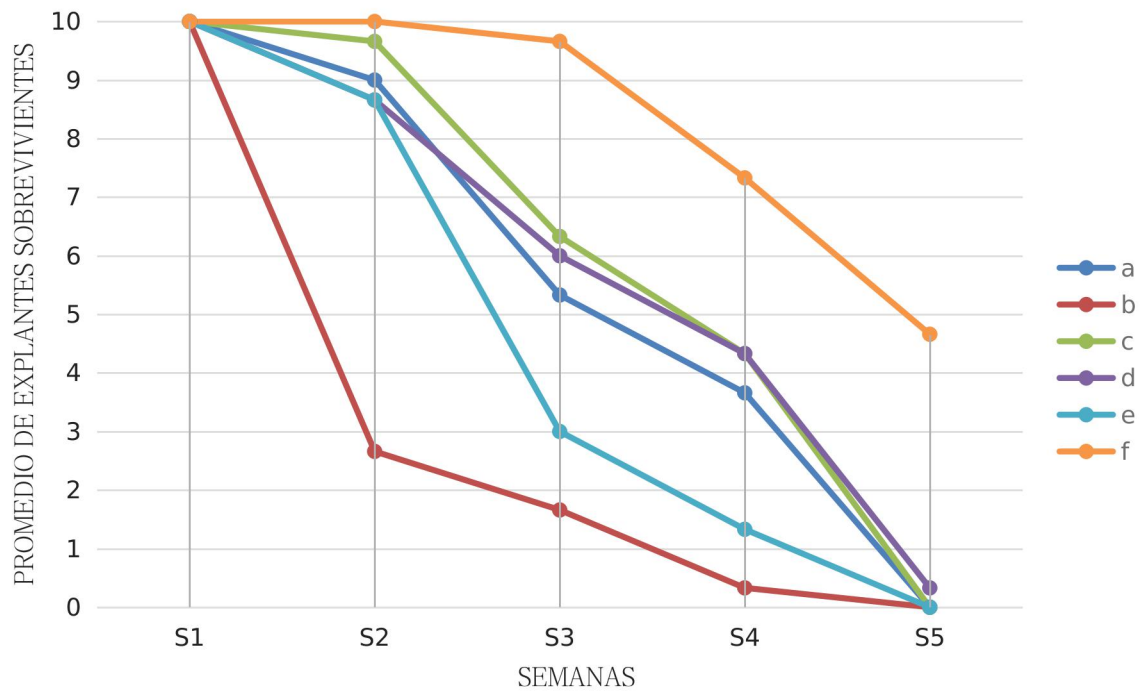


Figura 32. Efecto de los tratamientos de inducción a callo vegetal sobre el promedio de sobrevivencia de explantes foliares de *A. diversifolia*. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

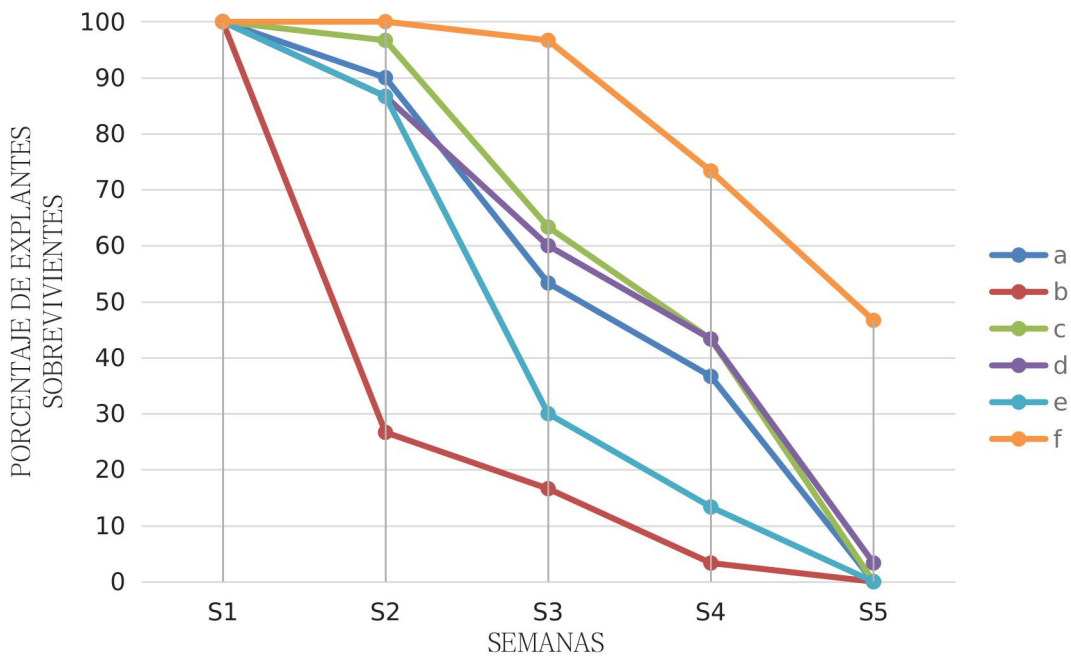


Figura 33. Efecto de los tratamientos de inducción a callo vegetal sobre el porcentaje de sobrevivencia de explantes foliares de *A. diversifolia*. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

En la figura 32 se observa que el tratamiento de inducción a callo vegetal que obtuvo mayor promedio de explantes sobrevivientes durante las cinco semanas, fue **f** (4.66). La mayoría de tratamientos mostraron un descenso considerable de explantes sobrevivientes a partir de la cuarta semana (anexo 21). Los tratamientos **b** (Figs. 34 y 35) y **e** presentaron los promedios más bajos de explantes sobrevivientes a partir de la tercera semana. Durante la quinta semana, únicamente los tratamientos **d** (Fig. 36) y **f** (Fig. 37), mostraron explantes sobrevivientes.

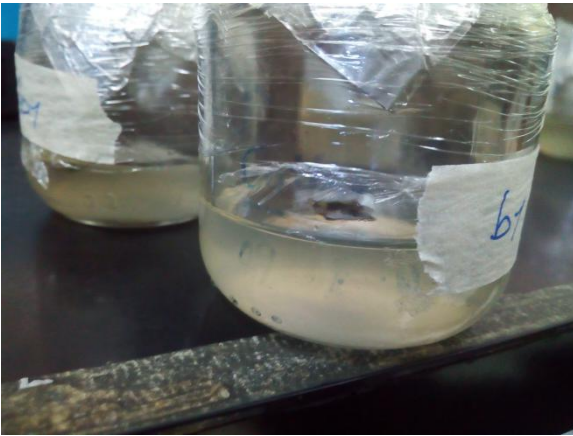


Figura 34. Explante foliar de *A. diversifolia* sembrado en tratamiento de inducción **b**, repetición **1**, después de dos semanas de siembra. Se observa oxidación en algunas zonas. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.



Figura 35. Explante foliar de *A. diversifolia* sembrado en tratamiento de inducción **b**, repetición **1**, después de tres semanas de siembra. Se observa oxidación en todo el explante. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.



Figura 36. Explante foliar de *A. diversifolia* sembrado en tratamiento de inducción **d**, repetición **1**, después de cuatro semanas de siembra. Se observan indicios de oxidación en los bordes del explante. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

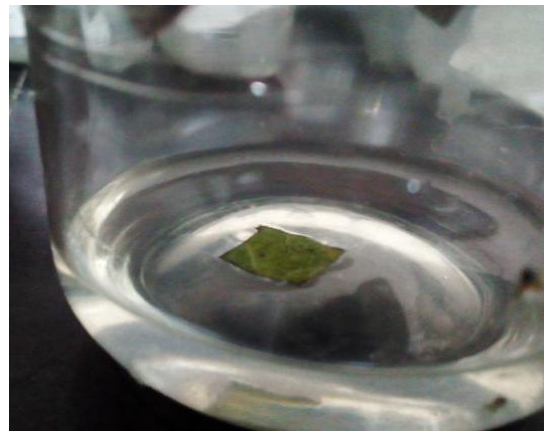


Figura 37. Explante foliar de *A. diversifolia* sembrado en tratamiento de inducción **f**, repetición **1**, después de cuatro semanas de siembra. Se observa sin indicios de oxidación ni contaminación. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

7. DISCUSIÓN

7.1. Etapa de desinfección superficial

7.1.2. Contaminación de explantes

Los tejidos vegetales de plantas adultas, generalmente presentan porcentajes altos de contaminación. Debido a ello, es necesaria una estricta desinfección superficial bajo condiciones asépticas (Landaverde *et al* 2002). De acuerdo a López *et al* (2014), no se han realizado estudios previos de desinfección superficial de explantes en *A. diversifolia*; sin embargo, éstos ya se han realizado en otros representantes del género *Annona*, utilizando plantas adultas (Rincón *et al* 1999; Ramírez *et al* 2002; Velásquez *et al* 2004; López *et al* 2014), y jóvenes (Dipré *et al* 2012).

Según Landaverde *et al* (2002), en cultivos de explantes provenientes de plantas leñosas adultas, los porcentajes de contaminación suelen presentar variaciones significativas a causa del tratamiento de desinfección superficial. Además, se recomienda la implementación de hipocloritos como desinfectante. Esto contrasta con los resultados obtenidos por Ramírez *et al* (2002), quienes obtuvieron altos porcentajes de contaminación (50-70% a los 20 días) en explantes adultos de plantas leñosas, utilizando hipocloritos. Por otra parte, Rincón *et al* (1999) y Ramírez *et al* (1999), obtuvieron contaminación mínima (0% a los 14 días y 25% a los 7 días respectivamente) al implementar antimicóticos de uso agronómico y antibióticos de uso médico, durante la desinfección superficial.

De acuerdo a lo anterior, y a lo descrito en el apartado de resultados, las observaciones semanales realizadas en los tratamientos **2** (Hipoclorito de sodio (1%) por 5 min; tres enjuagues con agua destilada esterilizada), **3** (Hipoclorito de sodio (0.5%) por 10 min; tres enjuagues con agua destilada esterilizada), y **6** (etanol (70%) por 1 min; benomil (2 g/L) + tetraciclina (0.2 g/L) por 15 min; tres enjuagues con agua destilada esterilizada), muestran altos porcentajes de contaminación (46.66%, 100% y 73.33% respectivamente). Los tratamientos **1** (Hipoclorito de calcio (10%) por 20 min; Hipoclorito de calcio (8%) por 10 min; tres enjuagues con agua destilada esterilizada), **4** (Hipoclorito de sodio (5.25%) por 5 min; tres enjuagues con agua destilada esterilizada; Ridomil (20 g/L) por 10 min; Tetraciclina (0.6 g/L) por 10 min), y **5** (benomil (2 g/L) + tetraciclina (0.2 g/L) por 15 min; etanol (70%) por 1 min; tres enjuagues con agua destilada esterilizada) presentaron bajos porcentajes de contaminación (0%, 6.66% y 13.33% respectivamente). Según Landaverde *et al* (2002), estas variaciones ocurren como consecuencia del efecto de sus tratamientos. Los altos porcentajes de contaminación en los tratamientos **2**, **3**, y **6** contrastan con resultados obtenidos en protocolos similares.

Los porcentajes de contaminación obtenidos implementando los tratamientos **2** y **3**, contrastan con los resultados reportados por Ramírez *et al* (2002). En dicho estudio, se obtuvo 50% de contaminación, utilizando el mismo procedimiento de desinfección superficial que en el tratamiento **2**, y de 70% aplicando el tratamiento **3** en explantes de *A. muricata*.

El menor porcentaje de contaminación obtenido en el tratamiento **2** con respecto a su análogo (Ramírez *et al* 2002), podría deberse a las condiciones donde se desarrollaron las plantas. Ramírez *et al* (2002), trabajaron con plantas procedentes del campo y en el presente estudio se trabajó con plantas procedentes de un vivero; sin embargo, al implementar

el tratamiento **3**, se obtuvo mayor contaminación que en el estudio de Ramírez *et al* (2002). De acuerdo a Rincón *et al* (1999), estas diferencias suelen ocurrir por una inadecuada forma de trabajar bajo condiciones asépticas. En dicho caso, las variaciones no se deben a la aplicación del pretratamiento utilizado (agua jabonosa por 10 min; un enjuague con agua corriente por 5 min; alcohol etílico al 70% por 10 seg), el cual está basado en el descrito por Landaverde *et al* (2002), donde se obtuvo baja contaminación (25-30%).

Los porcentajes de contaminación obtenidos implementando los tratamientos **5** y **6** (13.33% y 73.33% respectivamente), contrastan con los resultados reportados por Ramírez *et al* (1999). En dicho estudio, se presentó 25 y 45% de contaminación, utilizando un procedimiento de desinfección superficial similar al tratamiento **5**, aplicado a explantes adultos de *Psidium guajava* y *Psidium friedrichsthalianum* respectivamente. Además se recomendó invertir el orden de aplicación de desinfectantes, volviéndose semejante al tratamiento **6**. Según Ramírez *et al* (1999), esto permitiría mayor eficiencia en desinfección.

El menor porcentaje de contaminación obtenido en el tratamiento **5**, podría deberse en parte a las condiciones donde se desarrollaron las plantas, ya que en el trabajo de Ramírez *et al* (1999), se utilizaron plantas procedentes del campo. Por otro lado, tal como describen algunos autores, las diferencias pueden atribuirse a causa del pretratamiento (Lemos & Blake 1996). En pretratamientos similares al utilizado en este trabajo, se han obtenido bajos porcentajes de contaminación, implementando explantes foliares adultos, como indica Landaverde *et al* (2004). El alto porcentaje de contaminación en el tratamiento **6**, probablemente se deba a que la solución de antimicótico y antibiótico, desplazó o lavó gran parte del etanol al 70% impregnado en el explante. Esto es contrario a lo

sugerido por Ramírez *et al* (1999), donde se indicó que probablemente habría mayor desinfección utilizando este orden de inmersión.

El porcentaje de contaminación en el tratamiento **1** (0%), fue inferior a los obtenidos por Landaverde *et al* (2002) en explantes foliares adultos. En este caso, debido a que las condiciones de desinfección son semejantes, probablemente las diferencias se deban a la procedencia del explante. Esto coincide con lo reportado por Lemos & Blake (1996), donde se indica bajo porcentaje de contaminación en explantes no procedentes del campo. Los resultados del tratamiento **4** (6.66%), concuerdan con los bajos porcentajes de contaminación (0%) reportados por Rincón *et al* (1999) en explantes de *A. glabra*.

7.1.3. Supervivencia de explantes

Los tejidos vegetales de plantas leñosas adultas, generalmente presentan porcentajes altos de oxidación al cultivarse *In vitro* (Landaverde *et al* 2002; Ramírez *et al* 1999). Esto ya ha sido descrito como la principal causa de baja supervivencia de explantes adultos en plantas del género *Annona*, y se describe como un ennegrecimiento progresivo en el explante (Velásquez *et al* 2004; Ramírez *et al* 2002; Rincón *et al* 1999). Debido a ello, se sugiere implementar soluciones antioxidantes durante el traslado y pretratamiento (Landaverde *et al* 2002; Dipré *et al* 2012). Según Landaverde *et al* (2002), en cultivos de explantes adultos provenientes de plantas leñosas adultas, los porcentajes de oxidación suelen presentar variaciones significativas a causa del tratamiento de desinfección superficial. Además, se recomienda la implementación de soluciones antioxidantes conformadas por ácido ascórbico y ácido cítrico durante el traslado del material vegetativo. Esto contrasta con los resultados obtenidos por Rincón *et al* (1999) y Velásquez *et al* (2004), quienes

obtuvieron altos porcentajes de oxidación en explantes adultos de plantas leñosas (45% a los 14 días y 89% a los 24 días respectivamente). Por su parte, Dipré *et al* (2012), no reportó oxidación al implementar una solución de citrato previo a la siembra de explantes jóvenes de *A. muricata*. De acuerdo a Lemos & Blake (1996), la oxidación puede ser controlada añadiendo carbón activado y galactosa al medio de cultivo.

De acuerdo a lo anterior, y a lo descrito en el apartado de resultados, las observaciones semanales realizadas en los tratamientos, demuestran en general, bajos porcentajes de sobrevivencia debido a dos factores. En el caso de los tratamientos **2**, **3**, y **6**, la principal causa, fue la contaminación (46.66%, 100% y 73.33% respectivamente). Los tratamientos **1**, **4**, y **5**, presentaron bajos porcentajes de sobrevivencia, debidos principalmente a la oxidación (100%, 36.66% y 73.33% a los 28 días respectivamente). Los porcentajes de oxidación obtenidos implementando el tratamiento **1**, son mayores a los reportados por Landaverde *et al* (2002). En dicho estudio, se obtuvo 0% de oxidación durante los primeros quince días de incubación, utilizando el mismo procedimiento de desinfección superficial que el tratamiento **1**, aplicado a explantes foliares del café (*Coffea arabica*). Para este caso particular, puesto a que las condiciones en ambos estudios eran similares, el resultado podría deberse a un efecto tóxico (Ramírez *et al* 1999; Ramírez *et al* 2002). De acuerdo a Velásquez *et al* (2004), esto se evidencia cuando el explante pierde parte de su coloración natural luego de la inmersión en el desinfectante. Esta descripción coincide con lo observado en el presente estudio al implementar el tratamiento **1**. El porcentaje de explantes sobrevivientes obtenida implementando el tratamiento **5** (86.66% al cabo de 7 días), es mayor a la reportada por Ramírez *et al* (1999). En dicho estudio, se obtuvo 75% de explantes sobrevivientes en *Psidium guajava*, y 55% en *Psidium friedrichsthalianum*. Ambos al cabo de siete días de incubación, utilizando el mismo

procedimiento de desinfección superficial que el tratamiento **5**, aplicado a explantes adultos. No se evidenció un cambio de coloración debida a un efecto tóxico, como indica Velásquez *et al* (2004); sin embargo, este factor no se puede descartar (Ramírez *et al* 1999; Ramírez *et al* 2002; Landaverde *et al* 2002). Por otro lado, la oxidación de explantes en especies del género *Annona*, es atribuida a fenoles y polifenoxidasas comunes en estas plantas (Jordan *et al* 1993).

Para el caso de los resultados obtenidos en el tratamiento **4**, el porcentaje de explantes sobrevivientes (80% a los 14 días) es mayor a la reportada por Rincón *et al* (1999). En dicho estudio, se obtuvo 55% de explantes sobrevivientes en *A. glabra*, y 28% en *A. muricata*, ambos al cabo de 14 días de incubación, utilizando el mismo procedimiento de desinfección superficial que el tratamiento **4**, aplicado a explantes adultos. Según Rincón *et al* (1999), la baja sobrevivencia de explantes de *Annona* spp., se debe a la oxidación descrita por Jordan *et al* (1993). Los resultados concuerdan con Landaverde *et al* (2002), ya que se obtuvo menor porcentaje de explantes oxidados, probablemente por utilizar antioxidantes que combinan ascorbato y citrato, previos al procedimiento de desinfección. Además, los resultados coinciden con lo descrito por Dipré *et al* (2012), ya que probablemente el menor porcentaje de oxidación, se deba a remojar los explantes en una solución de citrato antes de la siembra. Por otro lado, los porcentajes de oxidación obtenidos en el tratamiento **4**, se encuentran entre los límites comunes, al cabo de dos y cuatro semanas de observación (Landaverde *et al* 2002; Velásquez *et al* 2004).

7.2. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción al callo vegetal

Ninguno de los tratamientos de inducción a callo vegetal permitió la obtención de callos vegetales, a pesar que dichos medios y condiciones de incubación han sido descritas como aptas para inducir callogénesis en diferentes especies (Landaverde *et al* 2002; Gómez *et al* 2006; Rodríguez *et al* 2014; Vacca *et al* 2015). De acuerdo a Velásquez *et al* (2004), esta respuesta negativa se obtuvo debido a que no fue posible detener la oxidación ocasionada por la presencia de tirosinasas y polifenoxidasas comunes en el metabolismo. Estas actúan sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos a quinonas que son fitotóxicas, sustancias que a su vez pueden polimerizarse y afectar proteínas vegetales, inhibiendo el crecimiento y viabilidad de los explantes. Dicho fenómeno se observa como un ennegrecimiento progresivo, tal como ocurrió en los explantes sembrados.

De acuerdo a Marks & Simpson (1990), al colocar células y tejidos vegetales en condiciones de oscuridad, se reduce considerablemente la oxidación. Esto ocurre debido a que muchas de las enzimas responsables de ella, se inactivan. Las condiciones de incubación aplicadas, implican oscuridad total. Además, los tratamientos implicaron uso de las sustancias antioxidantes descritas por Landaverde *et al* (2002) y Dipré *et al* (2012). Contrario a lo ocurrido en otros estudios (Landaverde *et al* 2002; Gómez *et al* 2006; Rodríguez *et al* 2014; Vacca *et al* 2015); los antioxidantes, condiciones de incubación y medios, no detuvieron la oxidación de los explantes. Probablemente, como indica Lemos & Blake (1996), al suplementar los medios de cultivo con carbón activado y galactosa, la oxidación de explantes se detenga, tal y como ocurrió en *A. muricata*, puesto a que su fisiología es similar a la de *A. diversifolia*. Por otro lado, de

acuerdo a Dipré *et al* (2012), al utilizar explantes jóvenes de plantas germinadas *In vitro* bajo condiciones de oscuridad, es posible obtener callos vegetales en algunas especies del género *Annona*, sin ocurrir oxidación.

7.2.1. Contaminación de explantes

Los promedios de contaminación obtenidos aplicando el tratamiento **4** durante esta etapa son bajos (0.00-2.33 durante la cuarta semana). Estos a su vez son parecidos a los obtenidos durante la primera etapa (0.66 durante la cuarta semana en tratamiento 4), lo cual confirma que el protocolo de desinfección basado en Rincón *et al* (1999), que implementa los antioxidantes sugeridos por Landaverde *et al* (2002), y Dipré *et al* (2012), es eficiente en explantes foliares de *A. diversifolia*. Las diferencias significativas en los promedios de contaminación durante la quinta semana, posiblemente se deben a contaminación externa en el área de incubación. Esto se evidencia debido a que el crecimiento de las colonias de hongos inicia a partir de las regiones periféricas del medio, y no directamente del explante.

7.2.2. Supervivencia de explantes

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

algunos casos, mayores a los obtenidos en MS basal al 50% de sus sales durante la etapa anterior de la investigación. Esto confirma que el protocolo de desinfección basado en Rincón *et al* (1999), que implementa los antioxidantes sugeridos por Landaverde *et al* (2002), y Dipré *et al* (2012), permite obtener explantes foliares sobrevivientes de *A. diversifolia*, en medios de diferente composición, durante los primeros catorce días.

La cantidad de explantes oxidados se acrecentó cada semana dependiendo del tratamiento utilizado. Los tratamientos con MS basal (tratamientos **a-e**), presentaron mayores promedios de oxidación que el tratamiento **f** (4.66 durante la quinta semana), en el cual se utilizó como base el medio B5. Según Azofeifa (2009), la composición del medio de cultivo es un factor que altera la oxidación de los explantes.

De forma general, los medios que implementan el MS basal al 100% de su composición salina, generan mayor oxidación. Esto explica el por qué el promedio de explantes oxidados en MS basal al 50% de sus sales al cabo de cuatro semanas es inferior al obtenido en los tratamientos **a-d** que contenían MS basal al 100% de sus sales (tabla 6); sin embargo, en tratamiento **e** se obtuvo promedio mayor de oxidación que en MS basal al 50% sin suplementos adicionales (anexos 13 y 28), a pesar de utilizar la misma composición salina.

De acuerdo a Azofeifa (2009), la diferencia en los promedios de oxidación obtenidos implementando MS basal al 50% sin suplementos adicionales y el tratamiento **e** (0.00 durante la quinta semana), podría atribuirse a la composición de los suplementos adicionales, especialmente al extracto de malta, el cual contiene sacarosa. Los carbohidratos tienden a hidrolizarse y formar 5-hidroximetil-2-furaldehído (HMF), durante el autoclavado, un factor inhibidor (Azofeira 2009; Fernández *et al* 2015). Ya que el tratamiento **f** contiene menor cantidad de sacarosa, probablemente este factor tendría menor efecto sobre el explante, lo cual explicaría el promedio bajo de oxidación. Además la composición del tratamiento **f**, tiene como base el B5, el cual contiene en general, menor cantidad de sales que el MS basal.

8. CONCLUSIONES

El método de desinfección superficial más adecuado para establecer *In vitro* explantes foliares procedentes de ejemplares adultos en *A. diversifolia*, fue el tratamiento **4** que consistió en hipoclorito de sodio (5.25%) por 5 min; seguido de 3 enjuagues con agua destilada esterilizada; una inmersión en Ridomil (20 g/L) por 10 min; y una inmersión en Tetraciclina (0.6 g/L) por 10 min). Posiblemente la combinación de desinfectantes y antioxidantes utilizados, permitió obtener los mayores promedios de explantes sobrevivientes.

La inmersión de las hojas en solución antioxidante que contenía ascorbato (100 mg/L) + citrato (150 mg/L) durante el traslado al laboratorio, y luego la inmersión en solución de citrato (0.5%) esterilizada, previo a la desinfección superficial y posterior a la misma, no fueron suficientes para controlar los efectos normales de la oxidación en explantes foliares procedentes de ejemplares adultos en *A. diversifolia*.

Los tratamientos de inducción al callo vegetal utilizados no indujeron la formación de callos vegetales a partir de explantes foliares procedentes de ejemplares adultos en *A. diversifolia*, ya que no fue posible detener la oxidación ocasionada por la presencia de tirosinasas y polifenoxidasas comunes en el metabolismo. En la mayoría de los explantes sembrados, se elevaron considerablemente los niveles de oxidación.

Los medios de cultivo que utilizaron como base el B5, o bien, el MS basal al 50% de su composición salina sin suplementos adicionales, redujeron considerablemente los niveles de oxidación en explantes foliares procedentes de ejemplares adultos en *A. diversifolia*.

9. RECOMENDACIONES

- Al realizar estudios preliminares de desinfección superficial y establecimiento *In vitro* en plantas leñosas adultas, se recomienda evaluar tratamientos que utilicen diferentes clases de desinfectantes combinados. De esta forma, los resultados obtenidos en cada tratamiento, podrán compararse directamente con los obtenidos por los autores que lo utilizaron.
- Para posteriores estudios de establecimiento *In vitro*, utilizando explantes procedentes de ejemplares adultos de *A. diversifolia*, se recomienda implementar los desinfectantes utilizados en tratamiento **4** (Hipoclorito de sodio (5.25%) por 5 min; tres enjuagues con agua destilada esterilizada; Ridomil (20 g/L) por 10 min; Tetraciclina (0.6 g/L) por 10 min)), ya que han demostrado ser eficientes en el control de microorganismos.
- Realizar estudios de relación dosis-respuesta con las concentraciones de desinfectantes utilizados en tratamiento **4**, aplicado a explantes foliares procedentes de ejemplares adultos de *A. diversifolia*, con el objetivo de determinar dosis óptimas de desinfección y sobrevivencia.
- Evaluar el efecto del tipo y período de sombreado de la planta madre, en la sobrevivencia de los explantes foliares de *A. diversifolia*, ya que este factor podría reducir los niveles de oxidación.
- Evaluar el efecto de enjuagues prolongados en explantes foliares procedentes de ejemplares adultos de *A. diversifolia*, y la adición de sustancias adsorbentes con efecto antioxidante al medio de cultivo.

- Evaluar el efecto del tratamiento **4** en la desinfección superficial de semillas de *A. diversifolia* para obtener vitroplantas.
- Evaluar el efecto del tratamiento de inducción **f** en cotiledones de *A. diversifolia*, ya que éstos deberían tener mayor potencial callogénico y baja oxidación.
- Utilizar explantes de alto potencial callogénico procedentes de ejemplares de 30 días de *A. diversifolia*, germinados bajo condiciones *In vitro*, ya que bajo estas condiciones se han obtenido callos vegetales en *A. muricata*.
- Evaluar el efecto del tratamiento **4** para la desinfección superficial de explantes provenientes de ejemplares adultos procedentes del campo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar A., 2008. Tratamiento enzimático de la pulpa del plátano (*Musa paradisiaca* L.) para la obtención de jarabe de glucosa y fibra dietética. Tesis para optar al grado de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional.
- Azofeifa A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana*. 1021-7444.
- Bejoy M. & Hariharan M. 1992. *In vitro* plantlet differentiation in *Annona muricata*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 31:295-247.
- Benítez C., Pece M., Galindez M. 2002. Conceptos básicos sobre análisis de varianza y diseño experimental. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Nacional de Santiago del Estero.
- Calva C.G. & Rios L.E. 1999. Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. En: Rodríguez V. R., Calva C. G., Ramos R. E. G., Salazar M. A. (Eds.) Aspectos aplicados de la biotecnología. pp 267-301.
- Calva C.G. & Pérez J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro. *Revista digital universitaria*. 1067-6079.
- Castro J. 2007. Cultivo de la anona. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Costa Rica.
- Celestino C., Hernández I., Carneros E., López D., Toribio M. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal 14(3), 345-357. Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA).
- CIEX 2018. Exportaciones anonas frescas registradas en el Centro de Trámites de Importaciones y Exportaciones. CIEX El Salvador.
- Crozier A., Kamiya Y., Bishop G., Yokota T., (2000). Biosynthesis of hormones and elicitors molecules. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and molecular biology of plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 850-929.
- Cruz E. 2002. Cultivo de anona. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). El Salvador.

- Cruz E. & Deras H. 2000. Colecta y establecimiento de anonáceas en El Salvador. *Agronomía Mesoamericana* 11(2): 91-95.
- Del Greco N. 2010. Estudio sobre tendencias de consumo de alimentos. Datos relevantes para la toma de decisiones en la Agroindustria de Alimentos y Bebidas.
- Dipré D., Chavarría Y., Mejía A., Castillo M., Vega B., Vega W. 2012. Multiple direct organogenesis in soursop (*Annona muricata* L.). *Electronic Journal of Biotechnology*.
- Encina, C. 1992. Método para el enraizamiento de estaquillas semileñosas de chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) cv. Fino de Jete, micropropagadas por cultivo de tejidos. (ESP), Patente n° 9200401, 12 p.
- Encina, C.L. 1994. *In vitro* morphogenesis of juvenile *Annona cherimola* Mill. bud explants. *Journal of Horticultural Science, Ashford Kent*, v.69, n.6, p.1053-1059.
- Escobar M., Cruz M., Flores H., Reyes A., Aguilar C., Rodríguez R. 2015. Análisis genético y bromatológico de mutantes de manzano (*Malus x domestica* Borkh) from golden delicious cultivar. 2(6):269-276. Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro.
- Fernández C., Díaz M., González L. 2015. Enraizamiento *in vitro* de embriones cigóticos de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart.
- Gamborg, O., Miller, R., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- George E. & Sherrington P. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Eversley: Exegetics, 709 pp.
- Gómez C., Uribe m., Ríos D., Sánchez-Olate M. 2006. Inducción de callo embriogénico en *Eucalyptus globulus* Labill 0378-1844.
- González E., Rosa A., Cazáres L., Mercedes L., Guzmán S., Adelina M., Chacón C., De la Cruz I., Hernández L., Flores G., Montoya S., Pablo G. 2012. *In vitro* larvicidal evaluation of *Annona muricata* L., *A. diversifolia* Saff. and *A. lutescens* Saff. Extracts against *Anastrepha ludens* larvae (Diptera, Tephritidae). *Interciencia* 0378-1844.

- González E., Tapia E., López L., Navarrete A., Reyes A., Martínez A. 2006. Anticonvulsant Effect of *Annona diversifolia* Saff. and palmitone on penicillin-induced convulsive activity. A behavioral and EEG. study in rats. *Epilepsia*, 47(11):1810-1817.
- González M. 2013. Revisión bibliográfica chirimoya (*Annona cherimola* Miller), frutal tropical y sub-tropical de valores promisorios. Cultivos tropicales 1819-4087. Ministerio de Educación superior. Cuba. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
- González R., Luisier A., Quer P. 1976. Historia natural, tomo III, Botánica. Undécima edición. Instituto Gallach. España. ISBN: 84-85009-42-8.
- Gutiérrez J., Santiago U., Luna L. 2016. Evaluación de extractos acuosos de *Annona lutescens* Safford (Annonaceae) contra *Escherichia coli* Escherich, 1885 (Enterobacteriaceae). Revista de ciencias de la UNICACH. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. México.
- Hartmann H. & Kester D. 1987. Propagación de plantas, principios y prácticas. 3ª reimpression. Editorial Continental. México.
- Honden P. R., Aitken M., Lindsey K., Yeoman M. M. (1988). Variability and stability of cell cultures of *Capsicum frutescens*. En: Morris P., Scragg A., Stafford A., Yeoman M. M. (Eds.) Secondary metabolism in plant cell cultures. Cambridge Un. Press., England. pp. 237-243.
- Hurtado D. & Merino M. 1997. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas. México.
- Irigoyen J. 2004. Guía técnica del cultivo de la anona. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Izquierdo J., López Y. 1991. Capítulo 16, Análisis e interpretación estadística de la experimentación *In Vitro*. Cultivo de tejidos en la agricultura fundamentos y aplicaciones. 958-9183-15-8. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Jordán M., Inturriaga L., Roveraro C., Goreux A. 1991. Promotion of cherimola *in vitro* shoot morphogenesis as influenced by antioxidants. *Gartenbauwissenschaft* 56: 224-227.
- Karp G. 2011. Biología Celular y Molecular. 6ª ed. McGraw-Hill Education.
- Kelly L., Ochoterena H., Medina R. 2000. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología. UNAM. México.

- Landaverde V., López A., Vásquez T. 2002. Estudio de inducción a callo embriogénico en variedades comerciales de café (*Coffea arabica*) de El Salvador. Universidad de El Salvador. El Salvador.
- Lemos E. & Blake J. 1996. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L.
- López C., Carmona E., Arana A., González I. 2014. Biotechnology applied to *Annona* species: A review 017-021.
- Marks T. & Simpson S. 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stock plants to darkness or low levels of irradiance. J. of Hort. Sci. 65: 103-111.
- Mejía A., 2004. Evaluación de tasas de siembra de callos embriogénicos de “café” (*Coffea arabica*) utilizando tres tamaños de recipiente para desarrollar suspensiones celulares. Universidad de El Salvador. El Salvador.
- Moncaleán P. 2015. Embriogénesis somática: generando bosques del futuro. Neiker tecnalia.
- Moreiras O., Carbajal A., Cabrera L., Cuadrado C. 2013. Tablas de composición de alimentos. 84-368-1571-8. Dieciseisava edición. Editorial Pirámide.
- Morillas J., Delgado J. 2012. Análisis nutricional de alimentos vegetales con diferentes orígenes: Evaluación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales. 32(2):8-20. Nutrición clínica y dietética hospitalaria.
- Murashige T. & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nair S., Gupta P., Mascarenhas A. 1984. *In vitro* propagation of *Annona* hybrid (*Annona squamosa* x *Annona cherimola* L.). Indian Journal of Horticulture, Lucknow, v.41, p.160-165.
- Orellana M. 2005. Caracterización de materiales genéticos de Anona (*Annona diversifolia*) en los municipios de Berlin y Mercedes Umaña, Departamento de Usulután. Universidad de El Salvador. El Salvador.
- ORT 2009. Introducción a la Bromatología. Instituto de Tecnología ORT.
- Otero M., Becerril A., Castillo A., Michel A., Ariza R., Barrios A., Rebolledo A. 2006. Producción de ilama (*Annona diversifolia* Saff.) en el trópico seco de guerrero, México. Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, Colegio de postgrados, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales

- Agrícolas y Pecuarias, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas. México.
- Padilla, I.M.G. 1997. Micropropagation of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) cv. Fino de Jete. 334 f. Thesis (PhD) - University of Málaga, Malaga.
- Padilla, I.M.G.; Encina, C.L. 2004. Micropropagation of adult cherimoya (*Annona cherimola* Mill). Cv. Fino de Jete. *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, Bethesda, v.40, p.210-214.
- Pandey N. & Barve D. 2011. Phytochemical and Pharmacological Review on *Annona squamosa* Linn 2229-3701. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences.
- Petiard V., Bariaud Fontanel A. (1985). El cultivo de células vegetales. Mundo Científico. 7(71): 730-736.
- Ramírez M., León de Sierralta S., Urdaneta A. 1999. Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz 16:243-255. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Venezuela.
- Ramírez M., Urdaneta A., León de Sierralta S. 2002. Establecimiento *in vitro* de explantes adultos del guanábano (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. 19: 48-55. Facultad de Agronomía, Universidad de Zulia.
- Rasai S., George A., Kantharajah A. 1995. Tissue culture of *Annona spp.* (cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): A review. Scientia Horticulturae Amsterdam, v.62, p.1-14.
- Rincón A., Ortega R., Urdaneta J., León de Sierralta S., Bracho B., Ramírez M. 1999. Establecimiento aséptico de brotes laterales de *Annona spp* 1:76-81. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Venezuela.
- Rodríguez M., Latsague M., Chacón M., Astorga P. 2014. Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocotilo y hoja de *Ugni molinae* 35(1): 111-118. Universidad Católica de Temuco. Temuco, Chile.
- Seabrook J. E. A. 1980. Laboratory culture. En: Staba, E. J. (Ed.) Plant tissue culture as a source of biochemicals. C.R.C. Press, Inc, Boca Raton, Florida, U.S.A. pp 1-20.

- Solomón E., Berg L., Martín D. 2013. Biología. 9ª ed. CENGAGE Learning.
- Street H. E. 1977. Cell (suspension) cultures techniques. En: Street H. E. (Ed). Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific Publishing., Oxford., England. pp. 61-102.
- Tazzari L., Pestelli P., Fiorino P., Parri G. 1990. Propagation techniques for *Annona cherimola* Mill. Acta Horticulturae, The Hague, v.275, p.315-321.
- Terradez M. & Juan A. Sin año. Análisis de la varianza (ANOVA). Universitat Oberta de Catalunya (UOC).
- Tempé J., Schell J. (1985). La manipulación de las plantas. Mundo Científico 7(71):792-801.
- Vacca M., Avilés Z., Bonomo M., Díaz L. 2015. Efecto del picloram en la inducción de embriogénesis somática de *Pterogyne nitens* Tul. "tipa colorada" pp. 771-777. Argentina.
- Velásquez M., González A., Mata F., León de Sierralta S., Esparza D., Ramírez M. 2004. Tipo de sombreamiento y tiempo de crecimiento de brotes laterales sobre la viabilidad de explantes de *Annona muricata* L. Luz. 21: 12-18.
- Wareing P. F., Al Chalabi T. (1985). Determination in plant cells. Biol. Plant. 27(4-5): 241-248.
- Yeoman M. M. (1970). Early development in callus cultures. Int. Rev. Cytol. 29: 383-409.

11. ANEXOS

Anexo 1. Frutos más consumidos en el mundo desde 1970 al 2010 (Del Greco 2010).

| Frutas | Consumo 1970 (Libras/persona) | Consumo 2000 (Libras/persona) | Variación de consumo (%) |
|----------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Bananas | 17.4 | 28.4 | 63 |
| Melones | 19.5 | 24.2 | 24 |
| Manzanas | 16.3 | 16.7 | 2.5 |
| Naranjas | 15.7 | 11.4 | -27 |
| Uva | 2.6 | 6.6 | 154 |
| Pomelo | 8 | 5 | -38 |
| Frutilla | 1.6 | 4.3 | 169 |
| Piña | 0.7 | 3.1 | 343 |
| Pera | 1.8 | 3 | 66 |
| Palta | 0.8 | 1.8 | 125 |
| Mango | 0.1 | 1.7 | 1600 |
| Lima | 0.2 | 1.2 | 500 |
| Papaya | 0.1 | 0.6 | 500 |
| Kiwi | 0.1 | 0.5 | 400 |

Anexo 2. Indicadores económicos para el cultivo de *A. diversifolia* por manzana (Irigoyen 2004).

| DESCRIPCIÓN | AÑOS | | | | | | | | | |
|-----------------------------|----------|--------|--------|---------|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Ingresos brutos (\$/mz) | | | 838.80 | 1,118.4 | 1,677.60 | 1,957.20 | 2,236.80 | 2,236.80 | 2,236.80 | 2,236.80 |
| Costos de producción | 1,228.99 | 392.61 | 718.28 | 953.36 | 940.70 | 1,048.64 | 1,124.51 | 1,293.97 | 1,222.38 | 1,252.07 |
| Ingreso neto (\$/mz) | | | 120.52 | 165.04 | 736.90 | 908.53 | 1,112.29 | 942.83 | 1,014.42 | 984.73 |
| TIR para 15 años 31% | | | | | VAN (10%) 15,503 | | | | | |

Anexo 3. Composición de los medios de cultivo MS basal al 50% y B5 al 100% de sus sales (Murashige & Skoog 1962; Gamborg *et al* 1968).

| Componentes | MS basal (mg/L) | B5 (mg/L) |
|--|------------------------|------------------|
| NH ₄ NO ₃ | 825 | - |
| KNO ₃ | 950 | 2500 |
| KH ₂ PO ₄ | 85 | - |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 220 | 150 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 185 | 250 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | - | 134 |
| Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O | - | - |
| NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O | - | 150 |
| KCl | - | - |
| Na ₂ SO ₄ | - | - |
| KI | 0.41 | 0.75 |
| H ₃ BO ₃ | 3.1 | 3 |
| MnSO ₄ .H ₂ O | - | 10.00 |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | 11.15 | - |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 4.30 | 2.00 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0.125 | 0.25 |
| H ₂ MoO ₄ | - | - |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.0125 | 0.025 |
| Fe ₂ (SO ₄) ₃ .7H ₂ O | - | - |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 13.9 | 27.80 |
| Na ₂ EDTA | 18.65 | 37.30 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0.0125 | 0.025 |
| Glicina | 1.00 | 2.00 |
| Tiamina-HCl | 0.05 | 10.00 |
| Piridoxina-HCl | 0.25 | 1.00 |
| Ácido nicotínico | 0.25 | 1.00 |
| Myo-inositol | 50.00 | 100.00 |
| Sacarosa | 30,000 | 20,000 |

Anexo 4. Tabla de frecuencias para toma de datos semanales durante la etapa de desinfección superficial. Fecha: _____

| T | R | Respuestas | | | | | |
|----------|----------|-------------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|
| | | EC | EC% | EO | EO% | ES | ES% |
| 1 | a | | | | | | |
| | b | | | | | | |
| | c | | | | | | |
| | Prom. | | | | | | |
| 2 | a | | | | | | |
| | b | | | | | | |
| | c | | | | | | |
| | Prom. | | | | | | |
| 3 | a | | | | | | |
| | b | | | | | | |
| | c | | | | | | |
| | Prom. | | | | | | |
| 4 | a | | | | | | |
| | b | | | | | | |
| | c | | | | | | |
| | Prom. | | | | | | |
| 5 | a | | | | | | |
| | b | | | | | | |
| | c | | | | | | |
| | Prom. | | | | | | |
| 6 | a | | | | | | |
| | b | | | | | | |
| | c | | | | | | |
| | Prom. | | | | | | |

Abreviaturas de tabla: T= tratamiento; R= Repetición; EC = Explantes contaminados; EC% = Porcentaje de explantes contaminados; EO = Explantes oxidados; EO% = Porcentaje de explantes oxidados ES = Explantes sobrevivientes; ES% Porcentaje de explantes sobrevivientes.

Anexo 5. Medio de inducción T1B modificado (Landaverde *et al*/2002).

| Composición | Inducción |
|-----------------------------|------------------|
| Macronutrientes MS basal/2* | 25 |
| Micronutrientes MS basal/2* | 25 |
| Fe EDTA/2* | 2.5 |
| Tiamina HCl | 1 |
| Myo Inositol | 100 |
| Ac. Nicotínico | 1 |
| Pyridoxina | 1 |
| Glicina | 1 |
| L. Cisteína | 0 |
| Extracto de malta | 400 |
| Hidrocaseína | 100 |
| Sulfato de adenina | 0 |
| 2,4-D | 0.5 |
| AIB | 1 |
| 2IP | 0 |
| BAP | 0 |
| Sacarosa** | 30 |
| Phytigel | 2.2 |

* = ml/L, ** = g/L. El resto está en mg/L.

Anexo 6. Tabla de frecuencias para toma de datos semanales durante etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal.

Fecha: _____

| T | R | Respuestas | | | | | | | | |
|---|-------|------------|-----|----|----|-----|----|-----|----|------|
| | | CA | CA% | DA | EC | EC% | EO | EO% | ES | ES % |
| a | 1 | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | | | |
| | Prom. | | | | | | | | | |
| b | 1 | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | | | |
| | Prom. | | | | | | | | | |
| c | 1 | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | | | |
| | Prom. | | | | | | | | | |
| d | 1 | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | | | |
| | Prom. | | | | | | | | | |
| e | 1 | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | | | |
| | Prom. | | | | | | | | | |
| f | 1 | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | | | |
| | Prom. | | | | | | | | | |

Abreviaturas de tabla: T= tratamiento; R= Repetición; CA = Callos formados; CA% = Porcentaje de callos formados; DA = Días de formación al callo vegetal; EC = Explantes contaminados; EC% = Porcentaje de explantes contaminados; EO = Explantes oxidados; EO% = Porcentaje de explantes oxidados ES = Explantes sobrevivientes; ES% Porcentaje de explantes sobrevivientes.

Anexo 7. Promedios de contaminación semanal de explantes foliares de *A. diversifolia* sembrados en MS basal al 50%. Etapa de desinfección superficial. UES 2017.

| Tratamiento | EC S1 | EC S2 | EC S3 | EC S4 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 3.66 | 4.66 | 4.66 | 4.66 |
| 3 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 4 | 0.66 | 0.66 | 0.66 | 0.66 |
| 5 | 1.33 | 1.33 | 1.33 | 1.33 |
| 6 | 4 | 7.33 | 7.33 | 7.33 |

Abreviaturas de tabla: EC = explantes contaminados; S = semana.

Anexo 8. Porcentajes de contaminación semanal de explantes foliares de *A. diversifolia* sembrados en MS basal al 50%. Etapa de desinfección superficial. UES 2017.

| Tratamiento | EC% S1 | EC% S2 | EC% S3 | EC% S4 |
|-------------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 36.66 | 46.66 | 46.66 | 46.66 |
| 3 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 6.66 | 6.66 | 6.66 | 6.66 |
| 5 | 13.33 | 13.33 | 13.33 | 13.33 |
| 6 | 40 | 73.33 | 73.33 | 73.33 |

Abreviaturas de tabla: EC = explantes contaminados; S = semana.

Anexo 9. ANOVA de promedios de contaminación de explantes foliares de *A. diversifolia* por tratamiento durante la cuarta semana, etapa de desinfección superficial. UES 2017.

| F. de Var.en EC | SC | GL | CM | F |
|-----------------|--------|----|-------|--------|
| Total | 232.97 | 17 | | |
| Tipo Trat. | 228.29 | 5 | 45.66 | 117.07 |
| E.E. | 4.68 | 12 | 0.39 | |

Abreviaturas tabla: F = Fuente de variación; EC = Explantes contaminados; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

Anexo 10. Promedios de sobrevivencia semanal de explantes foliares de *A. diversifolia* sembrados en MS basal al 50%. Etapa de desinfección superficial. UES 2017.

| Tratamiento | ES S1 | ES S2 | ES S3 | ES S4 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 5.66 | 0.66 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 9 | 8 | 6.66 | 5.66 |
| 5 | 8.66 | 1.66 | 0.66 | 0 |
| 6 | 6 | 0.33 | 0 | 0 |

Abreviaturas de tabla: ES = explantes sobrevivientes; S = semana.

Anexo 11. Porcentajes de sobrevivencia semanal de explantes foliares de *A. diversifolia* sembrados en MS basal al 50%. Etapa de desinfección superficial. UES 2017.

| Tratamiento | ES% S1 | ES% S2 | ES% S3 | ES% S4 |
|-------------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 56.66 | 6.66 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 90 | 80 | 66.66 | 56.66 |
| 5 | 86.66 | 16.66 | 6.66 | 0 |
| 6 | 60 | 3.33 | 0 | 0 |

Abreviaturas de tabla: ES = explantes sobrevivientes; S = semana.

Anexo 12. Promedios de oxidación semanal de explantes foliares de *A. diversifolia* sembrados en MS basal al 50%. Etapa de desinfección superficial. UES 2017.

| Tratamiento | EO S1 | EO S2 | EO S3 | EO S4 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 2 | 0.66 | 4.66 | 5.33 | 5.33 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0.33 | 1.33 | 2.66 | 3.66 |
| 5 | 0 | 5.66 | 6.66 | 7.33 |
| 6 | 0 | 2.33 | 2.66 | 2.66 |

Abreviaturas de tabla: EO = Explante oxidado; S = semana.

Anexo 13. Porcentajes de oxidación semanal de explantes foliares de *A. diversifolia* sembrados en MS basal al 50%. Etapa de desinfección superficial. UES 2017.

| Tratamiento | EO S1 | EO S2 | EO S3 | EO S4 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 2 | 6.66 | 46.66 | 53.33 | 53.33 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 3.33 | 13.33 | 26.66 | 36.66 |
| 5 | 0 | 56.66 | 66.66 | 73.33 |
| 6 | 0 | 23.33 | 26.66 | 26.66 |

Anexo 14. ANOVA de promedios de sobrevivencia de explantes foliares de *A. diversifolia* por tratamiento durante la primera semana, etapa de desinfección superficial. UES 2017.

| F. de Var.en ES | SC | GL | CM | F |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Total | 253.88 | 17 | | |
| Tipo Trat. | 242.54 | 5 | 48.51 | 51.33 |
| E.E. | 11.34 | 12 | 0.95 | |

Abreviaturas tabla: F = Fuente de variación; ES = Explantes sobrevivientes; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

Anexo 15. ANOVA de promedios de sobrevivencia de explantes foliares de *A. diversifolia* por tratamiento durante la segunda semana, etapa de desinfección superficial. UES 2017.

| F. de Var.en ES | SC | GL | CM | F |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Total | 151.13 | 17 | | |
| Tipo Trat. | 145.12 | 5 | 29.02 | 57.95 |
| E.E. | 6.01 | 12 | 0.50 | |

Abreviaturas tabla: F = Fuente de variación; ES = Explantes sobrevivientes; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

Anexo 16. ANOVA de promedios de sobrevivencia de explantes foliares de *A. diversifolia* por tratamiento durante la tercera semana, etapa de desinfección superficial. UES 2017.

| F. de Var.en ES | SC | GL | CM | F |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Total | 111.22 | 17 | | |
| Tipo Trat. | 107.88 | 5 | 21.58 | 77.52 |
| E.E. | 3.34 | 12 | 0.28 | |

Abreviaturas tabla: F = Fuente de variación; ES = Explantes sobrevivientes; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

Anexo 17. ANOVA de promedios de sobrevivencia de explantes foliares de *A. diversifolia* por tratamiento durante la cuarta semana, etapa de desinfección superficial. UES 2017.

| F. de Var.en ES | SC | GL | CM | F |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Total | 85.04 | 17 | | |
| Tipo Trat. | 80.37 | 5 | 16.07 | 41.31 |
| E.E. | 4.67 | 12 | 0.39 | |

Abreviaturas tabla: F = Fuente de variación; ES = Explantes sobrevivientes; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

Anexo 18. ANOVA de promedios de oxidación de explantes foliares de *A. diversifolia* por tratamiento durante la primera semana, etapa de desinfección superficial. UES 2017.

| F. de Var.en EO | SC | GL | CM | F |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Total | 244.51 | 17 | | |
| Tipo Trat. | 241.17 | 5 | 48.23 | 173.30 |
| E.E. | 3.34 | 12 | 0.28 | |

Abreviaturas tabla: F = Fuente de variación; EO = Explantes oxidados; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

Anexo 19. ANOVA de promedios de oxidación de explantes foliares de *A. diversifolia* por tratamiento durante la segunda semana, etapa de desinfección superficial. UES 2017.

| F. de Var.en EO | SC | GL | CM | F |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Total | 208.15 | 17 | | |
| Tipo Trat. | 195.47 | 5 | 39.09 | 37.00 |
| E.E. | 12.68 | 12 | 1.06 | |

Abreviaturas tabla: F = Fuente de variación; EO = Explantes oxidados; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

Anexo 20. ANOVA de promedios de oxidación de explantes foliares de *A. diversifolia* por tratamiento durante la tercera semana, etapa de desinfección superficial. UES 2017.

| F. de Var.en EO | SC | GL | CM | F |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Total | 200.41 | 17 | | |
| Tipo Trat. | 187.73 | 5 | 37.55 | 35.53 |
| E.E. | 12.68 | 12 | 1.06 | |

Abreviaturas tabla: F = Fuente de variación; EO = Explantes oxidados; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

Anexo 21. ANOVA de promedios de oxidación de explantes foliares de *A. diversifolia* por tratamiento durante la cuarta semana, etapa de desinfección superficial. UES 2017.

| F. de Var.en EO | SC | GL | CM | F |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Total | 195.39 | 17 | | |
| Tipo Trat. | 188.71 | 5 | 37.74 | 67.80 |
| E.E. | 6.68 | 12 | 0.56 | |

Abreviaturas tabla: F = Fuente de variación; EO = Explantes oxidados; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

Anexo 22. Protocolo para el establecimiento aséptico de explantes foliares de *A. diversifolia*.

1. Seleccionar plantas de *A. diversifolia* de 2-3 años de edad, cultivadas bajo condiciones de vivero.
2. Seleccionar y cortar las hojas jóvenes,
3. Depositar hojas en una solución antioxidante compuesta por: ascorbato (100 mg/L) + citrato (150 mg/L), hasta el momento de la aplicación del pretratamiento de desinfección superficial dentro del laboratorio.
4. Sumergir las hojas en agua jabonosa y lavarlas restregando suavemente la superficie de las hojas durante 10 min.
5. Colocar las hojas en un recipiente con agua corriente durante 5 min.
6. Sumergir las hojas en una solución de alcohol etílico al 70% durante 10 seg.
7. Sumergir las hojas inmediatamente en una solución de citrato al 0.5% esterilizada.
8. Trasladar las hojas en solución al interior de una cámara de flujo laminar bajo condiciones asépticas.
9. Realizar los siguientes pasos para la desinfección superficial en cámara:

| Paso 1 | Paso 2 | Paso 3 | Paso 4 | Paso 5 |
|--|---|---|---|---------------------------------------|
| Inmersión en Hipoclorito de sodio (5.25%) por 5 min. | Realizar 3 enjuagues con agua destilada esterilizada, cambiando de recipientes. | Inmersión en Ridomil (20 g/L) por 10 min. | Inmersión en Tetraciclina (0.6 g/L) por 10 min. | Inmersión en Citrato (0.5%) por 1 min |

Nota: El agua utilizada para preparar los desinfectantes dentro de la cámara de flujo laminar debe haber sido previamente esterilizada.

10. Sobre un puente de papel bond esterilizado, proceda a cortar hoja en segmentos de 1 cm² sin porciones basales, apicales ni nervadura central.
11. Sembrar uno o dos explantes en cada frasco con medio de cultivo.
12. Tapar y sellar el frasco con plastic wrap y rotular.
13. Colocar los frascos sembrados en condiciones de oscuridad y temperatura de 24-26°C.
14. Tomar datos de contaminación, oxidación y sobrevivencia semanalmente.

Anexo 23. Promedios de contaminación semanal de explantes foliares de *A. diversifolia* sembrados en diferentes tratamientos de inducción a callo vegetal. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

| Medio | EC S1 | EC S2 | EC S3 | EC S4 | EC S5 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| a | 0 | 1 | 1.66 | 1.66 | 2.33 |
| b | 0 | 1 | 1.33 | 1.33 | 1.66 |
| c | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| d | 0 | 1.33 | 2.33 | 2.33 | 2.66 |
| e | 0 | 1 | 1.33 | 1.33 | 1.33 |
| f | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Abreviaturas de tabla: EC = explantes contaminados; S = semana.

Anexo 24. Porcentajes de contaminación semanal de explantes foliares de *A. diversifolia* sembrados en diferentes tratamientos de inducción a callo vegetal. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

| Medio | EC% S1 | EC% S2 | EC% S3 | EC% S4 | EC% S5 |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| a | 0 | 10 | 16.66 | 16.66 | 23.33 |
| b | 0 | 10 | 13.33 | 13.33 | 16.66 |
| c | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| d | 0 | 13.33 | 23.33 | 23.33 | 26.66 |
| e | 0 | 10 | 13.33 | 13.33 | 13.33 |
| f | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Abreviaturas de tabla: EC = explantes contaminados; S = semana.

Anexo 25. ANOVA de promedios de contaminación de explantes foliares de *A. diversifolia* por tratamiento de inducción a callo vegetal durante la quinta semana, etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

| F. de Var.en EC | SC | GL | CM | F |
|-----------------|-------|----|------|------|
| Total | 38.03 | 17 | | |
| Tipo Trat. | 19.35 | 5 | 3.87 | 2.49 |
| E.E. | 18.68 | 12 | 1.56 | |

Abreviaturas tabla: F = Fuente de variación; EC = Explantes contaminados; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

Anexo 26. Promedios de sobrevivencia semanal de explantes foliares de *A. diversifolia* sembrados en diferentes tratamientos de inducción a callo vegetal. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

| Medio | ES S1 | ES S2 | ES S3 | ES S4 | ES S5 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| a | 10 | 9 | 5.33 | 3.66 | 0 |
| b | 10 | 2.66 | 1.66 | 0.33 | 0 |
| c | 10 | 9.66 | 6.33 | 4.33 | 0 |
| d | 10 | 8.66 | 6 | 4.33 | 0.33 |
| e | 10 | 8.66 | 3 | 1.33 | 0 |
| f | 10 | 10 | 9.66 | 7.33 | 4.66 |

Abreviaturas de tabla: ES = explantes sobrevivientes; S = semana.

Anexo 27. Porcentajes de sobrevivencia semanal de explantes foliares de *A. diversifolia* sembrados en diferentes tratamientos de inducción a callo vegetal. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

| Medio | ES% S1 | ES% S2 | ES% S3 | ES% S4 | ES% S5 |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| a | 100 | 90 | 53.33 | 36.66 | 0 |
| b | 100 | 26.66 | 16.6 | 3.33 | 0 |
| c | 100 | 96.66 | 63.33 | 43.33 | 0 |
| d | 100 | 86.66 | 60 | 43.33 | 3.33 |
| e | 100 | 86.66 | 30 | 13.33 | 0 |
| f | 100 | 100 | 96.66 | 73.33 | 46.66 |

Abreviaturas de tabla: ES = explantes sobrevivientes; S = semana.

Anexo 28. Promedios de oxidación semanal de explantes foliares de *A. diversifolia* sembrados en diferentes tratamientos de inducción a callo vegetal. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

| Medio | EO S1 | EO S2 | EO S3 | EO S4 | EO S5 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| a | 0 | 0 | 3 | 4.66 | 7.66 |
| b | 0 | 6.33 | 7 | 8.33 | 8.33 |
| c | 0 | 0.33 | 3.66 | 5.66 | 10 |
| d | 0 | 0 | 1.66 | 3.33 | 7 |
| e | 0 | 0.33 | 5.66 | 7.33 | 8.66 |
| f | 0 | 0 | 0.33 | 2.66 | 5.33 |

Abreviaturas de tabla: EO = Explante oxidado; S = semana.

Anexo 29. Porcentajes de oxidación semanal de explantes foliares de *A. diversifolia* sembrados en diferentes tratamientos de inducción a callo vegetal. Etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

| Medio | EO S1 | EO S2 | EO S3 | EO S4 | EO S5 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| a | 0 | 0 | 30 | 46.66 | 76.66 |
| b | 0 | 63.33 | 70 | 83.33 | 83.33 |
| c | 0 | 3.33 | 36.66 | 56.66 | 100 |
| d | 0 | 0 | 16.66 | 33.33 | 70 |
| e | 0 | 3.33 | 56.66 | 73.33 | 86.66 |
| f | 0 | 0 | 3.33 | 26.66 | 53.33 |

Abreviaturas de tabla: EO = Explante oxidado; S = semana.

Anexo 30. ANOVA de promedios de sobrevivencia de explantes foliares de *A. diversifolia* por tratamiento de inducción a callo vegetal durante la segunda semana, etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

| F. de Var.en ES | SC | GL | CM | F |
|-----------------|--------|----|-------|-------|
| Total | 133.74 | 17 | | |
| Tipo Trat. | 111.06 | 5 | 22.21 | 11.75 |
| E.E. | 22.68 | 12 | 1.89 | |

Abreviaturas tabla: F = Fuente de variación; ES = Explantes sobrevivientes; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

Anexo 31. ANOVA de promedios de sobrevivencia de explantes foliares de *A. diversifolia* por tratamiento de inducción a callo vegetal durante la tercera semana, etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

| F. de Var.en ES | SC | GL | CM | F |
|-----------------|--------|----|-------|-------|
| Total | 140.01 | 17 | | |
| Tipo Trat. | 117.33 | 5 | 23.47 | 12.42 |
| E.E. | 22.68 | 12 | 1.89 | |

Abreviaturas tabla: F = Fuente de variación; ES = Explantes sobrevivientes; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

Anexo 32. ANOVA de promedios de sobrevivencia de explantes foliares de *A. diversifolia* por tratamiento de inducción a callo vegetal durante la cuarta semana, etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

| F. de Var.en ES | SC | GL | CM | F |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Total | 120.47 | 17 | | |
| Tipo Trat. | 92.45 | 5 | 18.49 | 7.92 |
| E.E. | 28.02 | 12 | 2.34 | |

Abreviaturas tabla: F = Fuente de variación; ES = Explantes sobrevivientes; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

Anexo 33. ANOVA de promedios de sobrevivencia de explantes foliares de *A. diversifolia* por tratamiento de inducción a callo vegetal durante la quinta semana, etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

| F. de Var.en ES | SC | GL | CM | F |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Total | 56.59 | 17 | | |
| Tipo Trat. | 53.25 | 5 | 10.65 | 38.27 |
| E.E. | 3.34 | 12 | 0.28 | |

Abreviaturas tabla: F = Fuente de variación; ES = Explantes sobrevivientes; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

Anexo 34. ANOVA de promedios de oxidación de explantes foliares de *A. diversifolia* por tratamiento de inducción a callo vegetal durante la segunda semana, etapa de evaluación de medios de inducción a callo vegetal. UES 2017.

| F. de Var.en EO | SC | GL | CM | F |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Total | 100.44 | 17 | | |
| Tipo Trat. | 96.43 | 5 | 19.29 | 57.71 |
| E.E. | 4.01 | 12 | 0.33 | |

Abreviaturas tabla: F = Fuente de variación; EO = Explantes oxidados; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

Anexo 35. ANOVA de promedios de oxidación de explantes foliares de *A. diversifolia* por tratamiento de inducción a callo vegetal durante la tercera semana, etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

| F. de Var.en EO | SC | GL | CM | F |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Total | 112.53 | 17 | | |
| Tipo Trat. | 91.85 | 5 | 18.37 | 10.66 |
| E.E. | 20.68 | 12 | 1.72 | |

Abreviaturas tabla: F = Fuente de variación; EO = Explantes oxidados; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

Anexo 36. ANOVA de promedios de oxidación de explantes foliares de *A. diversifolia* por tratamiento de inducción a callo vegetal durante la cuarta semana, etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

| F. de Var.en EO | SC | GL | CM | F |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Total | 103.90 | 17 | | |
| Tipo Trat. | 73.88 | 5 | 14.78 | 5.91 |
| E.E. | 30.02 | 12 | 2.50 | |

Abreviaturas tabla: F = Fuente de variación; EO = Explantes oxidados; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

Anexo 37. ANOVA de promedios de oxidación de explantes foliares de *A. diversifolia* por tratamiento de inducción a callo vegetal durante la quinta semana, etapa de evaluación de medios de cultivo de inducción a callo vegetal. UES 2017.

| F. de Var.en EO | SC | GL | CM | F |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Total | 62.57 | 17 | | |
| Tipo Trat. | 37.89 | 5 | 7.58 | 3.68 |
| E.E. | 24.68 | 12 | 2.06 | |

Abreviaturas tabla: F = Fuente de variación; EO = Explantes oxidados; SC = Suma de cuadrados; GL = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.