

Desinfección de segmentos nodales en el establecimiento *in vitro* de *Erythrina americana* Miller.

Disinfection of nodal segments in the *in vitro* establishment of *Erythrina americana* Miller.

Martínez Hernández María de Jesús¹✉, Sánchez Hernández Sandra Ivonne¹, Castillo Rocha Doris¹, Rodríguez Mauricio Luna.²

¹ Facultad de Ciencias Agrícolas Campus Xalapa, Universidad Veracruzana. Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán S/N. C.P. 91090 Xalapa, Veracruz.

² LATEX, Laboratorio de Alta Tecnología Xalapa, Calle Médicos No. 5 Col. Unidad del Bosque Xalapa, Veracruz C.P. 91010. Universidad Veracruzana

✉ Autor de correspondencia mhernandezmj@gmail.com

Recibido: 18/02/2017

Aceptado: 30/06/2017

RESUMEN

Con la finalidad de establecer un protocolo de desinfección y multiplicación *in vitro* para la obtención de plántulas de *Erythrina americana* Miller, se evaluaron dos diferentes desinfectantes etanol e hipoclorito de sodio en concentraciones porcentuales de 35, 45, 55, 65 y 70 (v/v) y 20, 25, 30, 35 y 40 respectivamente, con tiempos de inmersión de 5, 10, 15, 20 y 25 minutos para ambos; se utilizaron segmentos nodales de 2.0 cm de longitud. El medio de cultivo utilizado fue Murashige y Skoog (MS) adicionado con 3% de sacarosa, vitaminas y bencilamino purina (BAP) 0.5 mgL⁻¹ y Ácido indolbutírico (AIB) 0.1 mgL⁻¹. Los resultados mostraron que la inmersión de los segmentos nodales en elevadas concentraciones y tiempos prolongados registraron el 100% de muerte por necrosis de los tejidos, sin embargo, con las soluciones de etanol al 35 % (v/v) e hipoclorito de sodio al 30% (v/v) con un tiempo de cinco minutos de inmersión, controlaron la contaminación fúngica o bacteriana, sin afectar la viabilidad de los segmentos nodales. Con la concentración de BAP 0.5 mgL⁻¹ y AIB 0.1 mgL⁻¹, se estimuló una yema durante la etapa de multiplicación, lo cual indicó, que es necesario hacer más combinaciones de reguladores del crecimiento a fin de obtener la concentración óptima que estimulen el mayor número de yemas posibles. Los resultados obtenidos permitieron comprobar que micropropagar esta especie es una alternativa viable para su comercialización, conservación y reforestación de zonas degradadas.

Palabras clave: *in vitro*, segmentos nodales, micropropagación.

ABSTRACT

In order to establish an *in vitro* multiplication and disinfection protocol for the production of American *Erythrina* Miller seedlings, two different disinfectants ethanol and sodium hypochlorite were evaluated in percentage concentrations of 35, 45, 55, 65 and 70 (v / v) and 20, 25, 30, 35 and 40 respectively, with an immersion time of 5, 10, 15, 20 and 25 minutes for both; 2.0 cm long nodal segments were used. The culture medium used was Murashige and Skoog (MS) added with 3% sucrose, vitamins and BAP 0.5 mgL⁻¹ and AIB 0.1 mgL⁻¹, a yolk was stimulated during the multiplication stage, which indicates that it is necessary to make more combinations of growth regulators in order to obtain the optimum concentration that stimulate the greatest number of possible buds. The results obtained showed that

micropropagation of this species is a viable alternative for the commercialization, conservation and reforestation of degraded areas.

Key words: *in vitro*, nodal segments, micropropagation

INTRODUCCIÓN

El árbol de *Erythrina americana* es de la familia *Fabáceae*, el nombre alude al color prevaeciente de las flores y deriva del griego *erythros* = rojo; comprende 115 especies distribuidas a través de las regiones tropicales del mundo; 25 de ellas se encuentran en México. (García-Mateo, *et al.*, 2001). En especial la especie *Erythrina americana* Miller que en el siglo XVII, el Códice Florentino le atribuye únicamente valor estético. En el mismo siglo Francisco Hernández comentó: “el jugo exprimido e instilado en la boca de los infantes les produce sueño”. Hasta el siglo XX se vuelve a registrar más información sobre esta planta. En México las flores se ha reportado el uso etnomédico como antídoto, antiinflamatorio, narcótico, contra dermatosis que producía parálisis (Brito, 2005). Se encuentra en todo el trópico y subtrópico de México, en los estados de México, Puebla, Tabasco, Veracruz, Chiapas y Yucatán. En Tlaxcala se le localiza como cerca viva en huertos familiares, traspatios y jardines públicos del centro y sur del estado. La especie *E. coralloides* crece en de clima frío o templado y *E. americana* crece en regiones más cálidas. (García-Mateo, *et al.*, 2001). En el estado de Veracruz la especie de *E. americana* Miller se puede encontrar en algunos linderos y en algunos patios de los municipios de Acajete, Banderilla, Emiliano Zapata y Rafael Lucio. En los estudios realizados hasta ahora, no se encuentran plantaciones, ni datos de que mencionen que se está conservando esta especie, el poco interés de los pobladores de recolectar y sembrar las semillas ha originado que cada vez excitan menos árboles. Un método alterno es la propagación *in vitro* el cual es el conjunto de técnicas usadas para crecer células,

tejidos u órganos vegetales, se cultiva bajo condiciones asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999) es importante, ya que permite obtener un gran cantidad de plantas en menor tiempo y espacio. El objetivo de este trabajo, fue establecer un protocolo de desinfección y multiplicación *in vitro* para la obtención de plántulas de *Erythrina americana* Miller.

MATERIALES Y MÉTODOS

El medio de cultivo utilizado para toda la investigación fue Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog 1962) y agar (Sigma ®) 6 g L⁻¹ y 30 g L⁻¹ de Sacarosa, adicionándole en la etapa de multiplicación BAP 1 mg L⁻¹. suplementándolo con AIB 0.1 mg L⁻¹ y vitaminas (Myo-inositol 0.1 mg l⁻¹, Thiamine 0.1 mg l⁻¹ y Pyridoxine 0.5 mg l⁻¹). Se ajustó el pH a 5.8 con KOH 1N o HCl 1N antes de adicionar el agar; se esterilizó en la autoclave a 120° C durante 20 minutos. Colocándose 20 mL del medio de cultivo en un frasco de vidrio, previamente esterilizado, de una capacidad de 120 mL.

Los explantes (segmentos nodales) fueron obtenidos de brotes de plantas madres, ubicadas en intemperie en el rancho denominado “María”, que se encuentra ubicado en Piletas Veracruz. Las varetas fueron tomadas de los primeros 15 cm superiores de los brotes. Al momento de la colecta de ellos, fueron colocados en papel periódico húmedo y en una hielera a fin de que no se deshidrataran. En el laboratorio se procedió a quitar las hojas y la desinfección del material vegetal (varetas) fue de manera superficial, se lavaron por dos ocasiones con agua potable, jabón líquido y un cepillo

de cerdas suaves para eliminar sedimentos y segmentos nodales de 2.0 cm de longitud. Además se adicionaron dos gotas de Tween 80 por cada 100 mL de solución, durante 15 minutos. Posterior a esto se realizaron los tratamientos (Tabla 1). Dentro de la cámara de flujo laminar se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril, para cada uno de los tratamientos.

partículas grandes. Se cortaron en En cada frasco se colocaron 3 segmentos nodales para su brotación, se cultivaron a una temperatura de 25° C y un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. El diseño experimental fue completamente al azar, la unidad experimental la constituyeron 16 frascos que contenían 3 brotes cada uno. Repitiéndose este experimento cuatro veces.

Tabla 1. Tratamientos concentración y tiempos de exposición

Tratamientos	Etanol % (v/v)	Tiempo (minutos)	Tratamientos	Hipoclorito de sodio % (v/v)	Tiempo (minutos)
1	35	5	1	20	5
2	35	5	2	25	5
3	35	5	3	30	5
4	35	5	4	35	5
5	35	5	5	40	5
6	45	10	6	20	10
7	45	10	7	25	10
8	45	10	8	30	10
9	45	10	9	35	10
10	45	10	10	40	10
11	55	15	11	20	15
12	55	15	12	25	15
13	55	15	13	30	15
14	55	15	14	35	15
15	55	15	15	40	15
16	65	20	16	20	20
17	65	20	17	25	20
18	65	20	18	30	20
19	65	20	19	35	20
20	65	20	20	40	20
21	70	25	21	20	25
22	70	25	22	25	25
23	70	25	23	30	25
24	70	25	24	35	25
25	70	25	25	40	25

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el programa SAS (SAS Institute, Inc. 1997). Se realizó el análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección de segmentos nodales.

En la figura 1, se puede observar que no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos para la supervivencia de segmentos nodales, el tratamiento 1, que fue las soluciones de etanol al 35 % (v/v) e hipoclorito de sodio al 30% (v/v) con un tiempo de cinco minutos de inmersión obtuvo el 100%, mientras que en los demás tratamientos la respuesta fue nula, se pudo observar la muerte de los tejidos por necrosis, esto afectó severamente la supervivencia de los explantes. Alvarado 1998, ha reportado este efecto en otras especies, dado que el empleo de dosis elevadas de agentes desinfectantes elimina la microbiota contaminante pero causa la muerte de todos los explantes utilizados.

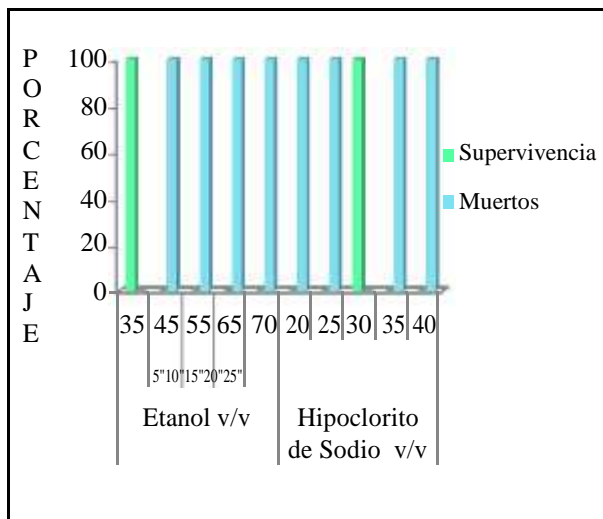


Figura 1. Porcentaje de supervivencia de segmentos nodales

Asimismo Uribe *et al.*, 2008, menciona que en *Berberidopsis corallina*, (michay rojo) durante la etapa de establecimiento, el factor limitante en la supervivencia y viabilidad de los explantes es el tratamiento de desinfección aplicado. De acuerdo a Cassells (1991), los contaminantes en el cultivo de tejidos pueden causar grandes pérdidas en los procesos de propagación *in*

vitro. Según Abdelwahd *et al.*, (2008) y Pedroza *et al.*, (2007), la obtención de explantes para iniciar actividades de cultivo *in vitro*, necesariamente implica causar cortes o heridas en los tejidos, los cuales facilitan la entrada de nutrientes y fitohormonas, pero favorecen también la exudación de compuestos relacionados con la cicatrización y defensa contra agentes externos (principalmente patógenos), estos compuestos generalmente de estructura fenólica, son rápidamente oxidados, causando el oscurecimiento del medio de cultivo y de los tejidos, haciendo que estos se necrosen y mueran. De ahí la importancia de su eliminación desde la fase de establecimiento, donde los daños son menores debido al menor volumen de explantes que se manipulan. Es importante mencionar que las altas concentraciones controlan la aparición de hongos y bacterias, sin embargo los explantes mueren, esto coincide con lo mencionado por Folgueras *et al.* (2001); Das y Pal (2005); Rodríguez *et al.*, (2008), que indican que los contaminantes más comunes durante el establecimiento *in vitro* de explantes procedentes de plantas adultas son los hongos y las bacterias que habitan de manera normal en el cultivo de las mismas en condiciones naturales. Alternamente se ha realizado la desinfección de yemas axilares de diferentes especies de bambú, con una combinación de fungicidas y bactericidas y posterior sumergimiento de los explantes en hipoclorito de sodio al 1.5% durante 10 minutos (Jiménez *et al.*, 2006). Igualmente se ha realizado la desinfección de los segmentos nodales con hipoclorito de sodio al 1% durante 5 minutos (Freire *et al.*, 2011). Lo antes mencionado y los resultados obtenidos coinciden con lo mencionado por Alves Dos Santos *et al.* (2010), una desinfección eficaz es aquella en la que los explantes que han sido expuestos a una baja concentración desinfectante, presentan tasas reducidas de contaminación microbiana y oxidación.

En la multiplicación cuando se le adicionó al medio de cultivo MS la concentración de BAP 0.5 mgL^{-1} y AIB 0.1 mgL^{-1} , estimuló una yema, lo cual indicó que la concentración por debajo de 1 mgL^{-1} de BAP no fue suficiente para la brotación de las yemas independientemente de la concentración de AIB. Resultados semejantes fueron obtenidos por Fick (2007), que partiendo de segmentos nodales de propágulos seminales germinados *in vitro*, evaluó distintas concentraciones de BAP combinado con ANA, concluyó que la adición de reguladores de crecimiento ya sea individual o combinada no promovió mejores resultados respecto al tratamiento sin hormonas. Por otro lado, Montavani *et al.* (2001), partiendo de segmento nodales (*Cordia trichotoma*) de seis meses de edad, obtuvo una mayor elongación y multiplicación de los brotes con BAP y GA3 (Ácido giberélico). Schendelbek (2007) concluyó que para la fase de multiplicación de brotes de Peteribí, los mejores resultados en cuanto al número de brotes por explante y coeficiente de multiplicación se obtuvieron con el empleo de 1.0 mgL^{-1} de BAP con o sin la adición de 0.1 mgL^{-1} ANA incluso de otro regulador.

CONCLUSIONES

La desinfección de las plantas madres es indispensable para disminuir la contaminación en la fase de establecimiento del material vegetal.

La inmersión de los segmentos nodales en etanol 35% (v/v) durante cinco minutos y luego en solución de hipoclorito de sodio al 30% (v/v) durante cinco minutos, logró un control de la contaminación y no afectó la viabilidad del segmento nodal, mientras que a concentraciones altas de etanol e hipoclorito de sodio y tiempos de exposición prolongados causa la muerte de los tejidos por necrosis de los mismos. El uso de hormonas BAP y AIB no promovió una mayor brotación de los explantes. Los resultados obtenidos permitieron comprobar que micropropagar esta especie es una

alternativa viable para su comercialización, conservación y reforestación de zonas degradadas.

AGRADECIMIENTOS

A las Plataformas de Innovación Tecnológicas de la Facultad de Ciencias Agrícolas Campus Xalapa, Universidad Veracruzana y al Proyecto “Diagnostico, propagación y alternativas de conservación para la especie *Erythrina americana* Miller, en el municipio de Actopan, Veracruz. SUPRO:PIT-PE007”

LITERATURA CITADA

Abdelwahd, R., Hakam, N., Labhilili, M., & Udupa, S. M. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of *faba bean*. *African Journal of Biotechnology*, 7(8), 997–1002.

Alvarado Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. In Pérez JN ed. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba. p. 81-104

Alves Dos Santos, M. R., Rodrigues Ferreira, M. D. G., De Oliveira Correia, A., & Félix Da Rocha, J. 2010. *In vitro* establishment and callogenesis in shoot tips of Peach Palm. *Revista Caatinga*, 23(1), 40–44.

Brito. F. I.C. 2005. Zompantle o colorín (*Erythrina americana* Miller). Edición electrónica. Revista Tlahui-medic No. 20. México

Cassells AC. 1991. Problems in tissue culture: culture contamination. In debergh P, RH Zimmerman eds. Micropropagation. Dordrecht, The Netherland. Kluwer Acad. Publish. p. 31-45.

https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0_

Das, M.; Pal, A. 2005. *In vitro* regeneration of *Bambusa balcoa* Roxb. Factors affecting changes of morphogenetic competence in

axillary buds. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 81 (1):109-112.

<https://doi.org/10.1007/s11240-004-3017-x>

Freire M, García Y, Hurtado O, León M, Fajardo L, Cruz M, Sánchez C, Alvarado Y, Acosta M, Tejada M, Roque B, Leiva M.

2011. Combinación de técnicas biotecnológicas y tradicionales para la propagación de diferentes especies de bambú. *Biotecnología vegetal* Vol. 11, Nº 3:163 -168. Cuba.

Folgueras, M., Herrera, L., Carrazana, D. 2001. La contaminación microbiana en la micropropagación in vitro de las raíces y tubérculos tropicales. En: Libro de reportes cortos. Ciego de Ávila: Taller internacional BioVeg'2001, pp.183-185.

García-Mateos, R., Soto-Hernández., Vibrans, H. 2001. *Erythrina americana* MILLER ("Colorín"; Fabácea), a Versátil Resource from México: a Review. *Economic Botany* 55(3):391-400

<https://doi.org/10.1007/BF02866562>

Jiménez V, Castillo J, Tavares E, Guevara E, Montie M. 2006. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant cell tiss. Org. Cult.* 86: 389 - 395.

<https://doi.org/10.1007/s11240-006-9120-4>

Mantovani; N. C.; Franco E. T.; Henz, Vestena S. 2001. Regeneração *in vitro* de Louro-Pardo (*Cordia trichotoma*. (Vell.) Arráb. Ex Steud). *Ciencia Florestal*, Santa Maria, V. 11, n. 2: 93-101

<https://doi.org/10.5902/198050981658>

Murashige, T., & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.

<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb>

Pedroza-Manrique, J. A., González-Molina, S. R., & Téllez-Ortiz, D. C. 2007. Micropropagación de *Dodonea viscosa* (L) Jacq: una especie en vías de extinción. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 33-44.

Pérez-Molphe-Balch E., Ramírez-Malagón R., Núñez-Palenius H. y Ochoa-Alejo N. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes (ed), Primera edición México. 47:179-183

Rodríguez, M., Matehus, J., Gersti, A., Santana, M. A. 2008. Identificación del agente causal de una bacteriosis en ñame (*Dioscorea alata* L.) *Interciencia* 33(7):1-11.

Uribe, M. E., Delaveau, C., Garcésa, M., Escobar, R. 2000. Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. *Bosque* 29(1):58-64.

<https://doi.org/10.4067/S0717-92002008000>

Schendelbek, A. L. 2007. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Cordia trichotoma* V. Tesis de maestría; Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba. Universidad Nacional de Misiones, Argentina

Copyright (c) 2017 María de Jesús Martínez Hernández, Sandra Ivonne Sánchez Hernández,

Doris Castillo Rocha y Mauricio Luna Rodríguez



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](#).

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia](#) - [Texto completo de la licencia](#)