



Artículo

Determinación del medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de banano (*Musa acuminata*) en la Estación Experimental Sapecho – Alto Beni

Determination of the culture medium for the *in vitro* establishment of banana (*Musa acuminata*) at the Sapecho Experimental Station - Alto Beni

Marco Antonio Echenique Quezada, Mariela Filomena Mamani Quisbert

RESUMEN:

El banano es un cultivo de importancia alimenticia debido a su gran contenido de vitaminas y minerales, la utilización del banano como alimento ha venido incrementando su valor económico, lo que implica la necesidad de mejorar sus rendimientos, calidad y fomentar su rápida multiplicación mediante el desarrollo y transformación de tecnologías. La *Musa acuminata* AAA tradicionalmente se propaga en forma vegetativa por cormos. Uno de los principales problemas que presenta al propagarlo de manera convencional es que la tasa de multiplicación es baja. El trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Sapecho, situada en el municipio de Palos Blancos del departamento de La Paz, con el objetivo de evaluar el medio más favorable para el establecimiento *in vitro* de banano (*Musa acuminata* AAA) Var. Gran Naine. Los medios evaluados fueron los de CATIE (2016), Ubilla (2016) y Medina *et al.* (2015), para el análisis de los datos se utilizó un Diseño Completamente al azar (DCA), con tres tratamientos y tres repeticiones y 15 unidades experimentales por repetición. Para la comparación de medias se aplicó la prueba de Fisher al 5% de probabilidad. Las variables evaluadas fueron: Supervivencia de los explantes, donde se observó la contaminación y oxidación. Los resultados mostraron que, en la primera fase de establecimiento, la mejor respuesta para la supervivencia de los explantes de banano (*Musa acuminata* AAA), fue con el medio de cultivo propuesto por Medina *et al.* (2015) compuesto por M.S. al 100%, Acido Naftal acético 0,5 mg L⁻¹, Acido Indol Butírico 0,5 mg L⁻¹, Bencil Amino purina 0,5 mg L⁻¹, Tiamina 4 mg L⁻¹, Carbón Activado 1 g L⁻¹, Sacarosa 30 g L⁻¹, Agar Agar 5 g L⁻¹, donde se obtuvo un menor porcentaje de oxidación (8%) y menor contaminación de explantes que fue de 15%.

PALABRAS CLAVE:

Banano, cormos, establecimiento, Gran naine, *in vitro*.

ABSTRACT:

Banana is an important food crop due to its high content of vitamins and minerals, the use of bananas as food has been increasing its economic value, which implies the need to improve its yields, quality and promote its rapid multiplication through the development and transformation of technologies. *Musa acuminata* AAA is traditionally propagated vegetatively by corms. One of the main problems with conventional propagation is that the multiplication rate is low. The work was carried out at the Plant Biotechnology Laboratory of the Sapecho Experimental Station, located in the municipality of Palos Blancos in the department of La Paz, with the objective of evaluating the most favorable medium for the *in vitro* establishment of banana (*Musa acuminata* AAA) Var. Gran Naine. The means evaluated were those of CATIE (2016), Ubilla (2016) and Medina *et al.* (2015), for data analysis a Completely Randomized Design (CRD) was used, with three treatments and three replications and 15 experimental units per replication. For the comparison of means, Fisher's test was applied at 5% probability. The variables evaluated were: survival of explants, where contamination and oxidation were observed. The results showed that, in the first establishment phase, the best response for the survival of banana explants (*Musa acuminata* AAA), was with the culture medium proposed by Medina *et al.* (2015) composed of M.S. 100%, Naftal Acetic Acid 0.5 mg L⁻¹, Indole Butyric Acid 0.5 mg L⁻¹, Benzyl Amino purine 0.5 mg L⁻¹, Thiamine 4 mg L⁻¹, Activated Charcoal 1 g L⁻¹, Sucrose 30 g L⁻¹, Agar Agar 5 g L⁻¹, where a lower percentage of oxidation (8%) and lower explant contamination was obtained, which was 15%.

KEYWORDS:

Banana, corms, establishment, Gran naine, *in vitro*.

AUTORES:

Marco Antonio Echenique Quezada: Docente Investigador, Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz - Bolivia. manmaeq@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7574-2258>

Mariela Filomena Mamani Quisbert: Programa de Ingeniería en Agronomía Tropical, Facultad de Agronomía - UMSA, La Paz – Bolivia. quismari5@mail.com

Recibido: 30/07/2021. Aprobado: 17/10/2021.



INTRODUCCIÓN

El banano pertenece a la familia de las *musáceas*, y representa uno de los cultivos más importantes en el mundo entero. Más de 400 millones de persona de las zonas tropicales y subtropicales de los países en vía desarrollo depende de la producción de este cultivo, siendo una fruta originaria del sureste del continente asiático, es de gran importancia alimentaria y económica a nivel mundial. (FAOSTAT, 2016).

En Bolivia, el área cultivada se estima en 20010 hectáreas de banano, con una producción aproximada de 301.162 t, datos preliminares al 2020 (INE, 2021), que se cultivan en la zona oriental, en Chapare de Cochabamba, en Alto Beni, en los Yungas y Caranavi de La Paz (Soto, A. 2010).

Las variedades de banano comercial más utilizadas en la actualidad, no producen semilla, es decir son triploides estériles, que solamente se pueden propagar por vía asexual por medio de brotes o “hijuelos” de la planta, este tipo de propagación es lenta y la tasa de multiplicación es relativamente baja, esto ayuda la diseminación de enfermedades y plagas a los nuevos cultivos. (Garrido, *et al.*, 2011).

La micropropagación *in vitro* es una técnica que permite la reproducción masiva de plantas libres de organismo fitopatógenos y se constituye en una herramienta para el mejoramiento genético (Roux *et al.*, 2002).

Para mejorar la producción de plantas se aprovecha las características que tiene la célula vegetal nucleada con la capacidad de desarrollar un nuevo individuo sin la necesidad de la totipotencia celular, dando lugar directamente a órganos o embriones somáticos (organogénesis o embriogénesis directa) (Aguilar *et al.* 2008).

La totipotencia celular se define una alternativa biotecnológica, dentro la técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, que permite la propagación masiva de muchas especies vegetales, libre de enfermedades permitiendo realizar selecciones clonales de genotipo sobresalientes, sus características agronómicas, organolépticas y de adaptación a ambiente específicos, resistentes a

estrés bióticos y abióticos. (Ortega, *et al.*, N. 2010).

La introducción de material a condiciones *in vitro* depende de muchos factores entre ellas el medio de cultivo adecuado para el establecimiento, el mismo al ser un medio nutritivo permite el crecimiento del explante, que es una pequeña parte de la planta y se cultiva en condiciones asépticas, este medio de cultivo, formado por macronutrientes, micronutrientes, carbohidratos, vitaminas, reguladores de crecimiento y a veces aminoácidos, todo esto debe estar bajo ambiente controlado (Sandoval, *et al.*, 1991).

Sin embargo, en la etapa de establecimiento de cultivo *in vitro*, es frecuente la presencia de microorganismos, oxidación fenólica de los tejidos, entre otros, por lo que se hace necesario la realización de pretratamientos a las plantas madres para disminuir la contaminación y mejorar el establecimiento de los explantes (Ramírez *et al.* 2008).

El objetivo de la investigación está referido al establecimiento del medio de cultivo adecuado para el cultivo de banano (*Musa acuminata* AAA) var. Gran naine, y lograr una adecuada sobrevivencia de los explantes.

MATERIALES Y METODOS

Localización

La investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Sapecho, dependiente de la Facultad de Agronomía – UMSA, , ubicado a 2 km de la localidad de Sapecho a una distancia de 276 km de la ciudad de La Paz, Provincia Sud Yungas, municipio de Palos Blancos, altitud de 430 m.s.n.m., latitud Sur 15° 33' 27.59", longitud Oeste 67° 20' 05.10", con temperaturas media anual de 28°C y una precipitación anual promedio de 1800 mm. (PDM Palos Blancos, 2012).

Metodología

Material biológico. Se utilizaron hijuelos de banano como material biológico de aproximadamente 20 cm de largo recolectados de la Estación Experimental Sapecho de la Facultad de

Agronomía - UMSA.

Recolección del material vegetal de campo. La planta seleccionada de tamaño mediano, con buena calidad de racimo y aparentemente sanas (libres de

enfermedades), se consideró la muestra, se escogió a los hijos espada de 20-30 cm con un pedicelo (o pedicelo) de 5 a 10 cm de diámetro. La muestra tuvo un meristemo viable. Todos los hijuelos (cormos) seleccionados fueron extraídos e identificados.



Figura 1. A. Hihuelos de banano; B. Limpieza de los cormos.

Cultivo in vitro de banano (*Musa acuminata*) en la fase de establecimiento. Para evaluar los medios de cultivo en la fase de establecimiento para la propagación *in vitro* del banano se siguieron los siguientes pasos: a) preparación de los medios de cultivo, b) desinfección del material vegetal y c) establecimiento del cultivo de banano.

Medios de cultivo. La comparación de los medios de cultivo solidos utilizados se describen en la Tabla 1. Estos se distribuyeron a 10 ml en cada copa de vidrio ensayos (75 mm de largo x 45 mm de diámetro). Posteriormente, las copas se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 15 PSI de presión y 121 °C.



Figura 2. A. Medio de cultivo 1; B. Medio de cultivo 2; C. Medio de cultivo 3

Desinfección del material vegetal. Se utilizaron cormos de tamaño de 10 cm de forma cuadrada, se procedió al vado de los cormos con agua y detergente, se desinfectaron en alcohol al

70% durante 5 minutos para luego colocarlos en hipoclorito de sodio (NaClO) al 5, 5% durante 15 minutos. (Ortega *et al.*, 2010).



Figura 3. A. Limpieza de explante; B. Desinfestación de explantes

Establecimiento. Dentro la cámara de flujo laminar, los hijuelos fueron reducidos a un tamaño de 3 cm y se dejó en hipoclorito de sodio (NaClO) al 6% durante 10 min, luego se procedió a realizar tres

enjuagues en agua destilada estéril posteriormente se redujeron a 1 cm y fueron depositados en solución de ácido cítrico 100 mg L⁻¹, por 10 s (Ortega *et al.*, 2010).

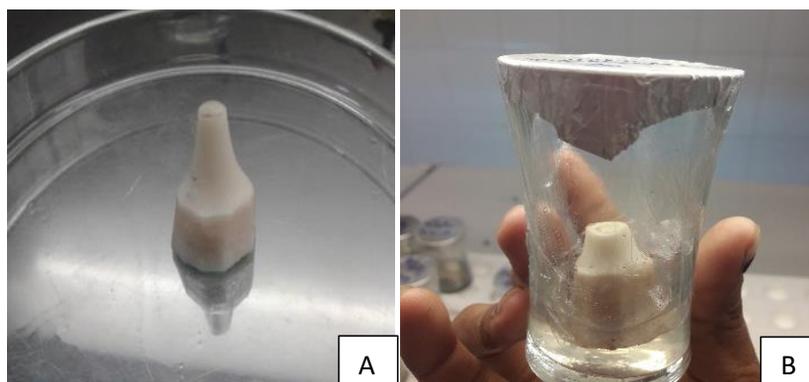


Figura 4. A. Disección de explante de banano; B. Siembra de explante

La siembra de los explantes se realizó bajo condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar y con la ayuda de pinzas y bisturí estériles. Se colocó los explantes en copas de vidrio con medio de cultivo previamente esterilizado. Para el establecimiento, se dejó en cuarenta (5 días), con ausencia de luz total para reducir el proceso de oxidación. Una vez cicatrizadas las heridas se evaluó el grado de Oxidación, el porcentaje de contaminación de hongos y bacterias, el mismo fue evaluado mediante observación directa, cada cinco días durante 30 días, también se determinó la presencia de contaminantes causado por hongos en base a la identificación visual

del micelio generalmente saliendo del meristemo del explante, las bacterias se identificaron por su apariencia lechosa y su color blanquecino y amarillo/anaranjado las cuales se manifestaron dentro del medio de cultivo o alrededor el explante en contacto con el medio de cultivo. (Ancasi *et al.*, 2016)

La investigación fue realizada bajo un diseño experimental completamente aleatorio (DCA) con tres tratamientos. Los tratamientos fueron los siguientes: 1) CATIE (2016), 2) Ubilla (2016) y 3) Medina *et al.* (2015).

Tabla 1. Medios de cultivo para la introducción de cormos de banano (*Musa acuminata*) en la fase de establecimiento *in vitro*.

| Medio 1 (CIAT, 2016) | | Medio 2 (Ubilla, 2016) | | Medio 3 (Medina <i>et al.</i> 2015) | |
|----------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| Elementos | Cantidad | Elementos | Cantidad | Elementos | Cantidad |
| Murashige and Skoog | 100% | Murashige and Skoog | 100% | Murashige and Skoog | 100% |
| BAP | 5 mg L ⁻¹ | BAP | 5 mg L ⁻¹ | ANA | 0,5 mg L ⁻¹ |
| AIA | 0,2 mg L ⁻¹ | Tiamina | 1 mg L ⁻¹ | IBA | 0,5 mg L ⁻¹ |
| Glicina | 2 mg L ⁻¹ | mioinositol | 100 mg L ⁻¹ | BAP | 0,5 mg L ⁻¹ |
| Acido nicotínico | 0,50 mg L ⁻¹ | L-Cisteína | 60 mg L ⁻¹ | Tiamina | 4 mg L ⁻¹ |
| Piridoxina | 0,50 mg L ⁻¹ | Ácido ascórbico | 100 mg L ⁻¹ | Carbón Activado | 1 g L ⁻¹ |
| Tiamina | 0,10 mg L ⁻¹ | Pantotenato de calcio | 1 mg L ⁻¹ | Sacarosa | 30 g L ⁻¹ |
| Mio inositol | 100 mg L ⁻¹ | Biotina | 0,01 mg L ⁻¹ | Agar | 5 g L ⁻¹ |
| Sacarosa | 30 g L ⁻¹ | Sacarosa | 40 g L ⁻¹ | | |
| Agar | 7 g L ⁻¹ | Agar | 5 g L ⁻¹ | | |

Análisis estadístico. Se realizaron análisis de varianza de un grado de libertad previa verificación de normalidad y homogeneidad de las variables. Las comparaciones de medias fueron realizadas a una P<0.05 de probabilidad, mediante la prueba de Fisher (InfoStat v.11).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentaje de sobrevivencia

Realizado el análisis de varianza del porcentaje de sobrevivencia, señala que no existe diferencia significativa entre los medios de cultivo para la introducción de banano a condiciones *in vitro* en la fase de establecimiento, obteniendo un coeficiente de variación de 8,2%, lo cual indica que los datos obtenidos en la investigación fueron llevados correctamente.

A través de la prueba de Fisher se identificó que no existieron diferencias estadísticas entre los medios de cultivo utilizados en la investigación, donde hubo promedios altos de sobrevivencia de los explantes fue en el medio de cultivo 3 con 75%, medio de cultivo 2 con 64% y finalmente el medio de cultivo 1 que causó menor porcentaje de sobrevivencia del 53%. (Figura 5).

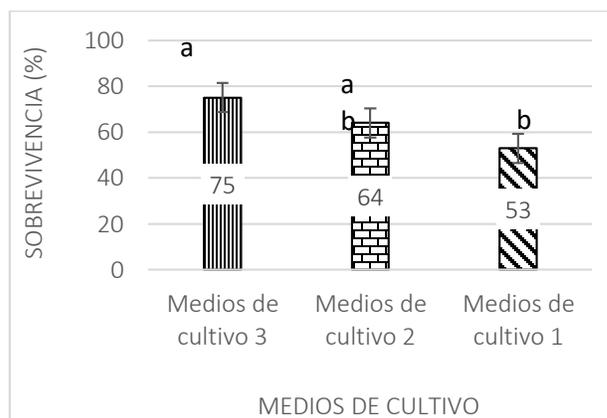


Figura 5. Porcentaje de sobrevivencia en la fase de establecimiento *in vitro* de banano (*Musa acuminata*)

Al respecto Aguirre *et al.* (2016) indican que con el uso de alcohol al 70% en tiempos cortos ayuda en la eliminación de grasas que facilitan la penetración del desinfectante en los explantes. Gomes (2018), realizó una investigación similar obteniendo el 100% de supervivencia del material vegetal, utilizó alcohol al 70% por 1 minuto e hipoclorito de sodio al 2% durante 6 a 8 minutos.

Porcentaje de contaminación

El análisis de varianza del porcentaje de contaminación señala que no existe diferencia significativa entre los medios de cultivo, obteniendo un coeficiente de variación de 9,4%, lo cual indica que los datos obtenidos en la investigación fueron llevados correctamente.



Figura 6. A. Contaminación por hongos; B. Contaminación por bacteria

Realizada la prueba de Fisher se obtuvo que no existieron diferencias estadísticas en los medios de cultivo, el medio de cultivo 3 es el que tiene menor porcentaje de contaminación con 15%, seguido del medio de cultivo 1 con 16,9% y finalmente el medio de cultivo 2 que registró un 17,2% de contaminación de explantes. (Figura 7).

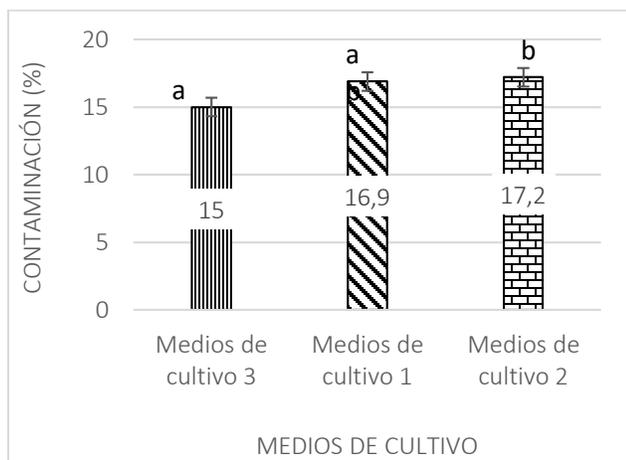


Figura 7. Porcentaje de contaminación en la fase de establecimiento *in vitro* de banano

La presencia de agentes contaminantes ya sean bacterias u hongos en los cultivos *in vitro* se

debe a varios factores, entre los que sobresalen la asociación del explante a su medio, las condiciones de la introducción y la fuente origen del material vegetal; de ahí la importancia de obtener un material vegetal adecuado para usarlo como explante (Mroginski, Roca, 1991).

Esto fue evidente, donde se pudo observar que cuando se introdujo material proveniente de campo, hubo altos porcentajes de contaminación que no permitieron el establecimiento *in vitro*.

Recalde y Bastidas (2007), menciona que la contaminación, más que matar a los explantes directamente, invade el cultivo haciendo que el explante no sea apto para su micropropagación.

Porcentaje de oxidación. El análisis de varianza (ANVA) mostró un coeficiente de variación de 8,6% (Tabla 2); según el modelo estadístico hubo un 95% de variación. Por lo que, el modelo fue apropiado para explicar la variación existente en los datos. Por otra parte, el C.V. fue inferior al 30%; lo cual, significa que las transformaciones realizadas homogeneizaron adecuadamente los datos.

Tabla 2. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación

| F.V. | SC | gl | CM | Fc | Ft (5%) | Significancia |
|-------------------|------|----|------|----|---------|---------------|
| Medios de cultivo | 0,38 | 2 | 0,19 | 9 | 0,00195 | ** |
| Error | 0,37 | 18 | 0,02 | | | |
| Total | 1,88 | 26 | | | | |

C.V.= 8,6 %

Igualmente, el ANVA para el porcentaje de oxidación por efecto de fenolización presentó que hubo diferencias altamente significativas entre los medios de cultivo ($p < 0.01$).

Realizada la comparación de medias se obtuvo que los medios de cultivo 2 y 3 obtuvieron bajos porcentajes de oxidación (8%). En cambio, la

oxidación del medio de cultivo 1 fue superior (33%) (Figura 8).

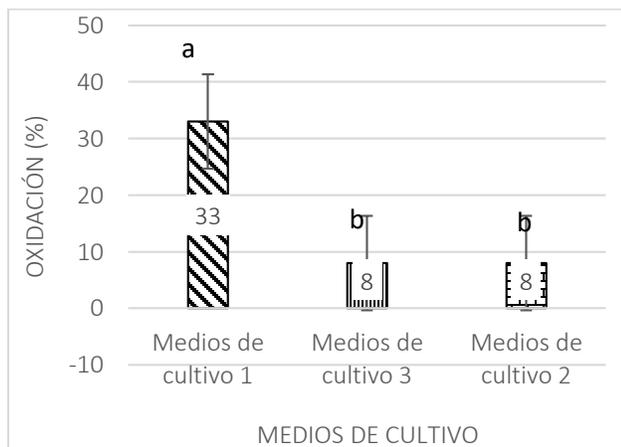


Figura 8. Porcentaje de oxidación en la fase de establecimiento *in vitro* de banano (*Musa acuminata*)

Según (Sandoval, *et. al*, 1991), indican que la oxidación fenólica para el cultivar Gran nain en la fase de establecimiento presentó mayor porcentaje con respecto al cultivar Dominicó, una de las causas se debe a las heridas debidas a la manipulación de los explantes, y otra, a que el cultivar Gran nain fue más propenso a la oxidación, al respecto Mroginski y Roca (1991), menciona que el control más efectivo de esta oxidación son los subcultivos frecuentes y la eliminación de tejidos senescentes de la base de los brotes.

CONCLUSIONES

La multiplicación *in vitro* acompañada de una buena selección del material en campo, permite disponer de mayor cantidad de plantas con excelentes condiciones fitosanitarias. Con respecto a la oxidación de los explantes y la contaminación en la fase de establecimiento del cultivo son las principales causas de pérdida de material vegetal que se puede controlar con una buena desinfección y reduciendo la oxidación con carbón activado u otros agentes antioxidantes. Para el establecimiento *in vitro* de banano variedad Gran nain es favorable usar el medio de Medina *et al.* (2015).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, ME; Ortiz, JL; Sandoval, J. 2008. Embriogénesis somática en plátano y banano: perspectivas y limitaciones. Boletín Técnico/CATIE, N° 27. Turrialba: CATIE; 50 p.

Aguirre, G; Pierre, J; Leigue, L. 2016. Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia. 241 p.

Ancasi, R; Montero, J; Ferreira, N; 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. Bolivia. All rights reserved. Vol 7 N° 2. ISSN 2072.9308 (online edition).

FAOSTAT (The Statistics Division of Food and Agriculture Organization). 2016. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. Dirección de estadística 7: 452-469. Consultado 5 julio 2021. Disponible en <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>.

Garrido, E; Hernandez, E; Noriega, D. 2011. Manual de producción de banano para la región del Soconusco. Estrategia para manejo de la Sigatoka Negra. Folleto para productores N° 10. Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacifico Sur. Campo experimental Centro de Chiapas, Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas (México). p. 35.

Gomes, R. 2018. Estandarización de un protocolo de micropropagación de papaya (*Carica papaya* L.) en un sistema de inmercion temporal de vasos gemelos (BIT). Tesis. Medellín, Colombia. Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias. 90 p.

INE (Instituto Nacional de Estadística). 2021. Estadísticas económicos agropecuario. Consultado el 29 de octubre de 2021 en <https://www.ine.gob.bo/index.php/estadisticas-economicas/agropecuaria/agricultura-cuadros-estadisticos/>

Mroginsky, L; Roca, W. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos Vegetales *in vitro*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia; p. 19-40

Ortega, N; Korvena, S; Ruiz, O; Santos, E; Peralta, E. 2010. Obtención de multimeristemas y callos de diferentes variedades de Banano y Platano *Musa acuminata* a partir de “Meristemas apicales” y “Scalps”. Revista

- Tecnológica ESPOL, Vol. 23, N° 1 Guayaquil (Ecuador). p. 4.
- PDM (Plan de Desarrollo Municipal). 2012. PDM, Desarrollo Productivo, Municipio de Palos Blancos. La Paz, Bolivia.
- Ramirez, M; Lindorf, H; Garcia, E. 2008. Cambios morfológicos en los ápices y del vástago y de la raíz del banano Williams (*Musa* sp AAA), bajo distintas concentraciones de N6-bencil Adenina. *J Agricul Univ Puerto Rico*. 92(1-2): 5372.
- Recalde, C; Bastidas, A. 2007. Establecimiento del cultivo in vitro y aclimatación en invernadero de nepeta hederácea variegata [tesis licenciatura]. Universidad Politécnica Militar. Ecuador. p. 92.
- Roux N, Toloza A, Busogoro JP, Panis B, Srosse H, Lepoivre P. 2002. Mutagenesis and somaclonal variation to develop new resistance to *Mycosphaerella* leaf spot diseases. In: Jacome, L.; P. Lepoivre.; D. Marin; R. Ortiz.; R. Romero and J. Escalant (EDS). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases. San José, Costa Rica. p. 239-50.
- 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). p. 2.
- Soto, V; Azurduy, S. 2010. Cuantificación de almidón total y de almidón resistente en harina de plátano verde (*Musa cavendishii*) y banana verde (*Musa paradisíaca*). *Rev Bol Quim*. 27(2): 94-99.