

Prevención de la contaminación microbiana en la micropropagación de la malanga clon 'Camerún 14' (*Colocasia esculenta*) *

Arletys Santos (1), Magaly García (1), Daymí Carrazana (2), Jorge López (1), José de la C. Ventura (1), Milagros Basail (1), Víctor Medero (1), Manuel Cabrera (1), Aymé Rayas (1), Diosdada Gálvez (1), Maricel Bauta (1), Miguel Álvarez (1) y Alexis Ortega (1).

(1) Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales. INIVIT, Santo Domingo, Villa Clara.

(2) Facultad de Química-Farmacía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

RESUMEN. La malanga constituye una de las viandas tropicales preferidas por la población, lo cual hace a esta especie un producto de alta demanda en el mercado nacional e internacional, así como en la dieta de hospitales, hogares de ancianos y círculos infantiles. Recientemente se ha producido un incremento en la demanda de semillas de alta calidad para la producción de la malanga. El presente trabajo se realizó con el objetivo de prevenir la presencia de contaminantes bacterianos en la micropropagación de la malanga. Los resultados demostraron el predominio de los contaminantes bacterianos en las poblaciones de plantas *in vitro*. Para la iniciación del material se utilizaron diferentes concentraciones de NaOCl unido a diferentes tiempos de desinfección y en la detección de contaminantes, se utilizó el método de siembra de fragmentos de tejidos vegetales en medio de cultivo bacteriológico. Al medio de cultivo para la multiplicación *in vitro* de la malanga se le adicionaron sustancias orgánicas que pueden promover el crecimiento de las bacterias contaminantes y facilitar su detección temprana. Los mejores resultados se lograron utilizando la desinfección con NaOCl al 3 % por 15 min ya que se logró un 19 % de muertos y solamente un 5,9 % de contaminación. Los mejores resultados para la detección temprana de los contaminantes, fueron obtenidos cuando se utilizó el medio de multiplicación de malanga con la adición de agua de coco (100 mL/L) y con extracto de levadura (250,0 mg/L).

Palabras clave: Malanga, contaminación, micropropagación, prevención.

ABSTRACT. Taro (*Colocasia esculenta*) constitute one of the main crop for the human diet and it has become a highly demanded species at the national and international markets, as well as, in the diet of hospitals, old man homes and children's circles. The demand of high quality seed for taro production has increased recently. This work was carried out to avoid the presence of bacterial contaminants in the micropropagation of taro. For the starting material, different NaOCl concentrations together with several disinfection times were used, and a planting method of fragments from plant tissues in bacteriological culture media was applied. Additional organic substances to promote growing of contaminating bacteria and to facilitate their early detection were added to the culture media for "in vitro" taro multiplication. The results were obtained at 3 % NaOCl during 15 minutes, as 19 % dead tissues and 5,9 % contamination were reached. The most important results for an early contaminant detection were noticed in the multiplication medium with the addition of coconut milk (100 mL/L) and yeast extract (250,0 mg/L).

Key words: Taro, contamination, micropropagation, prevention.

INTRODUCCIÓN

La malanga constituye una de las viandas tropicales preferidas por la población, lo cual hace a esta especie un producto de alta demanda en el mercado nacional e internacional, así como en la dieta de hospitales, hogares de ancianos y círculos

infantiles. Recientemente se ha producido un incremento en la demanda de semillas de alta calidad para la producción de la malanga (García, 1999).

Las técnicas de micropropagación de plantas ofrecen ventajas incuestionables con respecto a los métodos de propagación de en este cultivo,

* Agrocentro (IX Simposio de Sanidad Vegetal en la Agricultura Tropical)

pero se ve afectada por la incidencia de contaminantes microbianos.

La contaminación por microorganismos continúa siendo hoy en día uno de los principales problemas para los micropropagadores de plantas en el mundo. Por esta razón las pérdidas en el cultivo de tejidos de numerosas especies son cuantiosas lo cual hace ineficientes económicamente muchos procesos.

Se reporta como método para la detección de bacterias contaminantes el empleo de componentes de medios de cultivo bacteriológicos en el medio de cultivo de las plantas (Boxus y Terzi, 1987).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de prevenir la presencia de contaminantes bacterianos en la micropropagación de la malanga.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desinfección del material de plantación

Para la iniciación del material se utilizaron diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) unido a diferentes tiempos de desinfección, el clon utilizado fue Camerún 14 (malanga Colocasia).

Las concentraciones y tiempos utilizados fueron

NaOCl	Tiempo (min)	
1. 2,5 %	20	Testigo
2. 3 %	15	
3. 3 %	20	
4. 3 %	25	

Se evaluaron los explantes muertos y contaminados.

Detección de contaminantes bacterianos

Para la detección de contaminantes en las vitroplantas de malanga clon 'Camerún 14', se utilizó el método de siembra de fragmentos de tejidos vegetales en medio de cultivo bacteriológico.

En la fase de establecimiento se cortaron pequeños discos de los extremos de los ápices y se colocaron en el medio de cultivo Agar de Wilbrink (Peptona bacteriológica 5,0 g/L; KH_2PO_4 0,5 g/L; NaSO_3 0,05 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g/L; sacarosa 20,0 g/L; pH 7,4), se incubaron a oscuridad constante y 32 °C durante siete días. Diariamente se evaluó la presencia de contaminación bacteriana alrededor de los fragmentos de tejidos o sobre los mismos.

Detección de la contaminación microbiana mediante la adición de sustancias orgánicas al medio de cultivo

Al medio de cultivo para la multiplicación *in vitro* de la malanga se le adicionaron sustancias orgánicas que pueden promover el crecimiento de las bacterias contaminantes y facilitar su detección temprana.

Se tomaron líneas de plantas *in vitro* en fase de multiplicación, que habían sido sometidas a la detección de contaminantes bacterianos mediante el método de siembra de fragmentos de tejido vegetal en medio de cultivo bacteriológico.

Se seleccionaron las plantas *in vitro* libres de contaminantes bacterianos detectables (PLC) y plantas *in vitro* contaminadas (positivas en la prueba de detección) sin expresión en el medio de cultivo para la fase de multiplicación (PC).

Las sustancias que se le adicionaron al medio fueron Peptona bacteriológica, extracto de levadura, caldo trisona soya y agua de coco (extraída de frutos inmaduros donde no había comenzado la formación del endospermo sólido). Las mismas se ensayaron en las concentraciones recomendadas en la literatura.

Como medio de cultivo basal se utilizó el medio para la multiplicación de malanga *in vitro* (MM) (García, 1999).

Tratamientos

MM + Peptona bacteriológica 250,0 mg/L (MM+PB)

MM + Extracto de levadura 250,0 mg/L (MM+EL)
 MM + Caldo triptona soya 4,0 g/L (MM+CTS)
 MM+ Agua de coco 100 ml/L (MM+AC)

multiplicación de malanga para permitir la expresión del crecimiento bacteriano, constituye una acción 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 fototóxico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección del material de plantación

A los 21 días fueron evaluados los explantes muertos y contaminados.

Los mejores resultados se lograron utilizando la desinfección de NaOCl al 3 % por 15 min (Tabla 1) ya que se logró un 19 % de muertos y solamente un 5,9 % de contaminación.

Tabla 1. Efecto de diferentes tratamientos para la desinfección del material.

Tratamiento	Muertos (%)	Contaminados (%)
1	8	17
2	19	5,9
3	30	5,6
4	100	-

Detección de la contaminación microbiana mediante la adición de sustancias orgánicas al medio de cultivo

Los mejores resultados fueron obtenidos cuando se utilizó el medio de multiplicación de malanga con la adición de agua de coco (MM+AC) y con

Tabla 2. Efecto de la adición de sustancias orgánicas en el medio de multiplicación de la malanga

Tratamientos	Peso fresco(g)		Número de Brotes	
	PC	PLC	PC	PLC
MM+ PB	0,43 c	0,17 c	1,73 c	2,20 b
MM+ EL	0,61 b	1,17 a	1,40 d	2,66 a
MM+ CTS	0,27 d	0,43 d	1,20 e	1,26 c
MM+ AC	0,66 ab	1,01 b	2,13 a	2,86 a
MM	0,74 a	1,19 a	1,86 b	2,66 a

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p < 0,05$.

extracto de levadura (MM+EL). (Véase Tabla 2) La incorporación de componentes de medios de cultivo bacteriológicos al medio de cultivo de

Similares resultados obtuvo Alvarado (2002) cuando utilizó agua de coco 100 mL/L y extracto de levadura 250,0 mg/L para la multiplicación *in vitro* de la caña de azúcar.

Al hacer un análisis del efecto fototóxico 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, se redujo el vigor y provocaron clorosis a las concentraciones empleadas.

Las plantas *in vitro* que se sometieron al tratamiento que contenía agua de coco presentaron mayor vigor y color verde más intenso.

CONCLUSIONES

1. Los resultados demostraron el predominio de los contaminantes bacterianos en las poblaciones de plantas *in vitro* de malanga.
2. Los mejores resultados se lograron utilizando la desinfección con NaOCl al 3 % por 15 min.
3. Para la detección temprana de los contaminantes, los mejores resultados fueron obtenidos cuando se utilizó el medio de multiplicación de malanga con la adición de agua de coco (100 mL) y con extracto de levadura (250,0 mg/L).

RECOMENDACIONES

1. Utilizar esta estrategia para la detección de contaminantes en la micropropagación de malanga.
2. Continuar los estudios sobre los contaminantes en malanga.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarado, Y. (2002): 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 de Doctorado. IBP. UCLV, Santa Clara.

Boxus, P. H. y J. M. Terzi (1988): "Control of accidental contamination during mass propagation". *Acta Horticulturae* 225: 189-193.

García M. (1999): Generalización de la metodología de la malanga (*Xanthosoma* spp.) en Cuba, en *Biotecnología vegetal: Libro de reportes cortos*, 5to Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal, IBP, pp. 167-169.

Leifert, C.; C. E. Morris y W. M. Waites (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.