

## Manejo de la contaminación bacteriana en la propagación *in vitro* de yemas axilares de *Colocasia esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012'

Yenisey Gutierrez<sup>1\*</sup>, Mariluz Folgueras<sup>1</sup>, Arletys Santos<sup>1</sup>, Jorge López<sup>1</sup>, Víctor Medero<sup>1</sup>, Damisela Reinaldo<sup>1</sup>, Yelenys Alvarado-Capó<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales. Apdo 6. Santo Domingo. Villa Clara. Cuba.

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

\*Autora para correspondencia e-mail: contam.biotec@inivit.cu

### RESUMEN

La propagación *in vitro* de *Colocasia esculenta* se limita por la presencia de contaminantes microbianos, especialmente bacterias. El objetivo de este trabajo fue demostrar que la inclusión de acciones para el manejo de la contaminación bacteriana en la propagación *in vitro* de *C. esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012' a partir de explantes de campo, puede reducir las pérdidas. Se emplearon dos protocolos de propagación *in vitro* y se comparó la incidencia de contaminantes bacterianos en las fases de establecimiento y multiplicación. Un protocolo modificó al otro con acciones para el manejo de la contaminación bacteriana. En cada uno se partió de 20 rizomas primarios de los que se extrajeron al menos dos yemas axilares y de cada una se estableció una línea. Se cuantificó el número de explantes contaminados con bacterias por subcultivo. La contaminación bacteriana se observó en el medio de cultivo debajo de los explantes o alrededor de estos lo que indica al explante inicial como fuente primaria de contaminación. Con la aplicación del protocolo modificado se redujo el porcentaje de pérdidas por contaminación bacteriana en todos los subcultivos evaluados. En el establecimiento *in vitro* no rebasó el 5%. La combinación de acciones para el manejo de la contaminación bacteriana entre las que se encuentran la reducción del tamaño del explante, el trabajo por líneas y la detección visual de contaminantes previo al subcultivo del material vegetal reduce la presencia de contaminantes bacterianos en la propagación *in vitro* de *C. esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012'.

Palabras clave: explante, detección contaminantes, malanga

## Bacterial contamination management on *in vitro* propagation of axillary buds of *Colocasia esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012'

### ABSTRACT

The *in vitro* propagation of *Colocasia esculenta* is limited by the presence of microbial contaminants, especially bacteria. The objective of this work was to demonstrate that the inclusion of actions for the bacterial contamination management in the *in vitro* propagation of *C. esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012', from field explants, can reduce losses. Two *in vitro* propagation protocols were used and the incidence of bacterial contaminants in the establishment and multiplication stages was compared. One protocol modified the other with actions for the management of bacterial contamination. In each one, 20 primary rhizomes were taken from which at least two axillary buds were extracted and from each one a line was established. The number of explants contaminated with bacteria per subculture was quantified. Bacterial contamination was observed in the culture medium below or around the explants, indicating the initial explant as the primary source of contamination. With the application of the modified protocol, the percentage of losses due to bacterial contamination in all subcultures evaluated was reduced. In the *in vitro* establishment it did not exceed 5%. The combination of actions for the management of bacterial contamination among which are the reduction of the size of

the explant, the work by lines and the visual detection of contaminants prior to the subculture of the plant material reduces the presence of bacterial contaminants in the *in vitro* propagation of *C. esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012'.

Keywords: contaminant detection, explant, taro

## INTRODUCCIÓN

La propagación *in vitro* de malanga (*Colocasia* o *Xanthosoma*) tiene gran importancia económica ya que permite proveer de semilla de alta calidad genética y sanitaria a los productores. Generalmente el material vegetal inicial son yemas axilares o ápices meristemáticos (Yam *et al.*, 1990; García *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2003; Verma y Cho, 2010; Nath *et al.*, 2012; Medero *et al.*, 2016). Sin embargo, las técnicas de propagación *in vitro* han tenido limitaciones debido a la contaminación microbiana, principalmente por bacterias (Hernández *et al.*, 2005; Folgueras, 2006; Carrazana *et al.*, 2011; Vilchez *et al.*, 2011; Hossain, 2012; Santos *et al.*, 2015).

Estos contaminantes causan pérdidas económicas en las industrias de cultivo de tejidos vegetales. Unido a ello, la manipulación incorrecta del material vegetal y un medio ambiente no estéril aumentan la tasa de contaminación microbiana (Leelavathy y Sankar, 2016; Orlikowska *et al.*, 2017).

En este contexto, para reducir las pérdidas por la presencia de contaminantes bacterianos en el cultivo *in vitro* de malanga se han referido diferentes estrategias. Entre ellas se menciona el cultivo de las plantas madre en un sustrato estéril (Keolanui *et al.*, 1993), el uso de antibióticos (Rodríguez *et al.*, 2003), la aplicación de electroterapia (Vilchez *et al.*, 2011) o no eliminar las plantas contaminadas con bacterias (Carrazana *et al.*, 2011). Otros autores como Santos *et al.* (2015) comprobaron que el empleo de meristemas disminuye su incidencia. Sin embargo, también se ha considerado que la aplicación de medidas para la prevención y el manejo de la contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas suelen ser más efectivas, duraderas y económicas (Leifert *et al.*, 1994; Leifert y Cassells, 2001; Alvarado-Capó, 2003). Este enfoque no ha sido empleado de forma rutinaria en la propagación *in vitro* de malanga.

Atendiendo a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue demostrar que la inclusión de acciones para el manejo de la contaminación bacteriana en la propagación *in vitro* de *C. esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012' a partir de explantes de campo, puede reducir las pérdidas por este concepto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se emplearon rizomas primarios de *Colocasia esculenta* (L.) Schott cv. 'INIVIT MC-2012', proveniente del Banco de Germoplasma del INIVIT donde se siguieron las indicaciones del Instructivo Técnico de la Malanga (MINAG, 2012) para las atenciones agronómicas. Los rizomas cumplían con las características fenotípicas de los descriptores de la especie y cultivar (Medero *et al.*, 2014), no presentaban síntomas visuales de enfermedades y fueron cosechados después de 12 meses de cultivo en campo (Figura 1).

Se comparó la incidencia de contaminantes bacterianos en las fases de establecimiento y multiplicación de *C. esculenta* con el empleo de dos protocolos de propagación *in vitro* a partir de rizomas primarios de plantas cultivadas en campo.

El primero, propuesto por García *et al.* (1999) y el segundo, este mismo protocolo modificado por Gutierrez *et al.* (2017) que incluye pasos en el procedimiento para el manejo de la contaminación bacteriana.

Para cada protocolo se partió de 20 rizomas primarios de los cuales se extrajeron al menos dos yemas axilares. De cada una se estableció una línea que se conformó por todos los explantes que se derivaron de ella y que se manejaron en cada subcultivo separados de otras líneas.

Los subcultivos se realizaron cada 18 días en cámara de crecimiento a  $26 \pm 2$  °C, con luz continua blanca fluorescente ( $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y fotoperiodo 16 horas luz (Medero *et al.*, 2015).



Figura 1. Plantas (a) y rizomas (b,c) de *Colocasia esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012'.

En cada subcultivo (establecimiento y tres subcultivos de multiplicación) se cuantificó el número de explantes contaminados con bacterias (por observación visual de los recipientes de cultivo y comprobación de la presencia del grupo microbiano en observaciones directas al microscopio óptico, 400x y 1000x). Se calculó el porcentaje de contaminación bacteriana con respecto al total de explantes al inicio del subcultivo. Todos los explantes contaminados se eliminaron del proceso.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La contaminación bacteriana se observó en el medio de cultivo debajo de los explantes o alrededor de estos lo que coincidió con descripciones previas en el cultivo *in vitro* de malanga (Carrazana *et al.*, 2011; Gutierrez *et al.*, 2015). De forma general, los caracteres culturales del crecimiento bacteriano fueron similares en todos los explantes de una misma línea lo que apunta al explante inicial como fuente primaria de contaminación.

Con la aplicación del protocolo para la propagación *in vitro* de *C. esculenta* a partir de rizomas de plantas cultivadas en campo (García *et al.*, 1999) modificado por Gutierrez *et al.* (2017) se redujo el porcentaje de pérdidas por contaminación bacteriana en todos los subcultivos evaluados (Figura 2), con cero contaminantes visibles en los dos primeros de multiplicación. Este protocolo incluye como aspectos esenciales para el manejo de la contaminación bacteriana la reducción del tamaño del explante (empleo de yemas axilares de 0.3-0.5 cm), el cultivo individual de los explantes en la fase de establecimiento *in vitro* en tubos de ensayo con un explante en cada uno, un protocolo

para la detección visual de contaminantes bacterianos previo a cada subcultivo, el trabajo por líneas a partir de cada explante inicial hasta el tercer subcultivo de multiplicación, medidas de asepsia y procedimientos para el uso del instrumental y la capacitación del personal en la temática contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas.

Aunque en este trabajo se emplearon explantes iniciales procedentes de campo la contaminación bacteriana no rebasó el 5% en el establecimiento *in vitro*. La reducción del tamaño del explante inicial es una de las modificaciones que se introdujeron en el protocolo propuesto por García *et al.* (1999) y que contribuyó a que disminuyeran las pérdidas en más de un 20%. En este cultivar, Santos *et al.* (2015) demostraron que la utilización de meristemos extraídos de rizomas brotados en zeolita reduce la incidencia de contaminantes. Sin embargo, el porcentaje de regeneración de plantas a partir de meristemos en muchas ocasiones es limitado. La posibilidad de poder emplear yemas axilares de material vegetal diagnosticado como libre de virus, directo de campo, sin alta incidencia de contaminantes bacterianos, es una alternativa para la propagación de plantas *in vitro* (Rodríguez *et al.*, 2003).

Por otra parte, la detección de contaminantes bacterianos previo al subcultivo de los explantes con un protocolo definido y el entrenamiento del personal contribuye a que solo se manipulen explantes libres de contaminantes microbianos visibles. Esta es una práctica sencilla que no requiere gastos adicionales y garantiza que no se disemine la contaminación con el instrumental durante la manipulación de los explantes.

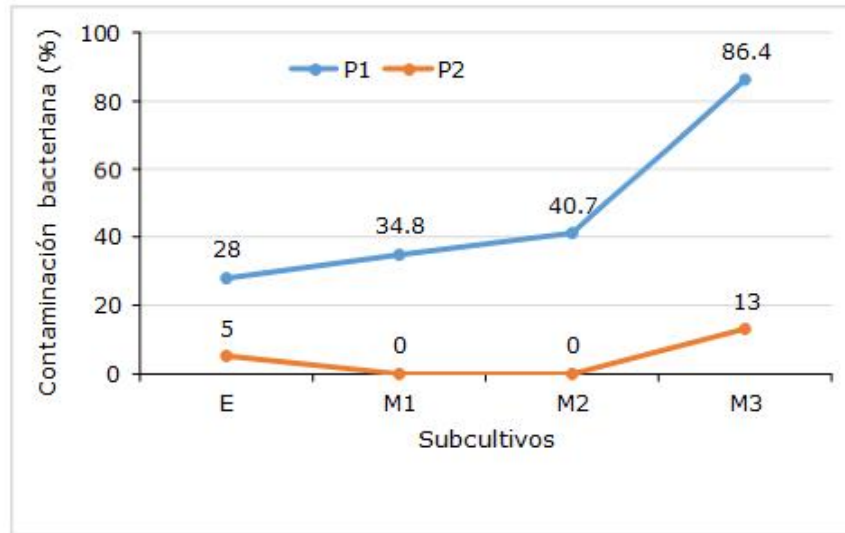


Figura 2. Incidencia de contaminación bacteriana en el establecimiento y multiplicación *in vitro* de yemas axilares de *Colocasia esculenta* INIVIT MC-2012 con el empleo de dos protocolos de propagación. E establecimiento, M multiplicación, P protocolo de propagación, P1 García *et al.* (1999), P2 García *et al.* (1999) modificado por Gutierrez *et al.* (2017).

De igual forma, el trabajo por líneas aseguró que los explantes de diferente origen no se mezclaran. Con ello se garantizó la trazabilidad del material vegetal. Aunque pudieran parecer engorrosas las operaciones de manipulación de los explantes por líneas hasta el tercer subcultivo este procedimiento permite manejar mejor la contaminación bacteriana. En este sentido, pueden ser descartadas las líneas contaminadas o separar las que ya hayan presentado explantes contaminados (en el caso en que no se manifieste crecimiento bacteriano en todos los explantes de la línea a la misma vez, asociado al explante inicial), eliminarlas del proceso o definir otra estrategia productiva como por ejemplo, formar un solo lote con esas líneas, no continuar multiplicándolas sino transferirlas a la fase de enraizamiento para llevarlas a la fase de aclimatización.

En el tercer subcultivo de multiplicación, después de dos sin presencia de contaminantes bacterianos en la propagación con el protocolo modificado por Gutierrez *et al.* (2017), nuevamente se observó contaminación bacteriana aunque en 73.4% menos que con el protocolo original. La aparición de contaminantes bacterianos en la fase de multiplicación y su incremento con el número de subcultivos ha sido mencionada por otros autores en diferentes cultivos y se asocia a la presencia de contaminantes

endógenos (Leifert *et al.*, 1994; Carrazana *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2015; Orlikowska *et al.*, 2017). En tal sentido, Carrazana *et al.* (2011) determinaron el carácter endófito de las bacterias en el cultivo *in vitro* de malanga *Xanthosoma* cv. 'México 08'.

Los resultados demostraron la importancia de considerar en la propagación *in vitro* procedimientos de manejo de la contaminación bacteriana que faciliten la toma de decisiones, eviten la mezcla de explantes contaminados y no contaminados en un mismo recipiente de cultivo y la diseminación de los microorganismos. En este contexto el entrenamiento al personal es determinante.

## CONCLUSIONES

La combinación de acciones para el manejo de la contaminación bacteriana entre las que se encuentran la reducción del tamaño del explante, el trabajo por líneas y la detección visual de contaminantes previo al subcultivo del material vegetal reduce la presencia de contaminantes bacterianos en la propagación *in vitro* de *C. esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012'.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte de la tesis de maestría 'Estrategia para el manejo de la contaminación bacteriana en la propagación

*in vitro* de *Colocasia esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012' del programa de maestría en Biotecnología vegetal del Instituto de Biotecnología de las Plantas. Los autores agradecen la contribución de todo el personal que labora en el cultivo *in vitro* de malanga en el INIVIT.

#### Conflicto de interés

Los autores no declaran conflictos de intereses.

#### REFERENCIAS

Alvarado-Capó Y (2003) Incidencia, identificación y estrategias para la prevención y el control de contaminantes bacterianos en el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara, Cuba

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

Folgueras M (2006) La contaminación microbiana en la micropropagación *in vitro* de las raíces y tubérculos tropicales. Centro Agrícola 33(2): 91-92

García M, Mederos V, Rodríguez S, López J, Ventura J, Cabrera M, Hernández R, González JE, Bermúdez D, Gálvez D, Gutiérrez V, Gálvez JR (1999) Generalización de la metodología para la micropropagación de la malanga (*Xanthosoma* spp.) en Cuba. En: IBP (ed). Libro de reportes cortos del 5to coloquio internacional de Biotecnología vegetal, pp. 167-169. IBP, Santa Clara

Gutiérrez Y, Torres Y, Robaina A, Bauta M, Rayas A, Santos A, Basail M, López J, Mederos V, Beovides Y, Rodríguez D (2015) 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'. Biotecnología Vegetal 15(3): 157 – 161

Gutiérrez Y, Folgueras M, Santos A, López J, Reinaldo D, Bauta M, López G, Alvarado-Capó Y (2017) Protocolo para la propagación *in vitro*

de *Colocasia esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012' Biotecnología Vegetal 17(4): 236 - 247

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

Hossain MJ (2012) *In vitro* organogenesis of *Colocasia esculenta* cv. antiquorum L. American Journal of Plant Sciences 3: 709-713

Keolanui R, Sanxter S, Hollyer JR (1993) Handbook for Commercial-Scale Taro (*Colocasia esculenta*) Tissue Culture in Hawaii. Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, Honolulu

Leelavathy S, Sankar PD (2016) Curbing the Menace of Contamination in Plant Tissue Culture. Journal of pure and applied microbiology 10(3): 2145-2152

Leifert C, Morris C, Waites W (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

Medero V, Rodríguez S, Basail M, Santos A, Rayas A, López J, Beovides Y, Rodríguez D, Torres M, Robaina A, Caballero W, Cruz J, Bravo Y, Pons C (2014) Clon de malanga *Colocasia* 'INIVIT MC- 2012', Registro de Variedades Comerciales No 02/2014. Centro Nacional de Sanidad Vegetal Ministerio de la Agricultura, Cuba

Medero V, Basail M, Moreno O, Santos A, Rayas A, López J, Beovides Y, Rodríguez S, Ramos JL, Caballero W, Gutiérrez Y, Rodríguez D, Pons C, Rodríguez D (2015) Impacto de la Biotecnología en la producción de semilla de raíces y tubérculos tropicales. Memorias del III Simposio Internacional de raíces, rizomas, tubérculos, plátanos, bananos y papaya. INIVIT, Santo Domingo; ISBN: 978-959-295-011-5

Medero V, Basail M, Moreno O, Santos A, Rayas A, López J, Beovides Y, Rodríguez S, Maza N, Caballero W, Gutiérrez Y, Rodríguez D, Pons C, Rodríguez D, Medero M (2016) Empleo de la biotecnología para la producción de semilla categorizada en malanga. Rev Agricultura Tropical 2(1): 52-60

- MINAG (2012) Ministerio de la Agricultura, Instructivo Técnico para la producción de semillas de viandas. INIVIT-FAO, La Habana
- Nath VS, Sankar MS, Hegde VM, Jeeva ML, Misra RS, Veena SS (2012) A Simple and Efficient protocol for rapid regeneration and propagation of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott.) *in vitro* from apical meristems. International Journal of Plant Developmental Biology 6(1): 64-66
- Orlikowska T, Nowak K, Reed B (2017) Bacteria in the plant tissue culture environment. Plant Cell Tiss Organ Cult 128: 487–508; doi: 10.1007/s11240-016-1144-9
- Santos A, López J, Basail M, Gutiérrez Y, Rayas A, Medero V, Rodríguez D, Rodríguez D, Beovides Y, Reinaldo D, Bauta M (2015) Incremento de la eficiencia en el establecimiento *in vitro* de la malanga 'INIVIT MC-2012' (*Colocasia esculenta* (L.) Schott.). Revista Agricultura Tropical 1(1): 70-74
- Rodríguez A, Quintero S, Rodríguez A, Fundora Z (2003) Establecimiento *in vitro* de ápices de malanga (*Xanthosoma sagittifolium* Schott.). Cultivos Tropicales 24(3): 19-22
- Verma VM, Cho JJ (2010) Plantlet development through somatic embryogenesis and organogenesis in plant cell cultures of *Colocasia esculenta* (L.) Schott. Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 18(1): 167-170
- Vilchez J, Albany N, Martínez L, Molina M, Alvarez C, Leal E, Bermúdez L (2011) Establecimiento *in vitro* de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott.). Rev Fac Agron (LUZ) 28(1): 434-444
- Yam TW, Young JLP, Fan KPL, Arditti J (1990) Induction of callus from axillary buds of taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*, Araceae) and subsequent plant regeneration. Plant Cell Reports 9: 459-462

Recibido: 10-01-2019

Aceptado: 26-02-2019

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y autores.