

Incidencia de contaminantes microbianos en la micropropagación de la caña de azúcar

Yelenys Alvarado Capó*, Nayanci Portal González, Leyanis García Aguila, Daimí Ramírez, Yudith Martínez.
*autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e.mail yalvarado@ibp.uclv.edu.cu

RESUMEN

En las fases de Establecimiento, Multiplicación y Enraizamiento de la micropropagación de la caña de azúcar se determinó la incidencia de contaminantes microbianos por observación visual de los recipientes de cultivo. El tipo de microorganismo presente se confirmó en observaciones al microscopio óptico. El porcentaje de contaminación por grupo microbiano fue determinado en 731 ápices en la Fase de Establecimiento, en cada subcultivo de multiplicación (hasta el séptimo) en un total de 5 225 plantas *in vitro* y 6 650 en la Fase de Enraizamiento. En las tres fases se constató la presencia de microorganismos contaminantes (hongos filamentosos, bacterias y levaduras) con predominio de las bacterias (13.7 – 31.6%). En la Fase de Multiplicación los porcentajes de contaminación bacteriana se incrementaron con el número de subcultivos. Los resultados indicaron la alta incidencia de contaminantes microbianos en la micropropagación de la caña de azúcar y la necesidad de prestar atención al control de la contaminación bacteriana.

Palabras clave: Bacteria, hongo filamentosos, levadura, plantas *in vitro*

ABSTRACT

The incidence of microbial contaminants in Establishment, Multiplication and Rooting stages of the sugarcane micropropagation was determined by visual observation of the culture vessels. The type of microorganism was confirmed in observations to the optic microscope. The percentage of contamination for microbial group was determined in 731 apexes in the Establishment stage, in each multiplication subculture (up to the seventh) in a total of 5 225 *in vitro* plants and 6 650 in the Rooting stage. In three stages the presence of microbial contaminants was verified (filamentous fungi, bacteria and yeasts) with prevalence of the bacteria (13.7-31.6%). In the Multiplication stage the percentages of bacterial contamination were increased with the number of subcultures. The results indicated the high incidence of microbial contaminants in sugarcane micropropagation and the necessity of paying attention to the control of the bacterial contamination.

Key words: bacteria, filamentous fungi, *in vitro* plants, yeast

INTRODUCCIÓN

En las biofábricas y laboratorios de investigación cubanos, tanto en la propagación de plantas *in vitro* por organogénesis, como en el desarrollo de procesos de embriogénesis somática, se ha presentado contaminación microbiana (Carrazana *et al.*, 1998; Jiménez *et al.*, 1999; Sierra *et al.*, 2002; Folgueras *et al.*, 2002; Acosta *et al.*, 2002).

Los trabajos en biotecnología vegetal en Cuba con la caña de azúcar se iniciaron a finales de los años 70 y principios de los 80 (Alfonso y Capote, 1979; Maribona *et al.*, 1983) y las investigaciones se han continuado en varias instituciones (el Centro Nacional de Investigaciones Científicas, el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, el Centro de Bioplantas, el Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar, el Instituto de Biotecnología de las Plantas, entre otros). En 1995 se inició el programa nacional para la producción de semilla de caña de azúcar por

métodos biotecnológicos en las biofábricas. Además, por mutagénesis y selección *in vitro* se han obtenido nuevas variedades (Pérez *et al.*, 1998), se han desarrollado proyectos de investigación con resultados en la propagación de esta especie en sistemas de inmersión temporal (Lorenzo *et al.*, 1998), en el empleo de la embriogénesis somática como sistema de propagación masiva, en el desarrollo de la semilla artificial (Jiménez *et al.*, 1999; Castillo, 2001; Freire, 2001) y la transformación genética para la resistencia a insectos (Arencibia *et al.*, 1998; Enríquez, 1999). Sin embargo, solo se tienen referencias de los estudios realizados sobre contaminación bacteriana en este cultivo por González *et al.* (1997) y Díaz *et al.* (1998) y en los mismos no se abordó la incidencia de contaminantes en las diferentes fases de la micropropagación como objetivo de trabajo.

Teniendo en cuenta la problemática planteada, este trabajo se propuso determinar la incidencia de

contaminantes microbianos en poblaciones de plantas *in vitro* de caña de azúcar durante las fases de Establecimiento, Multiplicación y Enraizamiento de la micropropagación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon poblaciones de plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) de las (variedades: C 87-51, C 1051-73, J 60-5 y CP 52-43). Las mismas fueron sometidas a tratamiento con electroterapia (Hernández *et al.*, 1997) así como se establecieron y propagaron según la metodología propuesta por Jiménez *et al.* (1997). Además, fueron diagnosticadas como libres de patógenos sistémicos del cultivo (Peralta *et al.*, 1997). Como material vegetal de partida habían sido empleadas plantas de campo procedentes de diferentes Estaciones Territoriales de Investigación de la caña de azúcar (ETICA) y Bancos de Semillas del país.

Determinación de la incidencia de contaminantes microbianos en la micropropagación de caña de azúcar

Se determinó por observación visual de los recipientes de cultivo la incidencia de contaminantes microbianos y se calculó el porcentaje de contaminación por grupo microbiano (bacterias, hongos filamentosos y levaduras) en poblaciones de plantas *in vitro* en las Fases de Establecimiento, Multiplicación y Enraizamiento. Además, el tipo de microorganismo presente se confirmó al microscopio óptico (OLYMPUS) (400x y 1000x) en preparaciones directas del crecimiento microbiano sobre portaobjetos con agua destilada estéril para las bacterias y Lactofenol (Fluka) para los hongos.

En la Fase de Establecimiento, diariamente hasta el final de la misma, se evaluaron un total de 731 ápices implantados durante dos años (septiembre de 1996 - agosto de 1998) de las variedades: C 87-51 (334), C 1051-73 (378), J 60-5 (569) y CP 52-43 (170).

Para la determinación de la incidencia de contaminantes microbianos en las Fases de Multiplicación y Enraizamiento se continuó con la población de plantas *in vitro* de la variedad C 87-51, propagada a partir del cuarto subcultivo en la biofábrica del IBP. Se examinaron, al final de cada subcultivo, en total 11 875 plantas *in vitro*. De ellas, 5 225 en la Fase de Multiplicación, hasta el séptimo subcultivo y 6 650 en la Fase de Enraizamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Fase de Establecimiento de las plantas *in vitro* se constató la presencia de microorganismos contaminantes. Los datos de incidencia de los diferentes grupos microbianos por variedades aparecen en la figura 1.

Los contaminantes bacterianos, independientemente de la variedad, predominaron sobre los hongos filamentosos y las levaduras en las poblaciones evaluadas. En las dos variedades del tipo Cuba (C 87-51, C 1051-73) la contaminación por bacterias no sobrepasó el 16.0%, sin embargo, en las otras dos (Ja 60-5 y CP 52-43) alcanzó valores por encima del 28.0%. Autores como Taylor y Dukic (1993), Díaz *et al.* (1998) y Moutia y Dookun (1999) han referido en el establecimiento *in vitro* de la caña de azúcar porcentajes de contaminación bacteriana superiores al 20.0%.

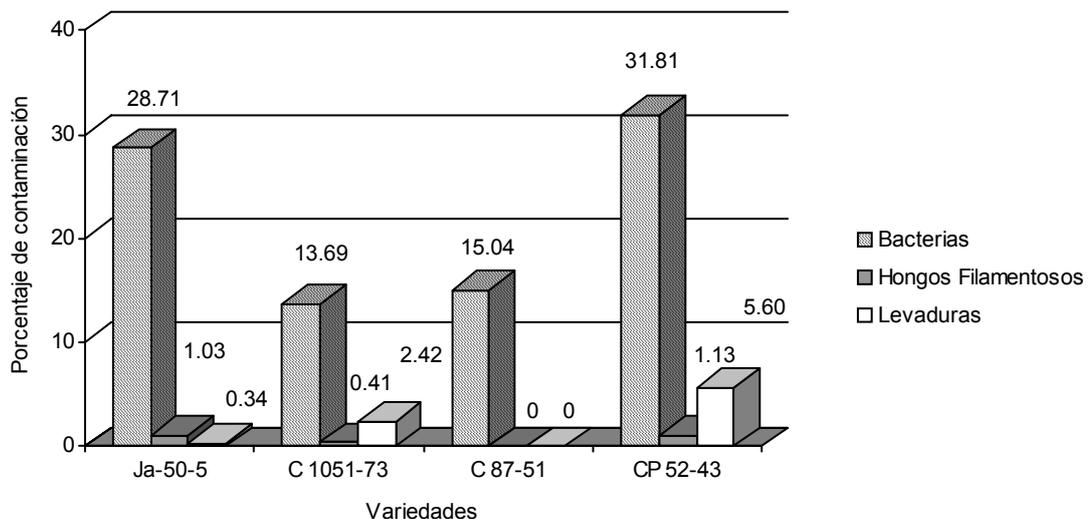


Figura 1. Incidencia de contaminantes microbianos en la Fase de Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar en cuatro variedades.

Dentro de los grupos de microorganismos contaminantes las bacterias ocupan un lugar sobresaliente (Herman, 1996, Leifert y Cassells, 2001). Algunas especies pueden crecer en los medios de cultivo alrededor de la base de los explantes después de la aplicación de métodos de saneamiento y de los procesos de desinfección a los cuales se someten (Moutia y Dookun, 1999).

Aunque el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar ha sido abordado por varios autores (Ahloowalia y Maretzki, 1983; Lee, 1987; Taylor y Dukic, 1993; Moutia y Dookun, 1999) no se encontraron referencias en la literatura consultada sobre datos de la incidencia de contaminantes bacterianos en las Fases de Multiplicación y Enraizamiento de la micropropagación de este cultivo, en investigaciones ni en su producción comercial en biofábricas.

Se observó crecimiento microbiano alrededor de la base de los ápices y colonizando el tejido vegetal, fundamentalmente sobre las superficies cortadas, tanto la superior como la inferior que se encontraba en contacto con el medio de cultivo, lo cual implicó al explante inicial como la fuente más probable de introducción de los contaminantes (Figura 2). En algunos tubos de ensayo se observaron, además, burbujas de gas dentro del medio de cultivo, cambios en su coloración y reblandecimiento del agar.

Las diferencias en los porcentajes de contaminación microbiana entre las variedades pudieran estar relacionadas con las características propias de las plantas donantes y su microbiota, las cuales provenían de Estaciones y Bancos de Semilla situados en diferentes regiones geográficas, con particularidades en los tipos de suelo, condiciones agroclimáticas y atenciones culturales a las plantaciones. La caña de azúcar soporta una

microbiota epifita y endofita diversa (Alfonso *et al.*, 1992; James y Olivares, 1997).

Estos resultados corroboraron el criterio de que para el establecimiento de material vegetal en condiciones *in vitro* se requiere de la existencia de un banco de donantes que garantice su calidad fitosanitaria (Jiménez, 1998). Todo ello unido a la calidad del trabajo humano en el tratamiento y la desinfección de los explantes pudo contribuir a los índices diferentes de contaminación.

En las Fases de Multiplicación y Enraizamiento de la población de plantas *in vitro* de la variedad Cuba 87-51, la incidencia de contaminantes microbianos manifestó una tendencia similar a la Fase de Establecimiento, con predominio de los porcentajes de contaminación por las bacterias sobre los hongos filamentosos y levaduras (Figuras 2 y 3). A partir del quinto subcultivo la contaminación bacteriana apareció súbitamente y alcanzó un 17.40%. En los siguientes subcultivos los porcentajes de contaminación por este grupo microbiano continuaron en ascenso.

Este comportamiento de la contaminación bacteriana ha sido registrado por otros autores (Cassells, 1991; Leifert *et al.*, 1992; Barrett y Cassells, 1994). Es uno de los aspectos principales que hace considerar a estos contaminantes como los que ocasionan los mayores daños pues pueden permanecer latentes y su crecimiento se hace visible sobre el medio de cultivo después de mucho tiempo de que las plantas *in vitro* se hayan establecido y el número de plantas es alto (Cassells, 1991 y George, 1993). Según el criterio de Leifert y Cassells (2001) cualquier pequeño cambio en las condiciones del medioambiente *in vitro* (pH, temperatura, composición del medio de cultivo, etc.) puede hacer que los contaminantes latentes proliferen rápidamente.

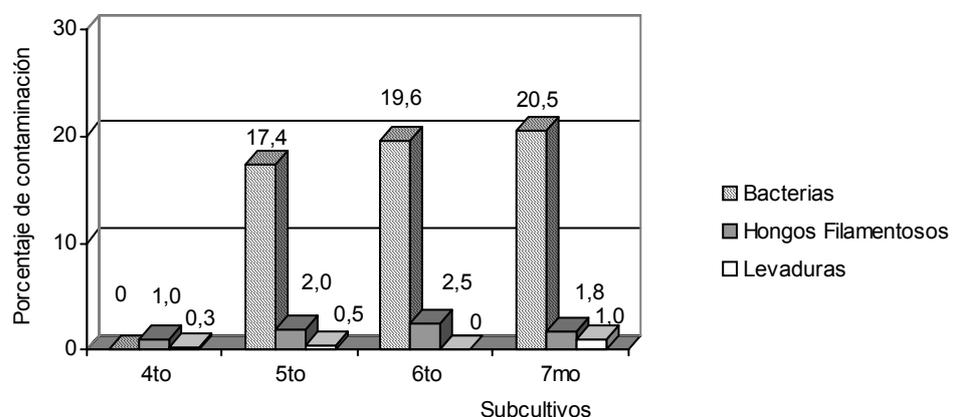


Figura 2. Incidencia de contaminantes microbianos en diferentes subcultivos de la Fase de Multiplicación de la micropropagación de la caña de azúcar var. Cuba 87-51.

La mayor parte de los contaminantes bacterianos solo fueron visibles después del tercer o quinto día de subcultivadas las plantas *in vitro*, lo cual, según el

criterio de George (1993), se vincula con el hecho de que las condiciones del ecosistema *in vitro* pueden ser adversas para el crecimiento de estos microorganismos.

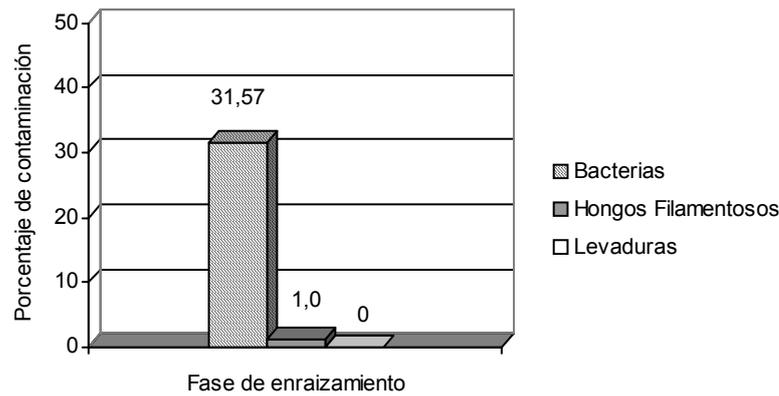


Figura 3. Incidencia de contaminantes microbianos en la Fase de Enraizamiento de la micropropagación de la caña de azúcar var. Cuba 87-51.

En estas dos fases los porcentajes de contaminación por hongos filamentosos y levaduras se mantuvieron por debajo del 3.0%. Es poco común que estos microorganismos permanezcan latentes *in vitro* ya que el medio para el cultivo de células y tejidos proporciona todos los nutrientes esenciales que requieren para su crecimiento (Danby *et al.*, 1994; Leifert *et al.*, 1994). Es importante apuntar que el análisis de la incidencia de contaminantes en las plantas *in vitro* se realizó en la biofábrica del Instituto de Biotecnología de las Plantas, donde se aplica un Sistema para el control y el aseguramiento de la calidad en todo el proceso productivo (Suárez y Alvarado, 1997) que incluye puntos para el control de los contaminantes introducidos en el laboratorio. El incremento sostenido de las medidas de asepsia y el entrenamiento del personal han posibilitado que los índices de contaminación se hayan encontrado por debajo del 3.0% (sin tener en cuenta las bacterias que no se cuantificaban) en los últimos cinco años (Triana, 2001). Ello constituye un ejemplo de cómo los contaminantes fungosos que no se encuentran asociados al explante inicial pueden ser prevenidos y controlados. Sin embargo, el caso de las bacterias en las biofábricas y laboratorios de investigación no ha sido tratado con suficiente profundidad. No se cuenta con registros de incidencia, principales géneros y especies contaminantes y no se incluyen dentro de las pérdidas en cada subcultivo. Además, se desconoce el efecto que los mismos pueden causar sobre las variables fundamentales que se tienen en cuenta para evaluar la eficiencia productiva de la propagación de plantas *in vitro* (coeficiente de multiplicación, estado fisiológico, supervivencia, etc.) y como regla general las plantas *in vitro* contaminadas continúan multiplicándose o se transfieren a la Fase de Aclimatización. Por otra parte, en los laboratorios de investigación a pesar de que la contaminación bacteriana tampoco se registra ni se refiere generalmente en las publicaciones científicas, su incidencia ha limitado y entorpecido

investigaciones sobre embriogénesis somática, semilla artificial, propagación de especies forestales y frutales, transformación genética, etc. (González *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 1999).

Leifert y Woodward (1998) revelaron que un índice de pérdidas no superior al 2.0% por subcultivo parece ser el mínimo requerido para garantizar una producción exitosa. El mismo no puede ser alcanzado sin la aplicación regular de prácticas de aseguramiento a la calidad y la introducción de una estrategia de control microbiológico en la producción. Teniendo en cuenta las características de las biofábricas cubanas, Aragón (1991) y Pérez y Suárez (1993), recomendaron que el índice de contaminación permisible fuera del 5.0% pero en este valor no se incluyeron los porcentajes de contaminación por bacterias.

La mayoría de los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales se ven afectados por la presencia de contaminantes bacterianos, independientemente de las especies de plantas que sean propagadas (Reed y Tanprasert, 1995). Sin embargo, en la literatura consultada no se encontraron referencias sobre las pérdidas ocasionadas por estos microorganismos en los laboratorios o compañías comerciales.

CONCLUSIONES

- Se determinó que la contaminación microbiana tuvo una alta incidencia en la micropropagación de la caña de azúcar y que los contaminantes bacterianos predominaron sobre otros grupos microbianos (hongos filamentosos y levaduras).

- La contaminación bacteriana afectó las Fases de Establecimiento, Multiplicación y Enraizamiento de la caña de azúcar con porcentajes que se incrementaron con el número de subcultivos. Los resultados hallados en este trabajo indicaron la necesidad de atender esta problemática en el cultivo *in vitro* de plantas y de desarrollar estrategias para su control.

REFERENCIAS

- Acosta, M, Caballero I, Alvarado Y y Leiva M (2002) Micobiota epifítica y contaminantes fungosos del establecimiento *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L.). En: Libro de resúmenes Sexto simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. p.122.IBP. Santa Clara
- Ahloowalia, BS y Maretzki A (1983) Plant generation via somatic embryogenesis in sugarcane. *Plant Cell Rep.* 2: 21-25
- Alfonso A y Capote A (1979) Cultivo de tejidos en la caña de azúcar, obtención y posterior regeneración de plantas *in vitro*. II Seminario del INCA. Libro de Resúmenes. p 114. La Habana
- Arencibia, A D, Carmona E, Téllez P, Chan MT, Yu SM y Trujillo Y (1998) An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* sp.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research* 7: 213-222
- Alfonso, M del P, Hernández M C y González M (1992) Poblaciones microbianas asociadas a la caña de azúcar. BIOFERTRO '92. Libro de resúmenes p. 41. La Habana
- Aragón, N (1991) Anteproyecto de norma para la producción de vitroplantas de plátanos y bananos. Informe final de investigación. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara
- Barrett, C y Cassells A (1994) An evaluation of antibiotics for the elimination of *Xanthomonas campestris* pv. *pelagonii* (Brown) from *Pelargonium x domesticum* cv. «Grand Slam» explants *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 169-175
- Carrazana, D, Herrera L, Vallin P (1998) Microorganismos contaminantes en el proceso de micropropagación *in vitro* de bananos y plátanos (*Musa* sp.). Diagnóstico y métodos de control. Libro de resúmenes. III Taller Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. pp. 403-404. La Habana
- Cassells, AC (1991) Problem in tissue culture: culture contamination. En: Debergh P. y Zimmerman RH. (Eds), *Micropropagation*, pp. 31-45. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Castillo, R (2001) La embriogénesis somática en la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Estudios básicos del proceso y su contribución a la semilla artificial. Tesis de Doctorado. Ciego de Avila, Cuba
- Danby, S, Berger F, Howiitt D, Wilson A, Dawson S y Leifert C (1994) Fungal contaminants of *Primula*, *Coffea*, *Musa* and *Iris* tissue cultures. En: Lumsden, P J, Nicholas, J R , Davies, W J, (eds.) *Physiology, growth and development of plants in culture*. Kluwer Academic Publishers. pp. 397-403. Dordrecht
- Díaz, P, Niubó, E, Simón M, Oliva O, Korneva S y Sánchez C (1998) Cultivo axénico de la caña de azúcar. Informe final del Proyecto CITMA Cod. 0300018. CENIC. Cuba
- Enriquez, GA (1999) Transformación genética de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) y el arroz (*Oryza sativa* L.) mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis de Doctorado. CIGB. Ciudad de la Habana
- Folgueras, M, Herrera L, Carrazana D, Quiñones R, Medero V y López V (2002) Microorganismos contaminantes en la propagación masiva de *Colocacia esculenta* y *Xanthomonas* spp. en la Biofábrica del MINAG en Villa Clara. En: Libro de resúmenes Sexto simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. p.122.IBP. Santa Clara
- Freire, M (2001) Nueva metodología de embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var. C87-51) empleando medios de cultivos líquidos. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias. Santa Clara
- George, EF (1993) *Plant propagation by tissue culture*. Chapter 5, Part1. 2nd Ed., pp. 130-143. Exegetics Ltd
- González, R, Borrás O, Concepción O, Trujillo R, Bruzón M, Cid M, Nápoles L y Recio MI (1997) Evaluación de diferentes técnicas para el control de las contaminaciones en el cultivo de tejidos de plantas. En: Libro de resúmenes. Técnicas de avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas. BIOVEG '97. 2-5 abril, Ciego de Avila
- Herman, EB (1996) *Microbial contaminations of plant tissue cultures*. Agritech Consultans, INC, SHRUB OAK
- Hernández, R, Igarza Y, González Y, Peralta E, Fontanella J, Pichardo T, Noa JC, García L, Alfonso E y Rodríguez M (1997) Nuevo método para el saneamiento a bacterias y virus en caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). *Cuadernos de Fitopatología* 54: 153-157
- James EK y Olivares FL (1997) Infection and colonization of Sugar Cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plants Sciences*, 17(1): 77-119
- Jiménez, E (1998) Cultivo de ápices y meristemas. En: Pérez, JN (Ed) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. pp. 45-56. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara.
- Jiménez, E, García L, Suárez M y Alvarado Y (1997) Instructivo técnico para la micropropagación de la caña de azúcar. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara
- Jiménez, E, Gómez R, Pérez J y Alvarado Y (1999) Informe final Proyecto CITMA Semilla Artificial. Código 300020
- Lee, TSG (1987) Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, 10: 47-55
- Leifert, C y Cassells AC (2001) Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* 37(2): 133-138
- Leifert, C y Woodward S (1998) Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 52 :83-88
- Leifert, C, Camotta H y Waites WM (1992) Effect of antibiotics on micropropagated plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 29: 153-160
- Leifert, C, Morris CE y Waites WM (1994a) Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13: 139- 183
- Lorenzo, JC, González BL, Escalona M, Teisson C, Espinosa P y Borroto C (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tissue and Organ-Culture*. 54 (3): 197-200
- Maribona, RH, Korneva SB, Ruiz A y Gonzalez S (1983) Obtention of sugar cane plants by tissue culture from different plant organs. *Proceeding of the International Society for Sugar Cane Technologist*. 2: 610- 620
- Moutia, M y Dookun A (1999) Evaluation of surface sterilization and hot water treatment on bacterial contaminants in bud culture of sugarcane. *Expl. Agric.* 35: 265-274

Peralta, EL, Martínez B y González MC (1997) Control fitosanitario en el programa de micropropagación de caña de azúcar en Cuba. En: Libro de Resúmenes. Tercer Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal. Palacio de las Convenciones. Cuba. p 75. La Habana.

Pérez, J y Suárez M (1993) La competitividad: Reto actual de la Biotecnología. En: Libro de resúmenes. Tercer Coloquio Internacional de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara.

Pérez, JN, Orellana P, Jiménez E, García L y Vidal J (1998) Empleo de la biotecnología en el mejoramiento genético de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Libro de resúmenes. III Taller Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. p.205. La Habana.

Reed, BM y Tanprasert P (1995) Detection and control of bacteria contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 1(3): 137-142.

Sierra, A, Concepción O, Trujillo R y Daquinta M (2002) Efecto de una optimización de la metodología de desinfección de yemas apicales de *Philodendrum xanadu*. En: Libro de resúmenes Sexto simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. p122. IBP. Santa Clara.

Suárez, M, y Alvarado Y (1997) Sistema de control de calidad para biofábricas de múltiples cultivos. En Libro de resúmenes. Técnicas avanzadas aplicadas a la propagación masiva de plantas. BIOVEG 97.2-5 abril. Ciego de Avila.

Taylor, WJ y Dukic S (1993) Development of an *in vitro* culture techniques for conservation *Saccharum* spp. hybrid germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 34: 217-222.

Triana, R (2001) Introducción de una nueva metodología para la esterilización de los medios de cultivo. Tesis de Mestría. IBP, UCLV, Santa Clara.