

USO DE ANTIBIOTICOS EN MEDIOS DE CULTIVO PARA REDUCIR LA PRESENCIA DE AGENTES CONTAMINANTES EN LA PROPAGACION *in vitro* DE PALMA DATILERA (*Phoenix dactylifera* L).

Luis Manuel Valenzuela-Núñez y Sigifredo Armendáriz-Erives.
Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Universidad
Autónoma Chapingo. Apdo. Postal No. 8. Bermejillo, Dgo., C.P.
35230. México. sarmenda@chapingo.uruza.edu.mx

RESUMEN

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas de la Universidad Autónoma Chapingo. El objetivo fue evaluar el efecto que tiene el uso de formaldehído, ácido benzoico y lugol como inhibidores de agentes contaminantes adicionados a medios de cultivo *in vitro* para semillas de palma datilera. Además se evaluó el efecto de estas sustancias sobre la germinación y crecimiento. El análisis estadístico para las variables de contaminación por hongos, contaminación por bacterias y germinación se llevó a cabo con la Prueba Exacta de Fisher usando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Para el análisis de longitud de raíz se utilizó la prueba de Kruskal y Whalis para más de dos pruebas independientes usando la tabla de Chi-cuadrada con tres grados de libertad y la misma prueba con el procedimiento para n grande. Los resultados muestran que los antibióticos no redujeron significativamente la presencia de agentes contaminantes en los medios de cultivo; a excepción del ácido benzoico que redujo de manera significativa la presencia de bacterias; éste mismo tratamiento inhibió fuertemente la germinación de las semillas y el crecimiento de la raíz. El formaldehído y el lugol no mostraron inhibir significativamente el crecimiento de raíces. A las tres semanas del establecimiento del cultivo *in vitro* éstos tratamientos mostraron un comportamiento estadísticamente igual en cuanto a la longitud radicular.

Palabras clave: antibióticos, medios de cultivo, *in vitro*, palma datilera.

SUMMARY

The tissue Culture Lab (Regional Branch for the Study of Arid Lands) at the University of Chapingo evaluated the effect of using formaldehyde, benzoic acid and lugol as an inhibitor on the growth of pollution agents in a vitro culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. The effect of these substances on seed germination and root growth were also evaluated. In the statistical analysis in fungi pollution, bacteria pollution and seed germination, the Fisher's Exact Test was used with $\alpha=0.05$ as the significant level. The Kruskal & Whalis test was used for more than two independent test in the root growth with the procedure for big n . Results indicated that all the antibiotics had no inhibitory effect on the bacteria, fungi pollution or germination. Root growth was strongly inhibited by benzoic acid. Formaldehyde and lugol showed equal statistical behavior three weeks after in vitro seeding.

Key words: Antibiotics, Pollution, In Vitro, Date Palm.

INTRODUCCION

La propagación de plantas a través de la técnica de cultivo de tejidos se encuentra limitada por la presencia de microorganismos contaminantes, y al hecho de que existen pocas publicaciones sobre técnicas de esterilización y de manejo de la contaminación ocasionada por hongos y bacterias.

La contaminación del medio es un problema considerable y es causada por microorganismos

presentes dentro de las células vegetales y que no se pueden eliminar mediante la desinfección externa. En principio hay dos maneras de combatir este problema: a) el cultivo de meristemos (donde no hay microorganismos presentes en ellos), b) mediante la adición de antibióticos al medio de cultivo. Por lo tanto el presente trabajo se dirigió a evaluar el comportamiento de diferentes antibióticos adicionados en medios de cultivo *in vitro* de semillas de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.), al efecto

de diferentes antibióticos sobre la presencia de hongos y bacterias en cultivos de semillas de palma datilera en condiciones *in vitro* y así mismo evaluar el efecto de los antibióticos sobre la germinación.

La frecuencia de ocurrencia de la incorporación de penicilina y otros antibióticos en el medio de cultivo mejoran la técnica de cultivo de tejidos (Coriell, 1979, citado por De la Rosa, 1988). Sin embargo, hay objeciones al uso generalizado de antibióticos para el control de contaminantes. Los antibióticos no destruyen a todos los microorganismos, algunos sólo son suprimidos o retardan su metabolismo; se descuidan las técnicas asépticas por el uso de antibióticos; se forma resistencia a antibióticos en muchos microorganismos, siendo más difícil controlarlos. La penicilina causa conversión de algunas bacterias a formas L, las cuales crecen rápidamente, pero no son fácilmente detectadas; por el efecto de los antibióticos se pierden índices obvios de contaminación como cambios de pH, turbiedad y evidencias microscópicas. Por lo tanto, los antibióticos no deben ser utilizados rutinariamente, tratando de sustituirlos por técnicas asépticas (Coriell, 1979, citado por Cervera, 1982).

La utilización de antibióticos en grandes cantidades generalmente conduce a una fitotoxicidad porque inhiben el crecimiento y desarrollo de plantas superiores. Pierik (1987), mencionan el uso de penicilina y acromicina, y otros investigadores han usado tetraciclina y 8-hidroxiquinoleína. Staritsky *et al.* (1983, citados por Pierik, 1987), compararon los efectos de oxytetraciclina, estreptomocina, cloromicetina, penicilina-G, rifampicina y gentamicina en el cultivo *in vitro* de *chryptocoryne* y cinchona, las cuales estaban infectadas internamente con bacterias y concluyeron que sólo en el caso de la rifampicina se inhibió el crecimiento de las bacterias, a la vez que no hubo un efecto del antibiótico sobre el crecimiento y desarrollo de los explantes. Young *et al.* (1984, citado por Pierik 1987), reporta que el empleo de un solo tipo de antibiótico no fue efectivo contra las bacterias contaminantes en cultivos de yemas de plantas leñosas y que la combinación de diferentes antibióticos fue mas efectiva. George y Sherington (1984, citados por Pierick, 1987), reportaron que en algunos casos el uso de antibióticos es capaz de incrementar la tasa de crecimiento de los tejidos cultivados *in vitro*.

Rodríguez *et al* (1996), reporta el uso de estreptomocina, penicilina, terramicina y tobramicina en dosis de 20 mg a 1 g por litro, siendo la terramicina la que observó un control de las bacterias, aunque el crecimiento de los brotes fue lento. La contaminación bacteriana es un problema para el desarrollo de algunas especies *in vitro*, y ésta es la causa de una gran cantidad de fracasos (Augé, *et al*, 1986).

La palma datilera es uno de los cultivos frutícolas mas antiguos (Popenoe, 1913 y S.A., 1973). Los primeros datos conocidos en Irak (Mesopotamia) demuestran que su cultivo fue probablemente establecido 3 000 años a.C. La palma datilera también se ha encontrado en Egipto desde tiempos prehistóricos, pero este cultivo no se volvió tan importante como en Irak (Danthine, 1937) hasta años más tarde desde el Oeste de Irán (Persia) a través de Arabia y Norte de Africa, el dátil ha sido por mucho tiempo alimento básico para la población.

MATERIALES Y METODOS

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Aridas de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en la Cd. De Bermejillo, Dgo., la cual a su vez se encuentra localizada dentro del Municipio de Mapimí, Dgo., cuya localización es el extremo Norte del Estado de Durango, a los 26°14'06" de Latitud Norte y 104°29'14" de Longitud Oeste, a una altura de 1 480 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con el Estado de Chihuahua, al oriente con el Municipio de Tlahualilo; por el Sur a los Municipios de Gómez Palacio, Lerdo y San Pedro del Gallo y hacia el poniente con el Municipio de Hidalgo. En la mayor parte del Municipio predomina un clima semicálido y semiseco, influyendo en gran forma para ello el Bolsón de Mapimí y la gran parte desértica que predomina en el municipio, con una temperatura máxima extrema de 41°C y una mínima extrema de 9°C. La precipitación pluvial anual es de 240.0 mm. promedio en los últimos cinco años.

El material vegetal utilizado fueron semillas de palma datilera y se obtuvieron directamente de las palmas en fructificación de la variedad "Halawy" en el Ejido "El Vergel", Durango.

En el laboratorio las semillas de palma datilera fueron sumergidas en alcohol al 70% durante 30 minutos y fueron lavadas con agua destilada tres veces. Se utilizaron cuatro medios de cultivo diferentes para cada uno de los tratamientos. El medio de cultivo base estuvo compuesto de 8 g de agar agar, 30 g de sacarosa, 100 mg de inositol, 10 ml de tiamina y 4.33 g de las sales de cultivo de Murashige & Skoog disueltos en agua destilada y fue adicionado con 0.2 mg de ácido benzoico para el tratamiento 2; 0.10 ml de formaldehído para el tratamiento 3 y 0.5 ml de lugol para el tratamiento 4. En el caso del tratamiento 1 (Testigo) el medio de cultivo fue el medio base sin adición de antibióticos.

Se colocaron 20 ml del medio de cultivo en cada uno de los frascos gerber y se sometió a un período de esterilización en autoclave de 15 minutos a 25 libras de presión.

Para la siembra de las semillas *in vitro* se trabajó totalmente en condiciones de asepsia bajo la campana de flujo laminar, se colocó una semilla por frasco y se sellaron con papel parafilm.

El período de incubación duró cinco semanas a partir de la siembra con un período de incubación de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y con una temperatura de 24°C.

El diseño experimental fue completamente al azar y se utilizaron cuatro tratamientos incluyendo al testigo. Los tratamientos fueron: 1) Testigo, 2) Acido benzoico al 0.02%, (bacteriostático); 3) Formaldehído al 0.01% (bactericida) y 4) Lugol al 0.05% (fungiestático). Cada tratamiento contó con 14 repeticiones. La unidad experimental fue una semilla en un frasco gerber. Las variables evaluadas fueron:

Contaminación por bacterias u hongos (%), longitud de raíz (cm) y número de días entre siembra *in vitro* y germinación.

Las evaluaciones de longitud de raíz fueron llevadas a cabo cada semana durante cinco semanas a partir de la fecha de siembra. La contaminación por bacterias, hongos y germinación se evaluó a la quinta semana del establecimiento del cultivo *in vitro*.

El análisis estadístico para las variables de número de frascos contaminados con bacterias, número de frascos contaminados con hongos y número de frascos con semillas germinadas fue realizado mediante la Prueba Exacta de Fisher usando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Para el análisis de longitud de raíz fue utilizada la prueba de Kruskal y Whallis de estadística no paramétrica para más de dos pruebas independientes usando la tabla de Chi-cuadrada con tres grados de libertad y la misma prueba con el procedimiento para número grande de repeticiones en un experimento (Hollander y Wolfe, 1973).

RESULTADOS Y DISCUSION

Para el análisis estadístico de presencia de bacterias, hongos y germinación, fueron utilizados únicamente para los datos de la quinta semana, ya que en las primeras cuatro semanas se presentó un comportamiento similar a las demás fechas de evaluación.

En el caso de contaminación por bacteria, los resultados muestran que todos los medios de cultivo adicionados con antibióticos no redujeron de maneja significativa la contaminación, excepto el tratamiento con ácido benzoico (Cuadro 1). Se observa una similitud de comportamiento en cuanto a la contaminación en los tratamientos 2 y 4 con respecto al testigo, en los que el nivel de significancia estimado está cerca de la zona de no rechazo de H_0 . Los demás niveles de significancia observados en las

comparaciones entre los demás tratamientos muestran ser mucho muy grandes.

Cuadro 1. Prueba Exacta de Fisher para el análisis de presencia de bacterias en tratamientos con formaldehído al 36.5%, ácido benzoico y lugol en la quinta semana de evaluación.

Tratamientos	P ₁	P ₂	Nivel de significancia estimado	Decisión tomada con $\alpha = 0.05$
T ₁ Vs T ₂	0.5	0.14	0.0516	No se rechaza Ho
T ₁ Vs T ₃	0.5	0.0	0.0029	Se rechaza Ho
T ₁ Vs T ₄	0.5	0.14	0.0516	No se rechaza Ho
T ₂ Vs T ₃	0.14	0.0	0.2410	No se rechaza Ho
T ₂ Vs T ₄	0.14	0.14	0.7020	No se rechaza Ho
T ₃ Vs T ₄	0.0	0.14	0.2410	No se rechaza Ho

Los resultados de comparación entre tratamientos para el caso de la contaminación por hongos muestran que todos los antibióticos no redujeron de manera significativa la presencia de hongos en los medios de cultivo. Se observa una similitud en las comparaciones de T1 Vs T2 y la comparación de T2 Vs T4.

Cuadro 2. Prueba Exacta de Fisher para el análisis de presencia de hongos en tratamientos con formaldehído al 36.5%, ácido benzoico y lugol en la quinta semana de evaluación.

Tratamientos	P ₁	P ₂	Nivel de significancia estimado	Decisión tomada con $\alpha = 0.05$
T ₁ Vs T ₂	0.5	0.14	0.5000	No se rechaza Ho
T ₁ Vs T ₃	0.5	0.0	0.1110	No se rechaza Ho
T ₁ Vs T ₄	0.5	0.14	0.2980	No se rechaza Ho
T ₂ Vs T ₃	0.14	0.0	0.2410	No se rechaza Ho
T ₂ Vs T ₄	0.14	0.14	0.5000	No se rechaza Ho
T ₃ Vs T ₄	0.0	0.14	0.5000	No se rechaza Ho

Para el caso de número de muestras con germinación a la quinta semana de evaluación la prueba exacta de Fisher se aplicó para comparar T1 con respecto a T2, T3 y T4, en los que el nivel de significancia estimado fue de 0.5. Para el caso de comparación entre T2 y T3, T2 y T4, y T3 y T4 no se aplicó la prueba debido a la similitud entre p1 y p2.

Los análisis para la longitud de raíces mediante la prueba de Kruskal y Whallis arrojan niveles de significancia muy altos (Cuadro 3), por lo que en la tabla de Chi-cuadrada éstos resultados son imposibles de leer, con esto la diferencia entre tratamientos resultó ser altamente significativa.

Cuadro 3. Prueba de Kruskal y whalis para determinar el nivel de significancia en similitud entre tratamientos de formaldehído, ácido benzoico y lugol y testigo en su efecto sobre la longitud de raíz en semillas de palma datilera.

Fecha	ΣRi	$\Sigma Ri^2/ni$	T
1	1 594.98	52 223.163	25.327
2	1 596	53 941.2499	31.7866
3	1 596	53 520.25	30.203
4	1 594	53 277.4	29.291
5	1 601	53 250.962	29.191

Durante la primera y segunda semana de evaluación hubo diferencias significativas marcadas entre los cuatro tratamientos incluyendo al testigo para el caso de longitud de raíz (cm) (Cuadro 4). Durante este período se observó un crecimiento muy lento en los tratamientos con antibióticos en comparación con el testigo.

Pero en la tercera semana de evaluación, el testigo resultó ser estadísticamente igual al tratamiento con lugol, mientras que los demás tratamientos resultaron ser estadísticamente diferentes (Cuadro 4). El crecimiento de raíz en los tratamientos con formaldehído al 36.5% y ácido benzoico siguieron presentando crecimientos muy lentos en relación al testigo, sin embargo este comportamiento cambió en la cuarta semana, donde se presentó un crecimiento similar al testigo al usar formaldehído (35%) y un lento crecimiento con ácido benzoico.

En la quinta semana de evaluación, las muestras no contaminadas en el testigo mostraron un crecimiento muy rápido en comparación con los demás tratamientos (Cuadro 4). Los tratamientos con formaldehído al 36.5% y el tratamiento con lugol mostraron ser estadísticamente iguales. En tanto que respecto a los demás tratamientos muestran ser estadísticamente diferentes (0.05). El tratamiento con ácido benzoico mostró una tasa de crecimiento menor en comparación a los demás tratamientos

Cuadro 4. Prueba de Kruskal y Whalis para η grande en el efecto de cuatro tratamientos con antibióticos en medios de cultivo incluyendo al testigo sobre la longitud de raíz en las cinco semanas de evaluación.

Fecha 1		Fecha 2		Fecha 3		Fecha 4		Fecha 5	
Ru - Rr		Ru - Rr		Ru - Rr		Ru - Rr		Ru - Rr	
246.5	T ≠ T ₁	165.5	T ≠ T ₁	115.5	T ≠ T ₁	86	T ≠ T ₁	73.5	T ≠ T ₁
384.16	T ≠ T ₁	461	T ≠ T ₁	416.5	T ≠ T ₁	308	T ≠ T ₁	235	T ≠ T ₁
107	T ≠ T ₁	97.5	T ≠ T ₁	14	T ≠ T ₁	108	T ≠ T ₁	56.5	T ≠ T ₁
137.66	T ≠ T ₁	295.5	T ≠ T ₁	301	T ≠ T ₁	384	T ≠ T ₁	398.5	T ≠ T ₁
139.5	T ≠ T ₁	68	T ≠ T ₁	101.5	T ≠ T ₁	22	T ≠ T ₁	17	T ≠ T ₁
277.16	T ≠ T ₁	363.5	T ≠ T ₁	402.5	T ≠ T ₁	416	T ≠ T ₁	381.5	T ≠ T ₁

CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que el ácido benzoico inhibe la presencia de bacterias en semillas de palma datilera germinadas *in vitro*.

Sin embargo, el ácido benzoico adicionado al medio de cultivo, inhibe el crecimiento de la raíz en su fase inicial de la germinación.

El crecimiento de la raíz responde de manera similar en los tratamientos con formaldehído y lugol a las tres semanas de establecer las semillas en el medio de cultivo.

Respecto a la longitud de raíz los tratamientos respondieron estadísticamente diferente durante las dos primeras semanas de establecimiento de las semillas *in vitro*.

LITERATURA CITADA

- S.A., 1973. The date palm. Henry Field De Field Researches Projects, Coconut Grove, Miami, Fla. USA.
- Auge, R.; G. Beauchense; J. Boccon-Gibod; L. Decourtye; B., Digat; J. C-L., Galandrin; R. Minier; J. C. Morand; H. Vidalie. 1986. Cultivo *in vitro*. Científica, S.A.
- Cervera, B., E. M. 1982. Micropropagación de Vainilla planifolia A. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Guadalajara. Guadalajara, Jal., México.
- Danthine, H. 1937. Le palmier-dattier et les arbres sacres dans l'iconographie de l'asie occidentale ancienne. Texte (277 pp) and Album (206 plates) Paris.
- De la Rosa P., P. 1988. Cultivo *in vitro* de yemas axilares del canelero (*Cyannomum zeylanicum*, Nees). Tesis de Licenciatura. Chapingo, México.
- Hollander, M. Y Wolfe, D. 1973. Nonparametrical Statistical Methods. John Wiley & Sons. USA.
- Pierik, R. L. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers. The Netherlands.
- Ostle, B. 1979. Estadística Aplicada. LIMUSA. México. p 157.
- Popenoe, P. B. 1913. Date Growing in the Old World and the New. Altadena, Calif. USA. 316 p.
- Rodríguez, J. L. *et al.* 1996. Obtención y propagación de plantas de alcatraz *Zantedeschia sp.* A partir del cultivo *in vitro* de yemas de bulbo. Memorias del III Congreso Nacional de Biotecnología. ANABAF. Chihuahua,. México.