

Formación de la unión del injerto en guanábano (*Annona muricata* L.).

Vidal Hernández, Librado¹, Ruiz Bello, Romeo¹
López Moctezuma, Héctor¹, Ruiz Montiel, César²
Vidal Martínez, Nayelli Ayatzol¹

¹Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus Xalapa,
Universidad Veracruzana

²Instituto de Genética Forestal. Universidad Veracruzana
Email: lvidal152@hotmail.com

Resumen

El guanábano (*Annona muricata* L.), pertenece a la familia de las Annonaceae y es la especie más importante, ampliamente distribuida en el trópico. La formación de la unión del injerto involucra procesos que incluyen muerte de células en la intersección, adhesión de los componentes del injertos, formación de callo, puente cambial, diferenciación de callo y el establecimiento y continuidad del cámbium vascular. La deshidratación de los tejidos se realizó a través de enjuagues con etanol al 50%, 70%, 96%. Para la infiltración e inclusión las muestras se cubrieron con glicolmetacrilato y etanol absoluto (50:50 v/v); (70: 30 v/v) y glicolmetacrilato (100%). Las primeras divisiones

celulares fueron observadas entre los 3 y 6 días después de la injertación, estas divisiones se iniciaron en el portainjerto. Todas las divisiones sucesivas ocurren entre 6 y 15 días después del injertado. A los 60 días se observó la formación de una unión de callo. La actividad de las células cambiales fue restaurada y la unión aparece como una cicatriz a los 90 días. Estas nuevas células cambiales producen nuevos tejidos vasculares, xilema hacia el interior y floema hacia el exterior, estableciendo así una conexión vascular entre la púa y el portainjerto requisito fundamental para el éxito de la unión del injerto.

Palabras claves: *Unión del injerto, puente cambial, cambium vascular y cicatrización*

Introducción

El guanábano (*Annona muricata* L.), pertenece a la familia de las *Annonaceae* y es la especie más importante, ampliamente distribuida en el trópico. Regularmente se propaga por la vía sexual, esto conduce a poblaciones muy heterogéneas, por lo que hay necesidad de conservar ciertas características genéticas y solo se logra a través del método de injerto. La formación de la unión del injerto involucra la fusión de dos unidades inicialmente independientes dentro de un sistema coherente. Los estudios anatómicos en la formación de la unión del injerto en plantas perennes han demostrado que los procesos involucrados son similares en las diferentes especies de árboles frutales. Esos procesos ha sido investigado durazno (Scaramuzzi, 1952), en manzano (Robitaille y Carlson, 1970; Soumelidou *et al.*, 1994). Los procesos incluyen muerte de células en la intersección, adhesión de los componentes del injertos, formación de callo, puente cambial, diferenciación de callo y el establecimiento y continuidad del cambium vascular. Soule (1971), describe los procesos de la formación de la unión del injerto en mango y esta ocurre en cuatro etapas: Precallo, callo, puente cambial y la cicatrización de la unión. El grado de compatibilidad en combinaciones de injerto fue determinado de acuerdo a Mosse y Herrero (1951) por investigaciones de estructura anatómica en la unión del injerto en 4 grupos:

Unión perfecta: La línea entre los tejidos del injerto puede apenas ser vista en ambas corteza y tejidos de madera y en la unión del injerto está libre de una capa necrótica

Unión buena: La línea entre el sector injertado puede ser visto pero la corteza y tejidos de madera son continuos.

Unión de injerto con corteza no continua: Los tejidos de madera y la unión del injerto, es como en el segundo grupo, sin embargo los tejidos de la corteza y la unión del injerto no es continua, presentando una capa de corcho de color oscuro en la intersección del injerto.

Unión del injerto con tejidos de corteza y madera no continuo: La madera es como en el grupo 2. Células del parénquima vital no lignificado es hallado en tejidos de madera que pueden también ser vistas en un anillo con un año de edad.

Cuando se realizan experimentos para probar la eficiencia de un determinado tipo de injerto, normalmente no se consideran las características morfológicas y anatómicas de la especie a pesar de que diversos autores han demostrado que es común encontrar plantas cuyo cámbium vascular posee irregularidades morfológicas, falla sectoriales o que presentan un periodo de letargo en la cual la actividad meristemática es prácticamente nula. El tejido más importante que participa en la unión del injerto y la regeneración de tejido vascular es el cámbium, tejido meristemático que debe ser estudiado para conocer su actividad morfológica y anatómica. En guanábano, se ha observado un bajo prendimiento de los injertos, esto a pesar de las habilidades y experiencia del injertador. Se desconoce que factor (es), son los responsables de este comportamiento.

Objetivo

El objetivo principal fue estudiar la secuencia de eventos en la cicatrización de la unión de injerto en guanábano.

Método

Localización del experimento

Este trabajo se realizó en condiciones de vivero en el Campo Experimental “La Bandera” perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana, ubicado en Actopan, Veracruz. Su localización geográfica es: 19° 31' de Latitud Norte y 96° 36' de Longitud Oeste y 400 msnm. De acuerdo con la clasificación de Köppen modificada por García (1988) el clima es del tipo Aw^o(w)(i¹), corresponde a un clima caliente subhúmedo, con régimen de lluvias en verano. La temperatura promedio es de 24.5 °C y un promedio de precipitación anual de 1026 mm.

Injerto

Las plántulas fueron obtenidas de semillas de frutos de árboles criollos de la región. Las semillas fueron depositadas en semilleros y después de 60 días fueron ubicadas en un vivero para su desarrollo. Ocho meses después alcanzaron el diámetro apropiado para su injertación. El proceso del injertado se realizó el 7 de febrero de 2004. El método empleado fue el enchapado lateral con púas subterminal, descrito por Vidal (1993).

Muestreo y microtecnia

La recolección de la muestra se realizó con base a un calendario de muestreo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Periodo de muestreos de la unión del injerto del guanábano en la fase de campo

1°	Muestreo	9 de febrero	2004
2°	Muestreo	11 de febrero	2004
3°	Muestreo	13 de febrero	2004
4°	Muestreo	15 de febrero	2004
5°	Muestreo	17 de febrero	2004
6°	Muestreo	19 de febrero	2004
7°	Muestreo	21 de febrero	2004
8°	Muestreo	24 de febrero	2004
9°	Muestreo	9 de marzo	2004
10°	Muestreo	16 de marzo	2004
11°	Muestreo	25 de marzo	2004
12°	Muestreo	2 de abril	2004
13°	Muestreo	9 de abril	2004
14°	Muestreo	9 de mayo	2004

Se recolectaron dos muestras por cada fecha de muestreo. Las muestras consistieron únicamente de la zona de unión de cada uno de los injertos. Se tomaron 6 cm de longitud de la zona de unión de injerto. Cada una de las secciones de unión se sumergió en una mezcla de glutaraldehído y Buffer de Fosfato, de esta manera las muestras se transportaron al laboratorio. La deshidratación de los tejidos se realizó a través de enjuagues con etanol al 50%, 70%, 96% y finalmente con etanol absoluto al 100%. Cada una de estas fases tuvieron un intervalo de 24 h. La infiltración e inclusión se realizó de la siguiente manera: las muestras se colocaron en pequeños viales de 6 mL de capacidad. Estos se cubrieron con glicolmetacrilato y etanol absoluto (50:50 v/v); (70: 30 v/v) y glicolmetacrilato (100%) por una semana respectivamente. Las muestras ya infiltradas se depositaron en cápsulas de gel # 00 a las que se le agregó la mezcla de glicolmetacrilato y peróxido de benzoilo (99:1 v/v) (Ruzin, 1999), éstas se dejaron reposar por dos días. Posteriormente se colocaron dentro de una estufa a 40°C por 48 horas. Para el proceso de montaje y corte, las muestras se colocaron sobre pequeños trozos de madera con ayuda de ciano-crilato, luego se procedió a los cortes

anatómicos. Con un micrótopo rotatorio Marca Leica 2125RT las secciones de muestras fueron cortadas a un grosor de 10 μm . Los cortes se depositaron sobre portaobjetos y éstos se colocaron sobre una plancha a 40°C por 15 min, para el proceso de secado de las muestras. La tinción de las muestras se realizó con azul de toluidine y posteriormente éstas se montaron con resina sintética y xilol. Las observaciones se realizaron en un fotomicroscopio y éstas se analizaron posteriormente.

Resultados y discusión

La afinidad entre el portainjerto y el injerto representa una serie de reacciones bioquímicas, fisiológicas y morfológicas en plantas injertadas. Cuando esta afinidad es con respecto a la compatibilidad, se observa una interacción positiva y un desarrollo armónico entre el portainjerto e injerto. Una vez realizado el injerto y en pleno contacto el cámbium vascular de la púa y del portainjerto, se inicia la división celular del parénquima para formar callo en ambos componentes en la región cambial. Por esta razón, es importante la presión hecha a través del amarre con el plástico, esto permite la firme unión de ambos cámbium de los componentes restaurando la actividad cambial de manera normal. Sobre la sobrevivencia del injerto, la yema terminal inició la brotación entre los 12 y 15 días después de la injertación. Se observó un renuevo prematuro de la yema, esto ocurrió cuando la unión cambial no había sido establecida. Esto podría ser un indicador confiable de la unión cambial, estableciéndose con ello un éxito en la injertación. Las primeras divisiones celulares fueron observadas entre los 3 y 6 días después de la injertación, estas divisiones se iniciaron principalmente en el portainjerto. La formación del callo después de la injertación usualmente ocurre primero en el portainjerto y más tarde en el injerto. Esto quizá se atribuya a las diferencias en las condiciones fisiológicas que prevalece en el injerto y portainjerto, como un resultado en donde el injerto ha sido completamente aislado de fuentes nutrimentales y agua, en tanto que el portainjerto permanece como una planta funcional. La principal característica anatómica en una sección transversal en tallo de joven de guanábano esta ilustrado en la (figura 1).

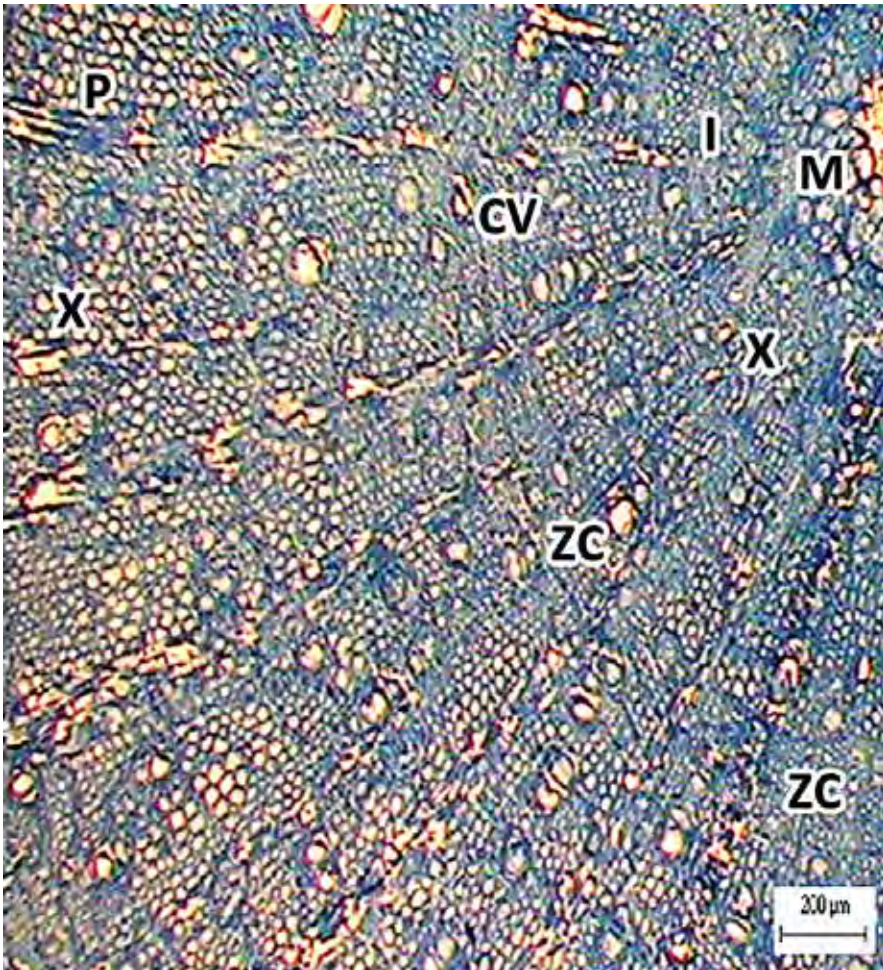


Figura 1. Corte transversal de la unión del injerto del guanábano 3 días después de la injertación. M: Médula; X: Xilema; F: Floema; ZC: Zona de conexión; CV: Cámbium Vascular; I: Injerto; P: Portainjerto

La unión del injerto en ambos componentes, estuvo bien ensambladas, un buen contacto se estableció entre el injerto y el portainjerto. Todas las divisiones celulares sucesivas ocurren entre 6 y 15 días después del injertado, esto condujo a la formación de un callo entrecruzado entre los dos componentes. Los primeros 15 días después de la

injertación se observó la formación de una unión de callo. Fragmentos de células lesionadas durante la operación dieron origen a la formación de una capa necrótica sobre la intersección de la unión. Los estudios en la formación de la unión del injerto en guanábano han revelado algunas observaciones interesantes sobre la división celular del callo en ambos componentes. La exposición de los tejidos vivos de la plantas por efecto de la remoción del material alrededor de la zona de afectación durante el proceso de la injertación, estimula la formación de callo. Reemplazando el tejido que ha sido removido y asentando firmemente el sitio de unión, restaurando nuevamente la actividad normal. Las células de parénquima se entremezclan, luego se presenta una diferenciación de las células del parénquima del callo en nuevas células cambiales conectándose con el cámbium original del portainjerto y de la púa, para finalmente producir tejidos vasculares por el nuevo cámbium, permitiendo así el paso de nutrimentos y agua entre el portainjerto y la púa (Simons y Chu, 1985). Células diferenciadas e inmaduras presentes en la zona de intersección fueron distorsionadas, presumiblemente como resultado de la presión durante el amarre del injerto. El daño celular contribuyó a la formación de la capa necrótica sobre el corte de la intersección. Al principio de la formación del callo fragmentado la capa necrótica fue gradualmente absorbida y con el tiempo esta desapareció. Stoddard y McCully (1979), refirieron a la muerte de células, material entre los componentes del injerto como la “capa necrótica” y Copes (1969) la llamó “capa de contacto”.

Es evidente que este tipo de estructura es de ocurrencia normal en el desarrollo de la unión del injerto. Se cree que está formada de pared celular y otros desechos según varios autores.

La presencia ocasional de las células del callo en la capa necrótica indica que las condiciones en la capa no es detrimental sobre el desarrollo del callo. De los diversos nombres atribuidos a la capa, la “capa necrótica” parece más apropiada, además la capa en guanábano consistió de muerte de células y remanente de citoplasma, el término también indica la poca participación activa en la formación de la unión. La capa necrótica desapareció y fue absorbida presumiblemente por la proliferación de callo durante el proceso de la formación de la unión

(Stoddard y McCully, 1979). Todos los tejidos vivos fueron dañados durante el proceso de la injertación e involucrados en la formación del callo. La primera división celular en respuesta a las lesiones fue observada 6 días después de la injertación y se observó en ese mismo sitio células del parénquima cortical y células de los radios del floema en el portainjerto (figura 2).

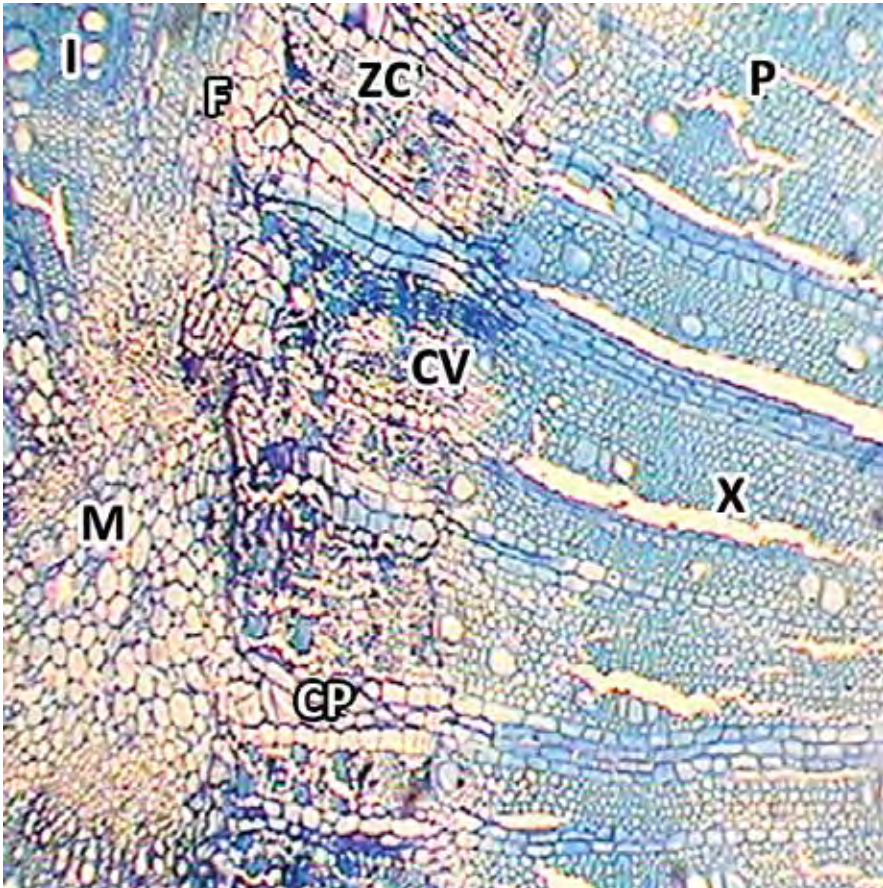


Figura 2. Corte transversal de la unión del injerto del guanábano 6 días después de la injertación. M: Médula; X: Xilema; F: Floema; ZC: Zona de conexión; CV: Cámbium Vascular; CP: Células del parénquima; I: Injerto; P: Portainjerto

Los estímulos que causaron la reacción en la superficie lesionada se extendieron más allá de la herida y las células de la médula también empezaron a alargarse y a dividirse en respuesta a las heridas. Más tarde el callo fue formado por células inmaduras del xilema secundario cerca del corte de la intersección de los componentes del injerto, así como de los radios celulares. Más callo fue producido y el tejido necrótico fue desapareciendo hacia dentro de la intersección del injerto/portainjerto hasta hacer contacto con el tejido necrótico opuesto o tejido de callo. La fusión de callo del portainjerto e injerto fue obstruida en áreas localizadas por esos fragmentos de tejidos necróticos. Después de 37 días se observó un buen establecimiento de filas de células de callo, este se presentó perpendicular al corte original. Ese puente en la unión de la corteza se extendió hacia la zona de la médula (figura 3). El injerto fue realmente expandido a los 37 días después de la injertación y mucho tiempo después con la continuidad vascular una vez prendido. Estas observaciones concuerdan con Herrero (1951) quién observó una capa de tejido no diferenciado en la unión del injerto entre ciruelo (*Prunus* spp) y pera (*Pyrus* spp) aun así los árboles fueron normales por muchos años.

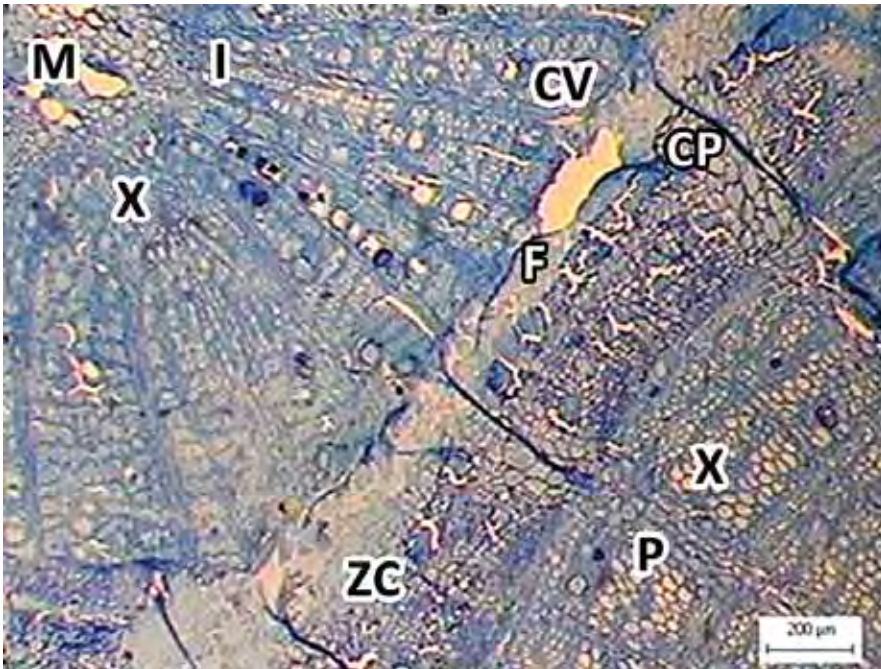


Figura 3. Corte transversal de la unión del injerto del guanábano 37 días después de la injertación. M: Médula; X: Xilema; F: Floema; ZC: Zona de conexión; CV: Cámbium Vascular; CP: Células del parénquima; I: Injerto y P: Portainjerto

Repetidas divisiones periclinales acompañadas con la expansión celular resultaron en la formación de un abanico en la región del callo consistente en diversas columnas de células a menudo originado en la médula debajo de la superficie de la herida. Como la proliferación del callo procedió, el espacio entre el cámbium vascular del injerto y del portainjerto fue rellenado con mezcla de callo. La extensión del cámbium vascular permaneció desde el borde hacia el final de la separación del viejo cámbium vascular de ambos componentes, y este fue continuo hasta restaurarse 60 días después. El cámbium vascular demostró haber contribuido muy escasamente en la producción del callo en este estudio. Estas observaciones están de acuerdo con Mergen (1954), quien observó que la mayor parte del callo fue producido por tejidos fuera de la zona del cámbium vascular. Buck (1954), sugirió que el cámbium

vascular no contribuyó en el proceso de cicatrización del callo. La formación de callo en células de radios del xilema ha sido reportada en *Pinus elliotii* (Mergen, 1954) y *P. ponderosa* (Harris y Barnett, 1975). Copes (1969), observó que el desarrollo del callo en *Pseudotsuga menziesii* estuvo asociado principalmente a los radios y las células del parénquima del floema localizados en la zona de entrecruzamiento y a las células cribosas no funcionales. Barnett y Weatherhead (1988) observaron en injertos de coníferas que el callo se originó de las células de radios del parénquima, así como del cámbium vascular. En contraste Braun (1958) y Fuji y Nito (1972) observaron que el callo fue producido principalmente por el cámbium vascular.

El establecimiento de la unión cambial a través del callo entre el portainjerto e injerto estuvo acompañado por la formación de una peridermis cubriendo el corte de la intersección. La peridermis es importante durante la formación del injerto, además protege a la unión contra parásitos invasores y otros efectos externos (Copes, 1969). Además la continuidad vascular entre el injerto y portainjerto asegura un sistema más eficiente para el transporte de agua y nutrimentos entre ambas partes; 60 días después la capa necrótica fue totalmente eliminada y la línea del injerto fue borrada por el callo en la intersección (figura 4).

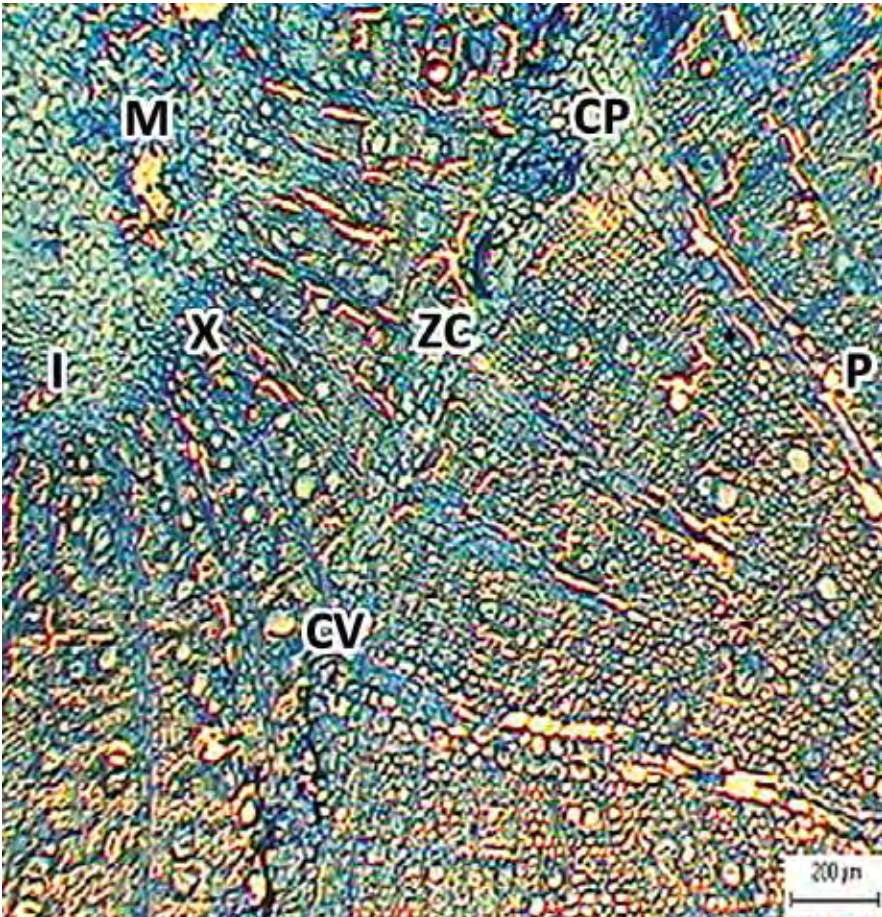


Figura 4. Corte transversal de la unión del injerto del guanábano 60 días después de la injertación. M: Médula; X: Xilema; F: Floema; ZC: Zona de conexión; CV: Cámbium Vascular; CP: Células del parénquima; I: Injerto y P: Portainjerto

La actividad de las células cambiales fue restaurada y la unión aparece como una cicatriz a los 90 días. Estas nuevas células cambiales producen nuevos tejidos vasculares, xilema hacia el interior y floema hacia el exterior, estableciendo así una conexión vascular (figuras 5 y 6).

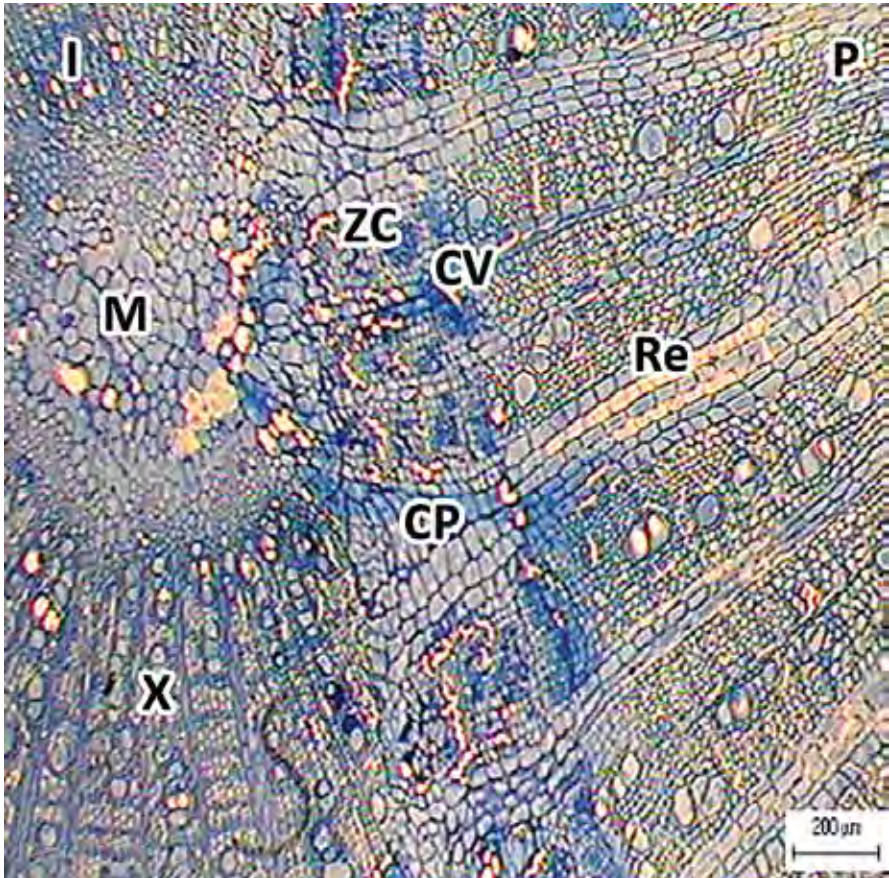


Figura 5. Corte transversal de la unión del injerto del guanábano 90 días después de la injertación. M: Médula; CV: Cambium Vascular; X: Xilema; I: Injerto; P: Portainjerto; ZC: Zona de conexión; CP: Células del parénquima y Re: Radios expandidos

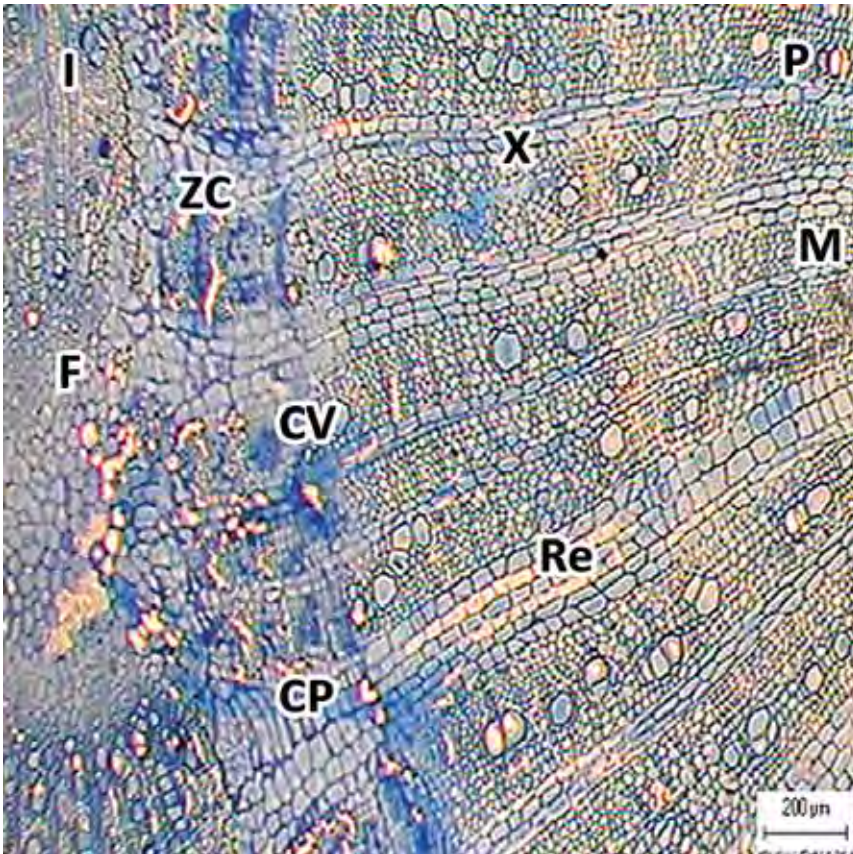


Figura 6. Corte transversal de la unión del injerto del guanábano 90 días después de la injertación. M: Médula; X: Xilema; F: Floema; ZC: Zona de conexión; CV: Cámbium Vascular; CP: Células del parénquima; I: Injerto; P: Portainjerto y Re: Radios expandidos

Conclusiones

1. Inicialmente se observó una capa necrótica en la zona de intersección, presumiblemente ocasionada por la operación durante los corte en ambos componentes, esta capa con el tiempo fue absorbida por la formación del callo en esa zona, quedando aislada dentro del nuevo tejido.

2. Se observó una división celular activa y continua de las células del parénquima, esto dio origen a una proliferación de callo que cubrió los espacios entre el cámbium vascular del injerto y del portainjerto.
3. Se observó que la formación del callo no fue limitada por algún tejido en particular. La médula fue un sitio de formación de callo, así como los radios y las células del parénquima del floema localizadas en la zona de conexión. Este resultado confirma la totipotencia de las células parenquimatosas.
4. La formación de callo después de la injertación usualmente ocurrió primero en el portainjerto y más tarde en el injerto.
5. Posterior a la formación del callo, producto de las divisiones celulares se presentó la diferenciación celular, para formar el tejido vascular que comprende al xilema y floema.
6. El cámbium vascular demostró haber contribuido muy escasamente en la producción de callo en este estudio.

Referencias

- Barnett, J.R and Weatherhead, I. 1988. Graft formation in Sitka spruce: A scanning electron microscope study. *Annls of Botany*. 61: 581-587.
- Braun, H. J. 1958. Die normalen verwachsungsvorgange nach Pfropfung von Laubbaumen II. Verfahren des seitlichen anplattens und der kopulation. *Zeitschrift für Botanik*. 46: 309-380.
- Buck, G. J. 1954. The histology of the bud graft union in roses. *Journal of Science*. 28 (4): 587-602.
- Copes, D. L. 1969. Graft union formation in Douglas-fir. *American Journal of Botany*. 56: 285-289.
- Fuji, T and Nito, N. 1972. Studies on the compatibility of grafting fruit trees. I. Callus fusion between the rootstock and scion. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 41: 1-10.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koopen. Instituto de Geografía. UNAM. 246 pp.
- Harris, J.M and Barnett, J.R. 1975. Differential callus nodules in resin pockets of *Pinus ponderosa* Laws. *Journal of Forestry Science*. 5: 226-229.

- Herrero, J. 1951. Studies of compatible and incompatible graft combinations with special reference to hardy fruit trees. *Journal of Horticultural Science*. 26: 186-237.
- Mergen, F. 1954. Anatomical study of slash pine graft unions. *Journal of the Florida Academy of Science*. 17 (4): 237-245.
- Mosse, B. and Herrero, J., 1951. Studies on incompatibility between some pear and quince grafos. *Jour. Hort. Sci.* 26 (3): 240-245.
- Robitaille, H. A. and Carlson, R. 1970. Graft union behaviour of certain species of malus and prunus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 95: 113-1134.
- Ruzin, S. E. 1999. Plant microtechnique and microscopy. Oxford University Press. pp. 61-69.
- Scaramuzzi, F. 1952. Le basi istogenetiche dell'innesto 'ad occhio'. Ricerche sul Pesco. *Annali dell' Istituto Sperimentale Agronomico*. 6: 517-537.
- Simons, R.K and Chù, M.C. 1985. Graft union characteristics of M26 apple rootstock combined with 'Red Delicious' strains. Morphological and anatomical development. *Scienttia Hort.* 25: 48-59.
- Soule, J. 1971. Anatomy of the bud-union in mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 96: 380-383.
- Stoddard, F.L., and McCully, M.E. 1979. Histology of the development of the development of the graft union in pea roots. *Canadian Journal of Botany*. 57: 1486-1501.

Soumelidou, K., Battey, N.H., John, P. and Barnett, J.R. 1994. The anatomy of the developing bud union and its relationship to dwarfing apple. *Annals of Botany*. 74: 605-611.

Vidal H, L. 1993. La Guanábana. Publicación Técnica Num. 2. Facultad de Ciencias Agrícolas. Zona Tuxpan. Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 16 pp.

VII. *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal



Foto: Alejandro Martínez Mena

