

Bacteria endófitas latentes no vitropatógenas en el cultivo *in vitro* de *Xanthosoma sagittifolium* (L. Schot)

Endophytic latent non vitropathogenic bacteria in the plant tissue culture of *Xanthosoma sagittifolium* (L. Schot)

Daymí Carrazana García^{1*}, Arletys Santos Pino², Yoana Alderete Fernández¹, Diosdada Gálvez Guerra², Rene Cupull Santana¹, Mirtha Navarro Legarreta¹.

¹. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. C/P: 54830

². Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba.

E-mail: daymic@uclv.edu.cu

RESUMEN. Usualmente se elimina un elevado número de frascos de cultivo de plantas *in vitro* en la fase de multiplicación de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schot), por presentar ligera opacidad por debajo del material vegetal, manteniéndose las plantas sanas. Esto pudiera deberse a bacterias endófitas latentes no vitropatógenas, o a la liberación de polifenoles. Se iniciaron 41 explantes de malanga *Xanthosoma* cv México 08, aislándose los contaminantes bacterianos visiblemente detectados en el medio de cultivo de establecimiento o de indexing bacteriológico. Además se determinó el carácter endófito de las bacterias. Las plantas se llevaron hasta un tercer subcultivo, determinándose la presencia de bacterias en el medio. Por último se evaluó la presencia de polifenoles en el medio de cultivo de frascos aparentemente contaminados, con aislamiento negativo. En la mayoría de las líneas de plantas donantes se detectó un bacilo Gram positivo esporógeno no vitropatógeno, dependiente del tejido vegetal para su crecimiento. También se aislaron cocos Gram positivos y Gram negativos y bacilos Gram negativos de origen ambiental. El método de desinfección del material vegetal donante es efectivo durante la fase I de la micropropagación, no así para la fase II. No se detectó la presencia de polifenoles en el medio de cultivo. Se recomienda no eliminar a las plantas *in vitro* que presenten el cambio de apariencia objeto de estudio en el medio de cultivo.

Palabras clave: Bacilo Gram positivo, contaminación bacteriana, micropropagación, polifenoles.

ABSTRACT. Generally, many of tissue culture pots under *in vitro* conditions are eliminated due to the presence of a light opacity beyond the plant in the mass propagation of *Xanthosoma sagittifolium* (L. Schot) without any damage to the vegetal tissue. The cause of this opacity carried is the presence of latent endophytic bacteria non vitro pathogenic or to liberation to media of polyphenolic substances. The objective of this work was to confirm one of these possibilities and for this purpose 41 explants of Taro cv Mexico 08, were initiated. The visible bacterial contaminants were isolated from the culture medium or by a bacteriological indexing. Histological studies were conducted in order to determinate the endophytic origin of the bacteria. The vitroplant were transferred to multiplication stage for the subcultives and the presence of bacterial contamination in the media was determined. The presence of sporogenous rods Gram positive non vitropathogenic was detected, in the majority of the donants explants lines which was dependent of the plant tissue. Also cocci Gram positive and Gram negative and rods Gram negative from the ambient was isolated. The disinfection method employed was effective to the stage I but no to the stage II. The liberation of polyphenols was not detected. It's recommended no eliminate the plants under *in vitro* conditions with the presence of the light halo surrounded the plants.

Key words: Rods Gram positive, bacterial contaminants, micropropagation, polyphenols.

INTRODUCCIÓN

Tanto en el Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales de Cuba (INIVIT), como en las biofábricas comerciales del país, se desecha un elevado número de frascos de cultivo a partir del tercer subcultivo en la fase de multiplicación, por presentar

manifestaciones en el medio de cultivo que son interpretadas por las operarias como contaminación bacteriana, consistentes en una ligera opacidad por debajo del material vegetal, si bien es frecuente que las plantas *in vitro* no muestran efectos deletéreos.

Los métodos de desinfección utilizados durante la preparación del explante en el establecimiento no siempre eliminan a los microorganismos, pues cuando estos se encuentran asociados a los tejidos de las plantas (endófitos) muchos son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o asociados al tejido, y permanecer sin expresarse por largos períodos de tiempo (Van den Houwe y Swennen, 2000). Por lo tanto, el cambio de apariencia del medio de cultivo puede deberse a la presencia de bacterias endófitas que, estando presentes en el material vegetal de partida en la micropropagación (explantes), permanecen latentes durante la fase de establecimiento y se manifiestan durante la multiplicación.

En la literatura científica se ha referido que en los tejidos de la malanga se ha detectado la presencia de polifenoles como respuesta defensiva a un daño por heridas y bajas temperaturas, entre otros factores, con efecto antioxidante por la vía de la inhibición de radicales libres, y además una marcada actividad polifenoloxidasas en sus tejidos (Yemenicioglu, *et al.*, 1999; Picerno *et al.*, 2003). Por lo que el cambio de apariencia en el medio de cultivo descrito, pudiera deberse no a contaminantes bacterianos, sino a la presencia de polifenoles, que son sintetizados y secretados por el tejido ya diferenciado en la fase de multiplicación, como respuesta al daño mecánico (incisión) ocasionado al subcultivar el material vegetal.

Por lo antes referido la presente investigación tiene como objetivo determinar cual de estas dos hipótesis es válida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron 41 explantes (meristemos de las yemas axilares) de malanga (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) cultivar México 08, los cuales fueron tomados de 14 plantas donantes con adecuada condición física provenientes del mismo campo en el INIVIT. Para preparar cada explante, que fue llevado a la fase de establecimiento por una operaria especialista, se siguieron las instrucciones del Instructivo Técnico para el cultivo *in vitro* de la malanga (I.T, 2005) pero en lugar de la desinfección del corno por inmersión con etanol al 70 %, durante 1 minuto, seguido de la inmersión en hipoclorito de sodio al 2,5 %, durante 15 minutos, se sumergió el

corno solamente en hipoclorito de sodio al 3,0 %, por 30 minutos.

Durante la preparación de cada explante se tomó un fragmento de tejido vegetal adyacente al mismo y se incluyó en fijador (formol 10 %). Otro fragmento de tejido vegetal subsiguiente se seccionó para la realización del indexing bacteriológico, colocándose cada uno en un tubo de ensayo de 15 cm de longitud y 2,5 cm de diámetro que contenía agar nutriente suplementado con extracto de carne (3,0 g L⁻¹). Estos tubos de ensayo fueron incubados a 30 °C, durante 30 días.

En caso de que se detectara, por observación visual, cambios en la apariencia del medio de cultivo de establecimiento o el de indexing bacteriológico a los siete, 16 y 30 días de iniciación, lo cual pudiera haberse debido a la posible presencia de contaminantes bacterianos, se procedió al aislamiento de cultivos puros microbianos, empleando el método de diseminación en placa de Petri conteniendo agar nutriente suplementado con extracto de carne (3,0 g L⁻¹), incubándose a 30 °C hasta siete días. De observarse colonias aisladas estas fueron transferidas a cuñas con igual medio de cultivo e incubadas en las mismas condiciones y descritas culturalmente atendiendo a forma, elevación, bordes, color y opacidad o traslucidez. En todos los casos se describieron las manifestaciones de la presunta contaminación bacteriana en el medio de cultivo de establecimiento y los efectos deletéreos en el explante y las características del crecimiento bacteriano en el medio de cultivo de indexing bacteriológico.

A los aislados bacterianos se les realizaron diferentes tinciones (simple, de Gram y en caso necesario de endosporas) y fueron observados en microscopio óptico antes referido a 1000x, para describir la forma y en algunos casos, corroborar la presencia de endospora.

La frecuencia de aparición (incidencia) de los contaminantes bacterianos se realizó calculando el porcentaje de aislamientos positivos respecto al número inicial de explantes y fragmentos de tejidos en el indexing bacteriológico. En caso de aislamiento negativo, se realizaron frotis directos teñidos con tinción simple con violeta cristal del área del medio de cultivo

con cambio de apariencia, para confirmar la ausencia o presencia de estructuras con morfología bacteriana.

Los fragmentos de tejidos vegetales fijados en formol, correspondientes a los tubos de ensayo en fase de establecimiento y/o con medio bacteriológico, que fueron separados por contaminación microbiana, fueron deshidratados e incluidos en parafina. En aquellos casos en que el aislamiento bacteriano fue positivo, o cuando siendo negativo el frotis directo confirmó la presencia de estructuras bacterianas, se realizaron corte histológicos de 10 a 15 μm y para detectar la presencia de estructuras bacterianas en el tejido vegetal, se empleó la tinción diferencial de Safranina-verde brillante (González, 1997).

Una vez concluida la fase de establecimiento de los explantes, se procedió a su multiplicación durante tres subcultivos para aquellos que permanecieron sanos y vigorosos, siguiendo la metodología referida en el Instructivo antes citado y se correlacionaron los resultados del aislamiento en esta fase de cultivo con los del indexing bacteriológico.

En todos los casos las líneas (plantas *in vitro* procedentes de un mismo explante) fueron inspeccionadas para la detección de posibles contaminantes bacterianos y se procedió a describir las manifestaciones en el medio de cultivo de multiplicación y los efectos deletéreos en el material vegetal.

El aislamiento de contaminantes bacterianos, así como su observación microscópica y descripción morfológica se realizó de la misma forma antes descrita.

Para calcular el porcentaje de plantas *in vitro* separadas por contaminación bacteriana aparente, se consideró el número total de las subcultivadas en cada uno de los subcultivos.

En primer lugar se analizó la composición química del medio de cultivo de multiplicación, para excluir la presencia de algún compuesto fenólico que pudiera interferir con el resultado, y se añadió a cuatro tubos con este medio de cultivo sin plantas *in vitro* y a cuatro con estas, donde no existiera manifestación visible alguna de contaminación

bacteriana aparente, 1 mL de metanol (reactivo puro para análisis), homogenizando la mezcla manualmente con un agitador de vidrio. Luego se adicionaron tres gotas de una solución de tricloruro férrico (FeCl_3) al 5,0% en solución salina fisiológica (0,9%), siguiendo la metodología usual para tamizaje fitoquímico (N.R, 2005).

Posteriormente se procedió a evaluar la presencia de polifenoles totales en el medio de cultivo de todos los frascos de cultivo separados como posiblemente contaminados en la fase de multiplicación, donde el aislamiento bacteriano hubiese sido negativo. Se especificó si la planta *in vitro* permanecía sana y vigorosa o no y el resultado del frotis directo para confirmar la ausencia o presencia de estructuras bacterianas. Para ello se tomó una porción del medio de cultivo del tubo de multiplicación procedente de la zona por debajo de la planta *in vitro* y se le adicionó 1 mL de metanol y tres gotas de FeCl_3 .

Como control positivo se prepararon diluciones seriadas en metanol (1:10) (v:v) de un extracto de las hojas verdes adultas de *Terminalia catappa* L. más (FeCl_3). Este procedió del laboratorio de Alelopatía de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UCLV. El material vegetal había sido colectado del árbol en la parte inferior de la copa, después del 3er o cuarto par de hojas. El extracto se había obtenido en acetona y luego de rotoevaporación para eliminar el solvente se resuspendió en agua, a razón de 1g mL^{-1} de materia seca. En las hojas del almendro de la India están presentes los taninos hidrolizables: Ácido chebulágico, corilagina, 1-degaloil eugenina, geranina, 2-3-(4-4'-5-5'-6'-6'-hexahidroxidifenol) glucosa, granatina, punicalagina, punicalina, tercataina, terflavina y tergalagina (NAPRALERT, 1998). Además se incorporaron controles negativos de extracto vegetal y de este con metanol sin reactivo de análisis (FeCl_3), y de metanol con este reactivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de 41 explantes de malanga en la fase de establecimiento, se separó, a los 30 días, un tubo de cultivo por posible contaminación bacteriana, para un 2,4% del total. En este se presentó turbidez en el medio de cultivo. El material vegetal permaneció sano, no observándose inhibición de la brotación.

A partir del medio de cultivo se aisló un bacilo Gram negativo que forma colonias circulares, de elevación pulvinada, borde entero, opacas y de color amarillo. La frecuencia de aparición de frascos de cultivo con alteraciones que supusieran una contaminación bacteriana fue baja, como es de esperar, según el comportamiento histórico del cultivo.

En la literatura científica se refiere que los medios de cultivo para tejidos vegetales no son del todo propicios para el crecimiento de bacterias, mientras que tienen composición química similar a los utilizados para el crecimiento de hongos (Leifert *et al.*, 1994), lo cual explica la muy baja presencia de este grupo microbiano en esta fase de la micropropagación.

A los siete días de incubados, se separaron cinco tubos de *indexing* bacteriológico aparentemente positivos. Todos presentaron opacidad ligera (en menor o mayor grado) sobre el medio de cultivo alrededor del material vegetal. A partir de tres de los tubos antes referidos, se aislaron cocos Gram positivos de idénticas características morfológicas microscópicas y culturales (forma circular, elevación convexa, borde entero, opacas y de color crema). A partir del último tubo, se aisló un coco Gram negativo que se caracterizó por formar colonias con igual descripción que las anteriores pero más pequeñas. El aislamiento bacteriológico a partir del primer de los tubos fue negativo. Al realizar un frotis directo teñido del área del medio de cultivo con cambio de apariencia no se observaron estructuras bacterianas. Lo anterior indica que es posible que las operarias separen erróneamente tubos de *indexing* bacteriológico por observación visual, cuando el cambio del medio de cultivo es poco perceptible.

El estudio histológico del tejido vegetal adyacente a los explantes, demostró ausencia de estructuras con morfología bacteriana en el interior de las células meristemáticas. Por lo tanto los aislados bacterianos correspondientes son de origen ambiental.

A los 16 días de incubación se separaron 11 tubos de *indexing* bacteriológico con opacidad muy ligera sobre el medio de cultivo alrededor del material vegetal. En todos los casos, excepto uno, el aislamiento bacteriológico fue negativo. A partir de este último se aislaron bacilos Gram negativos, los que formaron colonias circulares, de elevación convexa, borde entero, traslúcidas y de color crema.

El resultado del estudio histológico reveló presencia de estructuras bacilares en el interior de las células meristemáticas observadas en el tejido vegetal adyacente a los explantes correspondientes con los de *indexing* con aislamiento bacteriológico negativo, revelando su carácter endófito (Figura 1). Los bacilos Gram negativos aislados son de origen ambiental.

Cuando se observaron los frotis directos teñidos del área del medio de cultivo con cambio de apariencia en los tubos donde el aislamiento fue negativo, se observó la presencia de bacilos formando agrupaciones y cadenas, presumiblemente formadores de endospora, ya que se visualizaba un área refractaria al colorante (Figura 2). Esto último fue confirmado con la tinción especial para este tipo de estructura de resistencia bacteriana, y se determinó una respuesta positiva a la tinción de Gram.

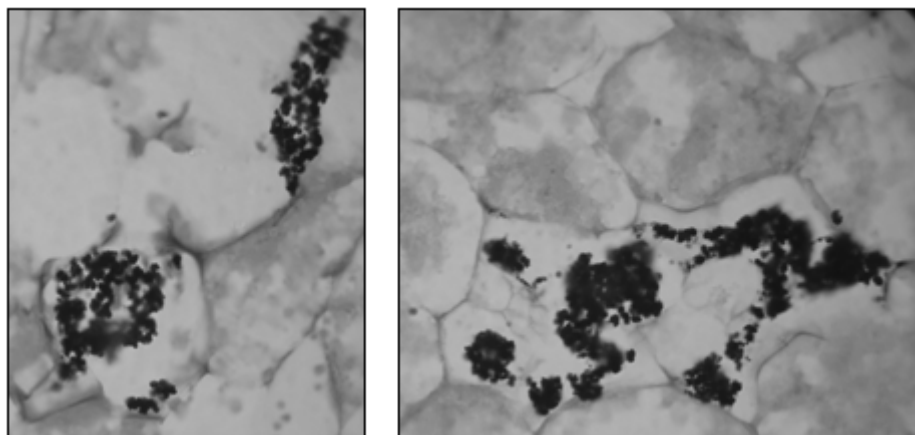


Figura 1. Células meristemáticas de yemsa axilares de malanga (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) cultivar México 08, con células bacterianas bacilares en su interior. Imagen a 1000x con objetivo de inmersión en aceite

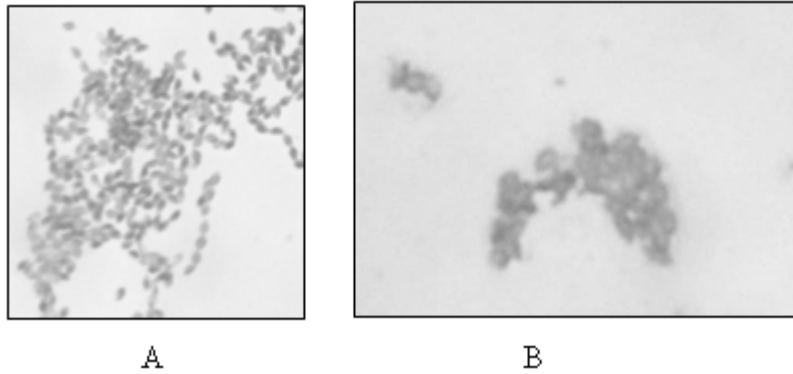


Figura 2. Frotis directos teñidos del área del medio de cultivo durante el indexing bacteriológico con opacidad muy ligera sobre el medio de cultivo alrededor del material vegetal donde se observan bacilos esporulados.

A: Imagen a 1000x con objetivo de inmersión en aceite; B: Imagen aumentada digitalmente

Carrazana *et al.* (2001) refieren la evaluación de cuatro tubos procedentes de un indexing bacteriológico de malanga *Xanthosoma* durante la fase de establecimiento, empleando como medio de cultivo Agar Triptona Soya. Los correspondientes tubos separados del establecimiento se caracterizaron por presentar turbidez ligera, permaneciendo sano el explante. En todos los casos no se observó crecimiento en el medio de cultivo bacteriológico. Este resultado es muy similar a la problemática tratada en la presente investigación. Los autores argumentan que se pudo estar en presencia de microorganismos que necesitan medios de cultivos muy selectivos para poder manifestarse, lo que coincide con Leifert y colaboradores (1994) quienes plantean que los medios bacteriológicos generales sólo detectan un rango de bacterias, pues se ha aislado un número de ellas con requerimientos nutricionales especiales que no crecen en los medios de rutina de indexing de muchos laboratorios. Y además que algunas especies bacterianas necesitan estar presentes en un elevado número para que se expresen en el indexing.

También a los 16 días de incubación se separó un tubo con crecimiento mucilaginoso de color amarillo sobre el medio de cultivo, estando incluido el material vegetal en la biomasa bacteriana. A partir de este se aislaron cocos Gram negativos formadores de colonias circulares, de elevación umbilicada, borde entero, opacas y de color amarillo.

Cuando el corte histológico vegetal teñido diferencialmente fue observado no se detectó la presencia de estructuras bacterianas, procediendo por lo tanto del ambiente.

Otro tubo presentó crecimiento mucilaginoso blanquecino en el fondo, separado del material vegetal, lo cual indica su procedencia ambiental. A partir de este se aislaron bacilos Gram negativos, formadores de colonias de forma circular, elevación convexa, borde entero, opacas y de color blanco. A los 30 días de iniciación no se detectaron tubos de indexing bacteriológico con cambios en el medio de cultivo atribuibles a crecimiento bacteriano.

En total de 41 tubos de indexing bacteriológico evaluados, 18 fueron separados por cambio de apariencia que suponía un resultado positivo para presencia de bacterias (43,9%), siendo confirmado en 17 de estos (41,5%). De estos resultaron endófitos 10 (24,4% del total) y 7 procedieron del ambiente (17,1%).

En todos los tubos de ensayo y frascos con contaminación bacteriana, a partir de los cuales se hizo el aislamiento de cultivos puros, se constató la presencia de un único microorganismo. Este resultado coincide con lo planteado por varios investigadores (Leifert *et al.*, 1991; Gunson y Spencer-Phillips, 1994) quienes han detectado que más del 90 % de los cultivos examinados presentan un único microorganismo contaminante, independientemente del tiempo de cultivo de las plantas *in vitro*, refiriéndose como posible causa la competencia entre microorganismos (Leifert *et al.*, 1994).

Procedentes de la fase de establecimiento se llevaron a multiplicación 40 plantas *in vitro*. El porcentaje de frascos de cultivos contaminados fue por lo tanto de 0 %.

El escaso desarrollo del tejido impidió que se seccionaran las plantas *in vitro* al subcultivar, salvo en un caso que se dividió en dos. Por lo tanto el número de estas que pasaron a un segundo subcultivo en la fase de multiplicación fue de 40.

Luego del segundo subcultivo se separaron tres frascos con opacidad ligera dentro del medio de cultivo por debajo del material vegetal que permanece sano (Figura 3). Por lo tanto el porcentaje de frascos separados por contaminación bacteriana fue del 7,5% del total.

En esta ocasión, al subcultivar, las plantas *in vitro* fueron seccionadas en dos o tres, según su crecimiento. El número total fue de 74.

Al finalizar el tercer subcultivo fueron separados 12 frascos con las mismas características referidas con anterioridad.

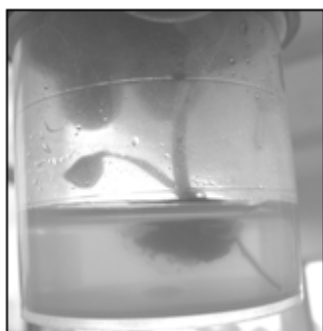


Figura 3. Frasco de cultivo de malanga en la fase de multiplicación con opacidad ligera dentro del medio de cultivo por debajo del material vegetal que permanece sano

El porcentaje de frascos separados por contaminación bacteriana en este subcultivo fue del 16,2% del total.

Según los resultados obtenidos se confirma el problema práctico que dio origen a esta investigación y se puede inferir la elevada magnitud que alcanzaría de realizar de 10 a 12 subcultivos, tal como se orienta en la Norma Ramal de la Agricultura para la propagación *in vitro* de la malanga (NRAG 205:11). En todos los casos el aislamiento bacteriano fue negativo y la observación de los frotis directos teñidos del área del medio de cultivo permitió la detección de bacilos formando agrupaciones y cadenas, presumiblemente formadores de

endospora, lo cual fue confirmado con la tinción especial para este tipo de estructura de resistencia bacteriana, así como la respuesta positiva al Gram. Estos bacilos presentaron la misma morfología que los detectados durante el indexing bacteriológico. Lo anterior confirma la hipótesis de que la problemática abordada en la presente investigación se debe a la presencia de bacterias endófitas que, estando presentes en el material vegetal de partida en la micropropagación (explantes), permanecen latentes durante la fase de establecimiento y se manifiestan durante la multiplicación.

Una gran parte de las líneas de plantas donantes (11 de 14) presentó estos contaminantes bacterianos endófitos y dada su difícil detección, es posible que las otras también los posean. Por lo tanto puede inferirse que se trata de un microorganismo asociado al cultivo en una relación simbiótica.

Santos y colaboradores (2005) evaluaron en el INIVIT modificaciones en el Instructivo Técnico para la micropropagación de la malanga (I.T, 2005), empleando como material donante a plantas del clon "Camerún 14" (*Colocasia esculenta* Schott). Estas consistieron en variaciones de la concentración del hipoclorito de sodio (%) y el tiempo de inmersión del tejido vegetal en este (minutos), considerando las siguientes variantes: 2,5-20, 3-15, 3-20 y 3-25. En tal caso los porcentajes de contaminación bacteriana detectada fueron de 17, 5,9, 5,6 y 0% y la mortalidad debido a la fitotoxicidad de 8, 19, 30 y 100%.

En este sentido la modificación en la evaluación presentada en este artículo es favorable, pues en la fase de establecimiento el porcentaje de contaminación bacteriana fue de solamente el 2,4% y ningún explante murió, a pesar de haber empleado la mayor concentración de hipoclorito de sodio usada por los autores referidos, durante cinco minutos más. Esto es atribuible a la eliminación del paso de inmersión en etanol. Puede que la bacteria endófitas detectada en el presente estudio establezca una relación simbiótica con la planta, y resulte necesaria para su crecimiento, una vez plantada.

Si bien la presencia de contaminantes latentes puede resultar perjudicial durante el cultivo *in vitro* de especies vegetales, al interferir en su crecimiento, la

proliferación de los brotes y el enraizamiento, e inducir necrosis tisular (Leifert et al., 1994), puede ser en ocasiones beneficiosa.

La biotización es el empleo de inóculos microbianos que favorecen cambios fisiológicos y de desarrollo que propician el aumento de la resistencia al estrés de los propágulos frente a los factores bióticos y abióticos del medio. Esta estrategia se está investigando debido a la importancia que tiene y a las ventajas que puede aportar a la producción de plantas de alta calidad y libres de contaminación microbiana (Kilian et al., 2000).

Durante las últimas décadas los investigadores se han dado a la tarea de estudiar algunos microorganismos epifíticos y/o endofíticos habitantes de las plantas, con el objetivo de adaptarlos a los procesos *in vitro* para favorecer la adaptación de los propágulos obtenidos mediante el cultivo de tejidos vegetales ante el estrés ambiental (Herman, 1996).

Otro objetivo perseguido con el uso de la biotización es la prevención de la hiperhidricidad (vitricación), habiéndose comprobado este efecto en cultivos de tejidos vegetales en presencia de *Pseudomonas* spp., *P. mucidolens*, *P. stutzeri* y *Beijerinckia indica* (Shetty et al., 1995; Ueno et al., 1998).

Algunos de estos microorganismos, como las bacterias y las micorrizas, pueden inducir en las plantas mayor resistencia al estrés ambiental y, por tanto, aumentar su viabilidad y rendimiento en el campo. La inducción de la resistencia al estrés en plantas producidas *in vitro*, antes de la plantación, ha sido tarea principal de un grupo de investigadores, quienes han utilizado para este fin, inóculos microbianos en la micropropagación, pues la inducción de la resistencia está bien documentada en el crecimiento de plantas *in vivo* y esto se ha tenido en cuenta para el cultivo *in vitro* (Herman, 1996).

Se plantea que algunas especies microbianas pueden presensibilizar el metabolismo de los propágulos obtenidos *in vitro* por sobreexposición al estrés, de modo que una vez en el campo las plantas sean capaces de responder más rápido y en mayor grado que aquellas no expuestas (Nowak y Shulaev, 2003).

Resultaría de interés realizar un estudio de mayor magnitud que el presentado, donde se calculara el

coeficiente de multiplicación del cultivo y se comparara con los valores referidos en la literatura científica para este cultivar, pues se ha descrito que muchas especies bacterianas presentes en el cultivo *in vitro* de especies vegetales pueden afectar este parámetro (Leifert, et al., 1994). Taylor (1994) refiere una situación el cultivo *in vitro* del boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) y la malanga (*Colocasia esculenta* Schott) muy similar a la del presente estudio. El autor refiere que en presencia de los microorganismos endófitos se obtienen plantas *in vitro* bien desarrolladas, aunque pudiera afectarse el coeficiente de multiplicación. En esta fuente bibliográfica también se plantea que incorporando antibióticos en el medio de cultivo se logra controlar la aparición visible de los contaminantes, que aun estando presentes, no se expresan.

Ninguno de los componentes orgánicos del medio de cultivo para la multiplicación de la malanga presenta anillos polifenólicos en su estructura química. Además no se observó la aparición del cambio de coloración referido como respuesta a la presencia de polifenoles en los tubos de cultivo con este medio de cultivo sin plantas *in vitro* y en aquellos con plantas donde no existió manifestación visible alguna de contaminación bacteriana aparente.

Teniendo en cuenta estos resultados, el método cualitativo propuesto para la detectar a presencia de polifenoles totales en el medio de cultivo de los frascos separados como posiblemente contaminados en la fase de multiplicación, donde el aislamiento bacteriano fue negativo, es adecuado.

Todos los frascos de cultivo evaluados (15) con las características antes referidas presentaron, como se describió, opacidad ligera dentro del medio de cultivo por debajo del material vegetal que permanece sano. Y si bien, en todos se detectó la presencia de al parecer la misma especie de bacilo esporulado, se realizó la evaluación en busca de polifenoles para confirmar o rechazar la hipótesis alternativa de la presente investigación, de que son estos los metabolitos los responsables del cambio de apariencia del medio de cultivo.

Es necesario hacer la consideración de que en el suelo existen microorganismos capaces de sintetizar polifenoles (García, 2008), los cuales juegan un importante papel en la formación del humus, y que

de resultar positivo este ensayo se debiera enfocar la discusión sobre esta base, teniendo en consideración la procedencia subterránea del material vegetal donante en la micropropagación de la malanga.

El resultado del ensayo de detección de la presencia de polifenoles totales en el medio de cultivo se muestra en la Figura 4.

Como se esperaba extracto vegetal empleado como control positivo formó un precipitado azul intenso a negro, disminuyendo la intensidad del color con el

aumento de la dilución. Este es característico de polifenoles del tipo de los taninos pirogalotánicos. Los controles negativos mostraron la efectividad del procedimiento de evaluación. Todas las porciones de medio de cultivo evaluadas resultaron negativas a la detección de polifenoles.

Por lo tanto la hipótesis alternativa a la presencia de bacterias endófitas latentes como causa de tal cambio de apariencia en el medio de cultivo de multiplicación de malanga *Xanthosoma*, abordada en la presente investigación es rechazada.

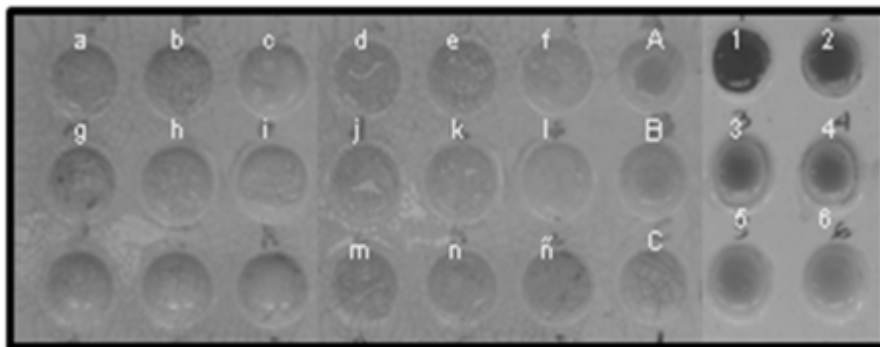


Figura 4. Prueba de detección de polifenoles totales.

1-6: Control positivo. Diluciones seriadas en metanol (1:10) de un extracto de las hojas verdes adultas de *Terminalia catappa* L. más FeCl_3 .

A: Control negativo. Extracto vegetal sin diluir.

B: Control negativo. Extracto vegetal diluido en metanol (1:10) (v: v).

C: Control negativo. Metanol (90 μL), más FeCl_3 .

a-ñ: Porción de medio de cultivo de los frascos separados como posiblemente contaminados en la fase de multiplicación, donde el aislamiento bacteriano hubiese sido negativo, más 90 μL de metanol, más FeCl_3 .

CONCLUSIONES

1. La incidencia de contaminación bacteriana visible en los tubos de malanga *Xanthosoma* cv México 08 en la fase de establecimiento es baja y de origen ambiental, siendo el procedimiento de desinfección del explante efectivo para esta etapa, el cual además no es fitotóxico.

2. La mayoría de las plantas *in vitro* de malanga *Xanthosoma* cv México 08 portan bacterias endófitas (bacilos Gram positivos esporógenos) dependientes del material vegetal, que causan opacidad ligera en el medio de cultivo de multiplicación, permaneciendo estas sanas.

3. Las plantas *in vitro* de malanga *Xanthosoma* no ocasionan un cambio de apariencia visible en el medio de cultivo, debido a la liberación polifenoles.

RECOMENDACIONES

1. No eliminar frascos en la fase de multiplicación de la malanga (*Xanthosoma*), que presenten una ligera opacidad por debajo del material vegetal, en los que plantas *in vitro* no muestran efectos deletéreos.

2. Determinar la influencia en la modificación del coeficiente de multiplicación de la malanga del bacilo Gram positivo endófito detectado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Carrazana, D., Folgueras, M., Herrera, L., Suárez, N., Rodríguez, J.A. y del Sol, L.: Contaminación bacteriana en la micropropagación de raíces y tubérculos tropicales en Cuba. Centro Agrícola. 28(2):60-65, 2001.

2. García, A.: La materia orgánica del suelo (MOS) y su papel en la lucha contra la degradación del suelo. XI Congreso Ecuatorial de la ciencia del Suelo, Quito, 2008.
3. Hernández, J. E., González, D., Bermúdez, D., Gálvez, V., Gutiérrez y Gálvez, J. R.: Generalización de la metodología para la micropropagación de la malanga (*Xanthosoma* spp.) en Cuba. En: 5^{to} Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. pp. 167-169, 1999.
4. González, A., Grillo, H., Más, O., Ríos, A. y del Valle, N.: Nudosidades de los cítricos en Jagüey Grande, aspectos histológicos y fisiológicos. Centro Agrícola. 24 (2): 80-86, 1997.
5. Gunson, H.E. y Spencer-Phillips, T.N.: Latent bacterial infections: Endophytes as contaminants of micropropagated plants. En: Nicholas, J. R. y Davis, B. J (Eds.), Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. pp. 385-400. Kluwer: Academic Publishers, Dordrecht, Holland, 1994.
6. Herman, E. B.: Beneficial effect of bacterial and fungi on plant tissue cultures. Agricell Rep. 27(1): 26-27, 1996.
7. I.T. Instructivo Técnico para la Micropropagación de la malanga (INIVIT), 2005.
8. Kilian, M., Steiner, U., Krebs, B., Junge, H., Schmiedeknecht, G. y Hain, R.: *Bacillus subtilis*, mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. Pflanzenschutz nachrichten Bayer. 53(1): 72-93, 2000.
9. Leifert, C., Morris, C. E. y Waites, W. M.: Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plant: reason for contamination problems *in vitro*. Critical Review in Plant Sciences. 13(1):139 -183, 1994.
10. Leifert, C., Camotta, H., Wright, S., Waites, B., Cheyne, V. A. y Waites, W. M.: Elimination of bacteria from micropropagated plant cultures using antibiotics. J. Appl. Bacteriol. 71(1): 307-330, 1991.
11. N.R.: Norma Ramal de Salud Pública para tamizaje fitoquímico: Detección de polifenoles totales, 2005.
12. NAPRALERT (Base de datos de Productos Naturales). ChicagoUniversity, 1998.
13. Nowak, J. y Shulaev, V.: Priming for transplant stress resistance *in vitro* propagation. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. 39(2):107-124, 2003.
14. NRAG 205:11. Norma Ramal de la Agricultura. Biotecnología. Propagación *in vitro* de la malanga (*Colocasia esculenta* y *Xanthosoma* spp.). Especificaciones.
15. Picerno, P., Mencherini, T. Lauro, M. R., Barbato, F. y Aquino, R.: Phenolic constituents and antioxidant properties of *Xanthosoma violaceum* leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (22): 6423-6428, 2003.
16. Santos, A., García, M., Carrazana, D., López, J., Ventura, J., Basail, M., Medero, V., Cabrera, M., Rayas, A., Gálvez, D., Álvarez, M. y Ortega, M.: Prevención de la contaminación microbiana en la micropropagación de la malanga clon "Camerún 14" (*Colocasia esculenta*). Centro Agrícola. 32(3): 31-34, 2005.
17. Shetty, K., Curtis, O. F., Levin, R. y Witkowsky Ang, W.: Prevention of vitrification associated with *in vitro* shoot culture of orégano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol*. 147(1): 447-451, 1995.
18. Taylor, M.B.: Endogenous contaminants and tissue culture. Pacific Regional Agricultural Programmed. G.P.O. Bpx 12621, Fiji, 1994.
19. Ueno, K., Cheplick, S. y Shetty, K.: Reduced hyperhydricity and enhanced growth of tissue culture-generated raspberry (*Rubus* sp.) clonal line by *Pseudomonas* sp. isolated from oregano. *Process Biochemistry*. 33(4): 441-445, 1998.
20. Van den Houwe, I. y Swennen, R.: Characterization and control of bacterial contaminants *in vitro* cultures of banana (*Musa* spp.). *Acta Horti*. 530(1): 69-79, 2000.
21. Yemenicioglu, A., Ozkan, M. y Cemeroglu, B.: Some characteristics of polyphenol oxidasa and peroxidasa from Taro (*Colocasia antiquorum*). *Tr. J. of Agriculture and Forestry*. 23(1): 425-430, 1999.

Recibido: 21/02/2011

Aceptado: 23/06/2011