

RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

Efecto del carbón activado en la germinación y brotación in vitro de *Citrus limon* (L.) y su dinámica de crecimiento.

Effect of activated charcoal on in vitro germination and shoot multiplication of *Citrus limon* (L.) and its growth dynamics.

Ivonne Vaca¹, Miguel Marulanda², Joana Verdesoto², Alejandro Núñez², Ramiro Daniel Acurio¹, Viviana Chiluisa-Utreras¹.

DOI. 10.21931/RB/2018.03.03.5

Resumen: Los estudios de cultivo de tejidos en *Citrus limon*, se han enfocado en la influencia de reguladores de crecimiento para su propagación. En la presente investigación se realizó la evaluación de la adición de carbón activado en el medio de cultivo, obteniendo mejores resultados que investigaciones sobre adición de fitoreguladores. El cultivo *in vitro* de *C. limon* en medio Murashige and Skoog (MS) adicionado con carbón activado (1 g.L⁻¹), permitió obtener resultados favorables en las variables días a la germinación y brotación. Además, se generó las curvas para las variables germinación (fase de introducción), longitud de tallo, número de brotes por planta, número de hojas por planta y longitud de la hoja (fase de multiplicación), lo que permite seguir su dinámica de crecimiento. Finalmente, se determinó la correlación del incremento del número de brotes y la longitud de tallo.

Palabras Claves: carbón activado, curvas de crecimiento, germinación, limón.

Abstract: Tissue culture of *Citrus limon* has focused on the influence of growth regulators for their propagation. In the present study, the evaluation of the culture medium supplemented with activated charcoal presented better results than the addition of plant growth regulators. The *in vitro* culture of *C. limon* in Murashige and Skoog (MS) medium added with activated charcoal (1 g.L⁻¹), allowed to get favorable results in days after germination and shoot multiplication. In addition, the curves were generated for germination (introduction phase), stem length, number of shoots per plant, number of leaves per plant and leaf length (multiplication phase), these parameters allows to follow the growth dynamics. Finally, the correlation of the increase in the number of shoots and stem length was determined.

KeyWords: activated charcoal, growth curves, germination, lemon.

Introducción

Citrus limon (L.), cuyo nombre común es limón o limonero, es un híbrido natural que presenta una gran cantidad de variedades, el fruto tiene diversas aplicaciones, el zumo tiene alto contenido de ácido cítrico y del epicarpo se obtiene la esencia¹. Recientes trabajos sobre *C. limon*, reportan altos contenidos de compuestos fenólicos en la corteza, que son responsables de las características antioxidantes de la pulpa, también informan que estos compuestos protegen el ADN contra la rotura por efecto de radicales libres y además tiene propiedades antibacterianas². Todas las cualidades del limón, lo convierten en una planta de alto interés científico en diferentes áreas, por lo que el estudio de su propagación y la dinámica de su crecimiento, son un punto clave para facilitar su producción.

La mayoría de estudios de cultivo *in vitro* de limón se han enfocado en reguladores de crecimiento; el presente estudio propone la adición de carbón activado en el cultivo de tejidos, ya que tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, tiene la capacidad de atrapar diferentes tipos de moléculas, sustancias en exceso, entre estos los inhibidores de crecimiento³. La capacidad de adsorción se debe a su fina red de poros y su amplia área interna, esto conlleva a favorecer a diferentes procesos de morfogénesis; además, se plantea la posibilidad que el carbón activado pueda ir liberando lentamente alguno de los reactivos adsorbidos⁴, favoreciendo

su respuesta en el cultivo de tejidos.

La dinámica de crecimiento, representado en las curvas de crecimiento reflejan el comportamiento de la planta en un ambiente particular, en relación al tiempo⁵, lo que en el cultivo *in vitro* permite dar seguimiento a las condiciones óptimas del mismo, como respuesta a diferentes factores de evaluación, en este caso las curvas permiten señalar las características de la vitroplanta [IV1] durante la fase de multiplicación.

Materiales y métodos

Desinfección del material vegetal

Para el cultivo *in vitro* de limón se seleccionaron frutos maduros, de los cuales se obtuvo la semilla. Se realizó una desinfección de los explantes con alcohol al 70%, durante 1 minuto, posteriormente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 20% (v/v) más una gota de tween, durante 20 minutos. Se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril previo a la siembra.

Evaluación del efecto del carbón activado en el cultivo in vitro

Las semillas ya desinfectadas fueron sembradas en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) suplementado con sa-

¹ Grupo de Investigación BIOARN. Universidad Politécnica Salesiana. Quito, Ecuador.

² Universidad Politécnica Salesiana, Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales.

carosa al 3% y un pH de 5,7. En la presente fase se evaluó el efecto del carbón activado en el medio de cultivo (1g.L^{-1}) y su correspondiente testigo (sin carbón activado). Posteriormente los explantes fueron incubados en el cuarto de crecimiento a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, durante ocho semanas para su evaluación.

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de germinación y número de brotes. Además se determinó los días a la germinación, definidos como los días a la emergencia de la radícula, tomados desde el momento de la siembra, hasta cuando cada tratamiento presentó 50% (primera fecha) y 75% de germinación (segunda fecha). Los datos de cada variable fueron sometidos a un análisis de varianza ADEVA y se realizó la prueba de Duncan al 5%, para los factores en estudio que presentaron diferencias significativas, empleando el software InfoStat. Mediante el seguimiento continuo se desarrolló la curva de germinación de las semillas.

Curvas de crecimiento durante la fase de multiplicación

Las plántulas obtenidas en la fase de introducción, fueron transferidas a un medio MS suplementado con sucrosa (30g.L^{-1}). Para la siembra en el medio de multiplicación, se eliminaron los cotiledones y radícula, se segmentaron explantes de 12mm de longitud aproximadamente. Durante la multiplicación se realizó un seguimiento continuo del crecimiento de los explantes provenientes de la siembra con carbón activado, por seis semanas.

Las variables evaluadas para las curvas de crecimiento durante la fase de multiplicación fueron: Longitud del tallo, Promedio de brotes por planta, Número de hojas, Promedio de longitud de las hojas. Se aplicó una regresión logarítmica sobre las variables longitud del tallo y promedio de brotes por planta.

Materiales y métodos

Evaluación del efecto del carbón activado en el cultivo in vitro

En la evaluación del efecto del carbón activado en el medio de cultivo, se encontró que para el porcentaje de germinación y días a la germinación ($p > 0,05$) no hay diferencias, mientras que para el número de brotes presenta diferencia significativa ($p = 0,0013$).

Germinación y brotación

La adición de carbón activado al medio de cultivo resultó en un efecto positivo, para el desarrollo de plantas de *C. limon*. Tanto la germinación como el número de brotes por planta, fueron mayores en el medio de cultivo adicionado con carbón activado, mientras que los días a la germinación disminuyeron (Tabla 1).

Tratamientos		Germinación (%)	Días a la germinación		Número de brotes (#)
Código	Carbón Activado (g.L^{-1})		Fecha 1	Fecha 2	
			50%	75%	
M0	0	92	28	42	$3,3 \pm 0,11\text{ a}$
M1	1	100	24	35	$10 \pm 0,14\text{ b}$

Tabla 1. Promedios de germinación, días a la germinación y número de brotes del *C. limón* durante la introducción al cultivo in vitro.

El promedio del número de brotes por planta, fue tres veces mayor en el medio de cultivo adicionado con carbón activado (M1), lo que puede atribuirse a su capacidad de adsor-

ción de sustancias inhibitorias, reguladores de crecimiento o componentes orgánicos, y puede liberar las sustancias de crecimiento previamente adsorbidas por el mismo carbón activado⁶; de esta manera la planta tendrá una fuente a largo plazo del reactivo, favoreciendo su respuesta en el cultivo in vitro. El carbón activado puede adherir en su superficie una gran diversidad de moléculas (capacidad de adsorción) ya que posee una estructura porosa, elevada área superficial y alta concentración de sitios activos⁷. Confirmando los resultados obtenidos en la presente investigación, se encontró mayor elongación de brotes y raíces en presencia de carbón activado, en el cultivo in vitro de *Solanum sessiliflorum* var. *Thais*⁸.

Curva de germinación

A pesar de no encontrar diferencias significativas en el porcentaje de germinación y los días a la germinación, se puede destacar que los explantes expuestos a Carbón activado (M1) llegaron al 50 y 75% (Fecha 1 y Fecha 2, respectivamente) de germinación varios días antes que el testigo (M0) (Tabla 1).

En M1 (MS+CA) se obtuvo el 100% de germinación a los 42 días (6 semanas), mientras que para M0 (MS) a las 8 semanas llegó cerca del 92% (Figura 1), lo que indica que el carbón activado aceleró el proceso de germinación en las semillas. El carbón activado puede actuar como catalizador de reacciones químicas⁷, favoreciendo por ejemplo los procesos de respiración de la semilla para su germinación. Singh et al.⁹, sugieren que el carbón activado facilita la capacidad de penetración de la testa, favoreciendo el contacto del agua y oxígeno con las células, dando como resultado mayor germinación de las semillas; en *Solanum lycopersicum* y *Vigna radiata*, los tratamientos con carbón activado favorecieron a la germinación, debido a una mejor absorción de dióxido de titanio. Existen reportes positivos en diferentes especies, respecto a la germinación en semillas expuestas a carbón activado, entre ellas *Hyophorbe lagenicaulis*, *Dendrobium nobile*, *Ophrys* sp., *Disa* spp., *Brassica napus*, *Vitis vinifera*; además se indica que el carbón activado favorece en procesos de embriogénesis somática, maduración y germinación, en diferentes sistemas⁴.

Curvas de crecimiento de la fase de multiplicación

Respecto a la multiplicación a los segmentos de yema sembrados en el medio de multiplicación, se encontró que la longitud del tallo principal incrementó un 77,1%, en seis semanas de evaluación, pasando de $11,8$ a $20,9\text{ mm}$ (Figura 2A), de igual manera el número de brotes incrementó en un 56,8% (Figura 2B).

Varios estudios realizados sobre micropropagación en *C. limon* han sido reportados en relación a reguladores de crecimiento, sin embargo el índice de multiplicación no ha superado los 3 brotes/planta en medio MS + BAP (2mg.L^{-1})¹⁰, contrario al promedio de número de brotes alcanzado en el presente estudio de 4 brotes/planta en 42 días (Figura 2B).

Quoirin, Da Silva, Martins, & De Oliveira¹¹, reportan que la adición de carbón activado (2g.L^{-1}) al medio de cultivo (75% sales MS), en la fase de multiplicación de *Acacia mearnsii*, favoreció en la elongación de los brotes y disminuyó la clorosis, resultados similares a los obtenidos en el presente estudio; concuerdan también con la revisión de Thomas⁴, que indica que el algodón (-----) cultivado con carbón activado, favoreció a la brotación y longitud de brotes.

En seis semanas de evaluación el número de hojas incrementó en un 66,7% ($2,59$ a $4,32$), y la hoja duplicó su longitud, con un crecimiento del 101,2% desde $5,16$ a $10,42\text{ mm}$. Además, se puede resaltar que el número de hojas tuvo su mayor

incremento en las dos primeras semanas, con un promedio de 1,09 hojas. Los resultados de la presente investigación concuerdan con el estudio de *Brassia verrucosa*, que reporta efectos positivos sobre la longitud de hoja, cuando se cultivó en medio de cultivo suplementado con carbón activado y peptona¹². Además, el crecimiento de la hoja pudo verse favorecido también, por la densidad de siembra (1 planta por contenedor), ya que le provee suficiente espacio al interior del frasco y favorece al paso de la luz.

Correlación del incremento del número de brotes y la longitud de tallo.

Después de probar con varios modelos de correlación, se ha establecido que el incremento en el número de brotes en relación a la longitud del tallo es descrito matemáticamente como una función que se ajusta mejor a una regresión logarítmica (Figura 3), con un coeficiente de determinación $R^2=0,997$. La ecuación resultante fue $Y = 5,154\text{Ln}(X) + 11,811$, donde Y es la longitud del tallo (mm) y Ln(X) el logaritmo natural del número de brotes por planta.

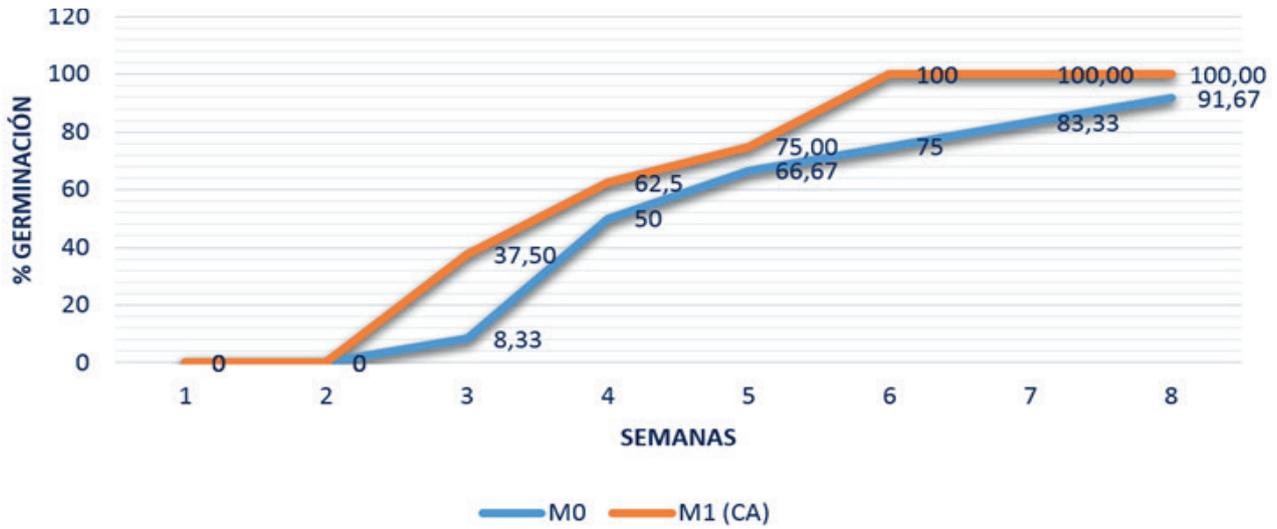


Figura 1. Curva de germinación del *C. limon* durante la introducción al cultivo in vitro.

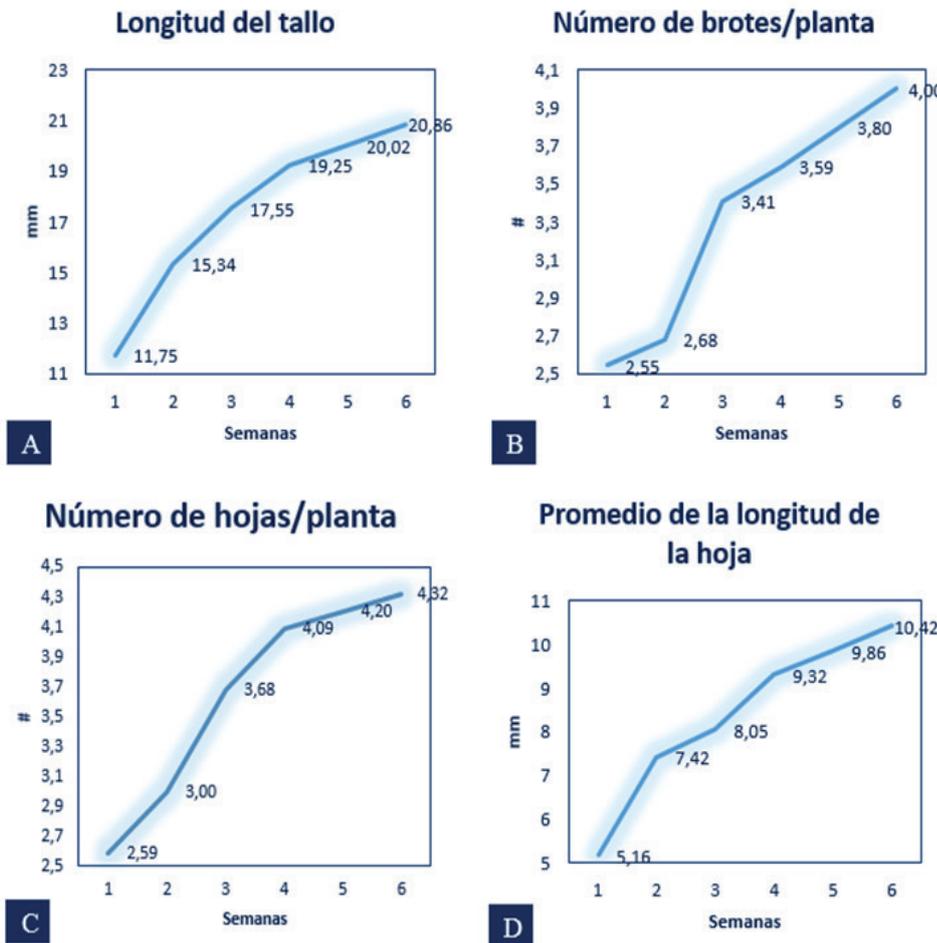


Figura 2. 2A: Curva de crecimiento del promedio de la longitud del tallo de la vitroplanta. 2B: Curva de crecimiento del promedio del número de brotes por planta. 2C: Curva de crecimiento del promedio de número de hojas por planta. 2D: Curva de crecimiento del promedio de la longitud de las hojas.

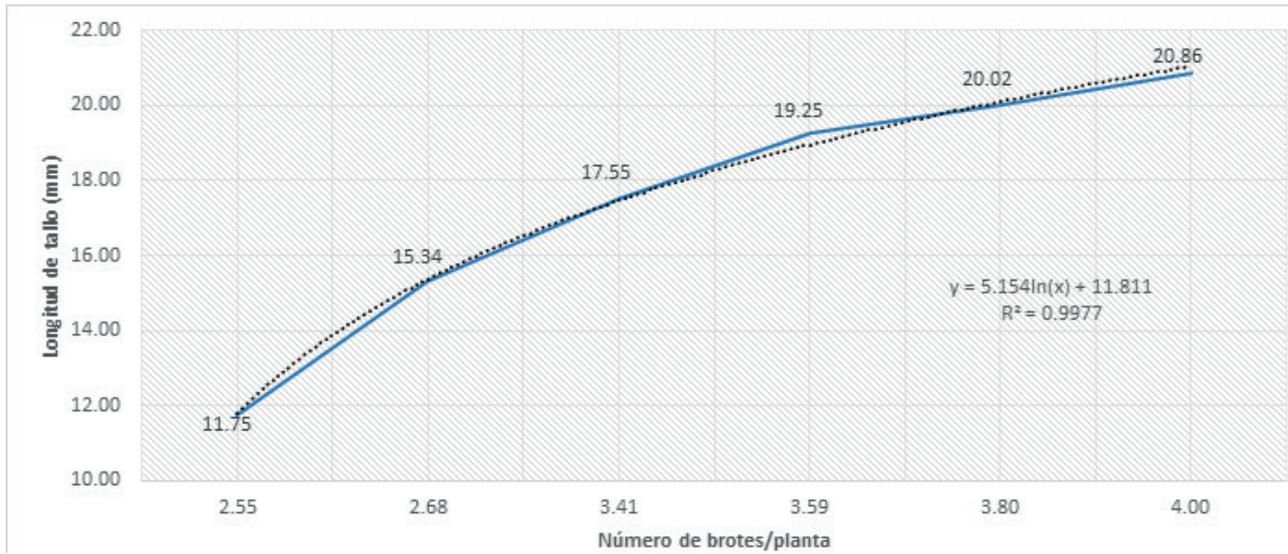


Figura 3. Curva y ecuación de regresión logarítmica (logaritmo natural) entre la longitud del tallo y el número de brotes por planta.

La relación entre el índice de multiplicación representado por el promedio de número de brotes por planta y la longitud del tallo, fue positiva y se ajustó a una curva de regresión logarítmica, misma que sugiere que a mayor longitud del tallo de *C. limon* habrá un mayor número de brotes. Información que concuerda con los datos reportados para *Rubus glaucus*, que a mayor longitud (2,18 cm) se contabilizaron mayor número de brotes (5,27)¹³.

La figura 3 muestra que el incremento en la longitud del tallo fue menor conforme avanzaron las observaciones semanales, empezando con un incremento de 3,59 mm de la primera semana y terminando con 0,84 mm en la última semana; esto relacionado con el número de brotes, permite suponer que los entrenudos fueron cada vez más cortos; lo que favorece al índice de multiplicación, evaluado como el número de yemas (nudos) por planta (14).

Conclusiones

La adición de carbón activado ($1g.L^{-1}$) en el cultivo *in vitro* de *Citrus limon* permite reducir los días a la germinación e incrementar el número de brotes obtenidos por planta. Las curvas de crecimiento obtenidas permitieron concluir que el mayor incremento de longitud de tallo, número de brotes por planta, número de hojas por planta y longitud de la hoja se da durante las primeras semanas de cultivo. Además se determinó una regresión logarítmica ($R^2=0,997$), para el número de brotes en relación a la longitud del tallo.

Referencias bibliográficas

- López González A. Guía de los árboles y arbustos de la Península Ibérica y Baleares. 2da ed. España; 2004. 894 p.
- Makni M, Jemai R, Kriaa W, Chtourou Y, Fetoui H. Citrus limon from Tunisia: Phytochemical and Physicochemical Properties and Biological Activities. *BioMed Research International*. 2018;2018(Article ID 6251546):10.
- Weatherhead MA, Burdon J, Henshaw GG. Some Effects of Activated Charcoal as an Additive to Plant Tissue Culture Media. *Z Pflanzphysiol Bd*. 1978;141-7.
- Thomas D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*. 2008;26:618-31.

- Casierra-Posada F, Cardozo MC. Análisis básico del crecimiento en frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill, cv. 'Quindío') cultivados a campo abierto. *RevFacNalAgrMedellín*. 2009;62:4815-22.
- Polzin F, Sylvestre I, Déchamp E, Ilbert P, Etienne H, Engelmann F. Effect of activated charcoal on multiplication of African yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) nodal segments using a temporary immersion bioreactor (RITA®). *In Vitro CellDevBiol-Plant*. 2014;50:210-6.
- Gómez A, Rincón S, Klose W. Carbón activado de cuesco de palma: Estudio de termogravimetría y estructura. Alemania: Kassel; 2010.
- Almendagna Rodrigues F, Alves R, Pasqual M, Gomes MT, Rezende S. Solidifying agents and activated charcoal for in vitro culture of *Solanum sessiliflorum*. *Pesq agropec bras*, Brasília. 2017;52(11):1123-6.
- Singh P, Singh R, Borthakur A, Srivastava P, Srivastava N, Tiwary D, et al. Effect of nanoscale TiO₂-activated carbon composite on *Solanum lycopersicum* (L.) and *Vigna radiata* (L.) seeds germination. *Energy, Ecology and Environment*. 2016;1(3):131-40.
- Pérez-Tornero O, Tallón CI, Porras I. An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2010;263-271.
- Quoirin, M, Da Silva M, Martins K, De Oliveira D. Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2001;66:199-205.
- Flores-Escobar G, Gil-Vásquez I, Colinas-León MT, Mata-Rosas M. Propagación in vitro de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman ex. Lindl. *Rev Chapingo SerHortic* [Internet]. 2011;17(1). Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rcsh/v17n1/v17n1a2.pdf>
- Vaca I. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE CULTIVO in vitro DE *Rubus glaucus* (BENTH), MEDIANTE EL USO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO. Congreso presentado en: II Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad - CIBE - ESPOL; 2014; Guayaquil - Ecuador.
- Benavides T, Córdova A. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN in vitro DE *Geranium chilloense* Willd. ex Kunth. Y *Lupinus pubescens* Benth. PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS COMPLETAS, PARA LA PRIMERA ETAPA DE RESTAURACIÓN DE LAS QUEBRADAS DE QUITO [Internet]. [Quito-Ecuador]: UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA; 2015. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/9372>

Recibido: 29 mayo 2018

Aprobado: 4 agosto 2018

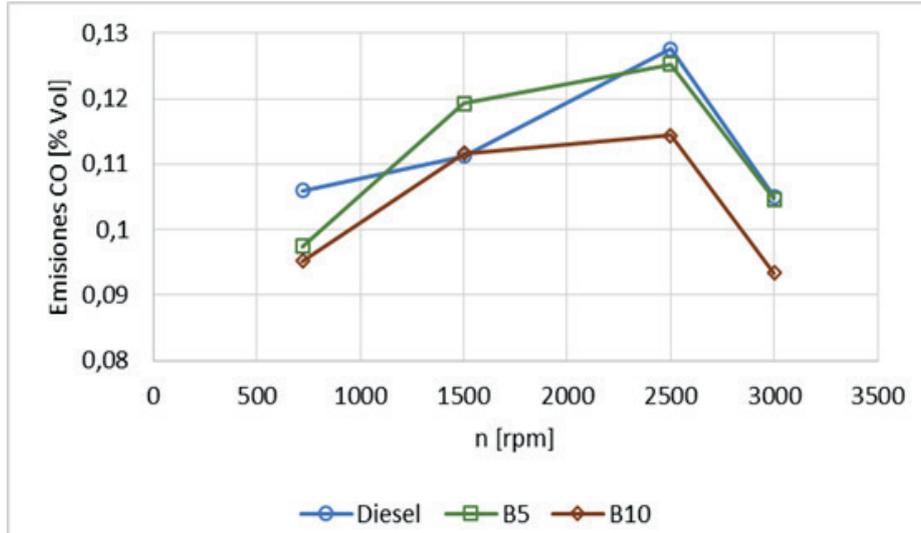


Figura 1. Emisiones de CO.

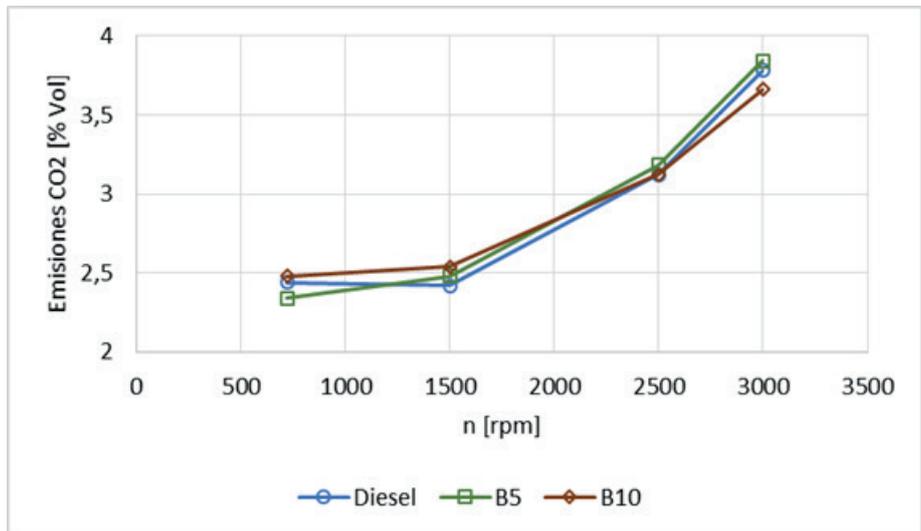


Figura 2. Emisiones de CO₂.

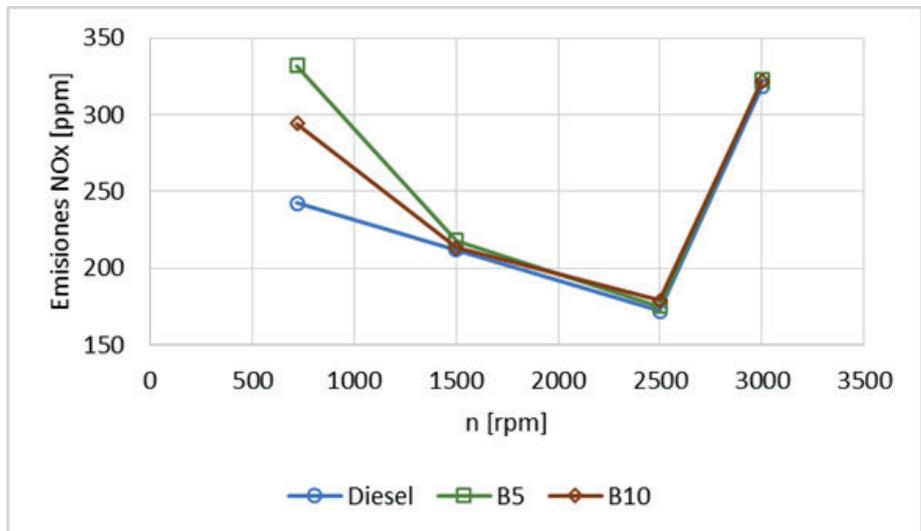


Figura 3. Emisiones de NO_x.

Las emisiones de CO₂ se incrementan en todo el rango de revoluciones, a distinción de ralentí. En lo que respecta a NO_x, a un régimen de 720 rpm se observa un elevado incremento de las emisiones, mientras que en el resto de revoluciones la diferencia es mínima.

Con mezcla B10 las emisiones de CO se redujeron con la misma similitud en ralentí, 2500 rpm y 3000 rpm, pero en 1500 rpm, hay un ligero aumento, el cual es prácticamente despreciable. Por otra parte, el CO₂ aumentó en bajas rpm, no presentó cambios a 2500 rpm y disminuyó a 3000 rpm, esto debido al mayor contenido de oxígeno en el biodiésel de aceite de algas, permitiendo un mejor quemado de la mezcla, lo cual eleva la temperatura en la cámara de combustión, incrementando las emisiones de NO_x en todo el rango de revoluciones, especialmente en ralentí.

17. Pandey A, Lee D, Chisti Y, Soccol C. Biofuels from algae. Great Britain. 2011; 5(4).
18. An H, Yang WM, Maghbouli A, Li J, Chou SK, Chua KJ. Performance, combustion and emission characteristics of biodiesel derived from waste cooking oils. Applied Energy. 2013; 112: p. 493-499.

Recibido: 29 mayo 2018
Aprobado: 4 agosto 2018

Referencias bibliográficas

1. Sakthivel R, Ramesh K, Purnachandran R, Shameer PM. A review on the properties, performance and emission aspects of the third generation biodiesels. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2018; 82: p. 2970-2992.
2. Hasan MM, Rahman MM. Performance and emission characteristics of biodiesel-diesel blend and environmental and economic impacts of biodiesel production: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2017; 74: p. 938-948.
3. Nhat PVH, Ngo HH, Guo WS, Zhang XB, Guo JB, Chang SW, et al. Can algae-based technologies be an affordable green process for biofuel production and wastewater remediation? Bioresource technology. 2018.
4. Satputaley E, Chawane C, Deshpande NV. A critical review of biofuel from algae for sustainable development. Conference on Innovative paradigms in engineering and technology. 2012; V(10).
5. Al-lwazy SH, Yusaf T. Diesel engine performance and exhaust gas emissions using Microalgae Chlorella protothecoides biodiesel. Renewable Energy. 2017; 101: p. 690-701.
6. Ramachandra TV, Madhab MD, Shilpi S, Joshi NV. Algae biofuel from urban waste water in India: scope and challenges. Renew Sustain Energy. 2013; 21(77).
7. Ahmad AL, Mat-Yasin NH, Derek C, Lim J. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production. Renew Sustain Energy. 2011; 15(584).
8. Gouveia L. Microalgae as a feedstock for biofuel. Springer briefs in microbiology. Netherlands Springer. 2011.
9. Fisher B, Marchese A, Volckens A, Lee T. Measurement of gaseous and particulate emissions from algae based fatty acid ethyl esters. SAE Int Fuel Lubricants. 2010; 3(9).
10. Demirbas A, Demirbas M. Importance of algae oil as a source of biodiesel. Energy Convers Manag. 2011; 52(163).
11. Demirbas A, Demirbas M. Algae as a new source of biodiesel green energy and technology. London Springer. 2010.
12. Borowitzka M, Moheimani N. Algae for biofuels and energy developments in applied phycology. Netherlands Springer. 2013.
13. An H, Yang W, Maghbouli A, Li J, Chou S, Chua K. Performance combustion and emissions characteristics of biodiesel derived from waste cooking oils. Applied Energy. 2012; 11(2).
14. Özener O, Yüksek L, Ergenç AT, Özkan M. Effects of soybean biodiesel on a DI diesel engine performance, emission and combustion characteristics. Fuel. 2014; 115: p. 875-883.
15. Rahman SMA, Masjuki HH, Kalam MA, Abedin MJ, Sanjid A, Imtenan S. Effect of idling on fuel consumption and emissions of a diesel engine fueled by Jatropha biodiesel blends. Journal of Cleaner Production. 2014; 69: p. 208-215.
16. Tuccar G, Ozgur T, Aydin K. Effect of diesel microalgae biodiesel butanol blends on performance and emission characteristics of biodiesel derived from waste cooking oils. Applied Energy. 2014; 4(2).