



Optimización de la desinfección y establecimiento *in vitro* de *Tithonia diversifolia* ICACuba Oc-10

Optimization of *in vitro* disinfection and establishment of *Tithonia diversifolia* ICACuba Oc-10

^{ID}Lianys González Salguero¹, ^{ID}Maibys Pérez Pérez¹, ^{ID}Amanda Abreu Cruz¹, ^{ID}Miriam Isidró Pérez¹,
^{ID}Mileny Edibet González del Castillo¹, ^{ID}Yolaine Medina Mesa², ^{ID}Andrés Raúl Hernández Montesinos^{2*}

¹Universidad Agraria de La Habana, A. Nacional, km 23 ½, San José de las Lajas, C.P. 32700, Mayabeque, Cuba

²Instituto de Ciencia Animal, C. Central, km 47 ½, San José de las Lajas, Apartado Postal 24, Mayabeque, Cuba

RESUMEN: La desinfección y establecimiento *in vitro* son etapas críticas en el cultivo de tejidos. En *Tithonia diversifolia* se desconoce su respuesta ante estas fases, por lo que el objetivo del siguiente estudio fue optimizar la desinfección superficial con hipoclorito de sodio (NaClO) y el establecimiento *in vitro* de yemas apicales de *T. diversifolia* ICACuba Oc-10. La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía en la Universidad Agraria de La Habana y se utilizaron yemas apicales de *T. diversifolia* ICACuba Oc-10 como material vegetal para implantar *in vitro*. El experimento presentó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos compuestos por uno, cuatro y 6 % de NaClO y un control con agua destilada estéril. Se evaluaron, a los siete días, las variables porcentaje de explantes contaminados totales, explantes contaminados con hongos y bacterias y la brotación a los diez días en la fase de establecimiento *in vitro*. La concentración de NaClO al 6 % fue más efectiva en la desinfección superficial de yemas apicales de *T. diversifolia* ICACuba Oc-10, y en la eliminación de la contaminación por hongos y bacterias a los siete días de establecimiento *in vitro*. La contaminación por hongos se encontró en todos los tratamientos con concentraciones de NaClO inferiores al 6 %, sin embargo, la contaminación bacteriana solo ocurrió en el control. No se observó brotación de los explantes a los diez días, sugiriendo la necesidad de mayor tiempo de establecimiento.

Palabras clave: contaminación, hipoclorito de sodio, micropropagación.

ABSTRACT: Disinfection and *in vitro* establishment are critical stages in tissue culture. In *Tithonia diversifolia*, the response to these phases is unknown; therefore, the objective of the following study was to optimize surface disinfection with sodium hypochlorite (NaClO) and the *in vitro* establishment of apical buds of *T. diversifolia* ICACuba Oc-10. The research was carried out at the Plant Biotechnology Laboratory of the Faculty of Agronomy at the Agrarian University of Havana, using apical buds of *T. diversifolia* ICACuba Oc-10 as plant material for *in vitro* implantation. The experiment followed a completely randomized design with four treatments consisting of 1, 4, and 6 % NaClO, and a control with sterile distilled water. At seven days, the variables percentage of total contaminated explants, explants contaminated with fungi and bacteria were evaluated, and sprouting was assessed at ten days during the *in vitro* establishment phase. The 6 % NaClO concentration was most effective for surface disinfection of apical buds of *T. diversifolia* ICACuba Oc-10 and for eliminating fungal and bacterial contamination at seven days of *in vitro* establishment. Fungal contamination was found in all treatments with NaClO concentrations below 6 %; however, bacterial contamination only occurred in the control. No explant sprouting was observed at ten days, suggesting the need for a longer establishment period.

Key words: contamination, micropropagation, sodium hypochlorite.

*Autor para correspondencia: andresraulhm@gmail.com

Recibido: 18/11/2025

Aceptado: 19/03/2026

Conflicto de interés: Los autores declaran que no tener conflicto de intereses.

Contribución de autores: **Conceptualización:** Lianys González Salguero, Andrés Raúl Hernández Montesinos. **Investigación:** Maibys Pérez Pérez, Amanda Abreu Cruz, Miriam Isidró Pérez, Mileny Edibet González del Castillo, Yolaine Medina Mesa, Andrés Raúl Hernández Montesinos. **Metodología:** Lianys González Salguero, Andrés Raúl Hernández Montesinos, Yolaine Medina Mesa. **Supervisión:** Miriam Isidró Pérez, Andrés Raúl Hernández Montesinos. **Redacción - borrador original:** Miriam Isidró Pérez, Yolaine Medina Mesa, Lianys González Salguero. **Redacción - revisión y edición:** Lianys González Salguero, Andrés Raúl Hernández Montesinos. **Curación de datos:** Andrés Raúl Hernández Montesinos.

Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0).
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



INTRODUCCIÓN

Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray es una arbustiva de la familia Asteraceae que, por su facultad de adaptación a múltiples condiciones ambientales, edáficas y de manejo, capacidad de rebrote y rápido crecimiento, además de, alto valor y aporte nutricional, ha demostrado su potencial para la alimentación animal. Se propaga a través de semilla sexual y vegetativa, además, su establecimiento en sistemas silvopastoriles y uso como abono verde puede mejorar las condiciones de fertilidad del suelo para aumentar la producción y rendimiento del pasto. Estas características le confieren alto potencial en la alimentación bovina, ya sea como recurso para ramoneo, procesado en harina o ensilado, reduciendo los costos de producción en sistemas ganaderos (1,2).

La accesión *T. diversifolia* ICACuba Oc-10 es el resultado del estudio de un grupo de materiales del arbusto *T. diversifolia* colectados en el Centro-Occidente de Cuba para conformar una tecnología con aquellos más destacados para la producción de biomasa, respuesta al corte y pastoreo, así como su evaluación en parámetros biológicos y fisiológicos de animales que se emplean para el desarrollo ganadero. Tiene la capacidad de producir 13,1 y 3,67 t ha /MS año como forraje o pastoreo respectivamente con 17 % de la misma en la estación seca. Su follaje presenta 19,7 proteína bruta, 36,24 fibra detergente neutro, 15,48 fibra detergente ácido y 73,2 % de digestibilidad MS. Además, reduce los microorganismos metanógenos en el rumen alcanzando valores de $16,2 \times 10^9$ ufc/mL, lo cual permite mitigar las emanaciones de metano a la atmósfera (3).

Por otro lado, uno de los principales problemas que se presenta en la micropropagación es la presencia de contaminantes microbianos endógenos que pueden provocar la muerte de los tejidos vegetales, ya que compiten por los nutrientes y modifican el medio de cultivo (4). Al respecto, la desinfección superficial de los explantes y concentración del desinfectante pueden ser determinantes para el éxito de esta técnica y entre las sustancias más utilizadas se encuentra el hipoclorito de sodio (NaClO), debido a su bajo costo, fácil adquisición, menor efecto fitotóxico en los tejidos y bajo efecto negativo en la salud del operario (5,6).

En la literatura disponible, en la actualidad, no se refieren estudios sobre las fases del cultivo *in vitro* de *T. diversifolia*, por lo que la optimización de procedimientos para las etapas de desinfección y establecimiento *in vitro* son fundamentales para iniciar estudios de micropropagación, mejoramiento genético y conservación de germoplasma de esta importante arbustiva forrajera. De acuerdo a estos antecedentes el objetivo del siguiente estudio fue optimizar la desinfección superficial con hipoclorito de sodio y el establecimiento *in vitro* de yemas apicales de *T. diversifolia* ICACuba Oc-10.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía en la Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez" (UNAH), situada en el municipio San José de Las Lajas, provincia Mayabeque.

Material vegetal

Se tomaron yemas apicales de la accesión *T. diversifolia* ICACuba Oc-10, con la misma edad de rebrote y establecidas en el banco de semillas del Centro Experimental de Pastos y Forrajes "Miguel Sistachs Naya" del Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, ubicado en los 22° 53 LN y los 82° 02 LO a 80 msnm.

Recolección y traslado

La recolección se realizó en el horario de la mañana (8:00 a 10:00 am), para ello se utilizó una tijera de jardinería para el corte de las yemas apicales, las cuales se introdujeron en un frasco que contenía agua destilada y los antioxidantes ácido cítrico a 150 mg L y ácido ascórbico a 100 mg L, para evitar la fenolización del tejido vegetal. Posterior a la recolección se trasladaron los explantes a temperatura ambiente, en el menor tiempo posible, hacia el laboratorio de Biotecnología.

Desinfección antes del flujo laminar

En el laboratorio se enjuagaron, las yemas apicales, con agua destilada y luego se lavaron con detergente comercial en agitación durante 5 min, posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada.

Desinfección en el flujo laminar

El flujo laminar se desinfectó debidamente con etanol al 70 % y se colocó una lámpara de luz ultravioleta encendida durante 30 min antes de comenzar la siembra. Los explantes se desinfectaron con etanol al 70 % durante un minuto, a continuación, se le realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril y se probaron tres concentraciones de hipoclorito de sodio durante cinco minutos de inmersión. Por último, se lavaron con suficiente agua destilada estéril antes de realizar la siembra.

Siembra y establecimiento *in vitro*

Los explantes apicales se colocaron en frascos que contenían 25 mL de medio de cultivo basal Murashige y Skoog (7), con 4,42 g L, sacarosa a 30 g L, 1 mg L de 6-Bencilaminopurina (6-BAP), 2 mg L de ácido naftalenacético (ANA), 2 mg L de ácido indol-3-acético (AIA), y solidificado con agar a razón de 10 g L. Para evitar la fenolización del medio se les aplicó los antioxidantes ácido cítrico a 150 mg L y ácido ascórbico a 100 mg L. El pH se ajustó a 5,7 con hidróxido de sodio al 0,1N y ácido clorhídrico al 0,1N antes de la esterilización.

Los medios se esterilizaron en autoclave por espacio de 20 min a 121 °C y una atmósfera de presión, y se almacenaron a temperatura ambiente por 72 horas antes de la siembra. Previo a la implantación se esterilizaron los utensilios en autoclave por espacio de 30 min a 121 °C y una atmósfera de presión. El experimento se estableció en cámara de crecimiento con una temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de 80-90 %, luz artificial con un fotoperiodo de 16 horas luz e intensidad lumínica de $18,75 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Tratamientos y diseño experimental

Se empleó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos compuestos por uno, cuatro y 6 % de NaClO y un control con agua destilada estéril. Cada tratamiento contó con tres repeticiones en las cuales se establecieron tres explantes por cada unidad experimental (frascos de vidrio).

Variables de análisis

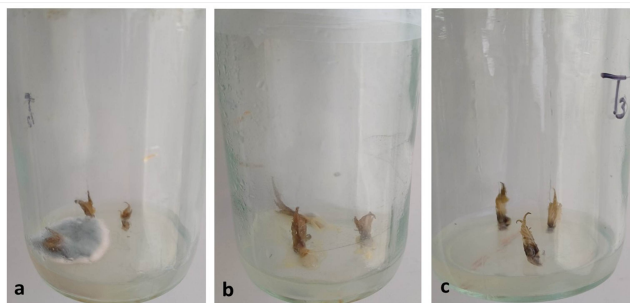
Después de transcurrido siete días del establecimiento *in vitro* se evaluaron las variables por ciento de explantes contaminados totales, número de explantes contaminados por hongos, número de explantes contaminados con bacterias y a los diez días el número de explantes brotados.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de comparación de proporciones (chi-cuadrado) y se utilizó la dócima de Fisher para $p < 0,05$ (8), para la variable número de explantes contaminados por hongos. Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico ComparPro versión 1 (9).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El comportamiento de la variable por ciento de explantes contaminados totales mostró, a los siete días, que el tratamiento control sin el uso del hipoclorito de sodio, presentó contaminación por hongos y bacterias en su totalidad, en explantes de *T. diversifolia* ICACuba Oc-10 (Figura 1A y 1B). La contaminación por bacterias solo fue visible en el tratamiento control y no se observó en los tratamientos donde se incluyó las diferentes concentraciones de NaClO. El tratamiento con 6% de hipoclorito de sodio fue el de mejor respuesta, ya que no presentó contaminación por microorganismos (Figura 1C). Este último demostró una mayor efectividad en la reducción de la contaminación, lo que sugiere que el NaClO a esta concentración es más eficaz para la desinfección de los explantes.



- Explantes contaminados por hongos en el tratamiento control.
- Explantes contaminados por bacterias en el tratamiento control.
- Tratamiento con 6 % de hipoclorito de sodio sin contaminación por microorganismos

Figura 1. Explantes apicales de *T. diversifolia* ICACuba Oc-10 con siete días de establecimiento *in vitro*

En los tratamientos con concentraciones inferiores a 6 % de hipoclorito de sodio predominó la contaminación por hongos, la cual llegó hasta 33,33 % en los tratamientos control y 1 % de NaClO (Tabla 1), en contraste con la baja incidencia de contaminación por bacterias que solo se observó en el tratamiento control. Por otra parte, a los diez días de cultivo, no se observó la formación de brotes en ninguno de los tratamientos evaluados, lo que podría indicar que los explantes necesitan más tiempo en el establecimiento para comenzar a brotar las yemas apicales.

Tabla 1. Comportamiento de la variable número de explantes contaminados por hongos a los siete días de establecimiento *in vitro* de *T. diversifolia* ICACuba Oc-10

Concentraciones NaClO (%)	Número de explantes contaminados por hongos	%	EE y Signif.
0	3	33,33	$\pm 13,19$
1	3	33,33	$p > 0,05$
4	1	11,11	
6	0	0	

Fuente: Elaborada por los autores

Una desinfección eficaz es cuando los explantes han sido expuestos a bajas concentraciones de desinfectante, presentan tasas reducidas de oxidación y contaminación microbiana, permitiendo el desarrollo de brotes (10). En este sentido, la concentración del hipoclorito de sodio se debe encontrar entre 1 y 3 % para activar la diferenciación celular de los explantes y lograr una buena desinfección (11). Por otra parte, las concentraciones superiores al 3 % de hipoclorito de sodio ocasionan daños fitotóxicos y la muerte de los tejidos del explante (10). Este planteamiento contrasta con los resultados obtenidos en el presente estudio, en los cuales se demuestra que se puede utilizar 6 % de hipoclorito de sodio con 5 min de inmersión sin provocar la muerte del explante de *T. diversifolia*.

Las diferencias en el porcentaje de contaminación se deben en gran parte a la acción superficial del hipoclorito de sodio como agente desinfectante y a la presencia endógena de microorganismos contaminantes en los tejidos (12). La contaminación de origen endógeno es una de las principales causas de pérdida de explantes en la etapa de establecimiento *in vitro*, especialmente si es de origen bacteriano, ya que se pueden alcanzar tasas de contaminación superiores al 90 % cuando se ha empleado hipoclorito de sodio al 1 % como agente desinfectante (13).

La obtención de explantes exentos de contaminantes es uno de los puntos críticos para el desarrollo de protocolos eficientes de micropropagación, debido a la presencia de agentes patógenos que contaminan los tejidos. La contaminación microbiana es uno de los problemas graves que limitan la extrapolación exitosa de las prácticas de cultivo de tejidos vegetales a otras especies de plantas. Las fuentes de contaminación *in vitro* incluyen los recipientes de cultivo, los medios, los explantes, el cuarto de cultivo, el área de transferencia, y el personal operativo (14).

Es importante destacar que mientras más intenso sea el protocolo de desinfección, se reduce la contaminación, pero los explantes resultan dañados severamente. El estrés provocado por la desinfección podría afectar y alargar la fase de establecimiento y la brotación de los explantes.

Diversos estudios han demostrado que el uso de agentes desinfectantes en altas concentraciones, como el hipoclorito de sodio al 10 %, puede eliminar eficazmente la carga microbiana, pero también induce oxidación y necrosis en los tejidos vegetales, comprometiendo su regeneración. En este sentido, en dos investigaciones observaron que a medida que aumenta la concentración y el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio disminuye el porcentaje de contaminación y la tasa de supervivencia, además se incrementa el porcentaje de necrosis o muerte de los explantes primarios cultivados en condiciones *in vitro* (15,16).

CONCLUSIONES

La concentración de hipoclorito de sodio al 6 % fue más efectiva en la desinfección superficial de yemas apicales de *T. diversifolia* ICACuba Oc-10, y en la eliminación de la contaminación microbiana por hongos y bacterias a los siete días de establecimiento *in vitro*. No se observó brotación de los explantes a los diez días, sugiriendo la necesidad de mayor tiempo de establecimiento.

AGRADECIMIENTOS

A los colegas del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de la Habana.

BIBLIOGRAFÍA

- Rivera-Herrera, J. E., Ruíz-Vásquez, T., Chará-Orozco, J., Gómez-Leyva, J. F. & Barahona-Rosales, R. Fases de desarrollo y propagación de ecotipos destacados de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. Revista mexicana de ciencias pecuarias. 2021; 12(3): 811-827. Available from: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i3.5720>
- Murgueitio, E. *Tithonia diversifolia*, una Asterácea diferente: su función en los sistemas sostenibles de producción agropecuaria. Cuban Journal of Agricultural Science. 2023; 57: 1-9. Available from: <https://cjas.science.com/index.php/CJAS/article/view/1090>
- Ruiz, T. E., J. Febles, G., Alonso, J., Torres, V., Valenciaga, N., Galindo, J., Mejías, R. & Medina, Y. Comportamiento agronómico en pastoreo de materiales destacados de *Tithonia diversifolia* en Cuba. Avances en investigación Agropecuaria. 2023; 27(1): 136-145. Available from: <https://doi.org/10.53897/RevAIA.23.27.26>
- Nikoloff, N. No siempre sale todo bien. In: Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Sharry, S. E., Adema, M. & Abedini, W. (eds). Ed. Universidad Nacional de La Plata (EDULP), Buenos Aires, Argentina; 2015. ISBN: 978-950-34-1254-1. pp. 1-102. Available from: <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/book/407>
- Ramírez, C. L. A., Granados, M. J. E. & Carreño, G. N. E. Evaluación del efecto de tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio sobre segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth para el establecimiento del cultivo *in vitro*. Revista de Investigación Agraria y Ambiental. 2014; 5(1): 155-169. Available from: <https://doi.org/10.22490/21456453.944>
- Díaz, L. M. I., Flor, B. B. A., Enciso, G. C. R. & González, S. L. R. El carbón activado y las condiciones de oscuridad en la micropropagación de banana variedad Nanicão. Revista Colombiana de Biotecnología. 2016; 18(2): 140-146. Available from: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.55618>
- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 1962; 15: 473-497. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Fisher, R. A. & Yates, F. Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research. Ed. Oliver & Boyd, Edinburgh and London; 1958. p. 146. Available from: <https://digital.library.adelaide.edu.au>
- Font, H., et al. Paquete estadístico ComparPro versión 1. Departamento de Biomatemática, Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, 2007. Available from: <https://scholar.google.com>
- Díaz-Lezcano, M. I., Pereira-Báez, K. D., Brítez -Moreira, J. R., Mongelós-Franc, J. Y. & Mussi-Cataldi, C. E. Efecto de la concentración del hipoclorito de sodio sobre la contaminación y oxidación de meristemas en la micropropagación de banano. Reportes Científicos De La FACEN. 2025; 14(2): 156-164. Available from: <https://doi.org/10.18004/rcfacen.2023.14.2.156>
- Ancasí, R., Montero, J., Ferreira, N. & Muñoz, I. 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. 2016; 7(2): 104-111. Available from: http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v7n2/v7n2_a08.pdf
- Quezada, M. A. E. & Almanza, L. L. C. Efecto de diferentes concentraciones y tiempos de inmersión de hipoclorito de sodio en el establecimiento *in vitro* de Asaí (*Euterpe precatoria* Mart). Apthapi. 2023; 9(3): 2572-2582. Available from: <https://doi.org/10.53287/hayv6872nv19u>
- Dutra, L. F. & da Silva, N. D. G. Establecimiento *In Vitro* de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Embrapa Clima Temperado. 2009; 215: 1-7. Available from: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/747440/1/comunicado215.pdf>
- Sivanesan, I., Muthu, M., Gopal, J., De Shadma, T., Doo Hwan, K. & Wook Oh, K. A fumigation-based surface sterilization approach for plant tissue culture. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2021; 18(5): 11. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijerph18052282>
- Borges G., M., Estrada A., E., Pérez R., I., & Meneses R., S. Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. Revista Colombiana de Biotecnología. 2009; 11(2): 127-135.

Available from: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/11747>

16. Lapiç-Culqui, Y. K., Tejada-Alvarado, J. J., Meléndez-Mori, J. B., Vilca-Valqui, N. C., Huaman-Huaman, E. & Oliva,

M. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de papayas de montaña: *Vasconcellea chachapoyensis* y *Vasconcellea x Heilbornii*. Bioagro. 2021; 33(2): 135-142. Available from: <https://doi.org/10.51372/bioagro332.7>