

# Tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio en la desinfección de meristemas de banano para su propagación clonal

Immersion time in sodium hypochlorite in the disinfection of banana meristems for their clonal propagation

Maura Isabel Díaz Lezcano<sup>1</sup> ; María Inés Quiroz<sup>1</sup> ; Valeriano Espínola<sup>1</sup> ;  
María José Britos<sup>1</sup> ; José Andrés Romero<sup>1</sup> 

## RESUMEN

El experimento se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, con el objetivo de evaluar tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio en la desinfección de meristemas de banano (*Musa spp.*) variedad Nanicao para su micropropagación. Se utilizaron 80 hijuelos de banano de los cuales se extrajeron los ápices meristemáticos que fueron sembrados en medios de cultivo de Murashige y Skoog suplementados de 1 g.l-1 de carbón activado como antioxidante. Los tratamientos de desinfección consistieron en la inmersión en una solución de NaClO (5 %) durante 5 (T1) y 10 minutos (T2), respectivamente. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar. Las variables evaluadas durante 15 días fueron: porcentaje de supervivencia, de oxidación fenólica y contaminación microbiana de los brotes. Al cabo del tiempo de evaluación, el T1 registró 17,55% de brotes supervivientes y 82,45% de contaminación microbiana atribuible al 75% de hongos y 25% a bacterias. Por su parte, el T2 mostró 15,82% de brotes supervivientes y 84,18% de contaminación microbiana atribuible al 70 % de hongos y 30 % a bacterias. Los hongos contaminantes de los explantes fueron los pertenecientes de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* en ambos tratamientos. No se observó indicios de oxidación fenólica con ninguno de los tratamientos aplicados. Se aplicó la Prueba de t de Student al 5% de significancia, verificando que no existen diferencias significativas atribuibles al tiempo de inmersión en el desinfectante.

**Palabras clave:** Banana; Cultivo de tejidos vegetales; Micropropagación

---

Fecha de recepción: enero 2023; fecha de aceptación: abril 2023

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

Autor de correspondencia: Maura Isabel Díaz Lezcano. Email: maura.diaz@agr.una.py



Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una Licencia Creative Commons.

## ABSTRACT

The experiment was carried out in the Biotechnology Laboratory of the Facultad de Ciencias Agrarias of Universidad Nacional de Asunción, with the objective of evaluating immersion time in sodium hypochlorite in the disinfection of banana meristems (*Musa* spp.) Nanicao variety for its micropropagation. 80 banana shoots were used, from which the meristematic tips were extracted and planted in Murashige and Skoog culture media supplemented with 1 g.l<sup>-1</sup> of activated carbon as an antioxidant. The disinfection treatments consisted of immersion in a NaClO solution (5 %) for 5 (T1) and 10 minutes (T2), respectively. The experimental design used was completely randomized. The variables evaluated during 15 days were: percentage of survival, phenolic oxidation and microbial contamination of the shoots. After the evaluation time, T1 recorded 17.55% surviving shoots and 82.45% microbial contamination attributable to 75% fungi and 25% bacteria. On the other hand, T2 showed 15.82% of surviving outbreaks and 84.18% of microbial contamination attributable to 70% fungi and 30% bacteria. The contaminating fungi of the explants were those belonging to the genera *Penicillium* and *Aspergillus* in both treatments. No signs of phenolic oxidation were observed with any of the treatments applied. The Student's t test was applied at 5% significance, verifying that there are no significant differences attributable to the time of immersion in the disinfectant.

**Keywords:** Banana; Plant tissue culture; Micropropagation

## INTRODUCCIÓN

Las bananas (*Musa spp.*), las manzanas y los cítricos son las frutas más comercializadas en todo el mundo en términos cuantitativos (FAO, 2016), representando en el periodo 2014-2016 una producción anual de banana a nivel mundial fue de 113 millones de toneladas (FAO, 2019). En Paraguay la producción de banana ha crecido sostenidamente desde principios de siglo, pasando de 64.265 toneladas en la zafra 2000/2001 a 72.266 toneladas en la zafra 2016/2017 (Enciso, 2019).

El banano tradicionalmente se propaga en forma vegetativa por cormos, estos son separados para sembrarlos, unos de los principales problemas que presenta propagarlos con este método es que la tasa de multiplicación es muy baja, pero aún más grave es el aumento de la población de insectos y otras plagas en la plantación. Por esta razón, la propagación in vitro es una de las alternativas para la obtención de plantas sanas libres de patógenos (hongos, bacterias, virus y viroides), a diferencia del método tradicional que pueden traer problemas fitosanitarios (Sandoval et al., 1991).

## MÉTODO

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

El medio cultivo utilizado fue el de Murashige & Skoog (MS) (1962) suplementado con 15 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa y gelificado con 4 g.l<sup>-1</sup> de ágar, además del agregado de 1 g.l<sup>-1</sup> de carbón activado, 50 mg.l<sup>-1</sup> de mioinositol y 10 ml.g<sup>-1</sup> de glicina, el pH del medio fue ajustado a 5,8 y posteriormente de autoclavado a 121 °C, 1 atm de presión durante 20 minutos. El medio de cultivo fue propuesto por Díaz Lezcano

El éxito del cultivo se basa fundamentalmente en la implantación de mudas libres de patógenos, por consiguiente, en banano, cuya multiplicación es asexual, se han desarrollado diferentes técnicas de propagación para obtener los propágulos en volumen y calidad adecuada. En este sentido, la propagación in vitro de *Musa spp.*, vía organogénesis a partir de ápices, se mantiene como el método más utilizado (Medina et al., 2015, Pérez et al., 2011 y Castro et al., 2002), dada la posibilidad de multiplicar gran cantidad de plantas de calidad, libres de patógenos, en períodos de tiempo y espacio físico reducidos, sin interrupción estacional. Por ello, para el establecimiento in vitro de meristemas apicales extraídos de los cormos de banano (*Musa spp.*) se requieren un protocolo de desinfección y un medio de cultivo adecuado para su micropropagación (Ortega et al., 2010 y Sandoval et al., 1991).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar dos tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio en la desinfección de meristemas de banano para su propagación clonal.

et al. (2016) para la micropropagación de *Musa spp.* variedad Nanicao.

Los materiales vegetales fueron colectados de la plantación de banano del campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, ubicado en latitud y longitud 25° 21' 54.80" S y 57° 30' 8.77" O.

Se utilizaron 80 ápices meristemáticos provenientes de hijuelos de banano, *Musa sp.* variedad Nanicao, de 30 - 40 cm de altura, que fueron obtenidos de la planta madre. Con ayuda del estereoscopio, los ápices meristemáticos fueron sometidos a reducciones hasta obtener un cono approxi-

madamente de 1 cm, formado por el meristema central y un mínimo del tejido de rizoma para facilitar la manipulación.

Los explantes fueron sumergidos por 30 segundos en alcohol etílico al 70 %, posteriormente a hipoclorito de sodio al 5 % durante 5 y 10 minutos, constituyendo los tratamientos 1 (T1) y 2 (T2), respectivamente, para luego realizarse el triple enjuague con agua destilada estéril.

Fue establecido un explante por frasco de medio de cultivo en la cámara de flujo laminar, e introducidos, posteriormente, en bolsas plásticas negras para mantenerlos en condiciones de oscuridad durante 7 días, y finalmente ser trasladados a una sala de crecimiento a 25 °C, 70 % de humedad relativa, en condiciones de fotoperiodo 16:8 horas luz y oscuridad.

Las variables evaluadas fueron: sobrevivencia y contaminación microbiana de los brotes. Los explantes se observaron a los 15 días posteriores a su inoculación en el medio de cultivo. Las variables medidas fueron: la supervivencia: se realizó la observación del desarrollo de brotes, la oxidación fenólica a través de la observación de la existencia de tejidos necrosados y la contaminación microbiana: se basó en la identificación visual del crecimiento micelial de los hongos, los cuales fueron

aislados en cultivos puros constituidos por PDA (papa, dextrosa, agar) o la apariencia lechosa de color blanquecino o amarillo, característico de las bacterias.

Para la identificación del patógeno con crecimiento micelial, se prepararon láminas portaobjetos con micelio para ser observado bajo microscopio óptico.

Las características morfológicas de las estructuras reproductivas de los hongos se visualizaron con un microscopio óptico, con el objetivo 40 x. La identificación de los géneros fúngicos se llevó a cabo mediante el uso de claves y consulta de literatura micológica especializada.

Para identificar la colonia bacteriana, con ayuda de una ansa de laboratorio, previamente flameado, se retiró una gota de la colonia bacteriana y se depositó en una esquina de la placa de Petri esterilizada conteniendo el medio de rutina 523 de Kado y Heskett (1970) para realizar estrías equidistantes a 0,5 cm.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, constituyendo casa meristema 1 unidad experimental. Los resultados obtenidos fueron sometidos al analizadomediante la Prueba de t de Student al 5% de significancia

## RESULTADOS

A los 15 días de evaluación, los explantes expuestos al T1 registró 17,55% de brotes supervivientes y 82,45% de contaminación microbiana atribuible al 75% de hongos y 25% a bacterias. Por su parte, el T2 mostró 15,82% de brotes supervivientes y 84,18% de contaminación microbiana atribuible al 70 % de hongos y 30 % a bacterias. La identificación morfológica de los hongos indicó la presencia de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* como agentes causales de la contaminación fúngica de los explantes, en ambos tratamientos. No se observó indicios de oxidación fe-

nólica en los explantes con ninguno de los tratamientos aplicados.

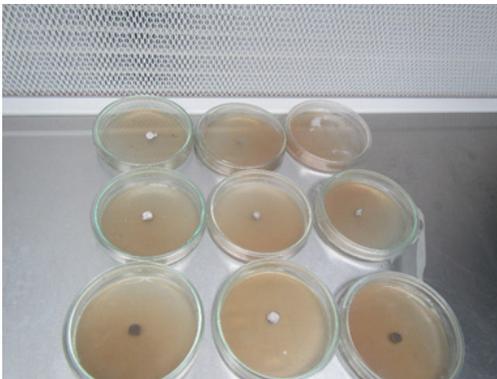
Mediante la Prueba t de Student al 5% de significancia se verificó que no existen diferencias significativas atribuibles a los tratamientos aplicados. A continuación, en la Figura 1 se presenta un explante de banana superviviente el cual desarrolló hojas y raíces adventicias. En la Figura 2 se pueden apreciar explantes contaminados con hongos y bacterias, y en la Figura 3 se observan placas de Petri con Hongos aislados en cultivos puros de PDA.



**Figura 1:** Explante de banano (*Musa spp*) sobreviviente



**Figura 2:** Explantes de banano (*Musa spp*) contaminado con hongos y bacterias



**Figura 3:** Hongos aislados en cultivos puros de PDA

## DISCUSIÓN

Pérez Álvarez et. al. (2016) utilizaron en la desinfección de ápices de papa (*Solanum tuberosum* L.) hipoclorito de sodio al 2 % durante 15 minutos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces y se dejaron secar durante 15 min obteniendo 100 % de contaminación por hongos en meristemas cultivados in vitro, siete días después de la implantación en el medio MS.

Mongelós Franco et. al. (2020) obtuvieron resultados similares en el proceso de desinfección de explantes de banano, siendo 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* sp.

Por su parte, Díaz Lezcano et. al. (2016), refieren que en la micropropagación de *Musa* spp. variedad Nanicao los meristemas fueron sometidos a un procedimiento de desinfección por 20 minutos con hipoclorito de sodio al 5 %, resultado un porcentaje de contaminación de los ápices de 39,06 % en la fase de establecimiento, y de 22,39 %. En el primer subcultivo, en tanto que la oxidación en la fase de establecimiento fue de 9,37 % y en el primer subcultivo fue de 8,85 %.

Ensayos de Díaz Lezcano et. al. (2021) sostienen que los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y las bacterias gram negativas son las causantes de la contaminación microbiana en la micropropagación de ápices meristemáticos de banano. En este contexto, *Penicillium*, produce micotoxinas que dañan los frutos, flores y semillas de las plantas. Este hongo penetra a través de las lenticelas o por aberturas de la corteza, que en un principio la herida presenta un aspecto blanco y de consistencia acuosa y con el tiempo se hunde sobre sí misma (Agrios, 2005), en tanto que la mayoría de las especies del género *Asper-*

*gillus* son hongos filamentosos saprófitos que desempeñan un papel esencial en la degradación de la materia orgánica, siendo este género uno de los más abundantes en la naturaleza y puede encontrarse en cualquier ambiente; se reproduce por conidios cuya germinación da origen a las hifas (Klich, 2002).

Por su parte, Ramírez et. al. (2000) trabajando en el establecimiento in vitro de segmentos nodales del guayabo (*Psidium guajava* L.) detectaron hongos pertenecientes a los géneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Helminthosporium* y *Rhizopus*, asimismo, se observaron la presencia de bacterias después de 10 días de cultivo.

Por otro lado, Carrazana García et. al. (2003) encontraron un bacilo Gram positivo no formador de endospora y un coco Gram positivo agrupado en forma de sarcina, ambos endógenos. *Fusarium* sp. y un hongo de la clase *Deuteromycetes* fueron contaminantes en la micropropagación de *Musa* spp. probablemente ambiental y endógeno respectivamente. Según Chandra y Chandra (2011) y Leifert y Cassells (2001) los contaminantes pueden introducirse con el explante, durante la manipulación en el laboratorio o por bacterias endofíticas.

## CONCLUSIONES

En las condiciones del ensayo se concluye que la contaminación microbiana fue la principal limitación para el establecimiento de un protocolo de su propagación clonal de banano, por lo que es de suma importancia tanto la sanidad del material vegetal con que se inicia el cultivo de tejidos como así también la desinfección de los explantes, verificándose que no existían

diferencias significativas en cuanto al tiempo de inmersión, 5 y 10 minutos, en hipoclorito de sodio. No se observó indicios de oxidación fenólica en los ápices meristemáticos, lo que indica que tanto la concentración del desinfectante (5%) y los tiempos empleados en la desinfección son recomendables para el control de esta variable.

## REFERENCIAS

1. Agrios, G. N. (2005) Plant pathology. Ed. Elsevier
2. Carrazana García, D., Herrera Isla, L., Mollinedo Diego, N., Suárez Canino, N., Arbolález
3. Moré, I., Castellanos Morales, H., & Martínez García, T. (2003). Detección de contaminantes bacterianos y fúngicos endógenos en el establecimiento de *Musa* spp.. *Biotecnología Vegetal*, 3(1). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/211/607>
4. Castro, D., Días, J., Montoya, N. 2002. Propagación clonal de bananos en birreactores de inmersión temporal. In: *Acorbat. Memorias XV reunión realizada en Cartagena de Indias, Colombia, 27 de octubre al 2 de noviembre de 2002*. Medellín, Colombia. Asociación Colombiana de Bananeros (AUGURA). p 44-8.
5. Chandra, J. R. y Chandra, S. K. "Endogenous microbial contamination during In vitro culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam): identification and prevention". *Journal of Agricultural Technology*, vol. 7, no. 6, 2011, pp. 1725– 1731.
6. Díaz Lezcano, M. I., Flor Benítez, B. A., Enciso Garay, C. R., & González Segnana, L. R. (2016). El carbón activado y las condiciones de oscuridad en la micropropagación de banana variedad Nanicão. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 140–146. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.55618>
7. Díaz Lezcano, M. I., Pereira Báez, K. D., Benítez Vera, S. G., Brítez Moreira, J. R., Alegre, C. E., Duarte Ovejero, N. N., Mongelós Franco, J. Y., Mussi Cataldi, C. E., & Batte Martínez, H. D. 2021. Identificación de agentes causales de la contaminación microbiana durante la micropropagación de *Musa* spp. *Steviana*, 13(2), 21–29. [https://doi.org/10.56152/StevianaFacenV13N2A2\\_2021](https://doi.org/10.56152/StevianaFacenV13N2A2_2021)
8. Enciso, V. (2019). Producción y comercialización de banana. San Lorenzo, Paraguay. Disponible en [http://www.agr.una.py/ecorural/ecorural\\_otras\\_publicaciones.php](http://www.agr.una.py/ecorural/ecorural_otras_publicaciones.php)
9. FAO. (2016). Situación del mercado del banano 2015-2016. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-i7410s.pdf>
10. FAO (2019). FAOSTAT. [Base de datos]. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/es/>
11. Kado, C Heskett, M. (1970). Selec-

- tive media for Isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60, 969-976. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1970Articles/Phyto60n06\\_969.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1970Articles/Phyto60n06_969.PDF)
- 12.** Klich M. A. (2002). Identification of Common *Aspergillus* Species. Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- 13.** Leifert, C. y Cassells, A. C. (2001). Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37 (2), 133-138. DOI 10.1007/s11627-001-0025-y Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2018). Síntesis estadísticas producción agropecuaria año agrícola 2000/2018. Disponible en [http://www.mag.gov.py/Censo/SINTESIS%20Estadisticas%202017\\_2018%20pdf%20N OV.pdf](http://www.mag.gov.py/Censo/SINTESIS%20Estadisticas%202017_2018%20pdf%20N OV.pdf)
- 14.** Pérez, M., Medero, V., Torres, M., López, J., Santos, A., 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.
- 15.** Medina, MA; Medina, CL; Medina, LK. (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.
- 16.** Mongelós Franco, Y., Mussi Cattaldi, C. E., Duarte Ovejero, N. N., & Díaz Lezcano, M.I. (2020). Protocolo de desinfección para establecimiento in vitro de meristema apical de banano *Musa* spp. *CEDAMAZ*, 10(2), 47–50. Recuperado a partir de <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/815>
- 17.** Murashige, T; Skoog, F. A. (1962). Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
- 18.** Ramírez, M., R. Santos y F. Isea. (2000). Hongos contaminantes durante el establecimiento in vitro del guayabo (*Psidium guajava* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 17, 217-225.
- 19.** Sandoval J, Brenes G, Pérez Sánchez L. (1991). Micropropagación de plátano y banano (*Musa* AAB, AAA) en el CATIE. Serie técnica, Informe técnico CATIE N° 186. Turrialba (Costa Rica).

## BIOGRAFÍA

### **Maura Isabel Díaz Lezcano**

Ingeniera Forestal por Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción, Máster por el Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas, Doctora en Ingeniería Forestal por la Universidad Politécnica de Madrid. Docente Investigadora de Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción, Docente de la Universidad Nacional de Canindeyú, Investigadora Categorizada en el Nivel 2 del PRONII, Conacyt.

<https://orcid.org/0000-0003-4629-8255>

### **María Inés Quiroz**

Ingeniera Agrónoma de la Universidad Nacional de Asunción. Posgrado en Didáctica Universitaria, Facultad de Ciencias Económicas UNA, Maestría en Fitosanidad, Universidad Nacional de Asunción. Docente de la Universidad San Carlos.

<https://orcid.org/0009-0002-8775-2178>

### **Valeriano Espínola Almirón**

Ingeniero Agrónomo (Producción Agrícola) Facultad de Ciencias Agrarias UNA: San Lorenzo, Departamento Central, PY. Magister Scientiae en Producción Vegetal. Docente Investigador de la FCA UNA, Casa Matriz

<https://orcid.org/0009-0008-0055-3103>

### **María José Britos Sánchez**

Ingeniera Agrónoma de la Universidad Nacional de Asunción, especialista en Ciencias y Tecnologías de Semillas de la Universidad de Pelotas \_ Brasil, modalidad a distancia, Magister en Producción Vegetal de la UNA-Py.

<https://orcid.org/0009-0008-6856-9849>

### **José Andrés Romero Benítez**

Ingeniero Agrónomo por la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción. Magister Scientiae en Producción Vegetal. Docente Investigador de la FCA UNA Filial Santa Rosa, Misiones. Coordinador de Pasantía de Carreras.

<https://orcid.org/0009-0006-9582-5540>