

Uso de L-Cisteína para el control de oxidación in vitro de Annona muricata L. *Use of L-Cysteine for the control of in vitro oxidation of Annona muricata L.*

Cruz-Gutiérrez Esmeralda Judith,
Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP. Boulevard de la biodiversidad 400, Rancho las Cruces,
47600 Tepatitlán de Morelos, Jal.
cruz.esmeralda@inifap.gob.mx

Hernández-Fuentes Luis Martín
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP-Campo Experimental Santiago
Ixcuintla. Apdo. Postal 100, Santiago Ixcuintla, NAY 63300, México.
hernandez.luismartin@inifap.gob.mx

Gómez-Reyes Luis Alberto
Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP. Boulevard de la biodiversidad 400, Rancho las Cruces,
47600 Tepatitlán de Morelos, Jal.
gomez.luis@inifap.gob.mx

Recibido 09, agosto, 2019

Aceptado 24, septiembre, 2020

Resumen

La guanábana (*Annona muricata* L.) es muy apreciada por sus cualidades organolépticas y nutritivas de su fruto. El empleo del cultivo in vitro de tejidos para la propagación vegetativa de árboles de guanábana, puede contribuir a incrementar la disponibilidad de plantas para el desarrollo de plantaciones en campo, además de que es una forma de obtener poblaciones morfológicas y genéticamente estables en frutales. Por ello, es necesario desarrollar métodos eficientes para el establecimiento in vitro, ya que se presentan dificultades en este proceso, por lo que este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de L-Cisteína y polivinilpirrolidona (PVP) para controlar la oxidación en explantes in vitro de guanábana. Primeramente, se realizó un protocolo de desinfección de tejido vegetal de guanábana, para posteriormente establecerlo en condiciones de in vitro. Se sembraron en tubos de ensayo con 10 ml de medio nutritivo MS al 50 %, 20 g/l de sacarosa, pH 5.8 y combinaciones de L-Cisteína con PVP. Se evaluó el grado de oxidación, contaminación y la sobrevivencia de los explantes. Se concluyó con estos resultados que concentraciones 50 mg/L L-Cisteína y 1 g/L PVP mostraron el menor índice de oxidación, aunque con menor porcentaje de sobrevivencia. En contraste, concentraciones de 150 mg/L L-Cisteína con 1 g/L PVP, 10 mg/L L-Cisteína con 5 g/L PVP y 50 mg/L L-Cisteína con 5 g/L PVP mostraron el mayor índice de sobrevivencia, pero mayor oxidación. Los resultados anteriores sugieren que en estudios posteriores habrá que seguir realizando combinaciones de L-Cisteína con PVP con el propósito de evitar la oxidación y aumentar la sobrevivencia de los explantes de Guanábana.

Palabras clave: L- Cisteína, guanábana, oxidación fenólica, PVP.

JEL Classification System: C9; **Mathematics Subject Classification (2020):** 61P99

Abstract

*The soursop (*Annona muricata* L.) is very appreciated for its organoleptic and nutritive qualities of its fruit. The use of in vitro culture of tissues for the vegetative propagation of guanabana trees, can contribute to increase the availability of plants for the development of plantations in the field, besides that it is a way to obtain morphological and genetically*

stable populations in fruit trees. For this reason, it is necessary to develop efficient methods for in vitro establishment, since there are difficulties in this process, so this work aimed to evaluate the effect of different concentrations of L-Cysteine and polyvinylpyrrolidone (PVP) to control oxidation in guanabana in vitro explants. Firstly, a disinfection protocol was carried out on guanabana plant tissue, to be subsequently established under in vitro conditions. They were seeded in test tubes with 10 ml of 50% MS nutrient medium, 20 g/l of sucrose, pH 5.8 and combinations of L-Cysteine with PVP. The degree of oxidation, contamination and survival of the explants was evaluated. It was concluded with these results that concentrations 50 mg/L L-Cysteine and 1 g/L PVP showed the lowest oxidation index, although with a lower percentage of survival. In contrast, concentrations of 150 mg/L L-Cysteine with 1 g/L PVP, 10 mg/L L-Cysteine with 5 g/L PVP and 50 mg/L L-Cysteine with 5 g/L PVP showed the highest index of survival, but greater oxidation. The previous results suggest that in subsequent studies it will be necessary to continue making combinations of L-Cysteine with PVP to avoid oxidation and increase the survival of the soursop explants.

Keywords: L- Cysteine, soursop, phenolic oxidation, PVP.

1. INTRODUCCIÓN

La guanábana (*Annona muricata* L.), es una planta de la familia Anonácea, de importancia económica debido a su creciente demanda, atribuido a las características organolépticas y nutritivas de su fruto (Acosta et al., 2011), además de que en los últimos años se han publicado diversos estudios que revelan que sus compuestos tienen actividad antitumoral, antihelmíntica, antimalárica, antiprotozoaria, insecticida, antimicrobiana, antifúngica e inmunodepresiva (Rajesh y kala, 2015). La guanábana hasta ahora se ha propagado de forma convencional utilizando métodos de propagación vegetativa y por semilla. El empleo del cultivo in vitro de tejidos para la propagación vegetativa de árboles de guanábana, puede contribuir a incrementar la disponibilidad de plantas para el desarrollo de plantaciones en campo, además que es una forma de obtener poblaciones morfológicas y genéticamente estables en frutales (Bring, 2000). Sin embargo, esta especie ha presentado grandes dificultades para el establecimiento in vitro debido a su alto grado de oxidación fenólica (Azofeifa, 2009), además de otras dificultades observándose alta contaminación microbiana y bajos porcentajes de brotación de las yemas (Bring, 2000), que resultan ser una de las principales limitantes, con importantes implicaciones prácticas y económicas.

Por otro lado, el PVP es una poliamida, que inicialmente se utilizó como adsorbente en la técnica de separación por cromatografía de sustancias ácidas aromáticas, aldehídos y fenoles. Para el caso de los fenoles, estos son adsorbidos a través de uniones hidrógeno, previniendo su oxidación y polimerización (George 1996). El PVP ha sido utilizado en la prevención del oscurecimiento de tejidos, ya sea, aplicado como enjuague al explante o mediante su incorporación al medio de cultivo. El PVP se ha aplicado como tratamiento al momento de separar el explante de la planta donadora (Amin y Jaiswal 1988), como pretratamiento anterior o posterior al proceso de desinfección (Gannoun et al. 1995, Figueiredo et al. 2001). También se han utilizado los antioxidantes para el cultivo de células vegetales in vitro el ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (AC) y la cisteína (CIS), este último se ha utilizado en café a una dosis de 10-50 mg/L (Monco et al., 1977), en caña de azúcar a una concentración de 100 mg/L (Villalobos y Arias, 1987) y en Musa a una concentración de 50 mg/L (Jarret et al., 1985), evitando la oxidación de los explantes.

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de L-cisteína y PVP para controlar la oxidación en explantes in vitro de guanábana, se evaluó el grado de oxidación, contaminación y la sobrevivencia de los explantes in vitro.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectó material vegetal de árboles de guanábana que se encuentran en campo en Compostela, Nayarit. Se les realizó un pretratamiento con fungicida y antibiótico, se asperjaron con Captan 2 g /L, Benomilo 1 g/L y Estreptomicina 2 g/L. Las aspersiones se hicieron cinco, tres y un día previo a la recolección del material vegetal. Los explantes se colocaron en frascos con agua bidestilada para posteriormente trasladarlas al Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP (CNRG-INIFAP). En el Laboratorio de cultivo in vitro y crioconservación, se realizaron los protocolos de establecimiento. Se lavaron con agua corriente y jabón. Se colocaron en alcohol al 70% durante 2 min, después en una solución de cloro comercial (5.25% de hipoclorito de sodio) al 30%, durante 15 min y finalmente se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril. Se sumergieron en ácido ascórbico al 1% durante 1 h. Se sembraron en tubos de ensayo con 10 ml de medio nutritivo MS al 50%, 20 g/l de sacarosa, pH 5.8 y combinaciones de L-Cisteína con PVP, ver Tabla 1. El experimento se realizó en un diseño factorial completamente al azar 2x2 con diez repeticiones cada uno. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias mínima significativa (LSD, $\alpha=0.05$) utilizando el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., 2002). La evaluación de oxidación, contaminación y sobrevivencia se realizó 10 días después del establecimiento del ensayo. Los valores que se tomaron fueron: oxidado o no oxidado, contaminado, no contaminado explante vivo o explante muerto.

Tabla 1. Concentraciones de L-cisteína y PVP agregadas al medio.

Tratamiento	L-Cisteína	PVP
Control	-	-
1	10 mg/L	5 g/L
2	50 mg/L	5 g/L
3	100 mg/L	5 g/L
4	150 mg/L	5 g/L
5	10 mg/L	1 g/L
6	50 mg/L	1 g/L
7	100 mg/L	1 g/L
8	150 mg/L	1 g/L

3. RESULTADOS

Durante la evaluación se observó que en el tratamiento control presentaba una tonalidad marrón oscuro en todo el explante y en la base de los segmentos nodales podía observarse el oscurecimiento del medio de cultivo como consecuencia de la exudación de compuestos fenólicos, en los demás tratamientos se pudo observar la ausencia de este oscurecimiento y los explantes que no presentaron contaminación se observaron de un tono verde intenso, aunque los extremos de todos los explantes se encontraban ligeramente oxidados.

Después del establecimiento se observó que el tratamiento con mayor sobrevivencia fue 10 mg/L de L-Cisteína con 5 g/L de PVP (Tratamiento 1), el de 50 mg/L de L-Cisteína con 5 g/L de PVP (Tratamiento 2) y el tratamiento con 150 mg/L de L-Cisteína con 1 g/L de PVP (Tratamiento 8). Sin embargo, estos tratamientos no presentaron menor oxidación de los explantes. En cuanto a la contaminación, se observó que el tratamiento 50 mg/L de L-Cisteína con 1 g/L de PVP (Tratamiento 6) presentó mayor contaminación y menor oxidación, pero con un menor porcentaje de sobrevivencia de los explantes. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados del establecimiento de *Annona muricata*.

Tratamiento	Oxidación	Contaminación	Sobrevivencia
Control	2.6000ab	1.0000c	1.7000abc
1	2.8000a	1.4000ab	1.9000a
2	2.8000a	1.1000bc	1.9000a

3	2.2000abc	1.3000abc	1.6000abc
4	2.2000abc	1.4000ab	1.6000abc
5	2.0000bc	1.1000bc	1.5000bc
6	1.8000c	1.6000a	1.4000c
7	2.6000ab	1.2000bc	1.8000ab
8	2.7000ab	1.3000abc	1.9000a

Letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$); $n = 5$. Simbología de tratamientos: (T1= 10 mg/L de L-cisteína con 5 g/L de PVP), (T2= 50 mg/L de L-cisteína con 5 g/L de PVP), (T3= 100 mg/L de L-cisteína con 5 g/L de PVP), (T4= 150 mg/L de L-cisteína con 5 g/L de PVP), (T5= 10 mg/L de L-cisteína con 1 g/L de PVP), (T6= 50 mg/L de L-cisteína con 1 g/L de PVP), (T7= 100 mg/L de L-cisteína con 1 g/L de PVP), (T8= 150 mg/L de L-cisteína con 1 g/L de PVP).

4. DISCUSIÓN

La L-Cisteína es un aminoácido que las plantas tienen en bajas cantidades para un crecimiento y desarrollo normal (Cisne et al., 2005) y de acuerdo con George y Sherrington (1984), la L-Cisteína no previene la oxidación, sino que actúa en la rápida remoción de cualquier quinona que se forma.

Cuando se coloca la L-Cisteína en el medio de cultivo in vitro puede tener dos efectos diferentes según la modalidad de esterilización (Nitsch y Nitsch, 1957); cuando se esteriliza con filtro, es inhibidor a nivel de 1-2 μmol , y cuando se usa la autoclave, aparentemente se descompone y actúa como una fuente de azufre. Cisne et al. (2005) menciona que en explantes de mora de Castilla establecidas in vitro con concentraciones de mayores a los 100 mg/l, fue tóxica provocando la muerte de los explantes aun y cuando se esterilizó en la autoclave. En este trabajo la L-Cisteína se esterilizó por medio de la autoclave, se observó que en concentraciones 50 mg/L L-Cisteína y 1 g/L PVP tuvieron una menor oxidación, sin embargo, se menciona en otros trabajos que la cantidad de luz que les llega a los explantes y la presencia de L-Cisteína influye en la oxidación del explante. Por ejemplo, el requerimiento de L-Cisteína más la presencia de luz para controlar la oxidación como en el establecimiento de ápices meristemáticos de plátano la oxidación se controló con L-Cisteína a una concentración de 4.0 mg/l (Reyes, 2001). En este trabajo no se evaluó la presencia o ausencia de luz, sin embargo, si se vieron diferencias significativas en la concentración de L-Cisteína con 16 horas luz y 8 de oscuridad, condiciones en que permanecieron los explantes.

Para las yemas apicales de *Cedrus atlantica*, el medio de cultivo WPM junto con el carbón activado (1 g L-1) y L-Cisteína (25 mg L-1), resultaron adecuados para evitar el proceso de oxidación de los explantes (Montes-Salazar, 2016). Por lo que la utilización de la L-Cisteína en el medio de cultivo favorece a los explantes para disminuir la oxidación, sin embargo, no para todas las especies resulta favorable. En este trabajo se observó que la presencia de concentraciones altas de L-Cisteína promueve la sobrevivencia, sin embargo, no baja el porcentaje de oxidación en los explantes y la presencia de contaminación es alta. Se observa mayor contaminación en explantes con mayor oxidación. La fuente de contaminación podría ser cuando se estableció, en donde no se eliminó totalmente los microorganismos de los explantes o que el explante tenga algún hongo o bacteria endógena. En este caso se observa que la concentración de 50 mg/L L-Cisteína y 1 g/L PVP aumentan la contaminación, sin embargo, con 10 mg/L de L-Cisteína y 1 g/L de PVP y 50 mg/L de L-Cisteína con 5 g/L de PVP presenta menor contaminación.

Otra opción es la de aplicar L-Cisteína directamente al explante para reducir la oxidación fenólica como en el caso de fresa cv Aiko, en donde se aplicó L-Cisteína (4 g/L) directamente al tejido antes de la siembra, manteniendo el tejido en presencia de luz (Sánchez-Cuevas, 2004). Las enzimas involucradas en la biosíntesis y la oxidación de fenoles se incrementan con la luz, por lo que es conveniente mantener los explantes en la oscuridad unos días antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja.

Por otro lado, los explantes de fresa tratados con PVP en dosis de 5% (con y sin luz) y 10% sin luz no sobrevivieron, así como los que no recibieron antioxidante alguno y permanecieron en la oscuridad

(control sin luz) (Sánchez-Cuevas, 2004). Estos resultados son similares a los que reportan Sánchez-Cuevas et al., (2001) quienes reportaron resultados de sobrevivencia del 80% de explantes de pimentero, libres de oxidación, con la adición de PVP (0.5 y 1.0 g/L) en presencia de luz.

Esto indica que es importante realizar combinaciones de antioxidantes con L-Cisteína para lograr un alto porcentaje de sobrevivencia y bajo porcentaje de oxidación, realizando también ensayos en presencia y ausencia de luz.

5. CONCLUSIONES

Se determinó que las concentraciones de 50 mg/L L-Cisteína y 1 g/L PVP mostraron el menor índice de oxidación, aunque con menor porcentaje de sobrevivencia de los explantes, por lo que hay que seguir realizando combinaciones de L-Cisteína con PVP para evitar la oxidación y aumentar la sobrevivencia de los explantes de Guanábana.

6. AGRADECIMIENTOS

Al INIFAP por el financiamiento de esta investigación a través del proyecto Fiscal N° 15234533989.

7. REFERENCIAS

- Acosta, A. M., Peña, E. J. y Castro, D. 2011. Evaluación de medios de cultivo para la producción in vitro de *Annona muricata* mediante la técnica de microinjertación seriada. *Acta Agronómica*. 60 (2): 140-146.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro, agronomía mesoamericana. 20 (1): 153-175.
- Amin, M. y Jaiswal, V. 1988. Micropropagation as a rapid cloning of a guava cultivar. *Scientia Horticulturae* 36 (1-2): 89-95.
- Cisne, J. D., Muñoz, I. y Reyes, H. 2005. Reguladores de crecimiento, L-Cisteína y ácido ascórbico en el cultivo in vitro de mora (*Rubus glaucus* Benth). LA Calera, UNA. 59-64.
- Figueiredo, S.F.L., Albarello, N. y Viana, V.R.C. 2001. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (JACQ.) BAILL. *In vitro Cellular and Development Biology – Plant* 37 (4): 471-475.
- Gannoun, S., Lionakis, S., Gerasopoulos, D., Kaska, N., Kuden, A., Ferguson, L. y Michailides, T. 1995. Aspects of in vitro culture of *Pistacia terebinthus* and *P. vera*. *Acta Horticulturae*. 419: 201-206.
- George, E. 1996. Plant propagation by tissue culture; part 2. In Practice. 2 ed. Exegetics Limited. England. 1361 p.
- George, E. F. and Sherrington, P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics. Eversley, Basingtoke, England. 109 p.
- Jarret, R., Rodriguez, W. y Fernandez, R. 1985. Evaluation, tissue culture propagation and dissemination of "Saba" and "Petipita" plantains in Costa Rica. *Scientia Horticulturae* 25: 137-147.
- Monco, L., Sondahl, M., Carvalho, A., Crocomo, O. and Sharp, W. 1977. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: Reinert, J; Bajaj, P. 1977. Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture. Springer-Verlag, Berlin. p. 109-129.
- Montes-Salazar A. M., Sepúlveda-Jiménez, G., Evangelista-Lozano S. y Rodríguez-Monroy M. 2016. Estudio preliminar para la propagación in vitro de *Cedrus atlantica* mediante yemas axilares. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7 (8): 2071-2078.
- Nistch, J.P. y Nitsch C. 1957. Auxin dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues; 2: Organic nitrogenous compounds. *American Journal of Botany*. 44 (6): 555-564.

- Rajesh, V. and Kala, M.B. 2015. Antiproliferative and Chemopreventive effect of *Annona muricata* Linn. on Ehrlich ascites carcinoma and Benzo[a]pyrene induced lung carcinoma. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 15 (4): 239–256.
- Reyes, P. B. 2001. Uso de L-cisteína y ácido ascórbico para reducir la oxidación durante el establecimiento y la multiplicación in vitro de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano (*Musa spp.*) incubados bajo luz y oscuridad. Tesis de Licenciatura. Universidad Zamorano. Honduras.
- Sánchez-Cuevas M. C. y Salaverría J. L. 2004. Control de oxidación y contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *Revista UDO Agrícola*. 4: 21-26.
- Sánchez-Cuevas, M. C., Anés R. J. y Cedeño J. R. 2001. Efecto de varios antioxidantes en la sobrevivencia de explante de pimentero (*Piper nigrum* L.). *Acta Científica Venezolana*. 52: 58.
- Villalobos, I. y Arias, O. 1987. Inducción y multiplicación de callos in vitro en tres cultivares comerciales de caña de azúcar (*Saccharum spp.*). *Agronomía costarricense* 11 (1): 39-44.

Este artículo puede citarse de la siguiente forma:

Citación estilo APA sexta edición

Cruz Gutiérrez, E.J., Hernández Fuentes, L.M. & Gómez Reyes, L.A. (septiembre-diciembre de 2020). Uso de L-Cisteína para el control de oxidación in vitro de *Annona muricata* L. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, 6(3), 1-6.

Citación estilo Chicago decimoquinta edición

Cruz Gutiérrez, Esmeralda Judith, Hernández Fuentes, Luis Martín & Gómez Reyes, Luis Alberto. Uso de L-Cisteína para el control de oxidación in vitro de *Annona muricata* L. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, 6 No. 3 (septiembre-diciembre de 2020): 1-6.

Citación estilo Harvard Anglia

Cruz Gutiérrez, E.J., Hernández Fuentes, L.M. & Gómez Reyes, L.A. 2020. Uso de L-Cisteína para el control de oxidación in vitro de *Annona muricata* L. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, 6(3), pp. 1-6.

Citación estilo IEEE

[1] E.J. Cruz Gutiérrez, L.M. Hernández Fuentes y L.A. Gómez Reyes. Uso de L-Cisteína para el control de oxidación in vitro de *Annona muricata* L. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, vol. 6 No. 3, pp. 1-6, septiembre-diciembre de 2020.