

Incidencia de contaminantes microbianos en la propagación *in vitro* de *Xanthosoma* spp. clon 'INIVIT MX-2007' y *Colocasia esculenta* (L.) Schott. clon 'INIVIT MC-2012'

Yenisey Gutierrez Sánchez*, Yadenys Torres, Ania Robaina, Maricel Bauta, Ayme Rayas, Arletys Santos, Milagros Basail, Jorge López, Víctor Mederos, Yoel Beovides, Dayana Rodríguez. *Autora para correspondencia

Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Apdo. 6, Santo Domingo, Villa Clara. Cuba.
e-mail: contam.biotech@inivit.cu

RESUMEN

El trabajo se realizó con el objetivo de determinar la incidencia de contaminantes microbianos en dos clones de malanga ('INIVIT MX-2007' e 'INIVIT MC-2012') en las fases de establecimiento y multiplicación. Para esto se contabilizaron los frascos de cultivo contaminados y se determinó el porcentaje de contaminación microbiana por clon en cada subcultivo. Se aislaron los contaminantes diferentes y se caracterizaron morfológicamente y culturalmente. Se comprobó una alta incidencia de contaminantes microbianos en los dos clones de malanga. Las bacterias fueron las que causaron mayores afectaciones en las fases de establecimiento y multiplicación.

Palabras clave: bacterias, malanga, plantas *in vitro*

Incidence of microbial contaminants in *Xanthosoma* spp. clone 'INIVIT MX-2007' and *Colocasia esculenta* (L.) Schott clone 'INIVIT MC-2012' *in vitro* propagation

ABSTRACT

The work was conducted to determine the incidence of microbial contaminants in two clones of taro ('INIVIT MX-2007' and 'INIVIT MC-2012') on the establishment and multiplication stages. The contaminated culture vials were counted and the percentage of microbial contamination was determined by clone in each subculture. Different contaminants were isolated and characterized morphologically and culturally. A high incidence of microbial contaminants in the two taro clones was found. Bacteria caused the greatest damage in the establishment and multiplication stages.

Key words: bacteria, *in vitro* plants, taro

INTRODUCCIÓN

La malanga (*Xanthosoma* spp. y *Colocasia* spp.), es una de las viandas tropicales de mayor demanda y tiene gran importancia socioeconómica. La disponibilidad de material vegetal de siembra se ve limitada por carencia de semilla de calidad y por la incidencia de patógenos (Espinosa *et al.*, 2012). Las técnicas biotecnológicas han permitido proveer a los productores un material vegetal rejuvenecido y saneado, con alto potencial productivo. La propagación *in vitro* de este cultivo ha sido informada por varios autores (Chand y Pearson, 1998; García *et al.*, 1999; Goswami *et al.*, 2012; Gálvez *et al.*, 2013).

'INIVIT MX-2007' (*Xanthosoma* spp.) e 'INIVIT MC-2012' (*Colocasia esculenta*) son dos clones que tienen características agronómicas de gran interés para los productores y para el consumo. Por ello, se trabaja en su propagación *in vitro* en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Se ha informado previamente que la contaminación microbiana produce pérdidas considerables en el cultivo *in vitro* de malanga y que las bacterias son los contaminantes más frecuentes (Hernández *et al.*, 2005; Folgueras, 2006). Sin embargo, en estos dos clones no se tienen registros al respecto. Para poder establecer estrategias productivas a través de la propagación *in vitro* se requiere conocer las pérdidas ocasionadas por los microorganismos

en las diferentes fases de este proceso biológico e identificar las posibles fuentes de contaminación (Leifert *et al.*, 1994; Alvarado-Capó *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo determinar la incidencia de contaminantes microbianos en la propagación *in vitro* de en estos dos clones de malanga.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon plantas *in vitro* de *Xanthosoma* spp. clon 'INIVIT MX-2007' y *Colocasia esculenta* clon 'INIVIT MC-2012' en fases de establecimiento y multiplicación, establecidas a partir de yemas axilares de plantas donantes provenientes del Banco de Germoplasma del INIVIT, según lo descrito por García *et al.* (1999) y Gálvez *et al.* (2013).

Determinación de la incidencia de contaminantes microbianos

Para determinar la incidencia de contaminantes microbianos, cada 72 horas desde el establecimiento hasta el término del tercer subcultivo de multiplicación (subcultivos cada 21 días), se procedió a la revisión del material vegetal por observación visual. Se cuantificaron los recipientes de cultivo (tubos de ensayo o frascos de cultivo) donde se observó la presencia de crecimiento microbiano y se calculó el porcentaje de contaminación en cada subcultivo.

Aislamiento de bacterias

Los grupos microbianos presentes en los frascos contaminados se identificaron a través de observaciones microscópicas directas (aumento 400x). De los recipientes de cultivo donde se comprobó la presencia de bacterias se realizaron aislamientos por agotamiento por estrías en placas de Petri con medio de cultivo Agar Nutriente (BIOCEN) (AN). Las placas se incubaron a 30°C durante 24-72 horas. Se obtuvieron cultivos puros por resiembra en el mismo medio de cultivo. De los aislados con caracteres culturales diferentes (por observación en microscopio estereoscópico), se describieron caracteres morfológicos (forma y agrupación) (400x y 1000x) en

preparaciones microscópicas directas y teñidas (tinción simple y tinción de Gram).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la propagación *in vitro* de los clones 'INIVIT MX-2007' e 'INIVIT MC-2012' se constató la presencia de microorganismos contaminantes en todos los subcultivos (Figura 1). Estos ocasionaron cambios de coloración del medio de cultivo, opacidad o turbidez. En la fase de establecimiento se observó turbidez en el medio de cultivo líquido, con aspecto viscoso o lechoso mientras que en la fase de multiplicación el crecimiento microbiano se presentó principalmente dentro del medio de cultivo en la zona debajo de la base del explante (Figura 2a-c).

En la fase de establecimiento se comprobó la presencia de hongos filamentosos y bacterias, mientras que en la fase de multiplicación predominaron los contaminantes bacterianos. Especialmente las bacterias, causaron porcentajes de pérdidas elevados (hasta 65% en 'INIVIT MX-2007' y 93% en 'INIVIT MC-2012'), en los subcultivos de la fase de multiplicación. Los porcentajes de contaminación se incrementaron con el número de subcultivos, excepto en el tercer subcultivo del clon 'INIVIT MX-2007'. Estas observaciones indicaron que en estos materiales vegetales la contaminación microbiana puede provenir del explante inicial. Resultados similares han sido referidos por Hernández *et al.* (2005) y Folgueras (2006) también en el cultivo *in vitro* de malanga, pero con otros cultivares, donde las bacterias tuvieron una mayor incidencia con respecto a otros microorganismos contaminantes.

Las plantas tienen numerosos microorganismos asociados a sus tejidos que pueden aparecer como contaminantes cuando se cultivan *in vitro* y se conoce que a medida que se incrementa el número de subcultivos la presencia de contaminantes bacterianos puede ser mayor (Cassells y Leifert, 2001; Alvarado-Capó *et al.*, 2003). En el caso de estudio, la propagación *in vitro* de estos clones se inició a partir de yemas axilares (Rodríguez *et al.*, 2003; Gálvez *et al.*, 2013) de plantas donantes del Banco de Germoplasma y no habían sido sometidas exámenes para la detección

temprana de contaminantes microbianos (Santos *et al.*, 2005). Por ello, pudieron pasar inadvertidos a la observación visual. Este hecho ha sido comentado por autores como Thomas y Prakash (2004) en otros cultivos donde principalmente las bacterias asociadas al explante inicial se observaron creciendo sobre o en el medio de cultivo.

Se observaron frascos de cultivo contaminados donde los microorganismos afectaron el crecimiento del material vegetal pero en otros su presencia aparentemente no causaba daños. Autores como Thomas y Prakash (2004) han realizado observaciones similares y las atribuyen al tipo de microorganismo presente, su origen y la relación con el material vegetal y si modifican o no el medio de cultivo.

Se obtuvieron 18 aislados bacterianos de cada clon y fase de la propagación *in vitro* con caracteres culturales diferentes y morfología de cocos o bacilos. Predominaron las bacterias Gram (+) y la morfología bacilar. Se encontraron bacilos Gram (+) esporulados (Figura 3). En estudios precedentes, Carrazana *et al.* (2011) informaron de la presencia de bacterias de tipo bacilar, G+, esporógenas, bacilos G- y cocos G+ en el cultivo *in vitro* de *X. sagittifolium* L. Schot cv. México 08, el primero dependiente del tejido vegetal para crecer en el medio de cultivo y los últimos de origen ambiental. En este estudio no fue posible establecer el origen de cada uno de los aislados, aunque presumiblemente la mayoría se asocia al explante por la ubicación en el medio de cultivo siempre debajo de la base de este.

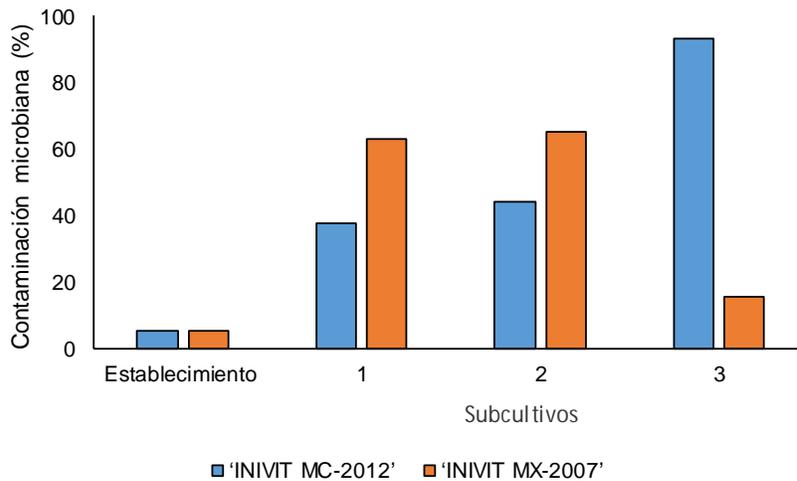


Figura 1. Incidencia de contaminantes microbianos en el establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Xanthosoma* spp. 'INIVIT MX-2007' y *Colocasia esculenta* 'INIVIT MC-2012'.

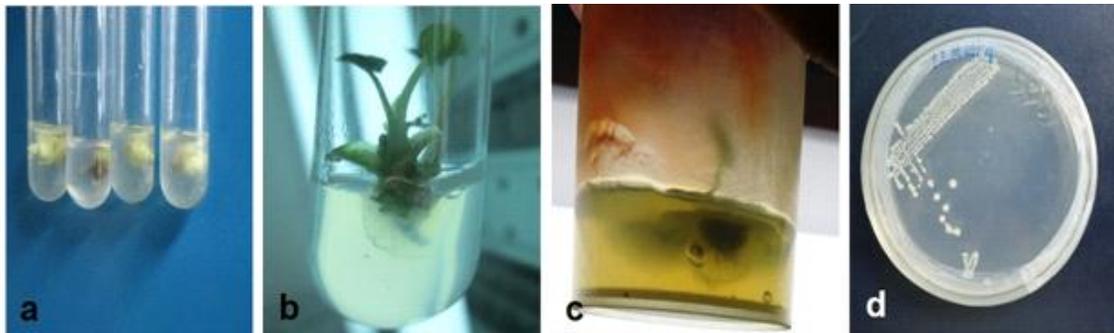


Figura 2. Contaminación microbiana en el establecimiento y multiplicación *in vitro* de malanga. a. Turbidez en el medio de cultivo de establecimiento, b. contaminación bacteriana debajo del explante en la fase de multiplicación, c. contaminación fúngica, d. colonias bacterianas en medio de cultivo Agar nutriente.

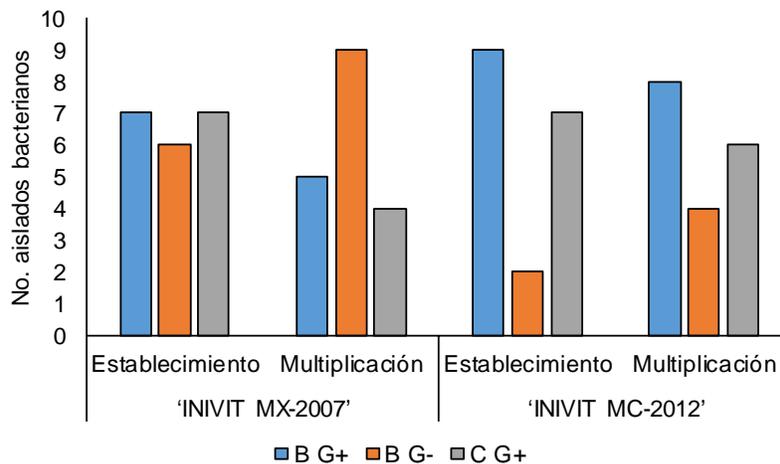


Figura 3. Morfología y respuesta a la tinción de Gram de aislados bacterianos contaminantes de la propagación *in vitro* de malanga *Xanthosoma* spp. 'INIVIT MX-2007' y *Colocasia esculenta* 'INIVIT MC-2012'. B G+ bacilos Gram +, B G- bacilos Gram negativos, C G+ cocos Gram positivos.

La contaminación por microorganismos es la causa más importante de pérdidas en laboratorios comerciales y de investigación de cultivo de células y tejidos vegetales (Alvarado-Capó *et al.*, 2003). Por ello, entre las estrategias de control de la contaminación microbiana se han adoptado medidas tales como tratamiento a las plantas donantes, inclusión de antibióticos en el medio de cultivo (Barret y Cassells, 1994) o la aplicación en varias fases de la propagación de métodos de detección temprana de contaminantes (*indexing*) (Santos *et al.*, 2005; Carrazana *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo, para el control de la contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de los clones de malanga se requiere el diseño de una estrategia integral que permita disminuir la incidencia de contaminantes asociados al explante inicial sin descartar aquellos que pueden ser introducidos en el proceso por inadecuadas técnicas de asepsia y manipulación del material vegetal.

CONCLUSIONES

En las fases de establecimiento y multiplicación *in vitro* de los clones de malanga 'INIVIT MX-2007' e 'INIVIT MC-2012' se comprobó una alta incidencia de contaminantes microbianos, con predominio de bacterias que causaron afectaciones al material vegetal.

REFERENCIAS

Alvarado Capó Y, Portal N, García L, Ramírez D, Martínez Y (2003) Incidencia de contaminantes

microbianos en la micropropagación de la caña de azúcar. *Biotecnología Vegetal* 3(1): 31-36

Barrett C, 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, Santos A, Alderete Y, Gálvez D, Cupull R, Navarro M (2011) Bacteria endófitas latentes no vitropatógenas en el cultivo *in vitro* de *Xanthosoma sagittifolium* (L. Schott). *Centro Agrícola* 38(4): 21-29

Chand H, Pearson M N (1998) Rapid vegetative multiplication in *Colocasia esculenta* (L.) Schott (taro). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55 (3): 223-226

Espinosa Ernesto, Herrera Lidcay, Dávila Amaury, Espinosa Alberto, Figueroa Yadelys, Armario Danneys, Pérez Delia, Aguiar José, Chamizo Michel (2012) Efecto del material vegetal de plantación sobre la incidencia de pudriciones secas en *Colocasia esculenta* (L.) Schott y *Xanthosoma* spp. *Biotecnología Vegetal* 12 (4): 235-244

Folgueras M (2006) La contaminación microbiana en la micropropagación *in vitro* de las raíces y tubérculos tropicales. *Centro agrícola* 33(2): 91

Gálvez D, Cabrera M, Beovides Y, Robaina A, Rodríguez S, Rodríguez D (2013) Establecimiento *in vitro* de yemas axilares del cultivar de *Colocasia esculenta* Schott 'INIVIT MC-2001'. *Biotecnología Vegetal* 13 (2): 107-112

García M, Mederos V, Rodríguez S, López J, Ventura J, Cabrera M, Hernández R, Gonzáles JE, Bermúdez

- D, Gálvez D, Gutiérrez V, Gálvez JR (1999) Generalización de la metodología para la micropropagación de la malanga (*Xanthosoma* spp.) en Cuba. 5^o Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal, pp. 167-169. IBP. Santa Clara
- Goswami Aakansha, Singh B, Gaurav S S, Singh Anju, Kumar Amit (2012) Tissue culturing of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) in *in vitro* conditions. Progressive Agriculture 12 (1): 158-163
- Hernández R, Lugo Y, González J, González Y, Rojas X, Herrera L (2005) Detección de microorganismos contaminantes del cultivo *in vitro* de la malanga. Centro Agrícola 32(1): 41-44
- Leifert C, Cassells AC (2001) Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro* Cell Dev. Biol. Plant 37(2): 133-138
- Leifert C, Morris CE, 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
- Thomas P, Prakash GS (2004) Sanitizing long-term micropropagated grapes from covert and endophytic bacteria and preliminary field testing of plants after 8 years *in vitro*. *In Vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant 40: 603-607
- Santos A, García M, Carrazana D, López J, Ventura J, Basail M, Medero V, Cabrera M, Rayas A, Gálvez D, Bauta M, Álvarez M, Ortega A (2005) Prevención de la contaminación microbiana en la micropropagación de la malanga clon 'Camerún 14' (*Colocasia esculenta*). Centro Agrícola 32(3): 31-34

Recibido: 20-04-2015

Aceptado: 25-09-2015