

Propagación *in vitro* de *Annona deceptrix* (westra) H. Rainer (*Annonaceae*) una especie en peligro de extinción en Ecuador

In vitro propagation of *Annona deceptrix* (westra) H. Rainer (*Annonaceae*), an endangered species in Ecuador

María Auxiliadora Nevárez Loor ¹*, Fátima Consuelo Macías Ponce ², José Pico-Mendoza ²

¹Programa de Maestría en Biotecnología, Instituto de Posgrado, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador, zip code 130104

²Carrera de Agronomía, Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Técnica de Manabí. Km. 13.5 vía Portoviejo-Santa Ana. Manabí, Ecuador; fima.macias@utm.edu.ec
newthon.pico@utm.edu.ec

* Correspondencia: maria.nevarez@utm.edu.ec



ABSTRACT

This work aims to develop a protocol for the *in vitro* propagation of *Annona deceptrix* (westra) H. Rainer. In addition, it measures survival in *ex-vitro* conditions. Nodal shoot segments were used as explants, disinfected with different NaClO concentrations and exposure times, and then precultured in the Murashige and Skoog (MS) basal culture medium. Woody Plant Medium (WPM) was used for the multiplication and rooting phase, with different types and concentrations of phytohormones. In the establishment phase, the explants responded better with the 1% NaClO treatment for 15 minutes, where the highest survival percentage was observed at 72.04%. For the variable number of shoots and stem diameter, the treatment with BAP (1 mgL⁻¹) + (GA3 0.25 gL⁻¹) + (WPM) reached the best average with a value of 2.00 and 2.35, respectively. Mm, respectively. For root induction, the best response was obtained when 3mgL⁻¹ IBA (T3) was added to the culture medium, reaching an average root length of 5.75 cm after 60 days of culture in the medium. The rooted *Vitro* plants of an approximate height of 5 cm were brought to the mesh house for their acclimatization; in this phase, the survival rate was evaluated during the first week of acclimatization, and the plant's growth fifteen days after sowing in trays containing a peat-based substrate, where T3 had an average survival of 70% and higher plant height at 60 days, indicating that this treatment promoted faster seedling development under conditions *ex-vitro*.

Keywords: *Annona deceptrix*, propagation, *in vitro* rooting, *ex-vitro* acclimatization, growth regulators.

RESUMEN

El presente trabajo como objetivo desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* de *Annona deceptrix* (westra) H. Rainer. Además, medir la sobrevivencia en condiciones *ex vitro*. Como explantes, se usaron segmentos nodales de brotes, que fueron desinfectados con diferentes concentraciones de NaClO y tiempo de exposición, luego fueron precultivados en el medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS). Para la fase de multiplicación y enraizamiento, se utilizó el medio Woody Plant Medium (WPM), con diferentes tipos y concentraciones de fitohormonas. En la fase de establecimiento, los explantes tuvieron mejor respuesta con el tratamiento al 1% de NaClO durante 15 minutos, donde se observó el mayor porcentaje de sobrevivencia con el 72,04%. Para la variable número de brotes y diámetro de tallo, el tratamiento con BAP (1 mgL⁻¹) + (GA3 0,25 gL⁻¹) + (WPM) alcanzó el mejor promedio con un valor de 2,00 y 2,35 mm, respectivamente. Para la inducción

de raíces, la mejor respuesta se obtuvo cuando se adicionó al medio de cultivo 3mgL^{-1} IBA (T3) alcanzando una longitud promedio de raíces de 5,75 cm a los 60 días de cultivo en el medio. Las vitroplantas enraizadas de una altura aproximada de 5 cm, fueron llevados a casa malla, para su aclimatación, en esta fase se evaluó la tasa de sobrevivencia durante la primera semana de aclimatación y el crecimiento de la planta a los quince días después de la siembra en bandejas conteniendo un sustrato a base de turba, donde la cual el T3 tuvo promedio de supervivencia del 70% y mayor altura de la planta a los 60 días, lo que indica que este tratamiento promovió un desarrollo más rápido de las plántulas en condiciones *ex vitro*.

Keywords: *Annona deceptrix*, propagación, enraizamiento *in vitro*, aclimatación *ex vitro*, reguladores de crecimiento.

INTRODUCCIÓN

La *Annona deceptrix*, conocida como anonilla o guineo de monte, es un árbol endémico de la provincia de Manabí, Ecuador. Su hábitat se encuentra en los bosques tropicales estacionalmente secos (BTES), los cuales son reconocidos por su alta diversidad y endemismo, pero también son considerados como los ecosistemas más amenazados a nivel mundial¹. La *A. deceptrix* pertenece a la familia anonáceas, la cual cuenta con alrededor de 25 géneros y 106 especies, de las cuales 19 son endémicas². Estas especies se distribuyen en una altitud que va desde los 0 a 1000 metros sobre el nivel del mar³.

Según la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), León et al.² informa que 16 de las 19 especies endémicas están catalogadas como amenazadas, siendo siete de ellas de peligro crítico, seis en peligro y cuatro vulnerables. En la actualidad se ha reportado pocos estudios sobre *A. deceptrix*, pero ha sido evaluada por la UICN en el 2018 como una especie vulnerable. Sus principales amenazas son las actividades antropogénicas, como el cambio de uso de suelo y la deforestación⁴, además de su característica intrínseca, como la baja capacidad de germinación en condiciones naturales^{1,5}.

Investigaciones realizadas por Lobo et al.⁶ han determinado que en *Annonas spp*, las semillas no poseen la tencia física que les permita absorber agua, lo cual impide a su germinación. En este sentido, Pico et al.⁵ en un estudio, aplicaron estrategias para favorecer la germinación de las semillas, donde determinaron que la escarificación mecánica mejora la germinación en un 100%, lo que favorece la supervivencia de esta especie evitando su extinción.

La propagación vegetativa de *Annonas spp*, a través de injertos es una técnica que proporciona plantas uniformes. Pero sin embargo, en algunos casos, los patrones tardan alrededor de un año para alcanzar su desarrollo óptimo, lo que genera problemas de vigor, productividad y riesgo de transmisión de patógenos^{7,(5)5}. Para la producción de esta especie de planta, se requiere calidad genética y fitosanitarias con el fin de obtener mejores rendimientos en el campo⁸. Sin embargo, en la actualidad existen otras herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* de tejidos, que permiten la propagación de plantas de manera más rápida y masiva, libres de patógenos y virus.

En la actualidad, el cultivo *in vitro* de tejido vegetales se ha convertido en una herramienta para la propagación de plantas de interés, especialmente en peligro de extinción, endémicas, raras, medicinales entre otras⁹. Esta técnica permite obtener plantas uniformes con alta riqueza genética en un corto periodo de tiempo, lo que la convierte en una herramienta clave para la supervivencia y explotación de estas especies¹⁰. Por lo tanto, a través de esta técnica, se planteó desarrollar un protocolo para la multiplicación de *A. deceptrix*, abarcando las etapas de establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación *ex vitro* de las plántulas.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí, ubicada en la parroquia Lodana del cantón Santa Ana de la provincia de Manabí, Ecuador con coordenadas 01° 09' 51" S y 80°23'24" O.

Material vegetal

El material vegetal utilizado en la presente investigación se obtuvo de plantas obtenidas de la germinación de frutos maduros, colectados en el bosque protector Cerro Pata de Pájaro, ubicado en el Cantón Pedernales con las coordenadas 00° 01' 66" de latitud Norte y 79° 58'33" de latitud Oeste. Las plántulas se cultivaron en invernaderos ubicados en la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica Manabí.

Desinfección del material vegetal y establecimiento *in vitro*

Se utilizaron como explantes, segmentos nodales de *A. deceptrix*, que contenían dos yemas vegetativas. Los explantes se lavaron con agua destilada estéril y dos gotas de jabón líquido, luego se enjuagaron con agua destilada estéril para eliminar residuos de jabón. En condiciones de cámara de flujo laminar, los explantes se colocaron en alcohol al 70% por 30 segundos, se enjuagaron tres veces y se pasaron a frascos esterilizados que contenían una solución de hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones más 2 gotas de Tween 20 x cada 100 mL de solución desinfectante en diferente tiempo de exposición (Tabla 1). Seguido a esto, se procedió a lavar tres veces para eliminar los tejidos afectados por el desinfectante y finalmente se sumergieron en una solución estéril de cisteína 50 ppm (antioxidante), durante 10 minutos antes de sembrar.

Los explantes fueron colocados en medio semisólido previamente esterilizado de Murashige y Skoog (MS) 4,3 gL⁻¹ (Murashige & Skoog 1962), suplementando con 30 g de azúcar + 5 ppm de cisteína, como agente gelificante se utilizó Agar, Plant TC (7,0 gL⁻¹) el pH se ajustó a 5,7 utilizando con HCL o KOH al 0,1 N. El medio estaba contenido en tubos de ensayos estéril con un volumen de 7 mL, posterior a esto se realizó la siembra de los explantes dentro de una cámara de flujo laminar, tener medio asépticos. Los cultivos *in vitro* se colocaron en un cuarto de incubación, donde las condiciones ambientales fueron: fotoperiodos de 16 horas de luz y temperatura entre 16 a 22°C.

En la etapa de establecimiento, se procedió a evaluar el porcentaje de explantes contaminados con hongos, bacterias, presencia de oxidación y sobrevivencia, considerando las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y el tiempo de desinfección, como se observa en la Tabla 1. El ensayo se realizó con 10 unidades experimentales por cada tratamiento, para luego proceder con la fase de multiplicación. Las evaluaciones se realizaron siete días después de la siembra, tomando valoración cada siete días durante veintidós días.

Tratamientos	Hipoclorito de sodio concentración (%NaClO)	Tiempo de exposición (minutos)	Medio de cultivo
T1	2	20	(MS)
T2	1	15	(MS)
T3	1	10	(MS)
T4	0,5	10	(MS)

MS: Medio Murashige y Skoog.

Tabla 1: Tratamientos para la fase de establecimiento *in vitro* en *A. deceptrix* con diferentes concentraciones de NaClO y tiempos de exposición.

Fase de multiplicación *in vitro*

Los explantes obtenidos en la fase de establecimiento con cuatro semanas de edad, se transfirieron al medio Woody Plant Medium (WPM) suplementado con vitaminas como tiamina 1 mg L^{-1} , inositol 100 mg L^{-1} y elantioxidante cisteína 50 mg L^{-1} . Además, se adicionaron las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento como se observa en la Tabla 2. El pH del medio se ajustó a 5,7 antes de adicionar el agar. En cada tratamiento se cuantificó el número promedio de brotes, número de hojas, el diámetro (mm) y altura (cm) de la planta se midió con la ayuda de un calibrador.

Tratamientos	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento vegetal + concentraciones (mg L^{-1})
T1	WPM	BAP (1 mg L^{-1}) + (GA3 $0,25\text{ g L}^{-1}$)
T2	WPM	BAP ($1,5\text{ mg L}^{-1}$) + (GA3 $0,25\text{ g L}^{-1}$)
T3	WPM	BAP ($2,0\text{ mg L}^{-1}$) + (GA3 $0,25\text{ g L}^{-1}$)
T4	WPM	KINETINA (1 mg L^{-1}) + (GA3 $0,25\text{ g L}^{-1}$)
T5	WPM	KINETINA ($1,5\text{ mg L}^{-1}$) + (GA3 $0,25\text{ g L}^{-1}$)
T6	WPM	KINETINA ($2,0\text{ mg L}^{-1}$) + (GA3 $0,25\text{ g L}^{-1}$)
T7	WPM	

BAP: 6-Bencilaminopurina; GA: giberelinas

Tabla 2: Tratamientos para la fase de multiplicación *in vitro* en *A. deceptrix*, con diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento.

Fase de enraizamiento *in vitro*

En esta fase se utilizaron los explantes provenientes de la multiplicación. El medio de cultivo que se utilizó para el enraizamiento fue el Woody Plant Medium (WPM) suplementado con diferentes concentraciones de auxinas Tabla 3. Además, se agregó 30 g L^{-1} de sucrosa + 1 mg L^{-1} de tiamina + inositol 100 mg L^{-1} + cisteína 50 mg L^{-1} , ajustado a un pH de 5,7 antes de adicionar el agar. Como variables se evaluó la longitud de las raíces (cm) y altura del brote enraizado (cm).

Tratamientos	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	Reguladores de crecimiento vegetal + concentraciones (mg L^{-1})
T1	WPM	IBA	1
T2	WPM	IBA	2
T3	WPM	IBA	3
T4	WPM	IAA	1
T5	WPM	IAA	2
T6	WPM	IAA	3
T7	WPM	ANA	1
T8	WPM	ANA	2
T9	WPM	ANA	3
T10	WPM		

IBA: ácido indolbutírico; IAA: ácido indol-3-acético; ANA: Ácido naftalenacético

Tabla 3. Tratamientos para la fase de enraizamiento *in vitro* en *A. deceptrix*, con diferentes tipos y concentraciones de auxinas.

Análisis estadístico

En todas las fases se usó un Diseño completamente al Azar (DCA), donde se evaluaron tres niveles diferentes en cada uno de los tratamientos. Los datos se sometieron análisis de varianza ANOVA y comparación de medias mediante la prueba de Tukey $<0,05$.

Fase *ex vitro*

Las plántulas enraizadas, se procedió a lavar con agua destilada hasta eliminar por completo los residuos de agar. Luego fueron sembradas en bandejas con turba estéril, donde permanecieron por 60 días en un ambiente de casa malla donde la radiación solar era baja, para evitar problemas de deshidratación. En esta fase se determinó la tasa de supervivencia y altura de la planta. Las mediciones se realizaron cada semana durante cuatro semanas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase de establecimiento

El mejor tratamiento en la fase de establecimiento se obtuvo cuando los explantes fueron sometidos hipoclorito de sodio al 1% durante 15 minutos (T2), alcanzando un 72,04% de supervivencia (figura 1). Estudios reportados por López et al. y Ramírez et al.^{11,12} indican que en concentraciones de 0 y 0,05% se obtiene baja viabilidad por lo que encontraron altos niveles de contaminación microbiana en los explantes, y a dosis mayor a 2% se reportó un efecto tóxico, mostrando necrosis en los explantes en *Annona muricata* L, por lo que consideran concentraciones de 0,5 a 1% con tiempos de exposición de 5 a 10 minutos, estos resultados coinciden con los datos obtenidos en esta investigación, donde se demostró que a mayor tiempo de exposición se tuvieron mejores resultados.

La concentración de NaOCl y el tiempo de exposición de la mismas, no tiene impacto significativo en el porcentaje de contaminación ($p>0,05$). Estudios realizados por Echenique y Mollo¹³ demuestran que el tiempo de exposición de NaOCl no influye de manera significativa en el porcentaje de contaminación de los segmentos nodales de la *Annona muricata* L, donde obtuvo una tasa de supervivencia del 30% utilizando una concentración del 5% y un tiempo de exposición de 10 minutos.

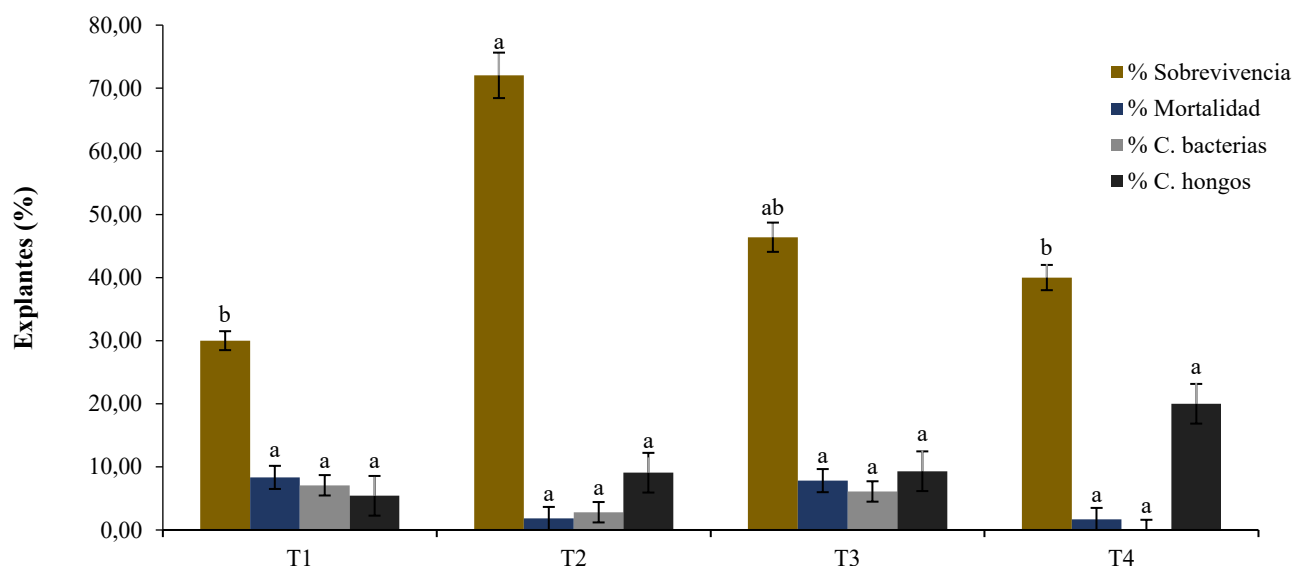


Figura 1: Establecimiento de explantes de *A. deceptrix*. Los valores corresponden al promedio por cada unidad experimental, las letras son los grupos homogéneos en cada parámetro evaluado de acuerdo al análisis de Tukey $p<0,05$.

Fase de multiplicación

Solis *et al.*¹⁴ observaron que el número de brotes es una variable importante en la fase de multiplicación, ya que está relacionado con una buena tasa de multiplicación. Así mismo. En la fase de multiplicación, el tratamiento con BAP (1 mg L^{-1}) + (GA3 $0,25 \text{ g L}^{-1}$) + WPM (T1) mostró mejor respuesta con un número de $2,00 \pm 0,47$ por explante, además, se observó mayor diámetro del tallo con un promedio de $2,35 \pm 0,34 \text{ mm}$, con respecto a los otros tratamientos (Figura 2). Este resultado se asemeja a lo reportado por Ahmed *et al.*, y Ba *et al.*^{15,16} donde indican que BAP fue más eficiente que la Kinetina para la regeneración y el alargamiento de brotes.

Con respecto a las concentraciones de los reguladores de crecimiento, estas no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) para el número de hojas por brotes, sin embargo, para las variables número de brotes, altura y diámetro mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Según estudios de Nagori y Purohit, Therezan *et al.*^{17,18}, se constató que, al iniciar el cultivo de explantes de *Annona squamosa* en un medio MS que contenía ácido bencenoacético (BA), e incluso después de realizar subcultivos repetidos, así como al aplicar una combinación de ácido giberélico (GA3) junto con BA, no se observó un aumento notable en el crecimiento de los explantes.

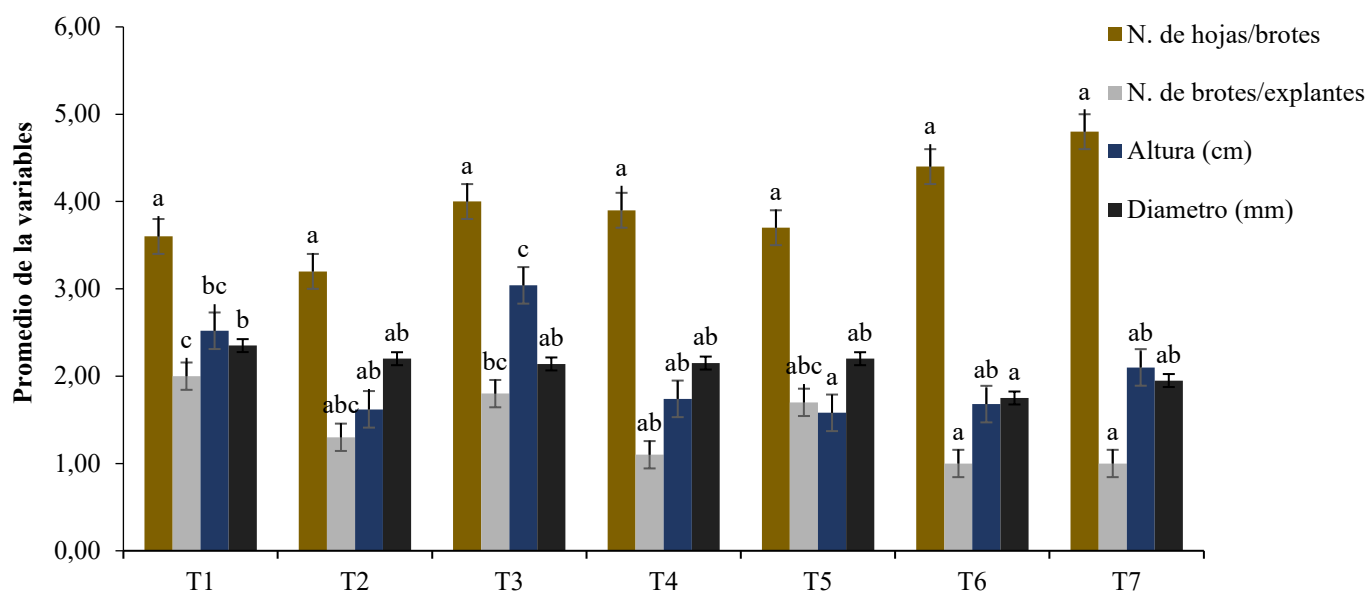


Figura 2: Multiplicación de explantes de *A. deceptrix*. T1, BAP (1 mg L^{-1}) + (GA3 $0,25 \text{ g L}^{-1}$); T2, BAP ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) + (GA3 $0,25 \text{ g L}^{-1}$); T3 BAP ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) + (GA3 $0,25 \text{ g L}^{-1}$); T4, KINETINA (1 mg L^{-1}) + (GA3 $0,25 \text{ g L}^{-1}$); T5, KINETINA ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) + (GA3 $0,25 \text{ g L}^{-1}$); T6, KINETINA ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) + (GA3 $0,25 \text{ g L}^{-1}$), T7, sin reguladores de crecimiento. Los valores corresponden al promedio de 10 repeticiones por tratamiento \pm la desviación estándar y las letras son los grupos homogéneos en cada parámetro evaluado de acuerdo al análisis de Tukey $p < 0,05$.

Por lo contrario Mollohuanca *et al.*¹⁹ manifiestan que con la aplicación de citoquininas BAP se obtiene altos valores en cuanto al número de brotes en la fase de multiplicación a partir de explantes en condiciones *in vitro*, además indican que a mayor concentración de BAP disminuye la dominancia apical, además hojas y yemas deformadas, por lo contrario, concentraciones menores de citoquininas favorece la elongación celular y disminuye la división celular^{18,20}.

Fase de enraizamiento

El crecimiento de la raíz es regulado por señales endógenas que mantiene la actividad de los meristemos apicales de la misma, contribuyendo a la generación de raíces laterales, siendo las auxinas las que juegan un papel importante en esta etapa²¹. En la fase de enraizamiento, de todos los tratamientos aplicados, solo los tratamientos T3, T4 y T5 tuvieron formación de raíces, sin embargo, el tratamiento T3: 3mgL⁻¹ IBA, tuvo los valores más altos en las variables evaluadas, con una longitud promedio de raíces de 5,75 cm, número promedio de raíces secundaria 2,80 y altura promedio de la planta de 2,61 cm (Figura 3); lo que pone en evidencia el efecto de la auxina sobre la elongación de las raíces de *A. deceptrix*.

Sin embargo, IAA en bajas concentraciones logró un efecto en el desarrollo de las raíces, mientras que ANA no tuvo efecto alguno, al contrario de lo reportado por Ramos y Canchignia²² donde determinaron que la aplicación de ANA, presentó mejores resultados en la longitud de las raíces de *A. muricata*. Autores indican que las plantas pueden obtener IAA a partir de la β - oxidación de IBA dado en los peroxisomas²³. Pérez et al.,²⁴ indican que IBA tiene un bajo poder en la liberación de auxínica, pero es excelente en la generación rizógena y en su estudio obtuvieron mejores resultados utilizando 2 mg L⁻¹ de IBA en *A. muricata*.

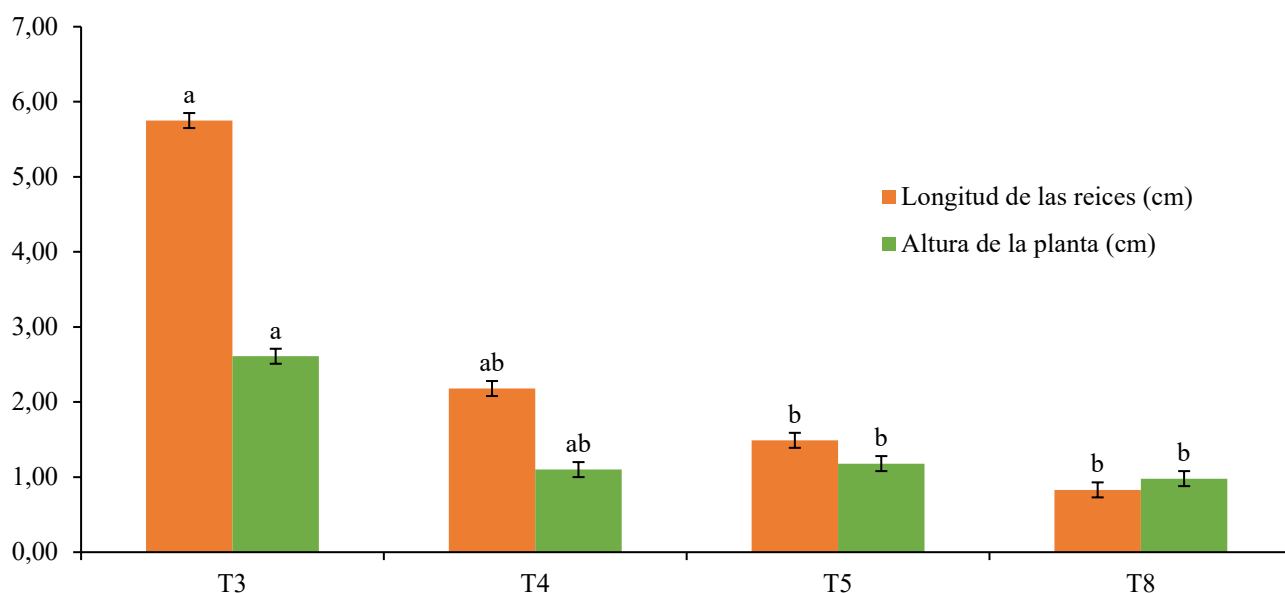


Figura 3: Enraizamiento *in vitro* de *A. deceptrix*. T3, IBA (3 mg L⁻¹); T4, IAA (1 mg L⁻¹); T5 IAA (2mg L⁻¹); T8, ANA (2 mg L⁻¹). Los valores corresponden al promedio de 10 repeticiones por tratamiento \pm la desviación estándar y las letras son los grupos homogéneos en cada parámetro evaluado de acuerdo al análisis de Tukey $p < 0,05$.

De acuerdo con el análisis estadístico el tipo de auxina influye significativamente ($p < 0,05$) en el desarrollo de las raíces, donde estos resultados se asemejan a lo reportado por Cárdenas et al.²⁵, Castro y Sánchez²⁶, donde también resultaron estadísticamente diferente la aplicación de varias auxinas y el uso de IBA, estimuló el enraizamiento en más del 80% en *Solanum dolichosepalum* y *Eucalyptus pellita*.

Fase *ex vitro*

El enraizamiento es importante para la fase de aclimatación *ex vitro*, debido a que, la planta requiere las raíces necesarias para un mejor desarrollo en el sustrato, además de poder inducir a la formación de nuevas raíces y pelos absorbentes que extraerá los nutrientes necesarios para el crecimiento¹⁴. En la fase de aclimatación de los explantes de *A. deceptrix*, se puede observar en la Tabla 1, que el T3 (3mg L⁻¹ IBA) tuvo mayor porcentaje

de sobrevivencia con un 70%, mientras que el T4 (1 mg L⁻¹ IAA) y T5 tuvieron (2 mg L⁻¹ IAA) alcanzaron un 20%.

Tratamiento	Número de vitroplantas inicial	Número de vitroplantas a los 60 días de aclimatación	Sobrevivencia (%)
T3	10	7	70
T4	10	2	20
T5	10	2	20
T8	10	1	10

Tabla 4: Porcentaje de sobrevivencia de los brotes de *A. deceptrix* en condiciones *ex vitro*.

En la Figura 4, se muestra el crecimiento de la planta en cada uno de los tratamientos que obtuvieron mejores respuestas en la fase de enraizamiento, el T3 (3mg L⁻¹ IBA) tuvo un crecimiento de 2,95 cm a los 60 días de aclimatación *ex vitro*, seguido del T4 (1 mg L⁻¹ IAA) con un crecimiento de 2,48 cm, lo cual demuestra que las concentraciones y auxinas utilizadas por su efecto auxínico favorece al proceso de rizogénesis. Pedrotti y Voltolini²⁷, demostraron que la dosis de IBA no afectó la longitud de las raíces de microestacas de manzanas en condiciones *ex vitro*. Pero, sin embargo, en la investigación, se observó que si incide el uso de diferentes reguladores de crecimiento en la fase *ex vitro*.

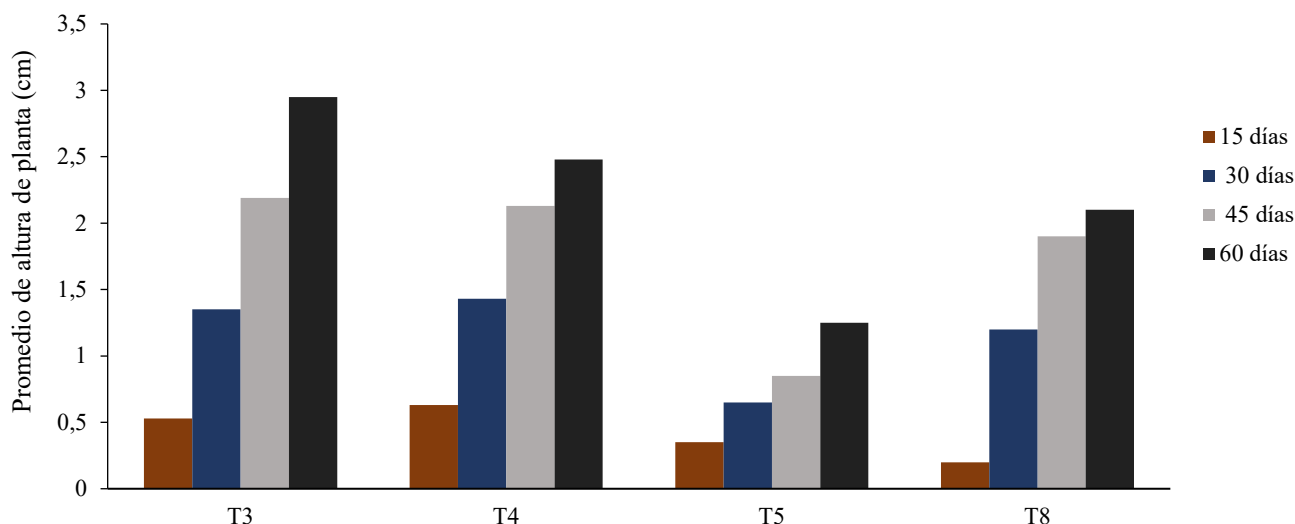


Figura 4: Crecimiento de los brotes de *A. deceptrix* en condiciones *ex vitro* durante los 60 días de muestreo. T3, IBA (3 mg/L); T4, IAA (1 mg/L); T5 IAA (2mg/L); T8, ANA (2 mg/l).

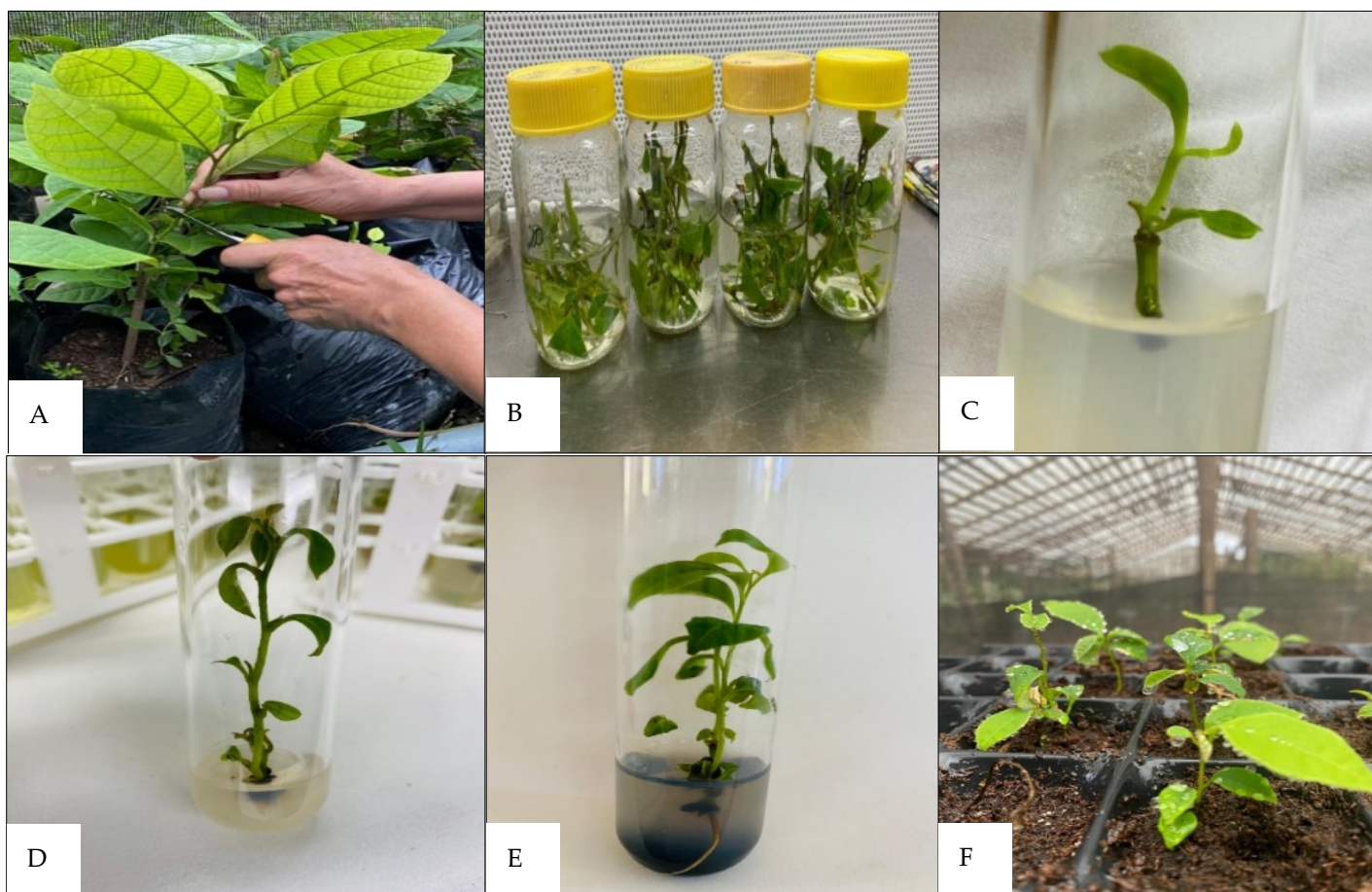


Figura 5: Fases de la propagación *in vitro* de *A. deceptrix*; A: Planta madre. B: Desinfección de la materia vegetal. C: Establecimiento *in vitro* de los explantes. D: multiplicación *in vitro*. E: enraizamiento *in vitro*. F: Aclimatización *ex vitro* de las plántulas obtenidas.

El ácido Indolbutírico (IBA) ayuda a la estimulación del alargamiento celular o su depresión de acuerdo a la concentración en la que se trabaja, además actúa en diferentes actividades de la planta como en la formación de raíces, crecimiento del tallo, abscisión de hojas y frutos, inhibición de las yemas laterales, también, activa las células del cambium en el tejido vascular²².

La micropropagación de *A. deceptrix* se logró con éxito mediante la optimización de diferentes etapas. El uso de hipoclorito de sodio al 1% durante 15 minutos resultó óptimo para el establecimiento de explantes, coincidiendo con estudios previos que reportan toxicidad a concentraciones mayores. En la fase de multiplicación, la combinación de BAP (1 mg L⁻¹) y GA3 (0,25 g L⁻¹) en medio WPM promovió el desarrollo de brotes, destacando la influencia del BAP en la regeneración, como lo indican Ahmed et al. y Ba et al. El enraizamiento se logró con la aplicación de IBA (3 mg L⁻¹), confirmando su papel en la elongación de raíces, aunque difiere de Ramos y Canchignia quienes obtuvieron mejores resultados con ANA en *A. muricata*. Finalmente, la aclimatización *ex vitro* fue más exitosa en plantas enraizadas con IBA, alcanzando un 70% de supervivencia. Estos resultados demuestran la importancia de optimizar las concentraciones de reguladores de crecimiento en cada fase para la micropropagación eficiente de *A. deceptrix*. Se resalta el rol del IBA no solo en la rizogénesis, sino también en otros procesos fisiológicos de la planta.

CONCLUSIONES

Durante la fase de establecimiento, se demostró que el tratamiento más efectivo para la desinfección de los explantes fue la aplicación de NaClO al 1% durante 15 minutos. En la fase de multiplicación, se encontró que el medio con una menor concentración de reguladores de crecimiento, es decir, BAP (1 mg L⁻¹) + GA3 (0,25g L⁻¹) + WPM, resultó con un mayor número de brotes y un diámetro de tallo promedio de 2,00 mm y 2,35 mm, respectivamente. Estos resultados podrían tener implicaciones económicas favorables para la propagación de *A. deceptrix*. En la fase de enraizamiento, el tratamiento con una concentración de 3 mg L⁻¹ de IBA arroja valores altos en las variables estudiadas. Además, este tratamiento promovió un desarrollo más rápido de las plántulas en condiciones *ex vitro*, logrando el mayor porcentaje (70%) de plantas adaptadas a condiciones *ex vitro*

Contribuciones de los autores

Todos los autores contribuyeron con la ejecución y la redacción de este artículo.

Financiamiento

Este trabajo no fue financiado por ninguna institución

Declaración de la Junta de Revisión Institucional

Trabajo inédito

Agradecimientos

A la Universidad Técnica de Manabí (UTM) y a su Programa de Maestría en Biotecnología del Instituto de Posgrado.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. Espinoza C, De la Cruz M, Luzuriaga L, Escudero A. Bosques tropicales secos de la región Pacífico Ecuatorial: diversidad, estructura, funcionamiento e implicaciones para la conservación. *Asoc Española de Ecol Terr.* 2012;21(1):167–79.
2. León S, Valencia R, Pitman N, Endara L, Ulloa C, Navarrete H. Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador [Internet]. 2da ed. Quinto: Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador; 2019. Available from: <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo>
3. Jimenez A, Tapia M, Cabrera C, Pionce G. Investigaciones de Pregrado sobre la Ecología del Bosque Seco Tropical. Runaiki. Manabí; 2020. 129 p.
4. Erkens R. *Annona deceptrix*. The IUCN Red List of Threatened Species 2021: e.T42828A176434191. 2021;
5. Pico J, Pinoargote M, Madrid L, Flor J, Álava J, Sancán G, et al. Germination Capacity of *Annona deceptrix* (Westra) H. Rainer (Annonaceae) an Endemic and Endangered Species in Manabí, Ecuador. *Indian J Agric Res.* 2020;54(3):329–35.
6. Lobo M, Delgado O, Régulo J, Fernández E, Medina C. Categorización de la germinación y la latencia en semillas de chirimoya (*Annona cherimola* L.) y guanábana (*Annona muricata* L.), como apoyo a

- programas de conservación de germoplasma. Agron Colomb [Internet]. 2007;25(2):231–44. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180320296005>
7. Puc C, Cituk D, Villanueva C, Pinzón L. Compatibilidad de injertación en tres clones de guanábana. *Agroproductividad*. 2018;11(10):71–4.
 8. García L, Álvarez J, Alvarado Y, González M, La O M, Mirabal D, et al. Establecimiento in vitro de segmentos nodales de plantas jóvenes de *Annona muricata* L. *Biotechnol Veg*. 2012;12(4):229–34.
 9. Shekhawat M, Kannan N, Manokari M, Ravindran C. In vitro regeneration of shoots and ex vitro rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures. *J Genet Eng Biotechnol* [Internet]. 2015;13(2):209–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.08.002>
 10. Jiménez A, Zhindón B, Indacochea B, Ramos M. explantation disinfection protocols micropropagation of *Cedrela odorata* L. *UNESUM-Ciencias Rev Científica Multidiscip*. 2017;1(2):1–6.
 11. Ramírez M, Urdeta A, León de Sierralta S. Establecimiento in vitro de explantes adultos del guanábano (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. *Rev la Fac Agron* [Internet]. 2002;19(1):48–55. Available from: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182002000100005&lng=es&nrm=iso
 12. López P, Iracheta L, Castellanos M, Méndez I, Francisco J, Gutiérrez A, et al. Campo Experimental Rosario Izapa. INIFAP. Carretera Tapachula-Cacahoatan, km 18. *Rev Mex Ciencias Agrícolas*. 2011;2:645–57.
 13. Echenique M, Mollo A. Establecimiento in vitro de segmentos nodales de guanabana (*annona muricata* l.) En la estación experimental sapecho - bolivia. *Rev Investig e Innovación Agropecu y Recur Nat* [Internet]. 2020;7(1):62–8. Available from: http://www.scielo.org.bo/pdf/riiarn/v7n1/v7n1_a09.pdf
 14. Solis L, Olivera S, Rosa R. Propagación in vitro de *Carica papaya* var. PTM-331 a partir de meristemas apicales. *Rev Peru Biol*. 2011;18(3):343–7.
 15. Ahmed A, Al-Olayan E, Aboul M, Al-Khedhairi A. The immune enhancer, thymoquinone, and the hope of utilizing the immune system of *Aedes caspius* against disease agents. *African J Biotechnol*. 2010;9(21):3183–95.
 16. Ba O, Dieme A, Ndoeye AL, Sy MO. In Vitro Clonal Propagation from Juvenile and Different Explant Types of Two Edible Annonaceae Species: *Annona muricata* L. and *Annona squamosa* L. *Adv Biosci Biotechnol*. 2021;12(12):458–80.
 17. Nagori R, Purohit SD. In vitro plantlet regeneration in *Annona squamosa* through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segments. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2004;99(1):89–98.
 18. Therezan R, Paiva R, Silva L. In vitro culture of *Annona emarginata* : A rootstock for commercial annonaceae species Cultivo in vitro de *Annona emarginata* : Porta-enxerto para espécies de anónaceas comerciais In vitro culture of *Annona emarginata* : A rootstock for commercial annonaceae. *Plant cell Cult y Micropropag*. 2016;12(1):1–6.
 19. Mollohuanca C, Mayta L, Bardales R. Growth Regulators (BAP and ANA) for in vitro Propagation of *Queñoa* (*Polylepis rugulosa* Bitter). *Manglar*. 2021;18(2):207–13.
 20. Cob J, Ríos D, María A, Cartes P, Sánchez M. Organogénesis directa para la propagación in vitro de *Quillaja saponaria* Molina en Sudamérica Austral. *Rev Mex Ciencias For*. 2017;7(34):057–67.
 21. Jovanovic M, Lefebvre R, Laporte P, Rizzo S, Frugier F, Brie C, et al. How the Environment Regulates Root Architecture in Dicots I. Introduction. *Adv Bot Res*. 2008;35–74.

22. Ramos R, Canchignia H. Propagación de Guanábana (*Annona muricata*) utilizando ANA (Ácido Nafalenacético) y AIB (Ácido Indolbutírico) en el Cantón Quevedo año 2015 [Internet]. Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2016. Available from: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/4314/1/T-UTEQ_0247.pdf
23. Jordán M, Casaretto J. Hormonas y Reguladores del Crecimiento : Auxinas , Giberelinas y Citocininas. In: Fisiología Vegetal [Internet]. Universida. La Serena, Chile; 2006. p. 1–28. Available from: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>
24. Pérez V, Panduro N, Sánchez J, Chuyma M, Villegas P. Indolbutírico en el enraizamiento de estaquillas de *annona muricata* « guanábana » en cámara de subirrigación. *Folia Amaz.* 2019;28(1):33–41.
25. Cárdenas C, Pacheco J, Vanzela A. Propagación in vitro de *Solanum dolichosepalum* (Solanaceae). 2016;7(2):9–22.
26. Castro D, Sánchez G. Propagación clonal in vitro de *eucalyptus pellita* f. Muell a partir de árboles plus. *Temas Agrar.* 2010;15(1):34–43.
27. Pedrotti E, Voltolini J. Enraizamento ex vitro e aclimatização do porta-enxerto de macieira m.9. *Rev Bras Frutic Jaboticabal.* 2001;23(2):234–9.

Received: October 9th 2023/ **Accepted:** January 15th 2024 / **Published:** 15 February 2024

Citation: Nevárez- Loor M. A., Macías- Ponce F. C., Pico-Mendoza J. *In vitro* propagation of *Annona deceptrix* (westra) H. Rainer (Annonaceae) an endangered species in Ecuador. *Bionatura Journal* 2024; 1 (1)17. <http://dx.doi.org/10.70099/BJ/2024.01.01.17>

Additional information Correspondence should be addressed to maria.nevarez@utm.edu.ec

ISSN. 3020-7886

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2024 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).