

Evaluation of the effect of disinfection of Cuba CT-115 grass explants with sodium hypochlorite. Technical note

Evaluación del efecto de la desinfección de explantes del pasto Cuba CT-115 con hipoclorito de sodio. Nota técnica

Andrés Raúl Hernández Montesinos^{1*}, José Jorge Palma Pérez², Amanda Abreu Cruz¹,
Magaly Herrera Villafranca¹ and Rafael Segundo Herrera García¹

¹Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

²Universidad Agraria de La Habana, Autopista Nacional, km 23 ½, C.P 32700. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba
Email: andresraulhm@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-5549-5237>

<https://orcid.org/0000-0002-3383-893X>

<https://orcid.org/0000-0002-5560-2020>

<https://orcid.org/0000-0002-2641-1815>

<https://orcid.org/0000-0003-1424-6311>

In order to evaluate the effect of different concentrations of sodium hypochlorite (3 and 5 %) on the disinfection of explants, apical cone of *Cenchrus purpureus* vc. Cuba CT-115, for its *in vitro* establishment an experiment was developed in Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de La Habana. Two observations were made at four and eight days after sowing. The data were analyzed by Chi-square comparison proportions, for $p < 0.05$ and ComparPro 1.0. statistical package was applied. The analysis of proportion comparison of the studied variables at four and eight days did not have significant differences between the treatments with sodium hypochlorite at 3 and 5 %. There was not contamination by fungi or bacteria in the two treatments studied at four days. Bacterial contamination occurred at eight days, but there were not differences between treatments. The explants disinfection of Cuba CT-115 can be performed with both concentrations of sodium hypochlorite, but it is recommended to disinfect apical cones of Cuba CT-115 with 3% sodium hypochlorite, which allows a saving of this substance during the procedure. It is suggested to study other concentrations of sodium hypochlorite and different immersion times.

Key words: *apex, contamination, Cenchrus purpureus, in vitro*

Plant tissue culture is a biotechnological technique that includes the maintenance of plants or their components under controlled environmental conditions, with the absence of associated microorganisms, heterotrophic nutrition, and plastic or glass containers (Suárez Padrón 2020). One of the main problems that arise when trying to establish *in vitro* cultures is microbial contamination composed of various types of microorganisms (fungi, yeasts, bacteria, phytoplasmas, virus), which can cause the death of plant tissues, since that compete for nutrients and modify the culture medium (Mroginski *et al.* 2010 and Nikoloff 2015).

Among the substances used for the disinfection of explants are sodium hypochlorite (NaClO), calcium hypochlorite $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, hydrogen peroxide (H_2O_2), commercial chlorine and bichloride of mercury (HgCl_2), among others (Alvarado Capó 1998). Of

Con el propósito de evaluar el efecto de diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (3 y 5 %) en la desinfección de explantes, cono apical de *Cenchrus purpureus* vc. Cuba CT-115, para su establecimiento *in vitro*, se desarrolló un experimento en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de La Habana. Se realizaron dos observaciones, a los cuatro y ocho días después de la siembra. Los datos se analizaron mediante comparación de proporciones Chi-cuadrado, para $p < 0.05$ y se aplicó el paquete estadístico ComparPro 1.0. El análisis de comparación de proporciones de las variables estudiadas a los cuatro y ocho días no dejó ver diferencias significativas entre los tratamientos con hipoclorito de sodio al 3 y 5 %. No se encontró contaminación por hongos o bacterias en los dos tratamientos estudiados a los cuatro días. La contaminación por bacterias ocurrió a los ocho días, pero no hubo diferencia entre tratamientos. La desinfección de explantes de Cuba CT-115 se puede realizar con ambas concentraciones de hipoclorito de sodio, pero se recomienda la desinfección de conos apicales de Cuba CT-115 con hipoclorito de sodio al 3 %, lo que permite el ahorro de esta sustancia durante el procedimiento. Se sugiere estudiar otras concentraciones de hipoclorito de sodio y diferentes tiempos de inmersión.

Palabras clave: *ápices, contaminación, Cenchrus purpureus, in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica biotecnológica que comprende el mantenimiento de plantas o de sus componentes en condiciones ambientales controladas, con ausencia de microorganismos asociados, nutrición heterotrófica y recipientes de plástico o vidrio (Suárez Padrón 2020). Uno de los problemas principales que se presentan cuando se trata de establecer los cultivos *in vitro* es la contaminación microbiana compuesta por diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus), que puede provocar la muerte de los tejidos vegetales, ya que compiten por los nutrientes y modifican el medio de cultivo (Mroginski *et al.* 2010 y Nikoloff 2015).

Entre las sustancias utilizadas para la desinfección de explantes se encuentran el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cloro comercial y bicloruro de mercurio (HgCl_2), entre otros (Alvarado Capó 1998). De ellos, el que más se

these, the most used is sodium hypochlorite in plant micropropagation, due to its low cost, easy acquisition, and less phytotoxic effect on tissues (Ramírez Correa *et al.* 2014).

The *Cenchrus purpureus* Schum cv. Cuba CT-115 is widely used in Cuba due to its favorable characteristics of growth and biomass production, less resistance to cutting, more leaves, drought tolerance, low lignin content, high intake and use by the animal and less internodes distance as age advances. For these reasons, it offers better possibilities for its harvest as a biomass bank, including grazing (Herrera and Martínez 2015 and Crespo and Martínez 2016 and Fortes *et al.* 2019).

The disinfection of apical cones of *C. purpureus* cv. Cuba CT-115 with sodium hypochlorite could reduce contamination by endogenous microorganisms in the *in vitro* establishment phase of this culture. The objective of this trial was to evaluate the effect of different concentrations of sodium hypochlorite on the disinfection of explants of *Cenchrus purpureus* cv. Cuba CT-115 for its *in vitro* establishment.

Plants of *Cenchrus purpureus* (Schumach) Morrone cv. Cuba CT-115 from Poaceae family, with the same regrowth age, collected in the germplasm bank of Instituto de Ciencia Animal were use as plant material. A total of 24 portions of apex were taken.

The apex were disinfected with 5 % commercial sodium hypochlorite for three minutes and rinsed twice with distilled water at the time of collection. Then they were transferred to the Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de La Habana in bottles duly washed with commercial detergent, rinsed twice with distilled water. In the laboratory, the apex were washed with a commercial detergent under agitation for five minutes and rinsed three times with distilled water.

The sowing of the explants, apical cone, was carried out in the laminar flow properly disinfected with 70 % ethanol and an ultraviolet light lamp was placed on for 30 min before starting the sowing. The apical cones were extracted in laminar flow and disinfected with 70% ethanol for one minute. Subsequently, they were washed with sufficient sterile distilled water. Next, two disinfection variants with 3 and 5% sodium hypochlorite were tested for 10 min. For this, a total of 12 apical cones per treatment were used. Finally, they were washed with enough sterile distilled water before sowing.

After disinfection, the explants were placed in Murashige and Skoog (1962) basal culture medium, with 30 g L⁻¹ sucrose, 1 mg L⁻¹ of 6-BAP, and 8 g L⁻¹ of agar. The pH was fitted to 5.7 with 0.1N sodium hydroxide and 0.1N hydrochloric acid before sterilization, which was performed in an autoclave at 121 °C and 1.5 kg cm⁻² pressure for 20 min. The explants were established in

emplea es el hipoclorito de sodio en la micropropagación vegetal, debido a su bajo costo, fácil adquisición y menor efecto fitotóxico en los tejidos (Ramírez Correa *et al.* 2014).

El *Cenchrus purpureus* Schum vc. Cuba CT-115 se utiliza ampliamente en Cuba por sus características favorables de crecimiento y producción de biomasa, menor resistencia al corte, mayor cantidad de hojas, tolerancia a la sequía, bajo contenido de lignina, alto consumo y aprovechamiento por parte del animal y menor distancia entrenudos en la medida que avanza la edad. Por estos motivos, ofrece mejores posibilidades para su cosecha como banco de biomasa, incluyendo el pastoreo (Herrera y Martínez 2015 y Crespo y Martínez 2016 y Fortes *et al.* 2019).

La desinfección de conos apicales de *C. purpureus* vc. Cuba CT-115 con hipoclorito de sodio pudiera disminuir la contaminación por microorganismos endógenos en la fase de establecimiento *in vitro* de este cultivo. El objetivo de este ensayo fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio en la desinfección de explantes de *Cenchrus purpureus* vc. Cuba CT-115 para su establecimiento *in vitro*.

Como material vegetal se utilizaron plantas de *Cenchrus purpureus* (Schumach) Morrone vc. Cuba CT-115 de la familia Poaceae, con la misma edad de rebrote, colectadas en el banco de germoplasma del Instituto de Ciencia Animal. Se tomaron 24 porciones de ápices caulinares.

Los ápices caulinares se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial al 5 % durante tres minutos y se enjuagaron dos veces con agua destilada en el momento de la recolección. Luego se trasladaron hacia el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de La Habana en frascos debidamente lavados con detergente comercial, enjuagados dos veces con agua destilada. En el laboratorio, los ápices se lavaron con detergente comercial en agitación durante cinco minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada.

La siembra de los explantes, cono apical, se realizó en el flujo laminar debidamente desinfectado con etanol al 70 % y se colocó una lámpara de luz ultravioleta encendida por 30 min antes de comenzar la siembra. Los conos apicales se extrajeron en el flujo laminar y se desinfectaron con etanol al 70 % durante un minuto. Posteriormente, se lavaron con suficiente agua destilada estéril. A continuación, se probaron dos variantes de desinfección con hipoclorito de sodio al 3 y 5 % durante 10 min. Para ello se utilizaron 12 conos apicales por tratamiento. Por último, se lavaron con suficiente agua destilada estéril antes de realizar la siembra.

Posterior a la desinfección, los explantes se colocaron en medio de cultivo basal Murashige y Skoog (1962), con 30 g L⁻¹ sacarosa, 1 mg L⁻¹ de 6-BAP, 8 g L⁻¹ de agar. El pH se ajustó a 5.7 con hidróxido de sodio al 0.1N y ácido clorhídrico al 0.1N antes de la esterilización, que se realizó en autoclave a 121 °C y 1.5 kg cm⁻² de presión durante 20 min. Los explantes se establecieron

test tubes with 15 mL of culture medium. The research was carried out under controlled conditions in a growth chamber with a photoperiod of 16 h of lighting and 8 h of darkness, relative humidity of $70 \pm 5\%$, light intensity of $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and temperature of $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ for a period of eight days.

The evaluations were made visually at four and eight days after sowing. The variables number of sprouted explants, number of non-sprouted explants, number of necrotic explants, number of contaminated explants, number of explants contaminated with fungi, and number of explants contaminated with bacteria were observed.

A completely random design was used, with 12 repetitions per treatment. For data processing, an analysis of proportions comparison (Chi-square) was performed using the statistical package ComparPro 1.0 (Font *et al.* 2007).

Four days after sowing the explants, there were not differences ($p > 0.05$) between the treatments with 3 and 5 % sodium hypochlorite (table 1), for the variables number of necrotic explants (figure 1a and 1b), number of sprouted explants and number of non-sprouted explants. After four days, there was not contamination by fungi or bacteria in the two studied treatments (figure 1c).

en tubos de ensayo con 15 mL de medio de cultivo. La investigación se desarrolló en condiciones controladas en cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16 h de iluminación y 8 h de oscuridad, humedad relativa de $70 \pm 5 \%$, intensidad lumínica de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por un período de ocho días.

Las evaluaciones se realizaron de forma visual a los cuatro y ocho días posteriores a la siembra. Se observaron las variables número de explantes brotados, número de explantes no brotados, número de explantes necrosados, número de explantes contaminados, número de explantes contaminados con hongos y número de explantes contaminados con bacterias.

Se empleó un diseño completamente aleatorizado, con 12 repeticiones por tratamiento. Para el procesamiento de los datos se realizó análisis de comparación de proporciones (Chi-cuadrado) mediante el paquete estadístico ComparPro 1.0 (Font *et al.* 2007).

A los cuatro días de sembrados los explantes, no hubo diferencias ($p > 0.05$) entre los tratamientos con hipoclorito de sodio al 3 y 5 % (tabla 1), para las variables número de explantes necrosados (figura 1a y 1b), número de explantes brotados y número de explantes no brotados. A los cuatro días no se observó contaminación por hongos ni bacterias en los dos tratamientos estudiados (figura 1c).

Table 1. Analysis of variables at four days

Treatments Variables	Sodium hypochlorite 3 %		Sodium hypochlorite 5 %		Total		SE (\pm) Signif.
	No.	%	No.	%	No.	%	
Number of sprouted explants	5	35.71	9	64.29	14	100	13.36 $p = 0.2850$
Number of non-sprouted explants	7	70.00	3	30.00	10	100	15.81 $p = 0.2059$
Number of necrotic explants	2	40.00	3	60.00	5	100	15.81 $p = 0.6547$

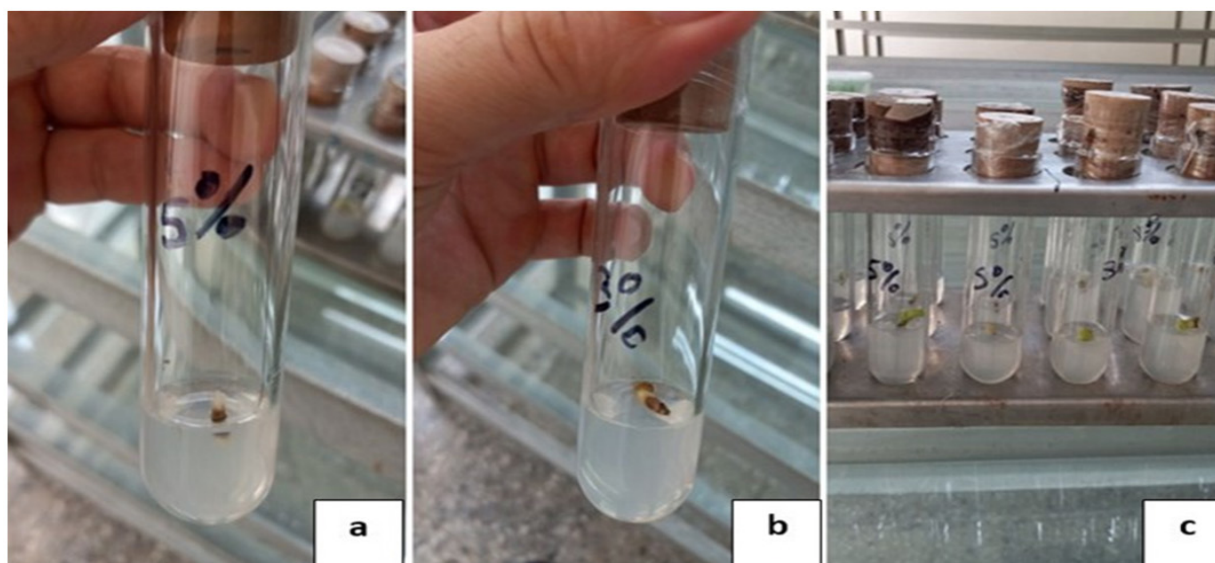


Figure 1a. Necrotic explant with doses of 5 % sodium hypochlorite after four days. Figure 1b. Necrotic explant with doses of 3 % sodium hypochlorite after four days. Figure 1c. View of the sprouted explants after four days, in both concentrations of sodium hypochlorite and without contamination in the culture medium.

After eight days, there were not differences ($p > 0.05$) between the treatments with 3 and 5 % sodium hypochlorite (table 2), for the variables number of sprouted explants, number of non-sprouted explants, number of necrotic explants, number of contaminated explants and number of explants contaminated by bacteria (Figures 2a, 2b and 2c). In this observation, there was not fungal contamination.

A los ocho días tampoco hubo diferencias ($p > 0,05$) entre los tratamientos con hipoclorito de sodio al 3 y 5 % (tabla 2), para las variables número de explantes brotados, número de explantes no brotados, número de explantes necrosados, número de explantes contaminados y número de explantes contaminados por bacterias (figuras 2a, 2b y 2c). En esta observación no se halló presencia de contaminación por hongos.

Table 2. Analysis of variables at eight days

Treatments Variables	Sodium hypochlorite 3 %		Sodium hypochlorite 5 %		Total		SE (\pm) Signif.
	No.	%	No.	%	No.	%	
Number of sprouted explants	6	40.00	9	60.00	15	100	12.91 $p = 0.4386$
Number of non-sprouted explants	6	66.67	3	33.33	9	100	16.67 $p = 0.3127$
Number of necrotic explants	3	50.00	3	50.00	6	100	15.81 $p = 0.9999$
Number of contaminated explants	7	58.33	5	41.67	12	100	14.43 $p = 0.5637$
Number of explants contaminated by bacteria	5	50.00	5	50.00	10	100	15.81 $p = 0.9999$

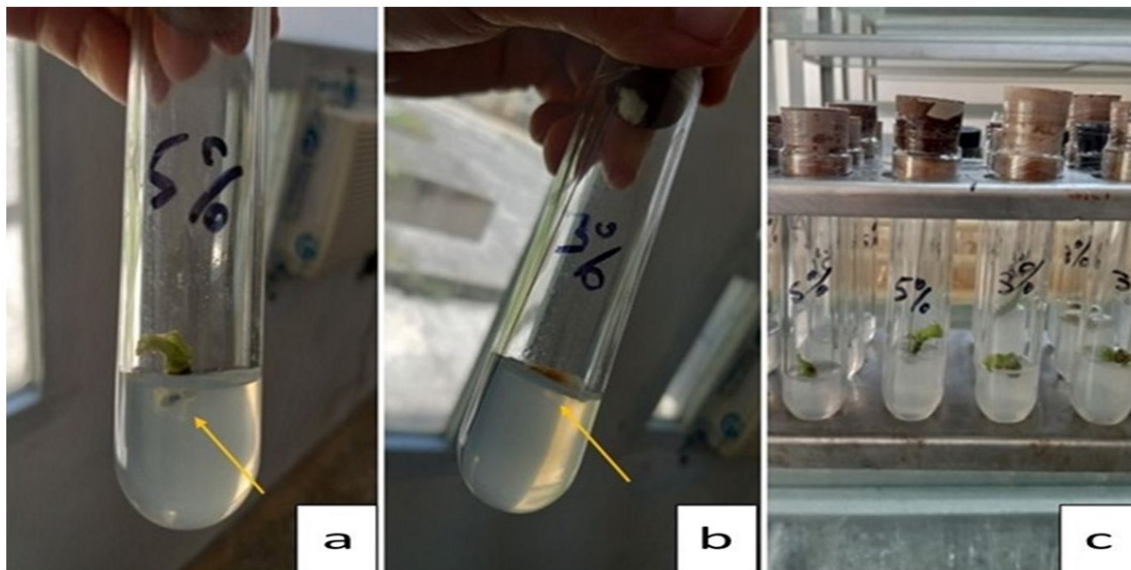


Figure 2a Explant disinfected with 5 % sodium hypochlorite, sprouted and contaminated by bacteria after eight days. Figure 2b. Explant disinfected with 3 % sodium hypochlorite, necrotic and contaminated by bacteria after eight days. Figure 2c. View of the sprouted explants at eight days in both concentrations of sodium hypochlorite

The superficial disinfection of plant explants is through chemical compounds. It is not possible to recommend a general procedure that guarantees removal of the microorganisms with the least possible damage to the explant. Some procedures are based on the only use of ethanol or sodium hypochlorite. The most popular method consists of a double disinfection by immersing the explants in ethanol (70 %) for 20-60 seconds, followed by 1-3 % sodium hypochlorite. Next, it should be washed with sufficient water and detergent for three

La desinfección superficial de los explantes vegetales es mediante compuestos químicos. No es posible recomendar un procedimiento general que garantice eliminar los microorganismos con el menor daño posible al explante. Algunos procedimientos se basan en el empleo único de etanol o de hipoclorito de sodio. El método más popularizado consiste en una doble desinfección mediante la inmersión de los explantes en etanol (70 %) durante 20-60 segundos, seguido de hipoclorito de sodio 1-3 %. A continuación, se debe lavar con suficiente

to 30 min, depending on the nature of the explant. Finally, it is necessary to remove the remains of these products through several washes with sterile distilled water (Mroginski *et al.* 2010).

In studies of genetic improvement by *in vitro* tissue culture techniques, Herrera *et al.* (2003) used 10 % sodium hypochlorite for 10 min for the disinfection of apical cones of Cuba CT-115. In the consulted bibliography, there is little evidence of studies referring to the disinfection of explants of *C. purpureus* cv. Cuba CT-115 for its *in vitro* establishment. However, in sugar cane (*Saccharum officinarum*) several studies on this aspect are reported.

Similar results are reported to those of this study with 5 % NaClO treatment for 15 min in apical meristems of *S. officinarum*, variety CCSP 89-43, which showed a low percentage of contamination (Betancourt Guerrero 2017). This effect could be due to the action of sodium hypochlorite on microorganisms, since it acts to inhibit enzymatic reactions and protein denaturation (Sánchez and Sáenz 2005).

The results of this study differ from the high values of necrosis that were reported when disinfecting explants of the apical leaf section and axillary buds of four varieties of *S. officinarum*, with 5 and 7 % NaClO (Araya Contreras 2006). Similarly, in the disinfection of foliar explants of *S. officinarum*, variety CP 72-2086, a high percentage of necrosis was obtained in plant tissues with concentrations of 10 % sodium hypochlorite for 25 min (Martínez Vega 2005).

Similar results to the previous, when using high concentrations of 20 and 30 % sodium hypochlorite and two immersion times (15 and 20 min), to disinfect apical cones of the sugar cane varieties ITV 92-1424, Laica 82-2220 and Q28-2. In this study good results of survival and asepsis are reported when applying 20% commercial chlorine for 20min, while the dose of 30 % NaClO was effective to control the contamination, although it caused darkness of the explants (Rangel-Estrada *et al.* 2016).

According to Nikoloff (2015), darkening, growth inhibition, necrosis, and explant death may be associated with oxidative stress derived from the use of disinfectant agents. The explant oxidation levels are related to the increase in the concentration and exposure time of the explant to the disinfectant (Lapiz-Culqui *et al.* 2021), which shows the toxic effect of NaClO on plant tissues (Causil *et al.* 2017). It could be showed that the different responses of the explants to the use of sodium hypochlorite correspond to the tolerance level of each plant species.

The difference between the results of previous studies and those obtained in the disinfection of explants of *C. purpureus* cv. Cuba CT-115 can be related to the manipulation of plant material, since it is one of the most common sources of contamination. In addition, it is confirmed that the superficial disinfection

agua y detergente de tres a 30 min, en dependencia de la naturaleza del explante. Finalmente, es necesario eliminar los restos de estos productos mediante varios lavados con agua destilada estéril (Mroginski *et al.* 2010).

En trabajos de mejora genética por técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*, Herrera *et al.* (2003) utilizaron hipoclorito de sodio al 10 % durante 10 min para la desinfección de conos apicales de Cuba CT-115. En la bibliografía consultada, es escasa la evidencia de estudios referidos a la desinfección de explantes de *C. purpureus* vc. Cuba CT-115 para su establecimiento *in vitro*. Sin embargo, en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) se informan diversos trabajos sobre este aspecto.

Se refieren resultados similares a los del presente estudio con tratamiento de NaClO al 5 % durante 15 min en meristemos apicales de *S. officinarum*, variedad CCSP 89-43, que mostró escaso porcentaje de contaminación (Betancourt Guerrero 2017). Este efecto se pudo deber a la acción del hipoclorito de sodio en los microorganismos, ya que actúa en la inhibición de las reacciones enzimáticas y desnaturalización de las proteínas (Sánchez y Sáenz 2005).

Los resultados de este trabajo difieren de los valores elevados de necrosis que se informaron al desinfectar explantes de la sección foliar apical y yemas axilares de cuatro variedades de *S. officinarum*, con NaClO al 5 y 7 % (Araya Contreras 2006). De igual forma, en la desinfección de explantes foliares de *S. officinarum*, variedad CP 72-2086, se obtuvo alto porcentaje de necrosis en los tejidos vegetales con concentraciones de 10 % de hipoclorito de sodio durante 25 min (Martínez Vega 2005).

Resultados similares a los anteriores, al utilizar concentraciones altas de hipoclorito de sodio 20 y 30 % y dos tiempos de inmersión (15 y 20 min), para desinfectar conos apicales de las variedades de caña de azúcar ITV 92-1424, Laica 82-2220 y Q28-2. En este estudio se reportan buenos resultados de supervivencia y asepsia al aplicar 20 % de cloro comercial por 20 min, mientras que la dosis de 30 % de NaClO fue efectiva para controlar la contaminación, aunque ennegreció los explantes (Rangel-Estrada *et al.* 2016).

Según plantea Nikoloff (2015), el oscurecimiento, la inhibición del crecimiento, la necrosis y la muerte del explante, pueden estar asociadas al estrés oxidativo derivado del uso de agentes desinfectantes. Los niveles de oxidación del explante se relacionan con el aumento en la concentración y el tiempo de exposición del explante al desinfectante (Lapiz-Culqui *et al.* 2021), lo que evidencia el efecto tóxico de NaClO en los tejidos vegetales (Causil *et al.* 2017). Se podría indicar que las diferentes respuestas de los explantes al uso del hipoclorito de sodio corresponden con el nivel de tolerancia propia de cada especie de planta.

La diferencia entre los resultados de estudios anteriores y los que se obtuvieron en la desinfección de explantes de *C. purpureus* vc. Cuba CT-115 se pueden relacionar con la manipulación del material vegetal, ya que es una de las fuentes más comunes de

of the explant is conditioned by factors such as the type, concentration and time of exposure to disinfectant agents, but also by the origin of the explant (Ticona and Triguero 2020).

It is concluded that the indicators studied for the disinfection of apical cones of Cuba CT-115 with concentrations of 3 and 5 % of sodium hypochlorite did not present differences. Therefore, it is recommended to disinfect with 3 % sodium hypochlorite, which saves this substance during the procedure. It is recommended to performed studies with other concentrations of sodium hypochlorite and different immersion times in the *in vitro* establishment stage of this culture.

Acknowledgments

Thanks to the researchers from Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de La Habana for their support in carrying out this study.

Conflict of interest

The authors declare that there is not conflict of interest.

Author's contribution

Andrés Raúl Hernández Montesinos: Idea, design and conduct of the experiment, analysis of the information, writing of the manuscript.

Amanda Abreu Cruz: Analysis of the information, writing of the manuscript.

José Jorge Palma Pérez: Conducting the experiment, writing the manuscript

Magaly Herrera Villafranca: Analysis of the information, writing of the manuscript.

Rafael Segundo Herrera García: Design of the experiment, analysis of the information, writing of the manuscript.

contaminación. Además, se confirma que la desinfección superficial del explante está condicionada por factores como el tipo, concentración y tiempo de exposición a los agentes desinfectantes, pero también por la procedencia del explante (Ticona y Triguero 2020).

Se concluye que los indicadores estudiados para la desinfección de conos apicales de Cuba CT-115 con concentraciones de 3 y 5 % de hipoclorito de sodio no presentaron diferencias. Por tanto, se recomienda realizar la desinfección con hipoclorito de sodio al 3 %, lo que permite un ahorro de esta sustancia durante el procedimiento. Se recomienda realizar estudios con otras concentraciones de hipoclorito de sodio y diferentes tiempos de inmersión en la etapa de establecimiento *in vitro* de este cultivo.

Agradecimientos

Se agradece a los investigadores del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de La Habana por su apoyo en la realización del presente estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses

Contribución de los autores

Andrés Raúl Hernández Montesinos: Idea, diseño y conducción del experimento, análisis de la información, redacción del manuscrito.

Amanda Abreu Cruz: Análisis de la información, redacción del manuscrito.

José Jorge Palma Pérez: Conducción del experimento, redacción del manuscrito.

Magaly Herrera Villafranca: Análisis de la información, redacción del manuscrito.

Rafael Segundo Herrera García: Diseño del experimento, análisis de la información, redacción del manuscrito.

References

- Alvarado Capó, Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: Pérez Ponce, J. N. (ed.), Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología, Santa Clara, IBP, pp. 81-104, ISBN:959-7122-02-2.
- Araya Contreras, J. F. 2006. Establecimiento *in vitro* de cuatro variedades de caña de azúcar a partir de explantes foliares y yemas axilares. Tesis en opción al grado de Master en Ciencias, Zamorano, Honduras, pp. 1-22.
- Betancourt Guerrero, J. M. 2017. Evaluación del cultivo *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) var. CCSP 89-43 a partir de meristemos apicales mediante la técnica de organogénesis. Tesis en opción al título de Microbiólogo Industrial, Universidad de Santander, Colombia, pp. 14-47.
- Causil, V. L. A., Coronado, G. J. L., Verbel, M. L. F., Vega, J. M. F., Donado, E. K. A. & Pacheco, G. C. 2017. "Cytotoxic effect of sodium hypochlorite (NaClO) in apical cells of onion roots (*Allium cepa* L.)". Rev. Colomb. Cienc. Hortic. 11 (1): 97-104, Online ISSN: 2422-3719.
- Crespo, G. & Martínez, R. O. 2016. "Study of the chemical soil fertility in the biomass bank technology of *Cenchrus purpureus* Schum cv. CUBA CT-115 with different exploitation years". Cuban J. Agric. Sci. 50th Anniversary. 50(2): 497, ISSN: 2079-3472.
- Font, H., Noda, A., Torres, V., Herrera, M., Lizazo, D., Sarduy, L. & Rodríguez, L. 2007. Paquete estadístico ComparPro versión 1, Instituto de Ciencia Animal, Dpto Biomatemática.
- Fortes, D., Herrera, R. S., García, M., Cruz, A. M. & Romero A. 2019. "Mineral composition of *Cenchrus purpureus* cv. Cuba CT-115, as biomass bank, after grazing". Cuban J. Agric. Sci. 53(4): 425-435, ISSN: 2079-3472.
- Herrera, R. S. & Martínez, R. O. 2015. Mejoramiento genético. En: Herrera, R. S. (ed.), Producción de biomasa de variedades y clones de *Pennisetum purpureum* para la ganadería, EDICA, Mayabeque, Cuba, pp.13-32, ISBN:078-959-7171-67-6.

- Herrera, R. S., Chaplé, Z., Cruz, A. M., Romero, A. & García, M. 2003. "Obtainment of *Pennisetum purpureum* plantlets resistant to drought and salinity. Technical note". Cuban J. Agric. Sci. 37(2): 189-191, ISSN: 2079-3472.
- Lapiz-Culqui, Y. K., Tejada-Alvarado, J. J., Meléndez-Mori, J. B., Vilca-Valqui, N. C., Huaman-Huaman, E. y Oliva, Manuel. 2021. "Establecimiento y multiplicación *in vitro* de papayas de montaña: *Vasconcellea chachapoyensis* y *Vasconcellea x Heilbornii*". Bioagro 33(2): 135-142, ISSN 1316-3361
- Martínez Vega, A. E. 2005. Elaboración de un procedimiento de desinfección y establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de yemas axilares. Tesis en opción al grado de Master en Ciencias, Zamorano, Honduras, pp. 1-30.
- Mroginski, L., Sansberro, P. & Flaschland, E. 2010. Parte I: Herramientas Básicas. Capítulo 1: Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (eds.), Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Editorial Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina, p. 1-15.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. "A revised medium for rapid growth and biosays with tobacco tissue culture". Physiol Plant, 15: 473-497, Online ISSN: 1399-3054.
- Nikoloff, N. 2015. No siempre sale todo bien... En: Sharry, S. E., Adema, M. & Abedini, W. (eds), Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*, Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP), Buenos Aires, Argentina, pp. 1-102, ISBN: 978-950-34-1254-1.
- Ramírez Correa, L. A., Granados Moreno, J. E., & Carreño González, N. E. 2014. "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*". RIAA, 5(1): 155-169, ISSN: 2145-6453.
- Rangel-Estrada, S. E., Hernández-Meneses, E. & Hernández-Arenas, M. 2016. "Micropropagation of sugarcane varieties grown in México". Rev. Fitotec. Mex, 39(3): 225 – 231, ISSN: 0187-7380.
- Sánchez, L. & Sáenz, E. 2005. "Antisépticos y desinfectantes". Dermatol. Peru, 15(2):172-174, ISSN: 1609-7203.
- Suárez Padrón, I. E. 2020. Prehistoria e historia del Cultivo de Tejidos Vegetales. En: Suárez Padrón, I. E. (ed.), Cultivo de Tejidos Vegetales. Fondo Editorial Universidad de Córdoba, pp. 13-19, ISBN: 978-958-5104-09-9.
- Ticona, J. & Triguero, M. L. 2020. "Evaluación del comportamiento *in vitro* de dos variedades de papaya (*Carica papaya* L.) mediante embriogénesis somática en la Estación Experimental Sapecho". RIIARn, 7(1): 55-61, ISSN: 2518-6868.

Received: December 20, 2022

Accepted: February 15, 2023

