

La micropropagation d'*Annona glabra* L. à partir de segments nodaux

Soami Fernanda Caio DECCETTI^{a*}, Renato PAIVA^a, Patricia DUARTE DE OLIVEIRA PAIVA^b, Magdi Ahmed Ibrahim ALOUFA^c

^a Département de Biologie, Université Fédérale de Lavras, CP 37, 37200-000, Lavras, MG, Brésil
renpaiva@ufla.br

^b Département d'Agriculture, Université Fédérale de Lavras, CP 37, 37200-000, Lavras, MG, Brésil

^c Département de Botanique, écologie et zoologie, Université Fédérale du Rio Grande do Norte, 59072-970, Natal, RN, Brésil

Micropropagation of *Annona glabra* L. from nodal segments.

Abstract — Introduction. *In vitro* propagation of *A. glabra* L., not yet studied, could make it possible to resolve certain difficulties of multiplication of this woody fruit-bearing species. Techniques of micropropagation having been already successfully tested with other species of *Annona* (*A. squamosa*, *A. cherimola* and *A. muricata*), we aimed at developing a complete micropropagation system for *A. glabra* L. by using explants of young seedlings. **Material and methods.** For the phase of axillary bud proliferation (duration 30 days), cuttings of nodal segments removed from juvenile plants were cultured in a basic medium MS supplemented with various concentrations of BAP, used isolated or in combination with various concentrations of NAA, and with or without 1.0 mg of GA₃·L⁻¹. At the end of this phase, the average number of shoots obtained by explants and their average size were measured for each treatment. For the rooting of shoots obtained at the end of this proliferation phase, various concentrations of IBA and different pH were tested in the medium (duration 15 days). At the end of this phase, the average number of roots obtained by shoots and their average size were evaluated. The acclimatization of the microplants was then followed in controlled conditions for 21 days. **Results and discussion.** All the treatments, even those without growth regulators, made it possible to obtain on average 1.5 shoots per nodal segment. However, the most developed shoots were obtained by using 0.5 mg·L⁻¹ of BAP used alone. The addition of 1.0 mg of GA₃·L⁻¹ to the multiplication medium was not favorable to the development of shoots. During the *in vitro* experimentation, shoot end necroses and foliar abscission could be observed; these could be related to a calcium deficit and an accumulation of ethylene inside the culture flask. The highest percentage of shoots with roots and the greatest number of roots produced by explants were obtained without addition of IBA to the culture medium, by using 4.0 mg·L⁻¹ of active charcoal and a pH of 5.0. The microplants with roots were acclimatized successfully.

Brazil / *Annona glabra* / plant propagation / micropropagation / culture media / culture techniques / plant growth substances

Micropropagation d'*Annona glabra* L. à partir de segments nodaux.

Résumé — Introduction. La propagation *in vitro* d'*A. glabra* L. non encore étudiée pourrait permettre de remédier à certaines difficultés de multiplication de cette espèce fruitière ligneuse. Des techniques de micropropagation ayant été déjà expérimentées avec succès avec d'autres espèces d'*Annona* (*A. squamosa*, *A. cherimola*, *A. muricata*), nous avons cherché à développer un système complet de micropropagation d'*A. glabra* L. en utilisant des explants de jeunes plantules. **Matériel et méthodes.** Pour la phase de prolifération de bourgeons axillaires (durée 30 jours), des boutures de segments nodaux prélevées sur la tige de jeunes plantes matrices ont été mises en culture dans un milieu de base MS supplémenté en différentes concentrations de BAP, utilisée seule ou en combinaison avec différentes concentrations d'ANA, et avec ou sans 1,0 mg de GA₃·L⁻¹. À l'issue de cette phase, le nombre moyen de tigelles obtenues par explant et leur taille moyenne ont été mesurés pour chacun des traitements. Pour l'enracinement des tigelles obtenues à l'issue de cette prolifération, diverses concentrations d'AIB et différents pH du milieu ont été testés (durée 15 jours). À la fin de cette phase, le nombre moyen de racines obtenues par tigelle et leur taille moyenne ont été évalués. L'acclimatation des microplants a ensuite été suivie en conditions contrôlées pendant 21 jours. **Résultats et discussion.** Tous les traitements, même ceux dépourvus de régulateurs de croissance, ont permis d'obtenir en moyenne 1,5 tigelles par segment nodal. Toutefois, les tigelles les plus développées ont été obtenues en utilisant 0,5 mg·L⁻¹ de BAP utilisé seul. L'addition de 1,0 mg de GA₃·L⁻¹ au milieu de multiplication n'a pas été favorable au développement des tigelles. Durant l'expérimentation *in vitro*, une nécrose de l'extrémité des tigelles et une abscission foliaire ont pu être observées ; cela pourrait être lié à un déficit en calcium et à l'accumulation d'éthylène à l'intérieur du récipient de culture. Le pourcentage le plus élevé de boutures enracinées et le plus grand nombre de racines produites par explant ont été obtenus sans addition d'AIB au milieu de culture, en utilisant 4,0 mg·L⁻¹ de charbon actif et un pH de 5,0. Les microplants avec racines ont été acclimatés avec succès.

Brésil / *Annona glabra* / multiplication des plantes / micropropagation / milieu de culture / technique de culture / substance de croissance végétale

* Correspondance et tirés à part

Reçu le 20 décembre 2004
Accepté le 13 juillet 2005

Fruits, 2005, vol. 60, p. 319–325
© 2005 Cirad/EDP Sciences
All rights reserved
DOI: 10.1051/fruits:2005038

RESUMEN ESPAÑOL, p. 325

1. Introduction

Annona glabra L. est une espèce fructifère tropicale, de la famille des Annonacées, trouvée communément en Amérique du Sud. Outre la production de fruits comestibles, cette plante a attiré l'attention du fait de sa possible utilisation en phytopharmacie. Toutefois, sa propagation par graines est gênée par une germination lente et non uniforme aboutissant à l'obtention de plants très hétérogènes.

Jusqu'à présent, aucune étude visant la maîtrise de techniques de propagation de l'espèce, par bouture par exemple, n'a été menée ; cela a limité l'obtention de nouveaux individus et contribué à la production de plantes aux caractéristiques agronomiques indésirables.

La propagation *in vitro* pourrait permettre de remédier à ces difficultés de multiplication. Ainsi, la propagation clonale, utilisant des techniques de micropropagation, s'est révélée viable pour d'autres espèces d'*Annona* comme *A. squamosa* [1], *A. cherimola* [2–4] ou *A. muricata* [5]. Le développement d'une telle méthodologie pour *A. glabra* L. pourrait aider au développement de sa culture. Toutefois, la micropropagation des espèces ligneuses comme *A. glabra* L. comparée à celle d'espèces herbacées induit de nombreuses difficultés qui sont aggravées par l'utilisation d'un matériel moins jeune ; en effet, la récupération des compétences de régénération des organes diminue alors au fur et à mesure qu'ils vieillissent [6]. Dans ce contexte, l'utilisation d'un matériel végétal provenant de matrices aseptisées obtenues par germination de graines *in vitro*, et non d'arbres adultes se développant en milieu naturel, pourrait garantir l'obtention d'un matériel végétal rajeuni, à plus grand pouvoir de régénération et possédant donc de meilleures caractéristiques pour la culture *in vitro* ; de plus les risques de contamination du matériel végétal mis en culture et d'oxydation phénolique *in vitro*, qui rendent souvent impossible l'utilisation de la micropropagation pour les espèces ligneuses, sont alors réduits.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal : explants nodaux

Notre expérimentation a eu lieu dans le laboratoire de « culture de tissus de plantes » du département de Biologie de l'université fédérale de Lavras (Brésil).

Des segments nodaux ont été isolés de plantules germées *in vitro*, puis développées en serre pendant 6 mois. Les explants ont été obtenus par section de (1,5 à 2,0) cm de tiges jeunes, non ligneuses et présentant un seul bourgeon. Rincés à l'eau courante pendant 40 min puis lavés avec un détergent, ils ont ensuite été désinfectés par immersion, sous flux laminaire, dans de l'alcool à 70 % (v/v) pendant 1 min, puis dans de l'hypochlorite de sodium à 50 % (v/v) pendant 15 min. Après cette désinfection, les explants ont été rincés trois fois dans de l'eau distillée et stérilisée ; ils ont ensuite été maintenus dans une solution d'acide ascorbique (200 mg·L⁻¹) pendant 20 min.

2.2. Milieu de base et conditions d'incubation

Après désinfection, les explants ont été mis en culture dans des flacons contenant 30 mL de milieu de Murashige et Skoog [7], solidifié avec 7 g·L⁻¹ d'Agar-Agar, enrichi de vitamines (1,0 mg·L⁻¹ de thiamine ; 0,5 mg·L⁻¹ de pyridoxine et 0,5 mg·L⁻¹ d'acide nicotinique), de myoinositol à 100 mg·L⁻¹, de saccharose à 20 g·L⁻¹, et supplémenté en benzylamino-purine (BAP) à différentes concentrations [(0 ; 0,05 ; 0,5 ; 1,0 ; 1,5) mg·L⁻¹] en combinaison avec différentes concentrations d'acide naphthalène acétique (ANA) [(0 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1,0) mg·L⁻¹], avec ou sans addition de 1,0 mg·L⁻¹ d'acide gibbérellique (GA₃). Le pH du milieu de culture a été ajusté à 6,0 avant passage en autoclave. Après mise en culture des explants, les flacons ont été maintenus à (25 ± 1) °C en salle de croissance obscure pendant 15 jours. Après cette période, ils ont été placés en photopériode de 16 h et à une intensité lumineuse de 13 μmol·s⁻¹·m⁻² pendant 30 jours,

puis le nombre moyen de tigelles obtenu par explant et leur taille moyenne ont été évalués.

2.3. Enracinement des tigelles

Pour expérimenter l'enracinement *in vitro* des tigelles obtenues lors de la phase antérieure, des segments apicaux, longs de 2 cm au moins et présentant 2 à 3 feuilles au plus près du méristème apical, ont été transférés dans des flacons contenant 30 mL d'un milieu *Wood Plant Medium* (WPM), tel que préconisé par Lloyd et McCown [8] mais avec une concentration de sels diluée de moitié et des vitamines (1,0 mg de thiamine·L⁻¹ ; 0,5 mg de pyridoxine·L⁻¹ et 0,5 mg d'acide nicotinique·L⁻¹), du myoinositol (100 mg·L⁻¹), du saccharose (30 g·L⁻¹), de l'agar-agar à 6,5 g·L⁻¹, du charbon actif à 4 g·L⁻¹ et supplémenté en différentes concentrations d'acide indole butyrique (AIB) [(0 ; 2,0 ; 4,0 et 6,0) mg·L⁻¹]. Le pH du milieu de culture a été ajusté, avant passage en autoclave, à trois valeurs différentes : 5,0 ; 6,0 et 7,0. Après inoculation, les explants ont été maintenus pendant 30 j dans une salle de croissance à (25 ± 1) °C, 16 h de photopériode et 13 μmol·s⁻¹·m⁻² d'intensité lumineuse ; le nombre moyen de racines obtenues par tigelle et leur taille moyenne ont alors été évalués.

2.4. Acclimatation des plantules

À la fin du processus d'enracinement, les microplantules, munies d'une protection de plastique transparent destinée à maintenir une humidité relative élevée dans leur environnement d'acclimatation, ont été transférées en caisses de type Gerbox contenant de la vermiculite ; elles ont été alors maintenues dans des conditions d'environnement contrôlées. L'intensité lumineuse a été limitée pendant 21 jours en utilisant trois écrans successifs (70 %, 50 % et 30 %) changés tous les 7 jours, qui ont permis d'augmenter progressivement la luminosité parvenant aux plants avec, respectivement, [(14, 25 et 75) μmol·s⁻²·m⁻¹]. Pendant cette période, la protection de plastique a été partiellement ouverte de façon à permettre une réduction progressive de l'humidité relative. Au terme

des 21 jours de cette phase d'acclimatation, la protection et l'écran ont été retirés et les plantules ont été transplantées en sacs en plastique de 4 L contenant de la terre, du sable et de l'engrais dans la proportion 3:2:1, avec une formule nutritive NPK de 4:14:8 ; les plantules ont été laissées ainsi jusqu'à leur transfert en pleine terre.

2.5. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé a été entièrement randomisé, avec dix répétitions (= dix flacons) par traitement, chaque flacon contenant un explant. Les paramètres devant être évalués ont été considérés comme possédant une distribution de Poisson (anormale) et nous avons opté pour une analyse de modèles linéaires généralisés [9]. Les traitements étant de nature quantitative, le constat de différences significatives entre eux a conduit à un prédictif linéaire correspondant à des modèles de régression multiple (superficie de réponse) appropriés. Le choix du meilleur modèle de régression a été basé sur la qualité de l'ajustement et, si possible, sur l'absence de signification des déviations de régression. La détection de différences significatives a été obtenue par analyse de « déviance » [9], utilisant le Khi-2 des différentes réductions de modèles. Pour la taille moyenne des tigelles, il n'a pas été possible d'adopter un modèle de régression multiple satisfaisant et l'effet des traitements a été étudié par analyse de régression simple.

3. Résultats

Les différentes concentrations de BAP n'ont pas entraîné de différences significatives du nombre moyen de tigelles obtenu par segment nodal. Au cours de l'expérimentation menée, la production moyenne observée a été de 1,5 tigelles par explant mis en culture quelle que soit la concentration de BAP, que cette cytokinine soit utilisée seule ou qu'elle soit associée à différentes concentrations d'ANA, en présence ou non de GA₃. Les segments nodaux mis en culture en milieux sans régulateurs de croissance ont également produit des boutures.

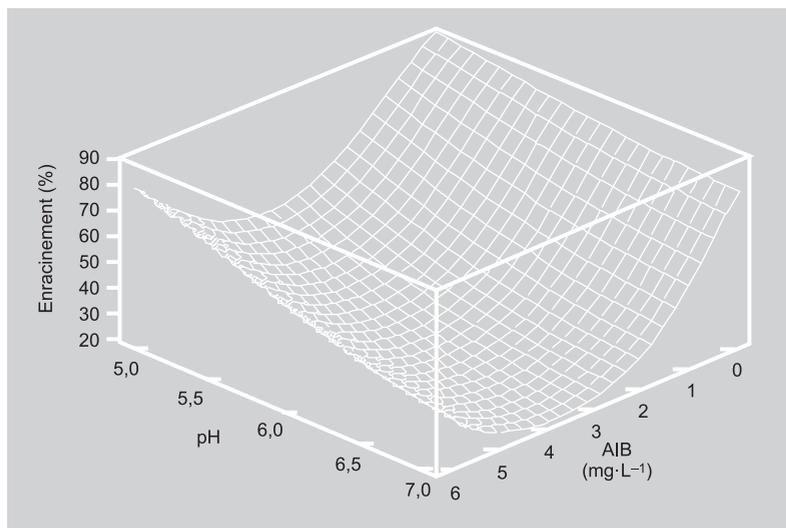
Tableau I.

Effet de l'addition de benzylaminopurine (BAP) et de l'acide gibbérellique (GA_3) sur la longueur moyenne de plantules d'*Annona glabra* L. issues de la micropropagation de segments nodaux, mesurées après 45 j de culture *in vitro* (moyenne de 10 répétitions par traitement).

Régulateur de croissance ($mg \cdot L^{-1}$)		Longueur moyenne des boutures (cm)
BAP	GA_3	
0,00	0,0	$1,12 \pm 0,3$
0,05	0,0	$1,45 \pm 0,3$
0,05	1,0	$0,79 \pm 0,2$
0,50	0,0	$2,12 \pm 0,8$
0,50	1,0	$0,68 \pm 0,1$
1,00	0,0	$0,80 \pm 0,2$
1,00	1,0	$0,68 \pm 0,2$
1,50	0,0	$1,19 \pm 0,6$
1,50	1,0	$0,44 \pm 0,4$

Figure 1.

Effets de l'ajout de différentes concentrations en AIB dans le milieu d'enracinement et de différents pH sur le pourcentage de boutures d'*Annona glabra* L. enracinées après 30 jours de culture (moyenne de 10 répétitions par traitement, $P \leq 0,05$, test Khi-2).



La longueur moyenne des tiges n'a été affectée que par les concentrations en BAP, l'interaction de cette substance avec le GA_3 étant par ailleurs significative ($P \leq 0,05$). En effet, l'addition d'ANA au milieu de culture, dans les concentrations testées, n'a pas stimulé la croissance de ces organes. Les tiges de tailles moyennes les plus élevées ont été obtenues en utilisant la concentration de $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BAP ; les concentrations supé-

rieures, de (1 et $1,5$) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BAP, ont induit des tiges de moindre longueur (tableau I).

La présence de $1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ dans le milieu de culture a eu un effet négatif sur le développement des tiges ; en effet, les milieux avec GA_3 n'ont produit que des tiges de taille inférieure à $1,0 \text{ cm}$, insuffisante pour réussir la phase d'enracinement qui a suivi.

Au cours de la phase de multiplication d'*Annona glabra* L., nous avons observé une nécrose de l'apex des boutures mises en culture et une abscission foliaire.

Le pourcentage de tiges enracinées et le nombre moyen de racines produites par chacune d'elles ont été affectés par la concentration en AIB et par le pH du milieu de culture. L'utilisation de AIB, principalement dans des concentrations supérieures à $1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, a réduit le pourcentage d'enracinement (figure 1) et le nombre moyen de racines produites par tige (figure 2).

Le plus fort pourcentage de tiges enracinées (90 %) et le plus grand nombre moyen de racines (deux racines par explant) ont pu être obtenus sans addition d'AIB au milieu de culture. Quelle que soit la concentration en AIB testée, c'est la réduction du pH de $7,0$ à $5,0$ qui a permis la meilleure réponse à la formation de racines, par augmentation du pourcentage d'enracinement et du nombre moyen de racines produites par tige.

Dans un milieu d'enracinement à pH de $5,0$, l'augmentation de la concentration en AIB a réduit, de manière significative et progressive, la longueur moyenne des racines produites (figure 3). Aux pH supérieurs, l'augmentation de la concentration en AIB n'a pas eu d'effet significatif sur la taille moyenne des racines formées.

4. Discussion

La méthodologie développée dans cette étude a permis la micropropagation d'*Annona glabra* L. à partir d'explants de jeunes plantules issues de la germination de graines. Ces travaux constituent une première référence pour la réalisation de prochaines

études visant à optimiser les conditions de microculture de cette espèce et à améliorer la méthode de micropropagation.

Généralement, des concentrations élevées en cytokinines favorisent la production d'un grand nombre de boutures [10]. Ainsi, il a été démontré que l'utilisation de concentrations de (2 et 4) mg de BAP·L⁻¹ augmentait de façon significative le nombre des boutures produites à partir d'explants d'*A. muricata* L. [5]. Par suite, il se pourrait que les faibles concentrations de BAP utilisées lors de notre expérimentation aient été insuffisantes pour induire des différences parmi les taux de multiplication observés.

Chez certaines espèces, comme *Maclura tinctoria* [11] ou *Nothofagus alpina*, l'utilisation d'ANA et de GA₃ combinés au BAP n'a pas conduit à améliorer le taux de multiplication [12]. Chez *A. muricata* L., l'utilisation de (0,5 ou 0,1) mg d'ANA·L⁻¹ avec 2,0 mg de BAP·L⁻¹ s'est révélée nécessaire pour maximiser la prolifération de tigelles sur des explants jeunes ou adultes, respectivement [5]. Toutefois, des résultats contradictoires ont été obtenus chez *A. squamosa* L., puisque l'ajout d'ANA au milieu de culture a réduit significativement le nombre de tigelles produites par explant, comparé à l'utilisation du BAP seul [13].

Au cours de nos expérimentations, la présence du régulateur de croissance GA₃ dans le milieu de culture n'a pas aidé à la prolifération de tigelles à partir d'explants prélevés sur des plantules d'*A. glabra* L. Un résultat similaire a été obtenu par Lemos et Blake [5] lors de la production de tigelles sur de jeunes explants d'*A. muricata* L. Selon George [14], l'effet du GA₃ sur la prolifération des tigelles varierait en fonction de l'interaction existant avec d'autres régulateurs de croissance et dépendrait également de l'espèce à reproduire. De façon générale, le GA₃ est de peu d'effet sur la prolifération des tigelles, ce qui pourrait provenir du fait que les gibbérellines sont utilisées en faibles concentrations et qu'elles perdent 90 % de leur activité biologique au passage en autoclave [15].

Les nécroses de l'extrémité des tigelles et l'abscission foliaire que nous avons observées lors de la phase de multiplication

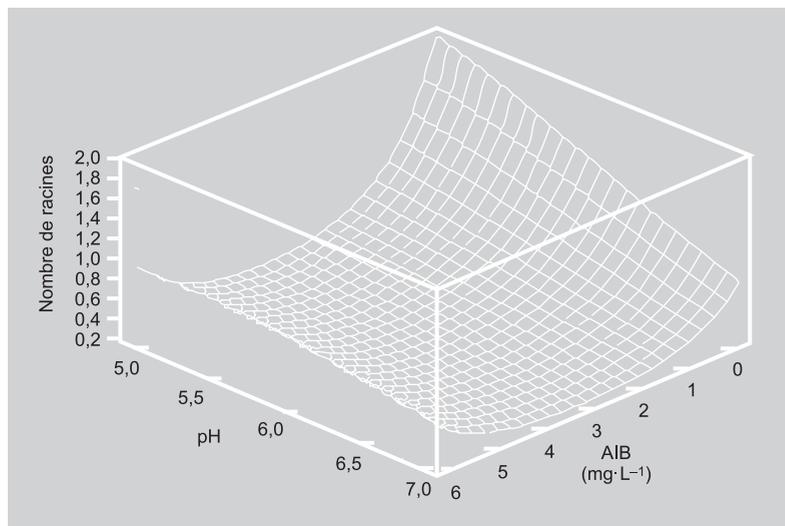


Figure 2. Effets de l'ajout de différentes concentrations en AIB dans le milieu d'enracinement et de différents pH sur le nombre moyen des racines produites par les boutures d'*Annona glabra* L. enracinées après 30 jours de culture (moyenne de 10 répétitions par traitement, $P \leq 0,05$, test Khi-2).

d'*A. glabra* L. constituent des désordres physiologiques fréquemment mentionnés durant la culture *in vitro* d'autres espèces d'*Annona* [13] ; ils ont été associés à des manques de calcium [16] ou à une accumulation d'éthylène [17]. Selon ces auteurs, le type de flacon utilisé et la technique de scellement adoptée seraient les principaux facteurs responsables du développement de ces désordres ; ils conduiraient à maintenir une forte humidité relative de l'air à l'intérieur du récipient, empêchant la transpiration de la plante nécessaire au calcium pour atteindre le xylème de la plante, et ils rendraient impossibles les échanges gazeux avec l'atmosphère extérieure, facilitant l'accumulation des gaz produits par les tissus à des niveaux physiologiquement actifs.

Le pourcentage élevé d'enracinement et le nombre moyen important de racines formées en l'absence d'AIB que nous avons constatés suggèreraient que la formation de racines adventices chez les pousses d'*A. glabra* L. ne dépendrait pas d'un apport exogène de ce régulateur de croissance. De la même façon, Jordan *et al.* [12] ont observé un pourcentage élevé d'enracinement d'explants de *Nothofagus alpina* en absence de régulateur de croissance. Ce fait pourrait indiquer un taux élevé d'auxines endogènes chez les explants et expliquer la relative facilité d'enracinement de cette espèce par rapport à *A. squamosa* L. [1] et à *A. cherimola* Mill.

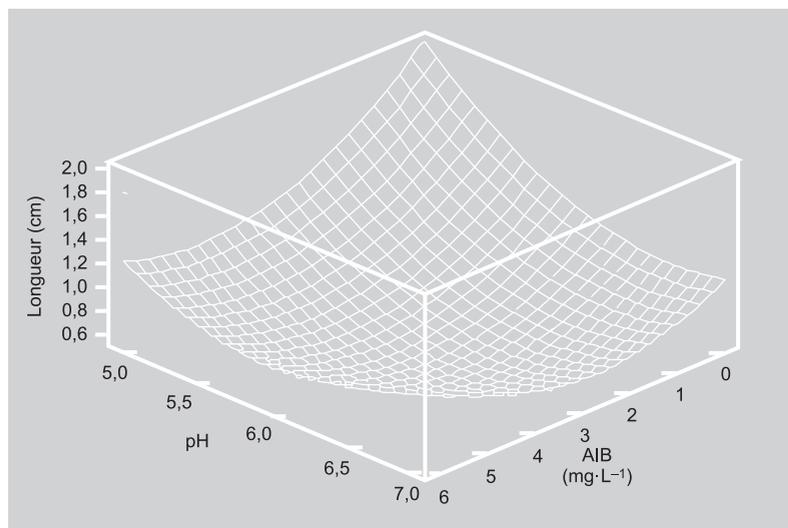


Figure 3. Effets de l'ajout de différentes concentrations en AIB dans le milieu d'enracinement et de différents pH sur la taille moyenne des racines produites par les boutures d'*Annona glabra* L. enracinées après 30 jours de culture (moyenne de 10 répétitions par traitement, $P \leq 0,05$, test Khi-2).

[2] qui requièrent une addition d'auxine au milieu de culture afin d'optimiser l'enracinement des tiges issues d'une phase de prolifération.

L'effet du pH sur l'enracinement des tiges néoformées à partir de la mise en culture d'explants de *A. glabra* L., mis en évidence au cours de nos expérimentations, a également été décrit par Harbage *et al.* [18] ; ces auteurs ont observé une stimulation de la formation des racines chez des boutures de pommiers dont le pH du milieu d'enracinement avait été réduit de 7,0 à 4,0. Selon Harbage *et al.*, la réaction des propagules à l'auxine exogène dépendrait fréquemment de la concentration appliquée, du niveau d'absorption et du métabolisme du tissu qui en découle, sachant que l'absorption d'AIB, compte tenu de la nature acide de ces molécules, pourrait être régulée par le pH du milieu de culture [18].

Bien que de fortes concentrations en charbon actif puissent absorber en grande partie l'AIB présent dans le milieu de culture, la réponse à l'enracinement des tiges d'*A. glabra* L. observée avec un pH de 5,0, en comparaison avec celle d'un pH de 6,0 ou 7,0, pourrait être due à une augmentation de l'absorption de l'AIB liée au pH acide du milieu de culture, compensant la disponibilité réduite de ce régulateur de croissance dans le milieu de culture. L'effet de l'augmentation de la concentration en AIB en

présence d'un pH de 5,0 sur la taille moyenne des racines corrobore les descriptions de Harbage *et al.* [19] selon lesquelles une quantité excessive d'auxine peut inhiber la croissance des racines.

Les résultats indiquent que l'effet du pH ne semble pas se limiter à la phase d'induction de la formation des racines adventives, comme l'avaient proposé Harbage *et al.* [19], mais qu'il influe également sur la croissance de celles-ci. Cependant, selon Gill *et al.* [20], la réussite de la phase d'acclimatation est davantage liée au nombre de racines qu'à leur taille. Selon Grattapaglia et Machado [21], de petites racines facilitent le rinçage destiné à éliminer le milieu de culture des racines des plantules et leur repiquage dans le substrat de transplantation.

Références

- [1] Lemos E.E.P., Blake J., Micropropagation of juvenile and mature *Annona squamosa* L., *Plant Cell Tissue Organ. Cult.* 46 (1) (1996) 77–79.
- [2] Padilla I.M.G., Encina C.L., Micropropagation of adult cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) cv. Fino de Jete, *In vitro Cell. Dev.-Pl.* 40 (2) (2004) 210–214.
- [3] Encina C.L., Barcelo-Munhoz A., Herrero-Castano A., Pliego-Alfaro F., *In vitro* morphogenesis of juvenile *Annona cherimola* Mill. bud explants, *J. Hortic. Sci.* 69 (6) (1994) 1053–1059.
- [4] Encina C.L., Padilla I.M.G., Cazorla J.M., Caro E., Tissue culture in cherimoya, *Acta Hortic.* 497 (1999) 289–301.
- [5] Lemos E.E.P., Blake J., Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L., *J. Hortic. Sci.* 71 (3) (1996) 395–403.
- [6] Rasai S., George A.P., Kantharajah A.S., Tissue culture of *Annona* spp. (cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): a review, *Scientia Hortic.* 62 (1/2) (1995) 1–14.
- [7] Murashige T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plantarum* 15 (1962) 473–497.
- [8] Lloyd G., McCown B., Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp., *HortScience* 15 (416) (1980) abstr. 321.

- [9] Demétrio C.G.B., Modelos lineares generalizados na experimentação agronômica, in: Anais do 5º simpósio de estatística aplicada à experimentação agronômica, Reunião Anual da Sociedade Internacional de Biometria, 38, Porto Alegre, Brazil, 1993.
- [10] Tanuwidjaja C., Webb D.T., Sagawa Y., Micropropagation of *Akia* (*Wikstroemia uva-ursi* A. Gray), Plant Cell Tiss. Org. 53 (2) (1998) 85–90.
- [11] Gomes G.A.C., Propagação *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*), UFLA, Dissertação, Lavras, Brasil, 1999, 91 p.
- [12] Jordan M., Vellozo J., Sabja A.M., Organogenesis *in vitro* of *Nothofagus alpina* (P. et E.) Oerst., Fagaceae, Plant Cell Rep. 15 (10) (1996) 792–795.
- [13] Zobayed S.M.A., Armstrong J., Armstrong W., Multiple shoot induction and leaf and flower bud abscission of *Annona* cultures as affected by types of ventilation, Plant Cell Tissue Organ. Cult. 69 (2) (2002) 155–165.
- [14] George E.F., Plant propagation by tissue culture, part I. The technology, 2nd ed., Edington: Exegetics, UK, 1996, 1574 p.
- [15] Yui E., Pasqual M., Ramos J.D., Nagib N., Chalfun J., Ishida J.S., Influência de reguladores de crescimento na proliferação *in vitro* de brotos do porta-enxerto de macieira M-7, Pesquisa Agropecuária Brasileira 28 (5) (1993) 597–602.
- [16] Lemos E.E.P., Blake J., Control of leaf abscission in nodal cultures of *Annona squamosa* L., J. Hortic. Sci. 71 (5) (1996) 721–728.
- [17] Armstrong J., Lemos E.E.P., Zobayed S.M.A., Justin S.H.F.W., Armstrong W., A humidity-induced convective through flow ventilation system benefits *Annona squamosa* L. explants and coconut colloid, Ann. Bot-London 79 (1) (1997) 31–40.
- [18] Harbage J.F., Stimart D.P., Auer C., pH affects 1H-indole-3-butyric acid uptake but not metabolism during the initiation phase of adventitious root induction in apple microcuttings, J. Am. Soc. Hortic. Sci. 123 (1) (1998) 6–10.
- [19] Harbage J.F., Stimart D.P., Evert R.F. Anatomy of adventitious root formation in microcuttings of *Malus domestica* Borkh. 'Gala', J. Am. Soc. Hortic. Sci. 118 (5) (1993) 680–688.
- [20] Gill M.I.S., Singh Z., Dhillon B.S., Gosal S.S., Somatic embryogenesis and plantlet regeneration on calluses derived from seedlings explants of 'Kinnow' mandarin (*Citrus nobilis* × *Citrus deliciosa* Tenore), J. Hortic. Sci. 69 (1994) 231–236.
- [21] Grattapaglia D., Machado M.A., Micropropagação, in: Torres A.C., Caldas L.S., Buso J.A. (Eds.), Cultura de tecidos e transformação genética de plantas, ABCTP/EMBRAPA – CNPH, Brasília, Brasil, 1998, p. 331–353.

Micropropagación de *Annona glabra* L. a partir de segmentos nodales.

Resumen — Introducción. La propagación *in vitro* de *A. glabra* L., aún no estudiada, podría permitir remediar algunas dificultades de multiplicación de esta especie frutal leñosa. Dado que ya se experimentaron exitosamente técnicas de micropropagación con otras especies de *Annona* (*A. squamosa*, *A. cherimola*, *A. muricata*), pretendimos desarrollar un sistema completo de micropropagación de *A. glabra* L. utilizando explantes de jóvenes plántulas. **Material y métodos.** Para la fase de proliferación de brotes axilares (duración 30 días), se pusieron algunos esquejes de segmentos nodales tomados del tronco de jóvenes plantas matrices en cultivo en un medio de base MS suplido por diferentes concentraciones de BAP, utilizada sólo o combinada con las diferentes concentraciones de ANA, y con o sin 1,0 mg de $GA_3 \cdot L^{-1}$. Después de esta fase, se midieron el número medio de radículas obtenidas por explante así como su tamaño medio para cada uno de los tratamientos. Para el enraizamiento de las radículas obtenidas después de esta proliferación, se testaron distintas concentraciones de AIB y diferentes pH del medio (duración 15 días). Al final de esta fase, se evaluaron el número medio de raíces obtenidas por radícula y su tamaño medio. La aclimatación de las microplantas se siguió a continuación en condiciones controladas durante 21 días. **Resultados y discusión.** Todos los tratamientos, incluso aquellos desprovistos de reguladores de crecimiento, permitieron obtener de media 1,5 radículas por segmento nodal. No obstante, las radículas desarrolladas se obtuvieron utilizando 0,5 $mg \cdot L^{-1}$ de BAP utilizado solo. La adición de 1,0 mg de $GA_3 \cdot L^{-1}$ en el medio de multiplicación no fue favorable para el desarrollo de las radículas. Durante la experimentación *in vitro*, se observaron tanto una necrosis de la extremidad de las radículas como una abscisión foliar; lo que podría vincularse a un déficit de calcio y a la acumulación de etileno dentro del recipiente de cultura. El porcentaje más elevado de esquejes arraigados y el mayor número de raíces producidas por explante se obtuvieron sin adición de AIB en el medio de cultivo, utilizando 4,0 $mg \cdot L^{-1}$ de carbón activo y un pH de 5,0. Las microplantas con raíces se aclimataron exitosamente.

Brasil / *Annona glabra* / propagación de plantas / micropropagación / medio de cultivo / técnicas de cultivo / sustancias de crecimiento vegetal