

## Control de la contaminación bacteriana en la semilla artificial de caña de azúcar a través de métodos de detección temprana

Yelenys Alvarado Capó\*, Nayanci Portal, Leyanis García Aguila, Yudith Martínez, Marisol Freire Seijo, Elisa Quiala, Tatiana Pichardo, Idalia Herrera. \* Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5½ Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e.mail yalvarado@uclv.etcscs.cu

### RESUMEN

Los estudios para el establecimiento de la tecnología de la semilla artificial en caña de azúcar (*Saccharum spp* híbrido) no han estado exentos de las afectaciones producidas por la contaminación bacteriana, principalmente en los estadios previos a la encapsulación de los embriones somáticos. Este trabajo tuvo como objetivo el control de la contaminación en líneas de plantas *in vitro*, callos y suspensiones celulares (variedad Cuba 87-51) que se utilizarían para obtener semillas artificiales de este cultivo. Para ello se emplearon dos métodos de detección temprana: siembra de fragmentos de tejido vegetal en medios de cultivo bacteriológicos y observación al microscopio óptico. Los mismos permitieron controlar la contaminación bacteriana antes de que se expresara en los medios de cultivo y garantizó que los materiales vegetales empleados para formar embriones somáticos de caña de azúcar estuvieran libres de contaminantes detectables.

Palabras clave: bacterias, callos, micropropagación, microscopía, suspensiones celulares

### ABSTRACT

The studies for establishment of artificial seed technology in sugarcane (*Saccharum spp* híbrido) have not been free of damage produced by bacterial contaminations, principally in the stage before somatic embryos encapsulation. The aim of this paper was the control of bacterial contamination on *in vitro* plant lines, callus and cell suspensions (var Cuba 87-51) that will be used for obtained artificial seed is this crop. For these purpose two methods for early detection of bacterial contamination were used: transfer plant material onto bacteriological media and microscopic observation. These methods permitted bacterial contamination control before bacterial growth expressing on the media and guaranteed that plant material utilized for sugarcane somatic embryos formed were free of detectable contaminants.

Key words: bacteria, callus, cell suspension, micropropagation, microscopy

De forma general la contaminación bacteriana continúa siendo una de las principales causas de pérdidas en el cultivo de tejidos vegetales y la que ocasiona los daños más serios porque las bacterias pueden ser sistémicas y su detección es más difícil (George, 1993; Leifert *et al.*, 1994). Numerosos géneros que han sido encontrados asociados a las plantas *in vivo* epifítica o endofíticamente se refieren frecuentemente como contaminantes *in vitro*. Estas bacterias pueden escapar al efecto de los desinfectantes y se introducen al cultivo *in vitro* con el explante inicial. Algunas especies tienen la capacidad de expresarse en el medio de cultivo de las plantas pero otras permanecen latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y así quedan protegidos de los agentes químicos. A través de este mecanismo se propagan con el material vegetal y no se observa crecimiento bacteriano sobre el medio de cultivo por largos períodos de tiempo debido a la inhibición ocasionada por las altas concentraciones de sales, la sacarosa o el pH y solo se manifiestan en condiciones de estrés (Cassells, 1991; George, 1993).

La caña de azúcar (*Saccharum spp* híbrido) es un cultivo de gran importancia económica para muchos países. La incorporación de técnicas biotecnológicas novedosas tales como la embriogénesis somática (Ho y Vasil, 1983) y los sistemas de inmersión temporal (Lorenzo *et al.*, 1998) junto a la micropropagación tradicional han contribuido a incrementar su productividad e introducir nuevas variedades a la producción comercial. No obstante, su cultivo *in vitro* no está exento de las afectaciones producidas por contaminantes microbianos y dentro de estos por las bacterias. Este es el mayor problema que atenta contra el éxito del cultivo de tejidos en las especies del género *Saccharum* (Taylor, 1997).

Desde que el concepto teórico original de semilla sintética (semilla artificial) fue propuesto por Murashige (1977), esta tecnología usando embriones somáticos ha sido desarrollada en especies como alfalfa (Fujji *et al.*, 1989), zanahoria (Molle *et al.*, 1993), abeto (Robert *et al.*, 1993) y apio (Janick *et al.*, 1993) entre otros. Los estudios para su establecimiento en la caña de azúcar

han sido llevados a cabo por investigadores cubanos (Quiala *et al.*, 1997; Tapia *et al.*, 1998) y la contaminación bacteriana también ha producido afectaciones principalmente en los estadios previos a la encapsulación de los embriones somáticos.

Por las ventajas que reviste contar con esta tecnología para la propagación de dicha especie vegetal, de gran importancia económica para el país, este trabajo tuvo como objetivo el control de la contaminación en líneas de plantas *in vitro*, callos y suspensiones celulares que servirían como material vegetal de partida para obtener semillas artificiales de caña de azúcar.

Se empleó la variedad de caña de azúcar Cuba 87-51 y los ensayos se realizaron con:

- líneas de plantas *in vitro* (en fase de multiplicación) saneadas por electroterapia (Hernández *et al.*, 1997), propagadas según la metodología propuesta por Jiménez (1995) y diagnosticadas como libres de patógenos sistémicos (Peralta, 1997).
- callos con estructuras embriogénicas formados a partir segmentos de hojas inmaduras de plantas de campo (Freire, 1998).
- suspensiones celulares establecidas a partir de callos con estructuras embriogénicas (establecidos a partir de segmentos de hojas inmaduras de plantas de campo o segmentos de la vaina de hojas enrolladas de plantas *in vitro* (Freire, 1998).

Para el control de la contaminación bacteriana se emplearon dos métodos de detección temprana: siembra de fragmentos de tejido vegetal en medios de cultivo bacteriológicos (Knauss, 1976, Leifert *et al.*, 1994) y observación al microscopio óptico. Los contaminantes bacterianos detectados no fueron identificados.

### **Siembra de fragmentos de tejido vegetal en medios de cultivo bacteriológicos**

A partir de resultados de ensayos preliminares se empleó el medio de cultivo Agar Wilbrink (g. l<sup>-1</sup>: Peptona bacteriológica 5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5, NaSO<sub>3</sub> 0.05, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25, sacarosa 20, agar 20, pH 7.4). Se tomaron discos de tejido vegetal de la base de las plantas *in vitro* así como pequeños fragmentos de callos (aprox. 5mm de diámetro) que se dispusieron en la superficie del medio de cultivo en placas de Petri a razón de tres fragmentos por muestra. Las placas se incubaron a la oscuridad a 30°C hasta dos semanas. Fueron examinadas 208 muestras de callos y 125 de plantas *in vitro* en fase de multiplicación (Fase II).

El crecimiento bacteriano se observó alrededor de los fragmentos de tejido, principalmente en las áreas donde se realizaron los cortes. El mismo se distinguió por la

coloración blanquecina, amarilla, rosada o morada. La textura varió de aguachenta a cremosa. Con respecto a las propiedades ópticas se observaron crecimientos transparentes, brillantes u opacos.

Se comprobó que este método puede ser utilizado para la detección de contaminantes del cultivo *in vitro* de la caña de azúcar antes de que se expresen en el medio de cultivo (Tabla 1). Además es fácil de realizar favorece el crecimiento de los posibles contaminantes y puede ser interpretado sin dificultad.

El resultado del análisis corroboró la mayor calidad fitosanitaria que poseen las plantas propagadas *in vitro* (92% libres de contaminantes detectables) sobre los callos formados a partir de material vegetal de campo (78.32%). Además permitió desechar para el establecimiento de las suspensiones celulares las líneas de plantas y callos que presentaban contaminantes.

La detección temprana de los contaminantes bacterianos contribuye notablemente a su control y por tanto a disminuir las pérdidas *in vitro*. Este es uno de los métodos más usados ya que permite el crecimiento de un gran número de representantes bacterianos y aunque algunas especies tienen requerimientos específicos se obtienen buenos resultados utilizando dos o tres medios de cultivo (Leifert *et al.*, 1994; Reed *et al.*, 1995 y Borrás *et al.*, 1996).

### **Observación al microscopio óptico**

Se examinaron muestras de suspensiones celulares con el objetivo de determinar al microscopio óptico (OLYMPUS) si presentaban contaminación por bacterias. De ellas 330 procedían de callos formados a partir de segmentos de hojas inmaduras de plantas de campo y 148 de segmentos de la vaina de hojas de plantas propagadas *in vitro*. Se realizaron preparaciones sobre portaobjetos con agua destilada estéril o se observaron directamente alícuotas de las suspensiones celulares al microscopio óptico con los objetivos de 40x y 100x.

El uso del microscopio óptico en el análisis de suspensiones celulares resultó una herramienta de trabajo útil y sencilla. Se logró discriminar entre las suspensiones que estaban contaminadas y las que no (Tabla 1). Es un método no destructivo, rápido y requiere de pequeñas cantidades de muestras. Se aplicó en el momento del subcultivo de las suspensiones o en los cambios de medio de cultivo. Para ello solo se utilizó el medio que normalmente se desecha. Esto permitió continuar trabajando solo con aquellas suspensiones en las cuales no se observaron células bacterianas.

Tabla 1. Detección de contaminantes bacterianos en callos y plantas *in vitro* de caña de azúcar var. C87-51.

Método de detección	Material vegetal	No. de muestras analizadas	Porcentaje de muestras sin contaminantes detectables
Siembra de fragmentos de tejido vegetal en medios de cultivo bacteriológicos	Callos	208	78.32
	Plantas <i>in vitro</i>	125	92.00
Observación al microscopio óptico	Suspensiones celulares <sup>1</sup>	330	64.04
	Suspensiones celulares <sup>2</sup>	148	94.29

<sup>1</sup>Suspensiones procedentes de callos con estructuras embriogénicas establecidos a partir de segmentos de hojas inmaduras de plantas de campo.

<sup>2</sup>Suspensiones establecidas a partir de segmentos de la vaina hojas enrolladas de plantas *in vitro*.

Las bacterias comúnmente encontradas presentaban morfología bacilar y motilidad. Se observaron solas o agrupadas formando parejas y cadenas alrededor de las células y agregados celulares de caña de azúcar. No obstante, en algunas ocasiones se apreciaron también cocos solos, en tétradas y racimos así como levaduras. La aparición de estos últimos refleja inadecuados procedimientos en el laboratorio (Leifert *et al.*, 1994).

Entre las características de las suspensiones celulares contaminadas se destacaron: aspecto viscoso o lechoso, turbidez en el medio de cultivo después de dejar sedimentar las células y en algunos casos fetidez. Se observaron diferentes grados de contaminación, no obstante, aún la presencia escasa de bacterias en el medio de cultivo alrededor de las células vegetales se registró como positiva.

Es significativo señalar que la turbidez en las suspensiones celulares no siempre fue sinónimo de contaminación por bacterias. Esto corroboró que el método de observación visual en este caso no resulta confiable. El análisis de las suspensiones al microscopio óptico resultó también una vía efectiva para detectar la contaminación por bacterias que en algunos casos pueden ser recalcitrantes al cultivo en el laboratorio.

Se comprobó además que el establecimiento de suspensiones celulares a partir de plantas *in vitro* (Freire, 1998) garantizó una disminución considerable de la contaminación bacteriana, en correspondencia con los resultados obtenidos por el método de siembra de fragmentos de tejido vegetal en medios de cultivo bacteriológicos.

Con los métodos utilizados se pudo controlar la contaminación bacteriana antes de que se expresara en los medios de cultivo, se desecharon las suspensiones celulares donde se observaron células

bacterianas y se garantizó que los materiales vegetales empleados para la obtención de embriones somáticos de caña de azúcar encapsulados estuvieran libres de contaminantes detectables.

Estos resultados corroboraron el criterio de Kunneman y Faaij-Groenen (1988) de que el control efectivo de la contaminación consiste en la detección de los contaminantes en las primeras fases y luego prevenir su diseminación a través del cultivo.

## REFERENCIAS

- Borrás, O, González R, Concepción O, Cid M, Nápoles L, Recio MI, Escalante D, Escalona M, Trujillo R y Borroto C (1996) Metodología para el control de las contaminaciones en el cultivo *in vitro* de plantas ornamentales. Cuadernos de Fitopatología 4:138-142
- Cassells, AC (1991) Problem in tissue culture: culture contamination. En: Debergh, P y Zimmerman RH (Eds) Micropropagation, pp. 31-45. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Freire, M (1998) Tesis para optar por el grado científico de Magister Scientiae en Biotecnología Vegetal Embriogénesis Somática en Caña de Azúcar.p.62
- Fujii, JA, Slade D y Redenbaugh K (1989) Maturation and greenhouse planting of alfalfa artificial seed. *In vitro* Cell Dev. Biol. 25:1179-1182
- George, EF (1993) Plant propagation by tissue culture. Chapter 5, Part1. 2<sup>nd</sup> Ed., pp. 130-143. Exergetics Ltd
- Hernández, R, Igarza Y, Gonzáles 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
- Janick, J, Kim YH, Kitto S y Saranga Y (1993) Desiccated synthetic seed. En: K Redenbaugh (Ed) Synseeds, pp 11-33, CRC Press. Boca Raton
- Jiménez, E (1995) Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido). Tesis de doctorado. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. 93p

- Knauss, JF (1976) A tissue culture methods for producing *Dieffenbachia picta* cv. Perfection free of fungi and bacteria. Proc. Fla. State Hort. Soc. 89:293-296
- Kunneman BPAM y Faaij-Groenen GPM (1988) Elimination of bacterial contaminants: a matter of detection and transplanting procedurs. Acta Hort. 225: 183-189
- 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
- Lorenzo, JC, Gonzalez 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
- Molle, F, Dupuis JM, Ducos JP, Anselm A, Crolus-Savidan I, Petiard V y Freyssinet G (1993) Carrot somatic embryogenesis and its application to synthetic seeds. En: K Redenbaugh (Ed) Synseeds, pp 257-287, CRC Press. Boca Raton
- Murashige, T (1977) Plant cell and organ cultures as horticultural practices. Acta Hort. 78:17-21
- Peralta, EL, Martínez B y González MC (1997) Control fitosanitario en el programa de micropropagación de caña de azúcar en Cuba. Libro de Resúmenes. Tercer Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal. Palacio de las Convenciones. p 75. Cuba
- Quiala, E, Jiménez E, de Feria M, Barbón R, Chávez M, Capote A (1997) Encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar (*Saccharum* sp.). Libro de Resúmenes. Técnicas de avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas. BIOVEG 97. Ciego de Avila. Cuba
- Reed, BM, Buckley PM y DeWilde TN (1995) Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated Mint plant. *In vitro* Cell. Dev. Biol. 31: 53-57
- Robert, DR, Webster FB, Flinn BS, Lazaroff WR y Cyr DR (1993) Somatic embryogenesis of Spruce. En: K Redenbaugh (Ed) Synseeds, pp 427-450, CRC Press. Boca Raton
- Tapia, R, Nieves N, Blanco MA, Castillo R y A. González (1998) Determinación de la capacidad de difusión de la matriz de alginato de sodio para la encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar. Libro de Resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, REDBIO 98. p 28.
- Taylor, PWJ (1997) *In vitro* germplasm conservation of sugarcane cultivars, basic sugarcane species and related genera. Plant Molecular Genetics and Germplasm Development Group: 243-256