

## Estrategia de trabajo para la prevención y el control de la contaminación bacteriana en la micropropagación de la caña de azúcar

Yelenys Alvarado Capó\*, Mileidy Cruz Martín, Nayanci Portal González, Leyanis García Águila, Marisol Freire Seijo, Elisa Quiala, Rafael Gómez Kosky. \*Autor para correspondencia.

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

### RESUMEN

La contaminación por microorganismos es la causa más importante de pérdidas en laboratorios comerciales y de investigación de cultivo de células y tejidos vegetales. Los métodos para eliminar los microorganismos y mantener los cultivos libres de contaminantes no son aún satisfactorios. Teniendo en cuenta esta problemática se definió como objetivo de trabajo evaluar métodos para la prevención y el control de la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de caña de azúcar. El medio de cultivo para la multiplicación de las plantas *in vitro* se modificó mediante la adición de sustancias nutritivas para evaluar su efecto sobre el porcentaje de contaminación por bacterias y su fitotoxicidad sobre las plantas *in vitro*. Además, se evaluó el efecto de modificaciones del pH inicial de los medios de cultivo sobre las plantas *in vitro* y los contaminantes bacterianos. Se comprobó que es posible, en presencia de las plantas *in vitro* y sin daños para ellas, lograr un incremento de la manifestación del crecimiento de bacterias contaminantes en el medio de cultivo para la multiplicación de la caña de azúcar por la adición de Agua de Coco (100.0 ml.l<sup>-1</sup>) o Extracto de Levadura (250.0 mg.l<sup>-1</sup>). Además, se seleccionó al pH inicial 6.5 para la detección temprana de contaminantes bacterianos, ya que favoreció el crecimiento de estos desde las 24h y no tuvo un efecto negativo para las plantas *in vitro*. A partir de estos resultados se estableció una estrategia de trabajo para la prevención y el control de la contaminación bacteriana en la micropropagación de la caña de azúcar por la aplicación de métodos de detección temprana.

Palabras clave: agua de coco, bacterias, extracto de levadura, *Saccharum* spp. híbrido

### ABSTRACT

The most important losses in labs are caused by microbial contamination. Though several methods have been assayed and put into practice to eliminate or to diminish bacterial contamination of *in vitro* culture in cells and plant tissues, none has been completely effective. In the present research the aim was to find effective methods to prevent and to control the bacterial contamination of *in vitro* culture of sugarcane. The culture media for the *in vitro* plant multiplication was modified by adding nutritive substances in order to evaluate its effect on bacterial contamination percent and its phytotoxicity on *in vitro* plants. It was also evaluated the effect of modification of the initial pH of the *in vitro* plant culture medium and bacterial contaminants. It was proved that it is possible, without damaging the *in vitro* plant, to increase the growing of bacterial contaminants by adding coconut water (100.0 ml.l<sup>-1</sup>) or yeast extract (250.0 mg.l<sup>-1</sup>) to the culture medium of multiplication of the sugarcane. The use of the initial pH 6.5 favors the early appearance of bacterial contaminants detecting them since the first 24 hours without a negative effect to the *in vitro* plant. Evaluating these results a working strategy was set for the prevention and control of bacterial contamination in sugarcane micropropagation by applying early detection methods.

Key words: bacteria, coconut water, *Saccharum* spp. hybrid, yeast extract

### INTRODUCCIÓN

La contaminación por microorganismos es la causa más importante de pérdidas en laboratorios comerciales y de investigación de cultivo de células y tejidos vegetales (Leifert y Cassells, 2001). Sin embargo, en las compañías comerciales la severidad e implicaciones del problema no se reconocen o admiten y muchos laboratorios científicos dejan de registrar los índices de contaminación. Los laboratorios para la micropropagación comercial de plantas a menudo solo reconocen las fuentes de introducción de microorganismos después que han ocurrido grandes pérdidas. La incapacidad de

reducirlas a un nivel que permita un rendimiento productivo predecible y se revierta en calidad de las plantas micropropagadas llevó, al menos parcialmente, a una disminución seria del número de estos en la década de los 90 (Leifert y Woodward, 1998).

Una amplia variedad de microorganismos (hongos filamentosos, levaduras, bacterias, virus y viroides) patógenos o no de las plantas cultivadas en condiciones naturales han sido identificados como contaminantes *in vitro*. Los mismos pueden ser introducidos con el explante inicial, durante las manipulaciones en el laboratorio o por

microartrópodos (Leifert y Cassells, 2001). Entre ellos, las bacterias han sido consideradas como las que causan los daños más serios. Algunas especies tienen la capacidad de manifestar crecimiento en los medios de cultivo inmediatamente, pero otras permanecen latentes por largos períodos de tiempo en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y después que han incrementado su número en el interior del tejido vegetal o las condiciones del ecosistema *in vitro* lo permiten, aparecen súbitamente (Cassells, 1991; George, 1993) y pueden conllevar a pérdidas de más del 20.0% (Leifert *et al.*, 1994).

El cultivo *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) no está exento de las afectaciones producidas por contaminantes microbianos y dentro de estos por las bacterias. Según Taylor (1997) la contaminación por microorganismos saprofitos es el mayor problema que atenta contra el éxito del cultivo de tejidos en las especies del género *Saccharum*. En Cuba, solo se tienen referencias de los estudios realizados por González *et al.* (1997) y Díaz *et al.* (1998).

En la lucha por prevenir o eliminar la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales se han ensayado y puesto en práctica diferentes alternativas. No obstante, los métodos para eliminar los microorganismos y mantener los cultivos libres de contaminantes no son aún satisfactorios. Se requiere de estudios que profundicen en el conocimiento de las poblaciones de bacterias contaminantes en los ecosistemas *in vitro*, en sus características y funciones para trazar estrategias de prevención y control más eficientes (Herman, 1996).

Teniendo en cuenta las razones expuestas anteriormente se definió como objetivo de trabajo evaluar métodos para la prevención y el control de la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de caña de azúcar.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Vegetal

Las plantas *in vitro* de caña de azúcar, variedad C 87-51 procedentes del Banco de Germoplasma *in vitro* y de la Biofábrica del Instituto de Biotecnología de las Plantas. Las mismas fueron sometidas a tratamiento por 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).

### Procesamiento estadístico de los datos

El procesamiento estadístico de los datos de las variables estudiadas se realizó con el paquete estadístico Statistic Package for Social Science

(SPSS) versión 8.1 para Windows. Los datos de las variables evaluadas (peso fresco, número de brotes y porcentaje de supervivencia) se analizaron por medio de un ANOVA de clasificación simple y las diferencias entre las medias se procesaron a través de la prueba de rangos múltiples de Duncan, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

## Detección temprana por modificaciones del medio de cultivo para la multiplicación de plantas *in vitro*

### Adición de sustancias nutritivas

El medio de cultivo para la multiplicación de las plantas *in vitro* se modificó mediante la adición de sustancias nutritivas que pueden promover el crecimiento de las bacterias contaminantes y facilitar su detección temprana. Para evaluar su efecto sobre el porcentaje de contaminación por bacterias y su fitotoxicidad sobre las plantas *in vitro* se desarrolló el ensayo que se describe a continuación.

Se tomaron líneas de plantas *in vitro* en Fase de Multiplicación, con cinco subcultivos, que durante todos los anteriores habían sido sometidas a la detección de contaminantes bacterianos por el método de siembra de fragmentos de tejido vegetal en medios de cultivo bacteriológicos (Knauss, 1976; Leifert *et al.*, 1994). Se seleccionaron plantas *in vitro* libres de contaminantes bacterianos detectables (PLC) y plantas *in vitro* contaminadas (positivas en la prueba de detección) sin manifestación de crecimiento bacteriano en el medio de cultivo para la Fase de Multiplicación (PC).

Se incluyeron en este estudio las siguientes sustancias: a) Peptona Bacteriológica y Extracto de Levadura (BioCen) (Boxus y Terzi, 1988 y George, 1993), b) Caldo Triptona Soya (BioCen) (Leifert *et al.*, 1994) y c) Agua de Coco (Norman y Alvarez, 1994). Las mismas se ensayaron a concentraciones recomendadas en la literatura.

Como medio de cultivo basal se utilizó el medio para la multiplicación de las plantas *in vitro* (MSM) (Jiménez *et al.*, 1997).

### Tratamientos:

- MSM + Peptona Bacteriológica 250.0 mg.l<sup>-1</sup>
- MSM + Extracto de Levadura 250.0 mg.l<sup>-1</sup>
- MSM + Caldo Triptona Soya 4.0 g.l<sup>-1</sup>
- MSM + Agua de Coco 100.0 ml.l<sup>-1</sup>
- MSM (Control)

Los medios de cultivo correspondientes a cada tratamiento se distribuyeron en tubos de ensayo (145.0 x 25.0 mm) a razón de 15.0 ml y se colocaron brotes individuales en cada uno. Se utilizaron 15 PLC y 15 PC como repeticiones, por tratamiento.

Posteriormente se incubaron en cámara de crecimiento con luz solar y temperatura entre 26-28 °C durante tres semanas. Al finalizar ese período se evaluó, por observación visual, el porcentaje de contaminación bacteriana y se determinó el peso fresco (g), el número de brotes por planta *in vitro* y cualitativamente se describieron el color y el vigor de las mismas. Teniendo en cuenta los resultados se seleccionaron las sustancias que promovían en mayor cuantía el crecimiento bacteriano sobre el medio de cultivo de las plantas *in vitro* y que no influían negativamente sobre ellas.

### Modificación del pH inicial del medio de cultivo

Este experimento se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de la modificación del pH inicial del medio de cultivo sobre las plantas *in vitro* y sobre bacterias contaminantes aisladas de las Fases de Multiplicación y Enraizamiento de la micropropagación de la caña de azúcar, para su posible uso en la prevención de la contaminación bacteriana.

### Plantas *in vitro*

Las plantas *in vitro* que se emplearon estaban libres de contaminantes bacterianos detectables por el método de siembra de fragmentos de tejido vegetal en medios de cultivo bacteriológico (Knauss, 1976; Leifert *et al.*, 1994). Se establecieron como tratamientos los siguientes pH iniciales: 3.5; 4.5; 5.6 (control); 6.5 y 7.4 en medio de cultivo para la multiplicación de las plantas *in vitro* (Jiménez *et al.*, 1997) líquido con las sales MS al 75.0 % que se distribuyeron a razón de 60.0 ml en los recipientes de cultivo. En cada uno se colocaron 20 brotes individuales y se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Los mismos se cultivaron durante tres semanas a una temperatura entre 26-28 °C en cámaras de crecimiento con luz solar. Al final de este período las plantas *in vitro* fueron examinadas para determinar el porcentaje de supervivencia, el peso fresco (g), el número de brotes por cada una y cualitativamente se describieron el color y el vigor de las mismas.

### Bacterias

Similares tratamientos fueron empleados para evaluar el efecto del pH inicial sobre seis cepas de especies bacterianas aisladas en las Fases de Multiplicación (CCIBP-M72, *Stenotrophomonas maltophilia*; CCIBP-M65, *Bacillus pumilus*; CCIBP-M27, *Bacillus subtilis*; CCIBP-M29 y *Ochrobactrum anthropi*) y dos en la Fase de Enraizamiento (CCIBP-Er8, *Enterobacter cloacae* y CCIBP-Er35, *Bacillus pumilus*) en los medios de cultivo para la multiplicación y el enraizamiento de las plantas *in vitro* (Jiménez *et al.*, 1997). Los mismos se distribuyeron en placas de Petri de 90.0 mm de diámetro.

Se realizaron suspensiones bacterianas individuales en solución salina (0.9%) a partir de colonias aisladas, crecidas en Agar Triptona Soya (BioCen) por 18-20 horas y para ello se empleó el método de suspensión directa de las mismas acorde a lo descrito por Jorgensen *et al.* (1993). Cada suspensión se ajustó al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland (aproximadamente  $1-2 \cdot 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup>).

Posteriormente se diluyeron 1:10 y de cada uno se colocaron 150.0 µl en pocillos de placas ELISA y se aplicaron sobre la superficie del agar con una pipeta multicanal (FINNPIPETTE) a razón de 3.5 µl por cepa (para una concentración final de aproximadamente  $10^4$  ufc.ml<sup>-1</sup>). La suspensión fue utilizada dentro de los 15 min siguientes a partir de su preparación.

Como controles se emplearon placas de Petri con Agar Triptona Soya (ATS) y cada tratamiento se repitió tres veces. Se evaluó el crecimiento o no de las cepas a las 24, 48 y 120 h de incubación a 30°C y se registró siguiendo el criterio de: (+) Crecimiento sobre el sitio de inoculación (-) Ausencia total de crecimiento sobre el sitio de inoculación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Detección temprana por modificaciones del medio de cultivo para la multiplicación de plantas *in vitro*

#### Adición de sustancias nutritivas

La adición de Caldo Triptona Soya, Peptona Bacteriológica, Extracto de Levadura y Agua de Coco al medio de cultivo para la multiplicación de las plantas *in vitro* (MSM), en presencia de estas, favoreció la expresión del crecimiento bacteriano el cual se incrementó entre un 40.0 % y un 93.0 % (Tabla 1).

Similares resultados obtuvieron Boxus y Terzi (1987) quienes, utilizando Extracto de Levadura (88.0 mg.l<sup>-1</sup>) y Peptona Bacteriológica (265.0 mg.l<sup>-1</sup>), lograron incrementar la expresión del crecimiento bacteriano en la multiplicación *in vitro* de frutales. Leifert y Waites (1992) recomendaron agregar Caldo Triptona Soya (4.0 g.l<sup>-1</sup>) al medio de cultivo para la multiplicación de *Delphinium* y *Hemerocallis* para favorecer el crecimiento de los contaminantes. Así mismo, Norman y Alvarez (1994) utilizando Agua de Coco incrementaron la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* en el cultivo *in vitro* de *Anthurium*. Al hacer un análisis del efecto fitotóxico de las sustancias utilizadas sobre las plantas *in vitro* se obtuvo que en las que estaban libres de contaminantes bacterianos detectables (PLC), excepto el Agua de Coco y el Extracto de Levadura, el resto redujeron el vigor y provocaron clorosis a las concentraciones empleadas. Con respecto a la variable peso fresco se constató que

las dos sustancias anteriores, así como la Peptona Bacteriológica, no produjeron afectaciones significativas. Sin embargo, esta última fue la única

que redujo significativamente el número de brotes por planta (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la adición de sustancias nutritivas en el medio de cultivo para la multiplicación de la caña de azúcar sobre la manifestación del crecimiento bacteriano y sobre las plantas *in vitro*.

Tratamientos	Porcentaje de contaminación	Peso fresco (g)		Número de brotes por planta	
	PC	PC	PLC	PC	PLC
MSM+PB	53.3 <sup>b</sup>	0.63 <sup>a</sup>	0.65 <sup>ab</sup>	3.53 <sup>a</sup>	2.60 <sup>b</sup>
MSM+EL	100.0 <sup>a</sup>	0.58 <sup>a</sup>	0.67 <sup>ab</sup>	2.67 <sup>b</sup>	2.93 <sup>ab</sup>
MSM+CTS	46.7 <sup>b</sup>	0.38 <sup>b</sup>	0.57 <sup>c</sup>	2.80 <sup>b</sup>	3.67 <sup>ab</sup>
MSM+AC	53.3 <sup>b</sup>	0.56 <sup>a</sup>	0.79 <sup>ab</sup>	3.20 <sup>a</sup>	4.33 <sup>a</sup>
MSM	6.7 <sup>c</sup>	0.43 <sup>b</sup>	0.93 <sup>a</sup>	2.73 <sup>b</sup>	4.40 <sup>a</sup>
EE		± 0.05	± 0.10	± 0.34	± 0.57

PB- Peptona Bacteriológica 250.0 mg.l<sup>-1</sup>, EL- Extracto de Levadura 250.0 mg.l<sup>-1</sup>, CTS- Caldo Triptona Soya 4.0 g.l<sup>-1</sup>, AC- Agua de Coco 100.0 ml.l<sup>-1</sup>. PC Plantas *in vitro* contaminadas sin manifestación de crecimiento bacteriano en el medio de cultivo, PLC Plantas *in vitro* libres de contaminantes bacterianos detectables. MSM- Medio de cultivo para la multiplicación de las plantas *in vitro*. Medias con letras no coincidentes en una columna difieren entre sí según la prueba de rangos múltiples de Duncan (P<0.05). EE- error estándar. n =15.

Por estas razones, se pudiera considerar que la adición al medio de cultivo para la multiplicación de las plantas *in vitro* de Agua de Coco (100.0 ml.l<sup>-1</sup>) o Extracto de Levadura (250.0 mg.l<sup>-1</sup>) pudiera convertirse en un método apropiado para la detección de contaminantes bacterianos en plantas *in vitro* de caña de azúcar durante la Fase de Multiplicación. Tiene entre sus ventajas, que es fácil de aplicar, no adiciona otras operaciones en el proceso de micropropagación ya que estas sustancias se añaden al medio de cultivo en el momento de su preparación y puede utilizarse en varios subcultivos. Además, favorece el crecimiento rápido de los contaminantes, puede ser interpretado sin dificultad y no produce efectos negativos para el material vegetal.

La incorporación de componentes de medios de cultivo bacteriológicos a los medios de cultivo de las plantas *in vitro* para permitir la manifestación del crecimiento bacteriano sobre estos constituye una opción que permite conocer el estado de todas las plantas con respecto a la presencia de contaminantes bacterianos, siempre y cuando estas sustancias no tengan un efecto fitotóxico. Este proceder no interfiere los procesos de subcultivo del material vegetal. Sin embargo, la detección temprana de contaminantes bacterianos no resulta totalmente factible en la Fase de Establecimiento ya que los residuos de desinfectantes o la presencia de compuestos fenólicos pueden inhibir el crecimiento bacteriano e introducir errores en los resultados (Leifert *et al.*, 1994). Después de lograr el establecimiento de las plantas *in vitro* en el primer subcultivo a multiplicación se pueden comenzar a utilizar los métodos de detección. Siempre se recomienda emplear más de uno (Cassells, 1991, George, 1993).

## Modificación del pH inicial del medio de cultivo

### Plantas *in vitro*

Las modificaciones del pH inicial del medio de cultivo provocaron una disminución significativa del peso fresco por planta *in vitro* en los pH extremos (3.5 y 7.4) con respecto al control. Este último pH también ocasionó una reducción significativa del número de brotes. Los porcentajes de supervivencia no sufrieron alteraciones en ninguno de los tratamientos (Tabla 2).

Las plantas *in vitro* en los tratamientos donde el pH inicial se situó en 3.5, 4.5 y 7.4 mostraron menor vigor y clorosis. Se apreció también la presencia de plantas con brotes pequeños y finos.

Estos resultados coincidieron con los descritos por Leifert *et al.* (1992) quienes encontraron reducciones en los coeficientes de multiplicación de plantas *in vitro* que crecían en medios de cultivo a los cuales el pH inicial se le había ajustado en valores entre 3.0 y 3.5 (del 9.0 % en *Iris*, 10.0 % en *Hosta* y 35.0 % en *Photinia*).

De igual forma Toledo y Pereira (1998) al evaluar el efecto de pH bajos (4.0; 5.0) sobre plantas *in vitro* de caña de azúcar de la variedad SP 801816 hallaron afectaciones en el crecimiento que se manifestaron en disminución del peso seco y alteraciones en la actividad de las enzimas peroxidadas, el contenido de proteínas y azúcares reductores.

Según Leifert *et al.* (1994) a pH por encima de siete los mecanismos de toma de nutrientes de

las plantas a través de las bombas de protones pueden ser inhibidos, además, muchos de ellos

comienzan a precipitar en el medio de cultivo y no pueden ser utilizados.

Tabla 2. Efecto del pH inicial sobre plantas *in vitro* de caña de azúcar var. Cuba 87-51 en la Fase de Multiplicación.

Tratamiento	Supervivencia (%)	Peso fresco (g)	No. de brotes por planta
pH 3.5	96.67	0.67 <sup>b</sup>	3.45 <sup>a</sup>
pH 4.5	98.31	0.75 <sup>ab</sup>	3.18 <sup>a</sup>
pH 5.6 (Control)	100.0	0.80 <sup>a</sup>	3.30 <sup>a</sup>
pH 6.5	98.33	0.80 <sup>a</sup>	3.05 <sup>a</sup>
pH 7.4	98.33	0.63 <sup>b</sup>	2.41 <sup>b</sup>
EE		± 0.04	± 0.20

EE- Error estándar. n =60 en cada tratamiento. Medias con letras no coincidentes en una columna difieren entre sí según la prueba de rangos múltiples de Duncan (P<0.05).

### Bacterias

Se determinó que el pH inicial del medio de cultivo de las plantas influyó sobre el crecimiento de las bacterias contaminantes. Los caracteres culturales del crecimiento bacteriano sobre los sitios de inoculación se vieron afectados. El crecimiento fue escaso como finas películas solo distinguibles a trasluz. La mayoría de las cepas resultaron sensibles

a los pH iniciales más bajos que se probaron (pH 3.5 y 4.5) en las primeras 48 h de incubación. Se mantuvieron como excepción *O. anthropi* (CCIBP-M29) y *E. cloacae* (CCIBP-Er8) que desde las 24 h ya exhibían crecimiento visible en todos los tratamientos (Tabla 3). A las 120 horas el resto de las cepas comenzaban a mostrar un escaso crecimiento denotando su capacidad de adaptarse también a estas condiciones de pH bajo.

Tabla 3. Comportamiento individual de cepas de diferentes especies de bacterias contaminantes en los medios de cultivo para la multiplicación (MSM) y el enraizamiento (MSE) de las plantas *in vitro* de caña de azúcar con diferentes pH a las 48h de incubación.

Especies	Cepas	pH					Control
		3.5	4.5	5.6	6.5	7.4	ATS
Crecimiento en MSM							
<i>S. maltophilia</i>	CCIBP-M72	-	-	+	+	+	+
<i>B. pumilus</i>	CCIBP-M65	-	-	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	CCIBP-M27	-	+	+	+	+	+
<i>O. anthropi</i>	CCIBP-M29	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en MSE							
<i>Bacillus pumilus</i>	CCIBP-Er35	-	-	-	+	+	+
<i>E. cloacae</i>	CCIBP-Er8	+	+	+	+	+	+

(+) crecimiento, (-) ausencia total de crecimiento ATS – Agar Triptona Soya, MSM- Medio de cultivo para la multiplicación de las plantas *in vitro*, MSE – Medio de cultivo para el enraizamiento de las plantas *in vitro* (Jiménez *et al.*, 1997).

Leifert *et al.* (1994) inocularon diferentes bacterias contaminantes aisladas de cultivos de *Delphinium* en el medio de cultivo de esta planta con pH 3.5 y encontraron que la mayoría fueron extremadamente sensibles al tratamiento ácido. Ello les indicó que las bacterias contaminantes de este cultivo podían ser eliminadas si disminuían el pH del medio de cultivo.

Cuando el pH se ajustó a 5.6 (pH de los medios de cultivo para la multiplicación y el enraizamiento

de las plantas *in vitro*) a partir de las 48 horas comenzó a observarse un ligero crecimiento sobre los sitios de inoculación, sin embargo, en presencia de los pH 6.5 y 7.4 todas las cepas crecieron desde las primeras 24 h. Teniendo en cuenta este resultado, el incremento del pH hasta valores por encima de 6.5 pudiera ser usado para facilitar la manifestación de la contaminación bacteriana en el medio de cultivo y emplearse como un método de detección temprana en la micropropagación de la caña de azúcar.

Leifert y Waites (1992) consideraron que el pH podía ser uno de los factores responsables por la presencia de distintas comunidades de bacterias sobre diferentes especies de plantas *in vitro* aunque parecía improbable que fuera el único. Ellos comprobaron que las plantas pueden hacer variar el pH inicial de los medios de cultivo de 5.5-5.8 a valores que van desde 3.8 a 6.3 durante su crecimiento y esto puede contribuir o inhibir el desarrollo de las bacterias o ejercer un efecto selectivo sobre los grupos bacterianos que pueden crecer en estos medios.

Un análisis en conjunto de los resultados de las plantas *in vitro* y las bacterias permitió seleccionar al pH inicial 6.5 para la detección temprana de contaminantes bacterianos, ya que favoreció el crecimiento de estos desde las 24h y no tuvo un efecto negativo para las plantas *in vitro*. Ello da la posibilidad de utilizarlo para la prevención de la contaminación por bacterias en la micropropagación de la caña de azúcar al eliminar las líneas de plantas *in vitro* contaminadas desde los primeros subcultivos donde el número de plantas es menor.

Con igual fin Reed *et al.* (1995) utilizaron el aumento del pH como una alternativa para la detección temprana de contaminantes bacterianos en varios genotipos de Menta (*Mentha* spp.) y lo ajustaron a 6.9 en medio de cultivo MS líquido con las sales al 50.0 %. Con este método consiguieron disminuir las pérdidas por la aparición súbita de las bacterias en el proceso de micropropagación que no pudieron ser detectadas en el medio estándar para el cultivo de las plantas (Sales MS 100.0 %, pH 5.6).

A partir de los resultados anteriores y teniendo en cuenta el esquemas de trabajo propuesto por Jiménez *et al.* (1997) para la micropropagación de la caña de azúcar se insertaron en cada una de las fases medidas que conformaron la estrategia de trabajo para la prevención y el control de la contaminación bacteriana. La misma se basó en: registro de la incidencia de contaminantes bacterianos, identificación de los principales contaminantes y detección temprana sistemática (Adición de agua de coco 100 ml.l<sup>-1</sup> o Extracto de Levadura 250 mg.l<sup>-1</sup> al medio de cultivo para la multiplicación de plantas *in vitro* o incremento del pH inicial del mismo a 6.5 en todos los subcultivos de multiplicación desde el primero hasta el cuarto) para solo propagar materiales vegetales libres de contaminantes detectables.

El enfrentamiento a la contaminación bacteriana es posible con un conocimiento profundo de los contaminantes bacterianos que inciden en el cultivo y el uso combinado de métodos de control que contribuyan a la aplicación de medidas preventivas más que curativas.

Esta estrategia puede ser aplicada a otros cultivos siempre que se conozcan las especies de bacterias contaminantes que inciden en los mismos.

## REFERENCIAS

- Boxus, PH y Terzi JM (1987) Big losses due to bacterial contamination can be avoided in mass propagation scheme. *Acta.Hort.* 212: 91-93
- Cassells, AC (1991) Problem in tissue culture: culture contamination. En: Debergh P. y Zimmerman RH. (Eds), *Micropropagation*, pp. 31-45. Kluwer Academic Publishers, 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
- 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 Consultants, 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
- 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
- Jorgensen, JH, Cleeland R, Craig WA y Doern G (1993) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically-Third Edition; Approved Standard*. En: NCCLS document M7-A3. Vol. 13 No 25. NCCLS, Villanova
- Knauss, JF (1976) A tissue culture method for producing *Dieffenbachia picta* cv " Prefection " free of fungi and bacterial. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 89: 293- 296
- 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, Morris CE y Waites WM (1994) 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
- Norman, DJ y Alvarez, AM (1994) Latent infections of *in vitro* *Anthurium* caused by *Xanthomonas campestris* pv *dieffenbachiae*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 39: 55- 61
- 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
- Reed, B, Buckley PM y DeWilde TN (1995) Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 31: 53-57
- Taylor, PWJ (1997) Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). En: YPS Bajaj (Ed) *Biototechnology in Agriculture and forestry*. Vol 39 Hight Tech and Micropropagation. V. Springer, pp 256-271. Berlin