

# Protocolo de desinfección para establecimiento *in vitro* de meristema apical de banano *Musa* spp.

## *Disinfection protocol for in vitro establishment of banana apical meristema *Musa* spp.*

Yerutí Mongelós Franco<sup>1,\*</sup>, Carlos Mussi Cataldi<sup>1</sup>, Nabila Duarte Ovejero<sup>2</sup> y Maura Díaz Lezcano<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay.

<sup>2</sup> Maestría en Fitosanidad, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay.

<sup>3</sup> Laboratorio de Biología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay.

\* Autor para correspondencia: yeruti91@gmail.com

Fecha de recepción del manuscrito: 30/07/2020

Fecha de aceptación del manuscrito: 16/12/2020

Fecha de publicación: 31/12/2020

**Resumen**—La propagación *in vitro* de banano (*Musa* spp.) constituye una alternativa rentable y segura para la producción de mudas libres de patógenos. Uno de los principales problemas del establecimiento *in vitro* de este cultivo es la alta carga de contaminantes que acompaña a los explantes. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar dos concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) para la desinfección de meristemas de *Musa* spp. Las concentraciones utilizadas fueron de 5% y 10%, con un tiempo de inmersión de 5 minutos, y fueron evaluados los porcentajes de sobrevivencia, contaminación y oxidación. Se registró un 100% de sobrevivencia de explantes y 0% de contaminación en el tratamiento con NaClO al 10% durante 5 minutos, en contraste con un 62,5% de explantes viables y un 37,5% de contaminación con hongos y bacterias en el tratamiento con NaClO al 5%. El porcentaje de oxidación de explantes fue de 100% en ambos tratamientos. El tratamiento con NaClO al 10% durante 5 minutos fue el más efectivo para la desinfección y establecimiento *in vitro* de meristema apical de *Musa* spp.

**Palabras clave**—Banana; Micropropagación; Contaminación; Oxidación.

**Abstract**—*In vitro* propagation of banana (*Musa* spp.) is a profitable and safe alternative for the production of pathogen-free seedlings. One of the main problems in the *in vitro* establishment of this culture is the high load of contaminants that accompanies the explants. Therefore, the objective of this study was to evaluate two concentrations of sodium hypochlorite (NaClO) for the disinfection of meristems of *Musa* spp. The concentrations used were 5% and 10%, with an immersion time of 5 minutes, and the percentages of survival, contamination and oxidation were evaluated. A 100% survival of explants and 0% contamination were recorded in the treatment with 10% NaClO for 5 minutes, in contrast to 62.5% of viable explants and 37.5% contamination with fungi and bacteria in treatment with 5% NaClO. The percentage of oxidation of explants was 100% in both treatments. Treatment with 10% NaClO for 5 minutes was the most effective for disinfection and *in vitro* establishment of the apical meristem of *Musa* spp.

**Keywords**—Banana; Micropropagation; Contamination; Oxidation.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de banano (*Musa* spp.) tiene gran relevancia económica y social en Paraguay, ya que constituye una fuente importante de ingresos para pequeños productores, así como también para medianos productores asociados en cooperativas productivas, principalmente en los departamentos de Caaguazú y San Pedro, zonas productoras de banano por excelencia en el país (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2008). El consumo de banano está difundido en todo el mundo, por lo cual cuenta con un mercado nacional e internacional importante.

Sin embargo, a pesar del enorme potencial productivo, el cultivo presenta diversas limitantes, especialmente en lo que concierne a la propagación. Las variedades comerciales de banano no producen semillas, por lo cual la propagación se realiza con material vegetativo extraído directamente del campo, principalmente por cormos. Sin embargo, esta actividad conlleva diferentes problemas fitosanitarios ya que generalmente poseen una alta carga de contaminantes, y constituyen un medio de diseminación de patógenos, lo cual no garantiza la productividad y sanidad de las plantaciones. Además, debido al escaso número de variedades locales y su reproducción asexual, el banano tiene una reducida reserva genética que lo hace vulnerable a plagas y enfermedades.

Los cultivares son susceptibles a enfermedades como la Sigatoka negra (*Mycosphaella fijiensis*), la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), y el Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum f. sp cubense*) que ocasionan pérdidas en la producción de frutas y afecta la disponibilidad de material vegetal de propagación sano en campo (Ancasi *et al.*, 2016). Otro de los problemas que se presentan con esta actividad es la lentitud de la propagación y la baja tasa de multiplicación obtenida en el campo (Díaz Lezcano *et al.*, 2016).

Frente a estos problemas, la propagación *in vitro* constituye una de las alternativas para la obtención de plantas sanas libres de patógenos (Sandoval *et al.*, 1991). El cultivo *in vitro* de meristema apical permite la producción en masa de mudas de banano totalmente uniformes y de alta calidad sanitaria, libres de patógenos, incluso en espacios reducidos (Castro *et al.*, 2002). Por todos los beneficios que ofrece esta técnica, es fundamental establecer un protocolo eficiente de desinfección de los explantes que permita la implementación óptima de esta técnica.

Actualmente se han desarrollado con gran éxito diferentes técnicas y metodologías para la micropropagación *in vitro* de musáceas, que permiten la obtención masiva de plántulas útiles en el establecimiento de cultivos comerciales (Pérez *et al.*, 2011). La multiplicación *in vitro* acompañada de una buena selección en el campo del material parental, permite disponer de plantas con excelentes condiciones agronómicas y fitosanitarias para conservar la especie y disponer de germoplasma (Medina *et al.*, 2015).

La propagación *in vitro* de *Musa spp.* generalmente se realiza por meristemos apicales extraídos de los cormos, debido a que estos meristemos tienen un crecimiento longitudinal y también por su totipotencia. Los meristemos se establecen en un medio de cultivo adecuado donde puede crecer una nueva planta (Ortega *et al.*, 2010). La desinfección de los explantes es fundamental para esta técnica, y la concentración del desinfectante puede ser determinante para su éxito (Díaz Lezcano *et al.*, 2016).

Por todo lo expuesto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la efectividad de dos concentraciones de hipoclorito de sodio en la desinfección de meristemos apicales para el establecimiento *in vitro* de banano *Musa spp.*, bajo la premisa de que, a mayor concentración de hipoclorito de sodio, mayor efectividad en el control de la contaminación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo fue desarrollado en el Laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, ubicada en la ciudad de San Lorenzo, Departamento Central, Paraguay. El periodo de ejecución estuvo comprendido entre los meses de abril y mayo de 2018.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 2 tratamientos y 8 repeticiones, totalizando 16 unidades experimentales, cada una de las cuales estuvo constituida por un tubo de ensayo con un explante. Los tratamientos

aplicados estuvieron comprendidos por diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio en la desinfección de los explantes, los cuales se detallan en la Tabla 1. El número reducido del número de muestras se dio en función de la escasez en la disponibilidad de plantas madres sanas.

**Tabla 1:** Tratamientos aplicados en la desinfección de meristema apical de *Musa sp.* para establecimiento *in vitro*. FCA – UNA. San Lorenzo, Paraguay. 2018.

Tratamiento	Concentración NaClO	Tiempo de exposición
1	5%	5 min.
2	10%	5 min.

Para la siembra *in vitro*, se utilizaron 16 ápices provenientes de hijuelos de *Musa sp.* de 0,8 a 1 m de altura, colectados del Campo Experimental de la FCA – UNA.

Los hijuelos fueron extraídos del suelo con una pala y en el campo se procedió a eliminar la parte aérea. Posteriormente, las hojas del pseudotallo fueron eliminadas hasta observar los tejidos blancos del cormo. Los tejidos blancos también fueron removidos hasta obtener un pequeño cono con meristema de 4 a 6 cm de longitud, los cuales constituyeron el material de siembra.

Los mismos fueron desinfectados mediante una inmersión en etanol al 70% durante 30 segundos, luego en NaClO en las diferentes concentraciones según los tratamientos durante 5 minutos, seguido de un triple enjuague con agua destilada estéril. El material desinfectado fue sembrado en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con carbón activado (3 g.L<sup>-1</sup>), y fue incubado en oscuridad durante 7 días (Fig. 1).



**Fig. 1:** Procedimiento para establecimiento *in vitro* de *Musa sp.* A) Meristema apical. B) Aplicación de los tratamientos. C) Siembra en medio MS con carbón activado. FCA – UNA. San Lorenzo, Paraguay. 2018.

La identificación del agente causal se basó en la identificación visual del crecimiento micelial de los hongos o la apariencia lechosa de color blanquecino o amarillo, característico de las bacterias, pudiéndose manifestar ambos patógenos: dentro del medio de cultivo, alrededor del explante en contacto con el medio de cultivo o saliendo del meristema del explante.

Las variables evaluadas fueron el porcentaje de sobrevivencia, contaminación y oxidación. Se aplicó la prueba de T Student a un nivel de confianza del 95% para verificar si existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados.

## RESULTADOS

Se evaluaron dos concentraciones de hipoclorito de sodio para determinar la eficiencia en la desinfección de ápices de *Musa* sp. con la finalidad de realizar el establecimiento *in vitro*. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 2.

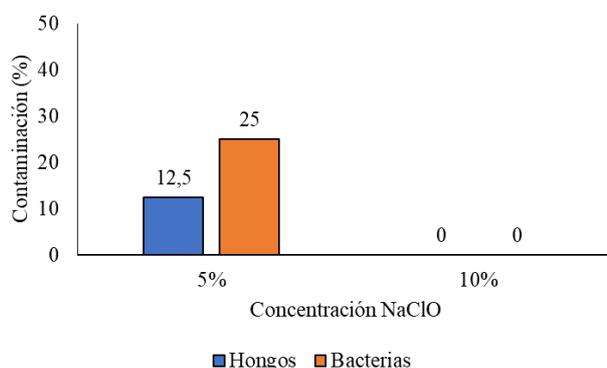
**Tabla 2:** Supervivencia, contaminación y oxidación de ápices de *Musa* sp. desinfectados con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio. FCA – UNA. San Lorenzo, Paraguay. 2018.

NaClO (%)	Supervivencia (%)	Contaminación (%)	Oxidación (%)
5	62,5	37,5	100
10	100	0	100

El menor porcentaje de supervivencia se registró en el tratamiento con hipoclorito de sodio al 5%, en donde se constató un 62,5% de explantes viables. Por otro lado, para este tratamiento se registró un 37,5% de contaminación con hongos y bacterias. El tratamiento con hipoclorito de sodio al 10% presentó un 100% de supervivencia y 0% de explantes contaminados, por lo cual resultó ser el tratamiento más efectivo en el control de la contaminación para el establecimiento *in vitro* de meristema apical de banano, registrándose diferencias significativas mediante la aplicación de la prueba de T Student a un nivel de confianza del 95%.

En cuanto a la contaminación del medio de cultivo (Fig. 2), se presentó cerca de 38% de explantes contaminados en el tratamiento con la concentración de 5% de NaClO y para la mayor concentración no se presentó contaminación alguna, siendo esta más efectiva en la desinfección del material. En cuanto a los agentes contaminantes, se puede constatar que el 25% estuvo constituido por bacterias, mientras que un 12,5% de explantes estuvieron contaminados con hongos.

En relación al porcentaje de oxidación, se observó que, para ambos tratamientos, el 100% de los meristemas apicales sembrados presentaron oxidación en diferentes niveles (Figura 2).



**Fig. 2:** Contaminación con hongos y bacterias en explantes de *Musa* sp. tratados con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio. FCA – UNA. San Lorenzo, Paraguay. 2018..

## DISCUSIÓN

Abdelwahd *et al.* (2008) evaluaron diferentes protocolos de desinfección para el establecimiento *in vitro* de meristema apical de *Musa* sp., y constataron que la probabilidad de contaminación por hongos y bacterias es 8,65 veces mayor cuando se utiliza hipoclorito de sodio al 5%, en contraste con la utilización de hipoclorito de sodio al 10%. Los resultados obtenidos en la presente investigación también demostraron que la aplicación de NaClO al 10% es más efectiva para controlar la contaminación, en contraste con la utilización de NaClO al 5%.

Al respecto, Medina *et al.* (2015) registraron un bajo porcentaje de contaminación en explantes tratados con hipoclorito de sodio al 3%, sin embargo, el tiempo de exposición fue de 20 minutos. Por otro lado, en un estudio sobre el efecto del carbón activado y las condiciones de oscuridad para la propagación *in vitro* de *Musa* sp., Díaz Lezcano *et al.* (2016) registraron un 39,09% de ápices contaminados en la fase de establecimiento, con un tratamiento con hipoclorito de sodio al 5%, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio.

Por su parte, Pereira *et al.* (2003) mencionan que la contaminación fúngica en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales procede principalmente del ambiente, mientras que las bacterias generalmente acompañan al explante y son un indicador de una desinfección deficiente. Así mismo, estos autores afirman que la contaminación bacteriana es más perjudicial, ya que no se detecta de forma temprana y los agentes contaminantes pueden ser transferidos durante los subcultivos. En la presente investigación se registró un 25% y 12,5% de contaminación con bacterias y hongos, respectivamente, en el tratamiento con 5% de NaClO, lo cual indica una desinfección insuficiente de los explantes.

Sin embargo, la aplicación de NaClO al 10% resultó efectiva para controlar estos agentes contaminantes. Sánchez y Salaverría (2004) también observaron que a medida que se incrementa la concentración de cloro y el tiempo de inmersión, la contaminación de los explantes disminuye.

En cuanto a la oxidación, el 100% de los explantes tratados con 5% y 10% de NaClO presentó oxidación. Ramírez *et al.* (2008), la oxidación puede estar asociada con compuestos fenólicos, responsables del ennegrecimiento, causado por enzimas oxidoreductasas que se liberan durante el proceso de obtención de los explantes por corte del tejido, lo cual es muy característico en banano, y por esta razón se utiliza carbón activado en el medio de cultivo, para adsorber los compuestos fenólicos, aunque en la presente investigación no evitó la oxidación, por lo que queda abierta la posibilidad de aumentar su concentración para obtener mejores resultados.

Existe también la posibilidad de utilizar agentes antioxidantes o la combinación de estos con carbón activado para aumentar el porcentaje de supervivencia de los explantes. Abdelwahd *et al.* (2008) observaron que la suplementación con ácido ascórbico a una concentración de 1 mg.L-1 en

combinación con 10 g.L-1 de carbón activado en el medio de cultivo redujo significativamente la oxidación y mejoró la regeneración *in vitro* de brotes de habas Vicia faba L.

Los autores anteriormente citados también sugieren la utilización de nitrato de plata o cisteína como agentes antioxidantes. Sánchez y Salaverría (2004) eliminaron completamente la oxidación en explantes de fresa *Fragaria x ananassa* al adicionar 4 g.L-1 de cisteína al medio de cultivo, en presencia de luz, lo cual podría funcionar para la propagación *in vitro* de meristema apical de banano.

En relación a la sobrevivencia, Ubilla N (2016) obtuvo resultados similares a los obtenidos en este estudio al registrar un 62% a 64% de meristemas apicales de *Musa sp.* establecidos *in vitro*, cuando sometió estos explantes a una desinfección con hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos. A medida que se incrementa la concentración de cloro para la desinfección, la sobrevivencia de explantes se ve reducida hasta un 50% en algunos casos (Sánchez y Salaverría, 2004).

## CONCLUSIÓN

En las condiciones en las cuales se llevó a cabo este estudio, se concluye que el tratamiento de desinfección más efectivo para el establecimiento *in vitro* de meristema apical de *Musa sp.* es con hipoclorito de sodio al 10%.

## REFERENCIAS

- Abdelwahd, R., Hakam, N., Labhilili, M., y Udupa, S. M. (2008). Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba vean. *African Journal of Biotechnology*, 7(8), 997–1002.
- Ancasi, R., Montero, J., Ferreira, N., y Muñoz, I. (2016). Determinación un mejor medio de cultivo en la fase de establecimiento para la propagación *in vitro* de plátano (*musa paradisiaca* L). *Journal of the Selva Andina Research Society.*, 7(2), 104–111.
- Castro, D., Días, J., y Montoya, N. (2002). Propagación clonal de bananos en birreactores de inmersión temporal. En Acorbat (Ed.), *Memorias xv reunión realizada en cartagena de indias* (pp. 4–88).
- Díaz Lezcano, M. I., Flor B, B. A., Enciso G, C. R., y González S, L. R. (2016). El carbón activado y las condiciones de oscuridad en la micropropagación de banana variedad nanicião. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 28(2), 140–146.
- Medina, M. A., Medina, C. L., y Medina, L. K. (2015). Propagación *in vitro* de *musa acuminata* (simmunds) plátano bocadillo del chocó, colombia, a partir del cultivo de meristemas apicales. *Revista Biodiversidad Neotropical*, 5(1), 47–53.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2008). *Censo agropecuario nacional*. Descargado de <http://www.mag.gov.py/>
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Ortega, N., Korvena, S., Ruiz, O., Santos, E., y Peralta, E. (2010). Obtención de multimeristemas y callos de diferentes variedades de banano y plátano *musa acuminata* a partir de meristemas apicales y scalps. *Revista Tecnológica ESPOL*, 23(1), 1–4.
- Pereira, J. E. S., Mattos, M. L., y Fortes, G. R. (2003). Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(7), 827–834.
- Pérez, M., Medero, V., Torres, M., López, J., Santos, A., y Rayas, A. (2011). Nueva alternativa para la micropropagación en inmersión temporal del cultivar del plátano vianda inivitpv-2011(aab). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 98–107.
- Ramírez, M., Lindorf, H., y García, E. (2008). Cambios morfoanatómicos en los ápices y del vástago y de la raíz del banano williams (*musa sp. aaa*) bajo distintas concentraciones de n6-bencil adenina. *Journal of Agriculture Universidad de Puerto Rico*, 92(2), 53–72.
- Sandoval, J., Brenes, G., y Pérez Sánchez, L. (1991). *Micropropagación de plátano y banano (musa aab, aaa) en el catie*. (techreport n.º 186). Turrialba (Costa Rica): CATIE.
- Sánchez, M. C., y Salaverría, J. L. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*fragaria x ananassa duch.*). *Revista UDO Agrícola*, 4(1), 21–26.
- Ubilla N, E. L. (2016). *Propagación in vitro de banano (musa acuminata) variedades gros michel y williams a partir de meristema*. (mathesis). Escuela Agrícola Panamericana, Carrera de Ingeniería Agronómica. Zamorano, Honduras.