



El carbón activado y las condiciones de oscuridad en la micropropagación de banana variedad Nanicão

Activated Carbon and dark conditions in banana micropropagation Variety Nanicão

Maura Isabel Díaz Lezcano *, *Bruno Alberto Flor Benítez* **, *Cipriano Ramón Enciso Garay* ***, *Luis Roberto González Segnana* ****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.55618

Resumen

El objetivo del trabajo fue evaluar los efectos del carbón activado y las condiciones de oscuridad inicial sobre la propagación *in vitro* de banana (*Musa spp.*) variedad Nanicão. Fueron empleados 64 ápices provenientes de hijuelos de 20 - 30 cm. Los tratamientos consistieron en la combinación de dos concentraciones de carbón activado (2 y 3 g/l) y dos condiciones de oscuridad inicial (15 y 30 días). El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2 y cuatro repeticiones. Cada unidad experimental estuvo constituida por cuatro ápices. Las variables evaluadas fueron la tasa media de multiplicación, el porcentaje de supervivencia, oxidación, contaminación y aclimatización de plántulas. El análisis estadístico consistió en el ANAVA con un nivel de significancia del 5 %. Las medias fueron comparadas a través del test de Tukey al 5 % de probabilidad. Los resultados mostraron que la combinación de 2 g/l de carbón activado y 15 días de oscuridad inicial promovió el mayor porcentaje de supervivencia del primer subcultivo que alcanzó 57,30 %. En la fase de establecimiento el porcentaje de contaminación de los ápices de 39,06 % mientras que en el primer subcultivo de 22,39 %. La oxidación en la fase de establecimiento fue de 9,37 % y en el primer subcultivo fue de 8,85 %. Se concluye que la combinación entre la concentración de 2 g/l de carbón activado y 15 días de período de incubación inicial resulta efectiva en el aumento de la supervivencia de los ápices.

Palabras clave: *Musa spp.*, banana, supervivencia, multiplicación *in vitro*.

Abstract

The objective of this work was to evaluate the effects of activated charcoal and the initial darkness conditions in the propagation *in vitro* of banana (*Musa spp.*) variety Nanicão. Were employed 64 apexes coming from shoots of approximately 20 to 30 cm. The treatments consisted in the combination of two concentrations of activated charcoal (2 and 3 g/l) and two initial dark conditions (15 and 30 days). The experimental design went completely randomized with 2 x 2 factorial arrangement and four replications. Each experimental unit consisted of four apexes. Statistical analysis consisted ANOVA with significance level of 5 %. The variables were the average rate of multiplication, survival percentage, oxidation, contamination and acclimatization of plantlets. Means were compared by Tukey test at 5 % of probability. The results showed significant difference in the interaction between the concentration of 2 g/l of activated charcoal and 15 days of initial darkness at the survival percentage from the first subculture which reached 57.30 %. In the establishment phase the percentage of contamination of the apexes was 39.06 % while that in the first subculture was 22.39 %. The oxidation in the establishment phase was 9.37 % and in the first subculture was 8.85 %. It is concluded the

* Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, Carrera de Ingeniería Forestal, San Lorenzo, maura.diaz@agr.una.py

** Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, Carrera de Ingeniería Agronómica, San Lorenzo, brunoflorbenitez@gmail.com

*** Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, Carrera de Ingeniería Agronómica, San Lorenzo, cenciso@agr.una.py

**** Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, Carrera de Ingeniería Agronómica, San Lorenzo, luis.gonzalez@agr.una.py

interaction between the concentration of 2 g/l of activated charcoal and 15 days of initial incubation period is effective in increasing survival.

Key words: *Musa* spp, banana, survival, *in vitro* multiplication.

Recibido: febrero 5 de 2016

Aprobado: octubre 14 de 2016



Introducción

La banana (*Musa* spp.) presenta un fruto de gran aceptación en el mercado nacional como internacional y proporciona una fuente importante de mano de obra para los habitantes de los diferentes departamentos involucrados en su producción como San Pedro y Caaguazú, Paraguay. Debido a que la mayoría de las variedades comerciales de banana no producen semillas, su propagación se realiza extrayendo del campo los propágulos. No obstante, esta actividad conlleva diferentes problemas fitosanitarios ya que los patógenos se diseminan de una plantación a otra, no garantizando la productividad y la sanidad de las mismas, 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.

En este sentido, la práctica e implementación del cultivo de ápices de banana es una técnica que facilita la obtención de plántulas de calidad y libre de patógenos, ofreciendo de igual manera uniformidad en la producción y mayor peso de racimos, ya que las plantas son seleccionadas por sus altas características productivas. Otra de las ventajas de este método de propagación referente al convencional es la posibilidad de obtener gran cantidad de plantines en un espacio físico reducido y en un corto periodo de tiempo. De ahí, la importancia de realizar trabajos o experiencias que lleven a dilucidar las incógnitas referentes a esta práctica. El objetivo del trabajo fue evaluar los efectos del carbón activado y las condiciones de oscuridad inicial sobre la propagación *in vitro* de banana (*Musa* spp.) variedad Nanicão.

Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción en San Lorenzo, Paraguay.

Se utilizaron 64 ápices provenientes de hijuelos de 20 - 30 cm de altura de la variedad Nanicão (AAA) seleccionados en base a sus sobresalientes características productivas (número de manos por racimo y peso del racimo, que en promedio fue de 26 kg). Posteriormente, se procedió a la eliminación en campo del pseudotallo a una altura aproximada de 10 cm por encima de la inserción de las hojas en el cormo basal y de las raíces hasta que se observen los tejidos blancos internos. El aislamiento y cultivo de ápices consistió en la remoción de la base externa de las hojas del pseudotallo y los tejidos blancos de la base del cormo (24 horas después de su recolección), hasta obtener aproximadamente un cono de 6 cm (longitud total del ápice desde su base hasta la parte distal) que preserve el meristema central y colocar el mismo en una solución de ácido ascórbico (100 mg/l) en tanto se reducían todos los ápices, conservando cerca de 1 cm³ de tejido del rizoma. Posteriormente, el material se sometió a un procedimiento de desinfección por 20 minutos con hipoclorito de sodio al 5 % para luego introducirlo en condiciones de asepsia en donde se realizaron tres enjuagues de cinco minutos cada uno, con agua destilada estéril. A continuación, con la ayuda de una lupa estereoscópica se realizó una primera reducción del material, conservando siempre un mínimo del tejido de rizoma para poder manipular fácilmente el ápice. Seguidamente, se realizó una segunda desinfección del cono superficialmente con hipoclorito de sodio al 5 %, adicionado con dos gotas de Polisorbato 20, durante 10 minutos y luego enjuagarlo tres veces con agua destilada estéril. A continuación, se procedió a eliminar los primordios adyacentes hasta obtener un tamaño final del explante de 1,5 - 2 cm. Inmediatamente, se cultivaron 16 ápices en medios MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementados con 2 y 3 g/l de carbón activado (CA) y puestas a oscuridad inicial de 15 y 30 días dependiendo del tratamiento. A los 45 días del establecimiento, el material que no presentó contaminación y oxidación aparente fue multiplicado. Se realizó 1 subcultivo luego de 22 días; también se procedió a la aclimatización de las plántulas generadas utilizando para tal efecto vermiculita y sustrato consistente en una mezcla de suelo agrícola y estiércol vacuno en proporciones 1:1, ambos previamente autoclavados. Las plántulas de aproximadamente 6 a 7 cm de longitud y que presentaron buen desarrollo tanto aéreo como radicular fueron extraídas de los frascos, se retiró el exceso del medio de cultivo de las plántulas y a continuación fueron plantadas bajo fotoperiodo constante de 16 horas luz. Las plántulas fueron irrigadas con un pulverizador manual e introducidas en una bolsa de polietileno, de esa manera se mantuvo al máximo la humedad relativa.

Bionota



Se evaluó la tasa media de multiplicación, el porcentaje de supervivencia, oxidación, contaminación y aclimatación de plántulas. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con arreglo bifactorial 2 x 2 y 4 repeticiones. Los tratamientos consistieron en la combinación de dos factores: Factor A, dos concentraciones de carbón activado, 2 y 3 g/l y Factor B, dos condiciones de oscuridad inicial, 15 y 30 días, totalizando 16 unidades experimentales. Cada unidad experimental estuvo compuesta por 4 ápices. Los datos obtenidos fueron sometidos a ANAVA (Análisis de Varianza) y las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey al nivel de 5% de probabilidad.

Resultados y Discusión

Tasa media de multiplicación

No se detectaron diferencias estadísticas significativas en el número de brotes del primer subcultivo en función a las concentraciones de carbón activado, 2 y 3 g/l, y los periodos de incubación inicial, 15 y 30 días respectivamente y la interacción de factores; registrándose una media de 1,46 brotes por explante, tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Tasa media de multiplicación de los ápices expuestos a concentraciones de 2 y 3 g/l de carbón activado y a 15 y 30 días de oscuridad inicial.

	15 días de oscuridad inicial	30 días de oscuridad inicial
2 g/l de carbón activado	1,75aA	2,12aA
3 g/l de carbón activado	0,5aA	1,5aA
Media	1,46	
C.V.	27,52	

Medias seguidas de la misma letra mayúscula en la columna y minúscula en la fila, no difieren entre sí por la prueba de Tukey al 5 % de probabilidad de error.

En la figura 1, se observa que no habiendo diferencias estadísticas significativas la combinación de 2g/l de carbón activado y 15 días de oscuridad inicial generó 26 brotes. En cuanto a la combinación de la concentración de carbón activado y condiciones de oscuridad se registró que con 2 g/l de carbón activado y 30 días de oscuridad inicial se obtuvo 22 brotes.

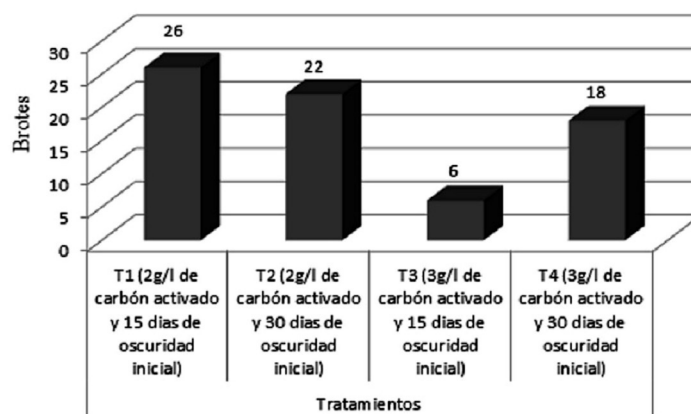


Figura 1. Cantidad total obtenida de brotes de banana (*Musa spp.*) al término del primer subcultivo expuestos a 2 y 3 g/l de carbón activado y a 15 y 30 días de oscuridad inicial.

Durante el primer subcultivo se observó la formación de raíces en los explantes. Según Oliveira & Silva (1997), el enraizamiento no es benéfico pues consume reserva que podría ser utilizada para la producción de brotes. La formación de brotes ocurrió solo durante el cultivo en el medio de multiplicación (suplementado con 4 mg/l de bencilaminopurina), y no en el medio de establecimiento. La relativamente baja concentración de bencilaminopurina (BAP) en el medio de establecimiento así como la concentración de citoquinina endógena, juntos con la presencia de altos niveles de ácido indolacético (AIA) en el tejido, son los involucrados en la ausencia de formación de brotes laterales (Zaffari, 2001).

Porcentaje de ápices supervivientes

En relación al porcentaje de ápices supervivientes en el primer subcultivo (tabla 2), el análisis estadístico no se detectaron diferencias significativas en la respuesta de los ápices a las concentraciones de carbón activado y las condiciones iniciales de oscuridad, aunque existió diferencia significativa en la interacción entre factores, verificándose que la combinación de 2 g/l de carbón activado y 15 días de oscuridad inicial promovió el mayor porcentaje de supervivencia que fue de 57,30%. Esto pudo ser consecuencia de la disminución de la contaminación y la oxidación de compuestos fenólicos. Oliveira (2010) obtuvo valores superiores a los de este experimento con 87,50% de explantes sobrevivientes al final del primer subcultivo. Por su parte, Hernández (2001) obtuvo resultados superiores alcanzando porcentajes de supervivencia en el primer subcultivo de entre 45,46% hasta el 100% en diferentes líneas comerciales de banana.

Tabla 2. Porcentaje de ápices sobrevivientes en el primer subcultivo expuestos a 2 y 3 g/l de carbón activado y a 15 y 30 días de oscuridad inicial.

Concentración de carbón activado	15 días de oscuridad inicial	30 días de oscuridad inicial	Media concentración de carbón activado
2 g/l de carbón activado	57,30aA	21,87aA	39,58A
3 g/l de carbón activado	4,17aB	41,67aA	22,92A
Media oscuridad inicial	30,73a	31,77 ^a	
D.M.S.	36,19		
C.V. (%)	25,32		

Medias seguidas de la misma letra mayúscula en la columna y minúscula en la fila, no difieren entre sí por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad de error.

Porcentaje de ápices con signos de oxidación

En la fase de establecimiento no existieron diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones de carbón activado como tampoco entre las condiciones de incubación inicial. La tabla 3 ilustra los resultados obtenidos.

Al medio de cultivo de Murashige & Skoog se añadió carbón activado para intentar favorecer el control de la oxidación fenólica y confirmado por Roca & Mroginski (1991), quienes manifiestan que el carbón activado se ha usado, para superar problemas específicos de oxidación los cuales se asocian con el cultivo de tejidos en musáceas.

Moreno *et al.* (2007), afirman que existió una respuesta positiva entre la oscuridad inicial y la adición de carbón activado al medio de cultivo, y concluyen que el uso del carbón activado como soporte catalítico en la oxidación del fenol resulta positivo y competitivo ante otros materiales porosos empleados bajo las mismas condiciones.

El análisis estadístico del porcentaje de oxidación en el primer subcultivo tampoco presentó diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones de carbón activado y las condiciones de incuba-





ción inicial; tampoco se registró interacción entre ambos factores, tal como se registra en la tabla 4. En el primer subcultivo se pudo constatar la presencia de oxidación en todos los tratamientos, esto podría deberse a la remoción del carbón activado del medio de cultivo debido a la interacción negativa del carbón activado con la hormona bencilaminopurina.

Tabla 3. Porcentaje de meristemas con signos de oxidación en la fase de establecimiento expuestos a concentraciones de 2 y 3 g/l de carbón activado y a 15 y 30 días de oscuridad inicial.

	15 días de Oscuridad Inicial	30 días de Oscuridad Inicial
2 g/l de Carbón Activado	6,25aA	0aA
3 g/l de Carbón Activado	25aA	6,25aA
Media	9,37	
C.V.	12,34	

Medias seguidas de la misma letra mayúscula en la columna y minúscula en la fila, no difieren entre sí por la prueba de Tukey al 5 % de probabilidad de error.

Tabla 4. Porcentaje de meristemas con signos de oxidación en el primer subcultivo expuestos a concentraciones de 2 y 3 g/l de carbón activado y a 15 y 30 días de oscuridad inicial.

	15 días de oscuridad inicial	30 días de oscuridad inicial	Media concentración de carbón activado
2 g/l de carbón activado	9,37aA	9,37aA	9,37A
3 g/l de carbón activado	4,17aA	12,50aA	8,33A
Media oscuridad inicial	6,77a	10,93a	
D.M.S.	18,77		
C.V. (%)	15,84		

Medias seguidas de la misma letra mayúscula en la columna y minúscula en la fila, no difieren entre sí por la prueba de Tukey al 5 % de probabilidad de error.

Porcentaje de ápices con signos de contaminación

El porcentaje de ápices con signos de contaminación no presentó diferencias significativas en la fase de establecimiento y el primer subcultivo en función a los factores, tampoco en la interacción.

En la fase de establecimiento se observó que la combinación de 3 g/l de carbón activado y 15 días de oscuridad inicial promovió 56,25% de contaminación, siendo la más elevada, seguida del tratamiento con 3 g/l de carbón activado y 30 días de oscuridad inicial. Las contaminaciones fueron aparentemente por bacterias en su gran mayoría presentando una coloración blanquecina o crema y en algunos casos por hongos. Estos resultados en cierta forma coinciden con los porcentajes obtenidos por Oliveira *et al.* (2008), en los cuales obtuvo valores de entre 39,30% y 19,50% en cuatro diferentes cultivares de *Musa spp.* Pereira *et al.* (2003), mencionan que a pesar de que las contaminaciones fúngicas también ocasionan importantes pérdidas materiales; las de origen bacterianas son las más serias, en razón de su difícil detección inicial, ya que pueden ser transferidas de un material a otro durante los sucesivos subcultivos. A diferencia de la contaminación bacteriana, la fúngica puede ser verificada fácilmente

a lo largo de los subcultivos, y es generalmente ocasionada por una inadecuada manipulación de las condiciones asépticas.

En el primer subcultivo se evidenció la presencia de contaminación en todos los tratamientos, sin embargo se comprobó una reducción del porcentaje de contaminación en comparación a la fase de establecimiento, obteniéndose el menor valor con 2 g/l de carbón activado y 15 días de oscuridad inicial que fue de 8,32% (figura 2). Lima & Moraes (2006) y Oliveira *et al.* (2008), verificaron de igual manera que las tasas de contaminación más elevadas son de origen bacteriana y la fase más susceptible de este tipo de contaminación es en el establecimiento *in vitro*, con tendencia a reducir a medida que van siendo realizados los subcultivos independientemente del cultivar a ser utilizado.

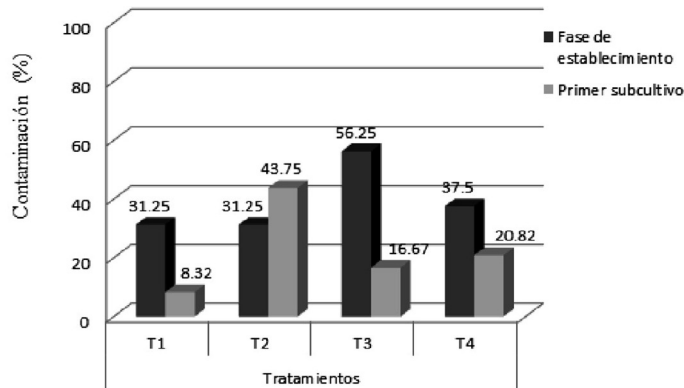


Figura 2. Porcentaje de contaminación en la fase de establecimiento y el primer subcultivo expuestos a concentraciones de 2 y 3 g/l de carbón activado y a 15 y 30 días de oscuridad inicial.

Aclimatización de plántulas

Una vez concluidas las evaluaciones, se procedió a la aclimatización de las plántulas a manera de observar la supervivencia de las mismas en condiciones *ex vitro*. Durante el proceso de aclimatización se observó una supervivencia del 100% de las plántulas. Campelo *et al.* (2010), obtuvieron 97% de supervivencia de las plántulas a la fase de aclimatización. Castillo (2004) hace mención a que en el momento en que se extraen las plántulas de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernadero, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta.

Conclusiones

En las condiciones del experimento se concluye que la suplementación de carbón activado al medio de cultivo MS y las condiciones de oscuridad inicial no favorecieron la propagación *in vitro* de banana (*Musa spp.*) variedad Nanicão al no encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos aplicados.

Referencias Bibliográficas

- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo (en línea). Las Brujas, UY. Recuperado de http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf
- Campelo, MF, Lemos, OF, Reis, LR., & Campos M, I. (2010). Enraizamiento e aclimatização de cultivares de bananeira (en línea). Belém, BR. Recuperado de <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/31425/1/MeicianeCampelo.pdf>
- Hernández, RB. (2001). Validación del Protocolo de Micropropagación de Musáceas en cinco líneas comerciales pertenecientes al clon Williams (en línea). Cartago, CR. Recuperado de <http://bibliodigital.itcr.ac.cr:8080/dspace/bitstream/2238/209/1/FINAL2.pdf>



- Lima, JD., & Moraes, WS. (2006). Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de Bananeira (en línea). San Paulo, BR. Recuperado de <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=253021639003>
- Moreno, JC, Sarria, VM, Polo, AD., & Giraldo, L. (2007). Evaluación de peróxido de hidrógeno en la oxidación del fenol con hierro soportado sobre tela de carbón activado (en línea). Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://www.scielo.cl/pdf/infotec/v18n2/art10.pdf>
- Oliveira, RP., & Silva, S. (1997). Avaliação da micropropagação comercial em bananeira (en línea). Brasília, BR. Recuperado de <https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/4654/7242>
- Oliveira, H. (2010). Comportamento de cultivares de Bananera (*Musa spp.*) resistentes a doenças no processo de micropropagação (en línea). Belém, BR. Recuperado de http://usadesign.com.br/mestrado/dissertacoes_concluidas/herica_oliveira.pdf.
- Pereira, JES, Mattos, ML., & Fortes, GR. (2003). Identificação e controle com antibióticos de bacterias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados (en línea). Brasília, BR. Recuperado de <http://www.scielo.br/pdf/pab/v38n7/18204.pdf>
- Roca, W., & Mroginski, A. (1991). Capítulo # 22 Micropropagación de Plátanos y Bananos. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT Centro Internacional de Agricultura Tropical. CR.
- Zaffari, GR, Kerbauy, GB, Kraus, JE., & Romano, EC. (2001). Hormonal and histological studies related to *in vitro* banana bud formation (en línea). San Pablo, BR. Recuperado de <http://www.springerlink.com/content/q20j2g7m7k564x77/fulltext.pdf>.