

TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE *Dioscorea cayenensis* subsp. *rotundata* Poir. CULTIVAR 'BLANCO DE GUINEA'

Aracelis Villavicencio Ramírez¹, Carlos Ros Araluce², y Misterbino Borges García²

¹ Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, Delegación Provincial del Ministerio de la Agricultura, Carretera Central vía Holguín, Bayamo, CP: 85 100, Granma, Cuba.

² Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma, Carretera Central vía Manzanillo, Km 17½, Bayamo, CP: 85 100, Granma, Cuba.

*Autor para la correspondencia: crossa@udg.co.cu.

Recibido: 29 de octubre de 2019; Aceptado: 13 de noviembre de 2019

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la efectividad de tres tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea cayenensis* subsp. *rotundata* Poir cv. 'Blanco de Guinea'. Se empleó un diseño completamente aleatorizado con tres tratamientos que consistieron en la inmersión de los segmentos nodales en etanol al 70 % + hipoclorito de sodio (1,5 %); lejía clorada comercial (2 %) y lejía clorada comercial (2 %) + bicloruro de mercurio. A los siete días se evaluó el porcentaje de contaminación y a los 35 días el porcentaje de plantas regeneradas. Se utilizaron 100 explantes por tratamiento. El tratamiento 3 (bicloruro de mercurio) fue el que mostró los mejores resultados con diferencias significativas sobre el resto de los tratamientos en cuanto al total de explantes regenerados (96 %) y en el porcentaje de contaminación (0 %). A los siete días de establecidos *in vitro* los segmentos nodales, no se observó contaminación en los frascos.

Palabras clave: contaminación, desinfección, segmentos nodales

DIFFERENT DISINFECTION TREATMENTS IN THE *IN VITRO* CULTURE OF *Dioscorea cayenensis* subsp. *rotundata* Poir. CULTIVAR 'BLANCO DE GUINEA'

ABSTRACT

The aim of the present work was to determine the effectiveness of three disinfection treatments in the *in vitro* culture of *Dioscorea cayenensis* subsp. *rotundata* Poir cv. 'Blanco de Guinea'. A completely randomized design was used with three treatments consisting on the immersion of the nodal segments in 70 % ethanol + sodium hypochlorite (1,5 %); commercial chlorine bleach (2 %) and commercial chlorine bleach (2 %) + mercury bichloride. The percentage of contamination was evaluated after seven days and the percentage of regenerated plants, after 35 days. One hundred explants per treatment were used. Treatment 3 (mercury bichloride) was the one that showed the best results, with significant differences over the rest of the treatments, in relation to the total of regenerated explants (96 %) and the percentage of contamination (0 %). There was not observed contamination in the vials, after seven days the nodal segments were established *in vitro*.

Keywords: contamination, disinfection, nodal segments

INTRODUCCIÓN

La contaminación por microorganismos compromete la efectividad de las técnicas de cultivo *in vitro* de plantas. Fundamentalmente hongos y bacterias son detectados en las primeras etapas afectando la producción y constituyendo un serio problema a escala mundial en numerosos laboratorios (Bogado *et al.*, 2016).

El uso de sustancias desinfectantes permite la limpieza del material vegetal para evitar la contaminación en los estadios iniciales en el cultivo *in vitro*, lo que posibilita incrementar los índices de establecimiento del material vegetal en condiciones *in vitro*. Entre los agentes desinfectantes que se emplean con mayor frecuencia se encuentran etanol (70 %), hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio y bicloruro de mercurio (Müller *et al.*; 2017), además de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), yodo, y fungicidas comerciales (Bonilla y Hernández 2012).

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto tres métodos de desinfección sobre el establecimiento *in vitro* de ñame *D. cayenensis* subsp. *rotundata* Poir cultivar 'Blanco de Guinea'.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se emplearon segmentos uninodales desprovistos de hojas con una longitud aproximada de 2,0 cm, obtenidos de plantas donantes de ñame (*D. cayenensis* subsp. *rotundata* Poir) clon 'Blanco de Guinea', cultivadas durante 35 días en condiciones semicontroladas (temperatura de 33 ± 2 °C, humedad relativa del 70-80 %, e iluminación natural con fotoperiodo de 12 horas). Se utilizaron 100 segmentos por tratamiento los cuales se lavaron con detergente comercial durante 30 min en zaranda orbital para la eliminación de restos de suciedad, luego se enjuagaron tres veces con abundante agua y a continuación, en condiciones de asepsia, en la cabina de flujo laminar, se aplicaron los tratamientos siguientes:

Tratamiento 1 (T1): Los segmentos se sumergieron 1 min en alcohol al 70 %, luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, y finalmente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1,5 % durante 30 min (Borges *et al.*, 2009).

Tratamiento 2 (T2): Los segmentos se sumergieron durante 30 min en lejía clorada comercial al 2 %, luego se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril.

Tratamiento 3 (T3): Los segmentos se sumergieron durante 30 min en lejía clorada comercial al 2 %, luego se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril y se sumergieron en bicloruro de mercurio al 0,1 % durante 10 min, posteriormente se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril.

Seguidamente los segmentos fueron seccionados por los extremos hasta una longitud final de 1,0 cm, luego fueron sembrados a razón de uno por frasco, en el medio Murashige Skoog con cloruro de calcio deshidratado (CaCl) 2,2 ml.L⁻¹, Yoduro de potasio(KI), 0,75 ml, FE-EDTA 7,5 ml.L⁻¹ Vitaminas MS 5 ml.L⁻¹, Cisteína 0,02 ml.L⁻¹, Sacarosa 30 g.L⁻¹, pH 5.7 y agar 6 g.L⁻¹.

Evaluación:

Durante los primeros siete días, mediante observación directa se evaluó:

- Porcentaje de frascos contaminados por tratamiento.

- Porcentaje de explantes necrosados por tratamiento.

A los 35 días de la siembra se evaluó:

- Porcentaje de plantas regeneradas por tratamiento.

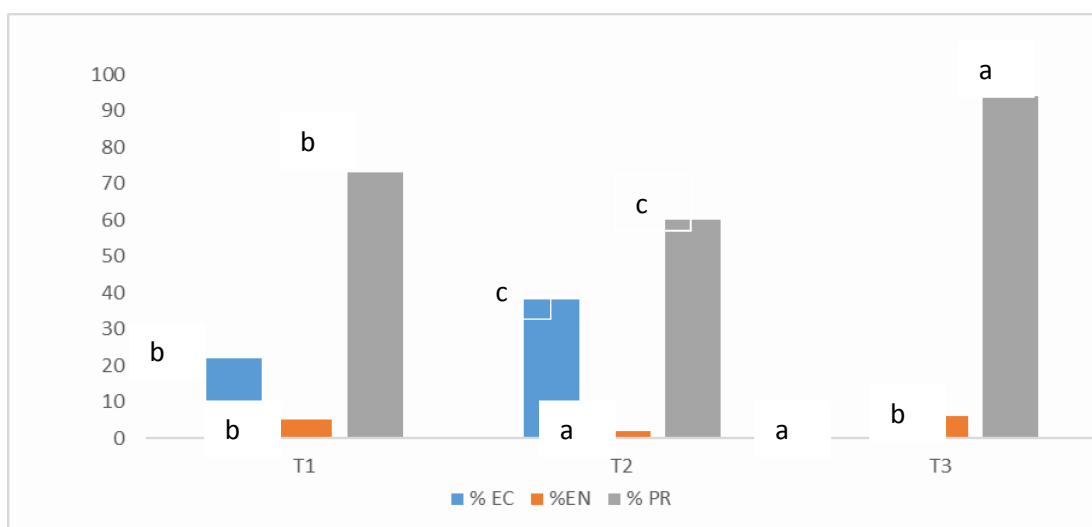
Se utilizaron 100 explantes por tratamiento, aplicándose un diseño completamente aleatorizado con análisis de varianza no paramétrica con la prueba Kruskal Wallis para un 5 % de probabilidad del error. Para comprobar la homogeneidad de varianzas se realizó la prueba de Bartlett. Todos los análisis estadísticos se realizaron con los programas InfoStat (2017) y Minitab (2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se observan los resultados de los diferentes tratamientos de desinfección sobre los explantes de *D. cayenensis* subsp. *rotundata* Poir cv. 'Blanco de Guinea'.

El tratamiento 3 (bicloruro de mercurio) fue el que mostró los mejores resultados con diferencias significativas sobre el resto de los tratamientos en cuanto al total de explantes regenerados (96 %) y en el porcentaje de contaminación (0 %). A los siete días de sembrados los segmentos nodales, no se observó contaminación en los frascos.

En cuanto al porcentaje de explantes necrosados, el tratamiento 2 (lejía clorada comercial) mostró los mejores resultados, sólo el 2 % de los segmentos nodales fue necrosado difiriendo de manera significativa del resto de los tratamientos. Entre T1 (5%) y T3 (6%) no existió diferencias significativas en este indicador evaluado.



Leyenda:

% EC: Explantes contaminados, % EN: Explantes necrosados, % PR: plantas regeneradas.

Figura 1. Efecto de los diferentes tratamientos de desinfección de *D. cayenensis* subsp. *rotundata* Poir cv. 'Blanco de Guinea'.

Estos resultados difieren de los obtenidos por Borges *et al.*, (2009), quienes lograron mayor desinfección con hipoclorito al 1,5 % durante 30 min en *D. alata* clon Caraqueño con 91 % de plantas regeneradas. El mismo autor planteó que a medida en que se

incrementó la concentración de hipoclorito disminuyó el porcentaje de establecimiento debido a necrosis en los explantes.

La utilización del bicloruro de mercurio (HgCl_2) en la desinfección del material vegetal ha sido referida por varios autores entre los que se destacan *García et al.* (2015), quienes alcanzaron los mejores resultados en el control de la contaminación y bajos índices de oxidación, cuando lo emplearon a una concentración de 0,125 % durante 10 minutos.

Otros autores han informado que este producto se debe trabajar con mucho cuidado, ya que es tóxico y afecta al medio ambiente. En este sentido Smith (2013), aseguró que es tóxico y activo a bajas concentraciones, además de que tiene efectos prolongados sobre el medio ambiente.

También Bedoya *et al.*, (2016) en la desinfección de explantes de *Aloysia tryphilla* Britton, alcanzaron los mejores resultados con la utilización de HgCl_2 , logrando reducir la contaminación por debajo del 20 %. A esa misma concentración, durante 20 min., lo emplearon Beltrán y Mesa (2014) quienes lograron una mayor efectividad en el control de la contaminación de hongos y bacterias endógenas en la desinfección del comino *Aniba perutilis* Hemsley.

Azofeifa *et al.*, (2019), lograron los mejores resultados en la desinfección de segmentos nodales de Vainilla cuando combinaron el fungicida Kilol y HgCl_2 al 0,2 % durante 15 minutos. Con esta combinación lograron el 100 % de explantes libres de contaminantes durante el establecimiento de los segmentos nodales. Estos autores informaron que el procedimiento de la doble desinfección con el empleo de Kilol y HgCl_2 puede ser efectivo para la formulación de ensayos logrando una óptima reducción de la carga contaminante microbiana con el consecuente incremento de la respuesta morfogénica de las variables de crecimiento durante el establecimiento y multiplicación sin el uso de aditivos antimicrobianos al medio de cultivo.

Por otra parte, Jiménez y Abdelnour (2015), también alcanzaron los mejores resultados en la desinfección de los tejidos de *Vaccinium consanguineum* Klotzsch para el cultivo *in vitro*, con el uso del bicloruro de mercurio al 0,02 % durante 5-6 min, como único agente desinfectante.

CONCLUSIONES

El tratamiento (T3) donde se empleó el bicloruro de mercurio al 0,1 %, con la combinación de legía clorada comercial al 2 % mostró los mejores resultados en la desinfección de segmentos uninodales de *D. cayenensis* subsp. *rotundata* Poir cv. 'Blanco de Guinea'.

BIBLIOGRAFÍA

- AZOFEIFA, J.; RIVERA, G.; PANIAGUA, A.; CORDERO, R.; y E., SALAS. 2019. Efecto de la desinfección de segmentos nodales sobre el rendimiento morfogénico de vitroplantas de *Vanilla planifolia* Andrews. *Agronomía Mesoamericana*. 30(1):33-49.
- BEDOYA, J.; SANCHEZ, C.; BERMUDEZ, S. y S., RAMIREZ. 2016. Estandarización de un protocolo de desinfección y establecimiento de cultivo *in vitro* de *Aloysia tryphilla*. *Bioteología en el Sector Agropecuario*. Vol. 14 (2): 38-46.

- BELTRÁN, D. y N., MESA. 2014. El bicloruro de mercurio como desinfectante en la micropropagación del comino (*Anibaerutilis hemsley*). *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol. 16 (1): 203-209.
- BOGADO, F.; VERA, C.; AYALA, P.; SANSBERRO, P. y C., LUNA. 2016. Uso de distintos desinfectantes superficiales para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Grevillea robusta*. *Ciencias Agronómicas* 27 (2):11-16.
- BONILLA, M. y O., HERNÁNDEZ. 2012. Propagación in vitro de ñame (*Dioscorea* spp.): una perspectiva en la producción masiva de plántulas y conservación de germoplasma. *Agronomía* 20(2): 65-76.
- BORGES, M.; ABEAL, E.; PÉREZ, I. y S., MENESES. 2009. Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11 (2): 127-135.
- GARCÍA, D.; MESA, N. y M. OCAMPO. 2015. Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2): 76-84.
- JIMÉNEZ V. y A. ABDELNOUR. 2015. Establecimiento *in vitro* de (*Vaccinium consanguineum*), un arándano nativo de Costa Rica. *Tecnología en Marcha*, 29 (2):77-84.
- MÜLLER, D.; GARCÍA, P.; TRAVACIO, A. y M., BUENO. 2017. Establecimiento in vitro de *Zephyranthes* spp. *Biotecnología Vegetal*, 17(1): 19-24.
- SMITH, R. 2013. Contamination. *Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments*. Third Edition. United States of America, p. 53-61. Consultado: 6 de junio de 2019. Disponible en: <http://books.google.com.co/books.isbn=0124159850>.