

UNIVERSIDAD AGRARIA DE LA HABANA
“FRUCTUOSO RODRIGUES PÉREZ”

Titulo: Efecto de la contaminación bacteriana en la micropropagación de FHIA 18 (Musa spp híbrido AAAB) en la Biofábrica de Cienfuegos

Tesis presentada en opción del título académico de
“ Master en Ciencias Agrícolas ”



AUTOR : Ing. Odalmys Pérez Espinosa

TUTORES: Dra. Yelenys Alvarado Capó
Msc. Silvio Martínez Medina

Año 2006.
“Año de la Revolución Energética en Cuba”

INDICE

pág

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	5
2.1 Importancia de plátanos y bananos.....	5
2.2 Micropropagación de plátanos y bananos.....	6
2.2.1 Fases de la micro propagación.....	6
2.2.1.1 Fase 0.....	6
2.2.1.2 Fase I.....	8
2.2.1.3 Fase II.....	11
2.2.1.4 Fase III.....	12
2.2.1.5 Fase IV.....	13
2.3 Microorganismos en el cultivo <i>in vitro</i> de células y tejidos vegetales.....	14
2.4 Contaminación bacteriana en al cultivo in vitro de células y tejidos vegetales.....	16
2.4.1 Fuentes de contaminación bacteriana.....	16
2.4.1.1 Los explantes.....	17
2.4.1.2 El ambiente.....	18
2.4.1.3 El hombre.....	19
2.4.2 Relación entre los componentes del ecosistema <i>in vitro</i> y contaminación bacteriana.....	19
2.4.2.1 Vitropatogenos.....	20
2.4.3 Métodos para el control de contaminación bacteriana.....	22
2.4.3.1 Detección temprana.....	22
2.4.3.2 Uso de antibióticos.....	23
3. MATERIALES Y METODOS.....	24
3.1 Material vegetal y condición de cultivo.....	24
3.1.1 Fase de establecimiento.....	24
3.1.2 Fase de multiplicación.....	25
3.1.3 Fase de enraizamiento.....	25
3.1.4 Manejo del material vegetal in vitro.....	26
3.2 Efecto de la contaminación bacteriana sobre el material vegetal in vitro.....	26
3.2.1 Efecto de la contaminación durante la fase I(establecimiento).....	27
3.2.2 Efecto de la contaminación bacteriana durante seis subcultivos de multiplicación..	27
3.2.3 Evaluación del efecto de la contaminación bacteriana sobre el material vegetal	28
3.2.4 Evaluación del efecto de la contaminación bacteriana sobre el material vegetal en la fase de enraizamiento.....	29
3.3 Evaluación del efecto de la contaminación bacteriana sobre el material vegetal en la fase de aclimatización.....	30
3.4 Análisis económico de los aportes a la tecnología para la micropropagación del híbrido FHIA 18(AAAB) en las diferentes fases.....	31
4. Resultados y discusión.....	32
4.1 Efecto de la contaminación durante la fase I(establecimiento).....	32
4.1.2 Efecto de la contaminación bacteriana durante seis subcultivos de multiplicación..	36

INDICE

pág

4.1.3Evaluacion del efecto de la contaminación bacteriana sobre el material vegetal.....	38
4.1.4 Evaluación del efecto de la contaminación bacteriana sobre el material vegetal en la fase de enraizamiento.....	41
4.2 Evaluación del efecto de la contaminación bacteriana sobre el material vegetal en la fase de aclimatización.....	45
4.3 Análisis económico de los aportes a la tecnología para la micropropagación del híbrido FHIA 18(AAAB) en las diferentes fases.....	47
5. Conclusiones.....	52
6. Recomendaciones.....	53
7.Referencia Bibliográfica.....	54
8.Anexos.....	55

RESUMEN

Este trabajo fue realizado en la Biofábrica de Cienfuegos en el período comprendido entre de enero 2004 y julio de 2005 con el objetivo de disminuir los índices de pérdidas por contaminación bacteriana e incrementar su eficiencia productiva en la micropropagación del híbrido FHIA-18. En los experimentos realizados se demostró la presencia durante le fase de establecimiento de contaminantes bacterianos predominando las de color blanco, en forma de cocos y crecimiento turbio. Fue posible disminuir en 7,5 el porcentaje de contaminantes bacterianos al reducirse hasta 10 ápices por frasco durante la primera desinfección. El trabajo en líneas, libres de contaminantes bacterianos permite reducir la contaminación, aumentar los coeficientes de multiplicación y la calidad de las plantas a comercializar. Los aportes del trabajo permiten incrementar la eficiencia productiva de la Biofábrica, ahorrándose 624 en MLC por concepto de agar-agar y reducirse los gastos de producción en 246 367 pesos para cumplir un plan de 1 3000 000 vitroplantas..

1.INTRODUCCIÓN

El cultivo de plátanos y bananos se encuentra ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales, el estimado de la producción es de 88 millones de toneladas al año con un área calculada de siembra de 10 millones de hectáreas (Leimart *et al.*, 2002). El mismo forma parte de la dieta alimenticia de más de 400 millones de personas y se ubica en el cuarto renglón en la categoría de productos alimenticios de gran demanda después del arroz, el trigo y la leche (FAO, 2001).

Las técnicas del cultivo de tejidos constituyen una de las aplicaciones prácticas más importantes de las ciencias biotecnológicas. La obtención de grandes volúmenes de material vegetal de propagación en plátanos y bananos libre de plagas y enfermedades fúngicas y bacterianas, así como la conservación e intercambio de germoplasma constituyen importantes aplicaciones de estas técnicas (Vuylsteke y De Langhe, 1985).

Sin embargo, una amplia variedad de microorganismos (hongos filamentosos, levaduras, bacterias, virus y viroides) patógenos o no de las plantas cultivadas en condiciones naturales han sido identificadas como contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas. Los mismos pueden ser introducidos con el explante inicial, durante las manipulaciones en el laboratorio o por microartrópodos (Cassells, 1991; George, 1993; Leifert *et al.*, 1994 ; Leifert y Casells, 2001). Entre ellos, las bacterias han sido consideradas como las que causan los daños más serios. Algunas especies tienen la capacidad de manifestar crecimiento en los medios de cultivos inmediatamente, pero otras permanecen latentes por largos periodos de tiempo en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y después que han incrementado su número en el interior del tejido vegetal o las condiciones del ecosistema *in vitro* lo permiten, aparecen súbitamente (Cassells, 1991; George, 1993) y pueden conllevar a pérdidas de más

del 20,0% (Leifert *et al.*.,1994). Al clasificarse las bacterias contaminantes se han podido determinar que pertenecen a varios grupos ecológicos (Stead *et al.*, 1998).

En Cuba, desde la primera mitad de la década del 80 del siglo XX se iniciaron las investigaciones para establecer la propagación *in vitro* de plátanos y bananos la cual fue publicada por Pérez *et al.* (1989). Actualmente existen en el país 13 Biofábricas destinadas a la propagación masiva de plátanos, bananos y otras especies, con una capacidad de producción de 60 000 000 de plantas *in vitro* (Pérez *et al.*.,2000). La Biofábrica de Cienfuegos que se dedica a la micropropagación de plátanos y bananos cuenta con una capacidad de producción de 1.5 millones de plantas *in vitro* anuales. Al igual que en otros laboratorios la presencia de bacterias contaminantes constituye una de principales causas de los altos índices de pérdidas por encima del 10 % permisible y la baja eficiencia del proceso.

Teniendo en cuenta las razones expuestas anteriormente y la necesidad de abordar el problema de la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de FHIA-18 (*Musa* spp. híbrido AAAB) se estableció la siguiente **hipótesis** de trabajo.

Es posible disminuir las pérdidas por contaminación bacteriana a partir de manejar *in vitro* el material vegetal libre de contaminantes y con ello incrementar la eficiencia de la Biofábrica.

Objetivo General

Evaluar el efecto de la contaminación bacteriana sobre el material vegetal en la micropropagación de FHIA 18 (AAAB) en la Biofábrica de Cienfuegos en dos años con diferente manejo del material vegetal (enero – julio 2004 y 2005).

Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto de contaminantes bacterianos en la fases de establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* del híbrido FHIA 18 (AAAB).
2. Evaluar el efecto de la contaminación bacteriana en las fase de aclimatización, sobre la calidad del material vegetal.
3. Realizar un análisis económico de los aportes del trabajo para la micropropagación del híbrido FHIA-18(AAAB) en la Biofábrica de Cienfuegos para dar cumplimiento a su plan anual de 1 5000 000 vitroplantas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importancia de Plátanos y Bananos.

Los plátanos y bananos poseen frutos altamente energéticos, sus carbohidratos son fácilmente asimilables por el organismo. En general estos frutos se componen principalmente de agua, carbohidratos, conteniendo cantidades insignificantes de proteínas y grasas, sin embargo son ricos en vitamina A, B, C, E y minerales, de ahí su alta demanda en la alimentación mundial (López, 1989). Además los diferentes órganos del banano poseen mundialmente diferentes usos entre los que se pueden citar: medicinal, producción de alcohol y fuente de fibra (INIBAP, 2001; INIBAP, 2002).

Mundialmente los agricultores suministran a los mercados locales bananos de diversos tipos (bananos para postres, cocción, molturación y plátanos). Ellos no suelen hacer tratamientos químicos para su conservación, por lo que necesitan clones resistentes y en muchos casos no poseen los recursos financieros para poder pagar otro tipo de tecnología que aumente los rendimientos y la resistencia a enfermedades. La biotecnología pudiera ofrecer nuevas oportunidades para la seguridad alimentaria, donde el banano es la fuente de mayor importancia como alimento fundamentalmente en países en vía de desarrollo lo que permitiría poner a disposición del consumo local más frutos y por periodos más largos. (INIBAP, 2004)

2.2. Micropropagación de plátanos y bananos.

La micropropagación ha sido definida usualmente como la multiplicación de material vegetal *in vitro* bajo condiciones asépticas en un medio de cultivo artificial. Este proceso tiene como premisa que las plantas resultantes sean fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta que les dio origen.

2.2.1 Fases de la Micropropagación

Las fases de la Micropropagación de plantas son las siguientes:

-Fase 0 (Preparativa): Es importante y necesaria para la micropropagación pues se selecciona el material de partida en base a sus características genéticas y fitosanitarias (Debergh y Maene, 1981)

-Fase I (Establecimiento o iniciación de los cultivos): El ápice caulinar es manipulado mediante la composición del medio de cultivo con el propósito de establecer un renuevo viable.

-La fase II (Multiplicación, proliferación o ahijamiento): Tiene como objetivo la multiplicación de vástagos.

-Fase III (Elongación, inducción de raíces y crecimiento): Su objetivo es preparar a las plantas *in vitro* para su establecimiento en condiciones *ex vitro*.

-Fase IV (Aclimatización): Es la fase final del proceso y por tanto, su objetivo es lograr plantas listas para su transplante.

2.2.1.1 Fase 0

Esta fase persigue garantizar material vegetal de partida de alta calidad genética y fitosanitaria. La selección y crecimiento de la planta madre en condiciones asépticas influye directamente en la disminución de la contaminación principalmente por bacterias (Martínez *et al.*, 1992; Orellana, 1994).

Entre las problemáticas que se presentan en la micropropagación de plátanos y bananos se encuentran la contaminación y la oxidación fenólica que se producen en la fase I, pues generalmente la selección del material vegetal se hace en campo y bancos de germoplasma y se introducen directamente *in vitro* (Damasco *et al.*, 1984, Sandoval, 1985; Zamora *et al.*, 1989; Pérez *et al.*, 1989).

La contaminación microbiana es un problema constante que compromete el desarrollo de todas las técnicas *in vitro*. Las pérdidas causadas por microorganismos contaminantes principalmente hongos y bacterias constituye un serio problema a escala mundial en los numerosos laboratorios. Estos están comúnmente en las plantas *ex vitro* pero pueden provocar efectos devastadores en las plantas en condiciones *in vitro* (Skirvin *et al.*, 1999).

La oxidación fenólica durante la fase I depende en gran medida del tratamiento que reciban los ápices durante la fase 0, en lo cuál los ápices pueden ser tratados con antioxidantes para disminuir la fenolización de los mismos en el medio de cultivo. Entre los antioxidantes empleados se refieren la cisteína, ácido cítrico, ácido ascórbico y carbón activado (Sandoval, 1985)

Se ha descrito que cuando los ápices provienen directamente de campo, la duración de la fase I se prolonga 24-25 días con índices de contaminación superiores al 20 % (Martínez *et al.*, 1992; Orellana *et al.*, 1994). Esta problemática puede ser resuelta por diferentes vías si los explantes provienen de plántulas donantes cultivadas en condiciones de mayor asepsia.

Desinfección del explante inicial.

Para la desinfección del explante inicial se han empleado comúnmente soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) en concentraciones entre 0.5 y 5 % (Kriokorian y Cronauer, 1984; Jarret *et al.*, 1985, citado por Martínez, 1995;

Sandoval, 1985). Las soluciones de hipoclorito de calcio (CaOCl) son tan efectivas como las de sodio (Vuylsteke y De Langhe, 1985; Benerjee *et al.*, 1985)

La excisión del explante es recomendable realizarla después de la desinfección para eliminar tejidos que han sido dañados por la solución de hipoclorito. La aplicación de una doble desinfección con hipoclorito de sodio o calcio, seguido de enjuague con agua destilada y esterilizada por 2-3 minutos ha sido empleada por varios investigadores (Sandoval, 1985; Novat *et al.*, 1988; Pérez *et al.*, 1989).

En el Anteproyecto de la Norma Técnica, que rige el funcionamiento de las Biofábricas de plátanos en Cuba se plantea la desinfección con hipoclorito de sodio al 3 % durante 20 minutos (Aragón, 1991).

2.2.1.2 Fase I

El objetivo fundamental en esta fase es lograr un cultivo aséptico de ápices de plantas con buenas características genéticas y fitosanitarias, previamente diagnosticadas para lograr confiabilidad durante el proceso tecnológico. La desinfección, el corte y la incubación de los explantes juegan un papel fundamental para lograr este objetivo.

Los explantes en la mayoría de los casos proceden de yemas, brotes jóvenes con hojas rudimentarias, hijos o brotes con hojas uniformes (Vuylsteke, 1989). La micropropagación a partir de ápices caulinares y meristemos ha sido referida en plátanos y bananos por numerosos autores. (Ma y Shii, 1972; Krikorian y Cronauer, 1984; Vuylsteke y De Langhe, 1985; Arias y Valverde, 1987; Pérez *et al.*, 1989). También se ha descrito el empleo de ápices meristemáticos florales como explante inicial (Krikorian y Cronauer, 1984; Rao *et al.*, 1993).

Los ápices caulinares pueden ser obtenidos de todas las partes de la planta que contengan meristemas. La respuesta al crecimiento y la sobrevivencia del explante no difiere entre los ápices caulinares obtenidos a partir del pseudotallo madre, sus hijos, yemas laterales o hasta los brotes muy pequeños (Jarret *et al*, 1985, citado por Martínez 1995; Vuylsteke y De Langhe, 1985).

Las yemas de ojos o botones que se encuentran alrededor de la yema apical han sido empleadas también como fuente donadora del explante inicial (Damasco *et al.*, 1984; Vuylsteke y De Langhe, 1985).

El establecimiento de ápices de plátanos y bananos a partir de plantas seleccionadas que crecen *in situ*, cultivadas en invernaderos y canteros tecnificados, constituyen una vía para aumentar la eficiencia de los métodos *in vitro* (Orellana, 1994; Martínez, 1995).

Tamaño y seccionado del ápice implantado

El tamaño final de ápices de plátanos y bananos a implantar depende de si es necesario o no el saneamiento a virus, si se quiere sanear el tamaño final del ápice meristemático debe ser reducido entre 0.1 y 1.3 mm, y se puede combinar con tratamientos químicos y térmicos (Pérez *et al.*, 1989). Otros autores recomiendan tamaño entre 3-8 mm con varias hojas primordiales (Damasco *et al.* , 1984 ;Sandoval, 1985). Estos autores encontraron como tamaño optimo del ápice 5 mm y que a menor tamaño del explante menor supervivencia e incremento de la oxidación fenólica.

El Anteproyecto de Norma Técnica para las Biofábricas cubanas orienta dejar el cormo en forma de base cuadrada de 0.5 cm y 0.5 cm de alto del pseudotallo. El explante inicial tiene gran importancia para la fase II, pues de su seccionado

depende el número de brotes en el primer subcultivo (Aragón, 1991; Martínez *et al.*, 1992; Orellana, 1994; Martínez, 1995).

Incubación de los explantes

La temperatura e iluminación constituyen las condiciones ambientales más estudiadas y necesarias para la incubación de los ápices durante la iniciación. Para el desarrollo de ápices o meristemas de plátanos y bananos son normales las fluctuaciones entre las temperaturas diurnas y nocturnas en rangos de 26-32 grados Celsius (Vuylsteke, 1989). Los valores próximos a los 30 grados Celsius resultan óptimos (Dore Swamy *et al.*, 1983; Krikorian y Cronawer, 1984; Benerjee *et al.*, 1985).

En la iniciación de los ápices, la intensidad y calidad de la luz, así como el fotoperíodo son de vital importancia. Se refieren en rangos de 8-16 horas de luz (Damasco *et al.*, 1984; Vuylsteke y De Langhe, 1985), sin embargo es ampliamente utilizado para el crecimiento proliferativo y la regeneración de plantas de plátanos y bananos fotoperíodos de 12 hasta 16 horas de luz. La mayor cantidad de trabajos de micropropagación se han llevado a cabo bajo condiciones de luz artificial brindada por tubos fluorescentes blancos (Vuylsteke y de Langhe, 1985). Tanto la luz solar como artificial pueden ser empleadas durante el cultivo *in vitro* con excelentes resultados (Pérez *et al.*, 2000).

Generalmente se utilizan rangos de intensidad de la luz de 1500-3000 lux, pero una mayor intensidad de la luz da lugar a una regeneración de plantas más rápidas (Vuylsteke y De Langhe, 1985). Niveles por encima de 3000-10000 lux han sido empleados mejorando la supervivencia (Murashige, 1974; George y Sherrington, 1984).

Los ápices caulinares para el establecimiento en las Biofábricas deberán incubarse a temperaturas de 26 a 32 °C, cámaras de luz solar o artificial con una intensidad luminosa entre 2000 y 5000 lux (Aragón, 1991).

2.2.1.3 Fase II

La producción de grandes volúmenes de propagulos de alta estabilidad genética constituye el objetivo de esta fase. Estos objetivos se pueden obtener por tres vías: propagación por yemas axilares, por yemas adventicias y embriogénesis somática. La propagación por yemas adventicias se ha usado con frecuencia en plátanos y bananos (Ma y Shii, 1972; Dore Swamy *et al.*, 1983; Damasco *et al.*, 1984). La embriogénesis somática de plátanos y bananos aún no está muy difundida en esta especie.

Empleo de yemas axilares o adventicias.

Las yemas adventicias proporcionan altos coeficientes de multiplicación con respecto a las axilares, sin embargo el riesgo de que un número considerable de estas sean atípicas aumenta. Por ejemplo empleando yemas adventicias en el clon Zanzíbar (AAB) se encontró una alta frecuencia de variación somaclonal (Martínez *et al.*, 1992).

Los niveles altos de citoquininas estimulan la formación de yemas múltiples (Vuylsteke y De Langhe, 1985). El 6BAP es la citoquinina más ampliamente utilizada y efectiva para la formación de multiyemas. Las concentraciones comúnmente empleadas en la multiplicación de brotes oscilan entre 2-5 mg/l⁻¹. Se han utilizado niveles de hasta 10mg/l⁻¹ de 6BAP, los cuales en el clon Zanzíbar (AAB) forman yemas múltiples (Martínez *et al.*, 1992). Otros han empleado esta concentración en la formación de multiyemas (Dore Swamy *et al.*, 1983; Damasco *et al.*, 1984).

Las concentraciones por debajo de 10 mg/l^{-1} disminuyen la formación de brotes (Zamora *et al.*, 1989). Concentraciones de 5 mg/l^{-1} de 6BAP son consideradas como óptimas (Krikorian y Cronauer, 1984 y Jarret *et al.*, 1985, citado por Martínez, 1995). Esta última concentración se considera como la estándar para la inducción de brotes, sin la formación de raíces, con ella y el empleo de medios de cultivo líquidos se obtienen yemas axilares mientras que en el medio semi-sólido se forman yemas múltiples (Krikorian y Cronauer, 1984). A pesar de obtenerse con las yemas axilares índices de multiplicación más bajos, estas ofrecen mayor estabilidad genética que las yema adventicias y la embriogénesis (Orellana, 1994).

La técnica de inmersión temporal también ha sido utilizada en la multiplicación acelerada del cultivar FHIA-18 (AAAB) *Musa sp. híbrido*, empleando como medio de cultivo las sales propuestas por Murashige y Skoog, (1962), suplementadas por 4 mg/l^{-1} de 6BAP y utilizando paclobutrazol como inhibidor de crecimiento (Daquinta *et al.*, 1999).

2.2.1.4 Fase III

El propósito final en la formación de plantas completas es la regeneración de raíces adventicias en los brotes obtenidos en la fase II. Existen especies en que la elongación de los brotes es inhibida por la influencia de la citoquinina durante la fase de multiplicación que ejerce un efecto residual, por lo que un período de inducción radicular es necesario antes del enraizamiento (Hu y Wang, 1984). Este efecto residual puede ser disminuido mediante el empleo de medios de cultivo líquidos en movimiento estático y reduciendo los niveles de citoquininas.

2.2.1.5 Fase IV

Esta fase es trascendental para la propagación comercial ya que influye directamente en la calidad final de las plantas y la calidad final del proceso. En esta fase se garantiza un retorno gradual de las plantas a sus características morfológicas normales (Agramonte *et al.*, 1998).

Las técnicas más eficaces en la son las que van encaminadas a lograr gradualmente menos humedad relativa, más luz, crecimiento autotrófico y un medio séptico. La eficiencia de la aclimatización es trascendental para la propagación comercial, pues de los resultados de esta dependerá en gran medida, la eficiencia total del proceso la calidad y la tecnología. Su eficiencia está dada por el grado de supervivencia de las plantas durante el tiempo de aclimatización.

En el proceso normal de micropropagación los brotes y plantas son cultivadas en medios de cultivos con azúcares, vitaminas y otras sustancias orgánicas, lo que determina el desarrollo heterótrofo o mixótrofo de los mismos (nula o baja capacidad fotosintética). Sin embargo, durante la fase de aclimatización estas plantas están forzadas a ser completamente autotrofas y sintetizar los compuestos orgánicos necesarios a partir de minerales, agua, CO₂ y luz. Este cambio en las plantas así como la morfología de las mismas determina la susceptibilidad durante las etapas iniciales del proceso de aclimatización.

Teniendo en cuenta las características *in vitro* en un inicio deben cultivarse las plantas en condiciones que se acerquen a este ambiente, es decir, alta humedad relativa y baja intensidad luminosa; posteriormente debe reducirse la humedad relativa y aumentarse la intensidad luminosas para que las plantas se desarrollen en un ambiente parecido al de campo abierto con hojas, tallos y raíces adaptados a estas condiciones completamente funcionales (Isaza, 2004).

2.3 Microorganismos en el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales

La presencia de microorganismos en el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, de forma general, ha sido considerada indeseable a partir de que este se ha definido como aséptico. Tal problemática constituye uno de los principales obstáculos para el uso de métodos biotecnológicos con fines científicos o comerciales.

Durante el crecimiento y desarrollo de las plantas muchos microorganismos habitantes de la filosfera y la rizosfera, patógenos, o no, pueden entrar a los tejidos de forma oportunista a través de aberturas naturales, heridas, y colonizarlos (Cassells, 1991). Fiore y del Gallo (1995) consideraron a las plantas y a los microorganismos en la naturaleza como parte de un ecosistema tendiente a lograr el equilibrio. Dentro del microsistema de la planta, diferentes especies microbianas pueden ser capaces de interactuar y establecerse. Algunas de ellas se reconocen como especies dominantes (Van Peer *et al.*, 1990) y están representadas por aquellos microorganismos más frecuentemente aislados. De igual forma hay un grupo de especies que no se aíslan con facilidad debido a su bajo número. Así las plantas desarrollan microbiotas endofíticas de variable composición de especies que incluyen microorganismos intracelulares tales como: virus, viroides, bacterias y hongos. En el establecimiento *in vitro* de los tejidos en dependencia del tipo de explante utilizado estos microorganismos pueden introducirse (Cassells, 1991). Se mencionan como contaminantes tanto a patógenos de las plantas que se cultivan *in vitro* como a saprofitos.

La propagación de material vegetal libre de microorganismos es una de las premisas fundamentales para la comercialización de plantas *in vitro*, el intercambio de germoplasma o el mejoramiento genético. Muchas veces en los sistemas de propagación de plantas *in vitro* o en investigaciones relacionadas con la biotecnología vegetal, carentes de programas de diagnóstico de microorganismos patógenos, se refieren a estos como contaminantes de los cultivos que se

trabajan. Por ejemplo: Barret y Cassells(1994) en el cultivo de *Pelargonium x domesticum* cv.“*Grand Slam*” encontraron como contaminante a *Xanthomonas campestris* pv. *pelagonii* (Brown).

En Cuba, a raíz del establecimiento de programas nacionales para la propagación de plantas de interés económico por métodos biotecnológicos tales como: plátanos y bananos (*Musa spp.*), caña de azúcar (*Saccharum spp. híbrido*), papa (*Solanum tuberosum* L.), etc. se implantaron sistemas de diagnósticos para los patógenos de estos cultivos y se garantiza que solo se propague material vegetal libre de estas.

Cuando se habla de contaminación endógena se hace referencia de forma general a bacterias asociadas al explante inicial; patógenas o no, y a organismos fastidiosos ya que aparte de ciertos patógenos obligados los contaminantes fúngicos no deben encontrarse latentes (ausencia de síntomas visibles sobre el material vegetal o de crecimiento microbiano sobre el medio de cultivo) en los cultivos *in vitro* (George, 1993, Leifert *et al.*, 1994 a).

Por otra parte, los microorganismos que se introducen en el laboratorio son generalmente habitantes del suelo que se encuentran en el ambiente, saprofitos o patógenos de las plantas (Leifert y Woodward, 1998) así como habitantes de la microbiota normal del cuerpo humano que se han relacionado con procedimientos inadecuados, condiciones higiénicas sanitarias deficientes o incumplimientos de la disciplina tecnológica (Wéller, 1997).

2.4 Contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales

Las bacterias encontradas como contaminantes en el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales pertenecen a varios grupos ecológicos. Ellos incluyen a patógenos de la planta, epifitos, endofitos y contaminantes accidentales por ejemplo del aire o del hombre (Stead *et al.*, 1998). De este modo algunas bacterias entran al cultivo de tejidos con los explantes pero otras se introducen durante los procedimientos de trabajo en el laboratorio (George, 1993; Leifert *et al.*, 1994 a).

Como contaminantes *in vitro* de plantas se han aislado especies de bacterias pertenecientes a los géneros: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Methylobacterium*, entre otros (Leifert *et al.*, 1989 a, George, 1993; Barrett y Cassells, 1994; Reed *et al.*, 1995; Wildholm, 1996).

Leifert *et al.*, (1991) estudiaron la composición de las comunidades bacterianas que crecían sobre plantas *in vitro* de *Delphinium* y *Hemerocallis* y llegaron a la conclusión de que podían variar considerablemente entre diferentes especies de plantas. Esto usualmente se atribuye a que especies de bacterias específicas de plantas han sido introducidas en el cultivo *in vitro* con el material vegetal (George y Sherrington, 1984; Comu y Michel, 1987).

2.4.1 Fuentes de contaminación bacteriana.

Existen muchas fuentes que pueden introducir contaminantes bacterianos al cultivo *in vitro* de plantas. Su determinación a menudo se dificulta ya que los análisis se realizan post mortem cuando han intervenido numerosos factores

Entre las principales fuentes de contaminación bacterianas se citan: los explantes, el ambiente de los locales de trabajo, los operadores y técnicas deficientes de esterilización. Además, los microorganismos pueden diseminarse por ácaros, trips y hormigas (George, 1993; Roca y Mrogrinski, 1993, Reed y Tanpraset, 1995; Pype *et al.*, 1996).

2.4.1.1 Los explantes.

Hace mucho tiempo que se ha reconocido que las bacterias son resistentes comunes de las plantas y pueden ejercer influencia sobre su sanidad en determinadas condiciones o tener una relación estrictamente comensal con su planta hospedera. Debido a la importancia económica de la sanidad de las plantas, numerosas investigaciones sobre las bacterias se han centrado en los patógenos y se ha prestado poca atención a los comensales estrictos (Beattie y Lindow, 1995). A partir de estudios de especies de plantas de importancia agrícola y hortícola se conoce que una gran variedad de géneros bacterianos pueden ser aislados del interior del tejido de las plantas sanas (Chanway, 1998).

Los microorganismos epifitos o endofitos de las plantas pueden ser introducidos al cultivo *in vitro* con el explante inicial. Con el cultivo de meristemas, según el tamaño que se establezca, mucho de ellos pueden ser eliminados pero en explantes de hojas, pecíolos o tallos en su mayoría, no es posible (Cassells, 1991).

Los métodos de desinfección utilizados en la fase de establecimiento no siempre eliminan las poblaciones de microorganismos asociadas a los tejidos de las plantas *in vivo*. Algunos de ellos son capaces de permanecer en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y así quedan protegidos de los agentes químicos. De esta forma se introducen en el cultivo de

tejidos, se propagan con el material vegetal y pueden manifestarse sobre los medios de cultivo en la fase de establecimiento o permanecer sin expresarse por largos períodos de tiempo (Cassells, 1991; George, 1993).

Las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae* se ha referido como la causantes de las mayores pérdidas en las primeras fases de la micropropagación lo cual se ha explicado porque son las bacterias más abundantes en la superficie aérea de las plantas y el suelo (Leifert *et al.*, 1994 a; Buckley *et al.*, 1995). Leifert y Woodward (1998) las consideraron como microorganismos indicadores de ineficiente desinfección de los explantes en la fase de establecimiento. Atendiendo al criterio de Parkinson *et al.*(1996), antes de que puedan ser usados con efectividad protocolos de desinfección, se requiere conocer la microbiota asociada con las plantas que serán micropropagadas.

2.4.1.2 El ambiente de los locales

El ambiente de los locales de trabajo es una fuente de contaminación ya sea directa o indirectamente. A través de las corrientes de aire las partículas de suelo cargadas de esporas y células de microorganismos son arrastradas y penetran por los acondicionadores de aire, son transportadas e introducidas por el hombre y permanecen en el ambiente por condiciones higiénicas inadecuadas. Este aspecto quedó demostrado en investigaciones realizadas por Leifert *et al.* (1994a) quienes encontraron una correlación directa entre especies y géneros de levaduras y hongos filamentosos hallados en el ambiente de los laboratorios y aquellos que se identificaron como contaminantes de los cultivos.

Según Pype *et al.*,(1996) la contaminación puede diseminarse por ácaros y trips que también se introducen al ambiente de los locales de trabajo por los conductos de los acondicionadores de aire, adheridos al vestuario del personal, con los explantes que se llevan al laboratorio desde condiciones *ex vitro* para su

establecimiento, etc. Varias especies de ácaros se han identificado en el cultivo de plantas *in vitro* pertenecientes a los géneros: *Tyrophagus sp.*, *Siteroptes sp.*, *Pyemotes sp.* *Tarsonemus sp.*

2.4.1.3 El hombre

El hombre interviene directamente en todas las operaciones que se realizan en el cultivo *in vitro* de plantas y es una fuente primaria de contaminantes a través del estornudo, la tos, la conversación, etc. La presencia de microorganismos contaminantes que son habitantes de la microbiota normal del cuerpo humano como por ejemplo: *Staphylococcus epidermis*, *Candida albicans* y *Micrococcus spp.* generalmente indican ineficientes técnicas de asepsia por parte de los operarios (George, 1993; Wéller, 1997).

2.4.2 Relaciones entre los componentes del ecosistema *in vitro* y contaminantes bacterianos

La interacción entre plantas y microorganismos forma parte de un ecosistema. Mientras una considerable cantidad de conocimientos se ha acumulado con respecto a las interacciones de plantas con microorganismos fijadores de nitrógeno y con microorganismos patógenos, poco se conoce acerca de otros tipos de interacciones tales como las que existen dentro del ecosistema del medioambiente del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales (Herman, 1996).

La mayoría de los hongos y levaduras crecen bien sobre el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) para el cultivo de tejidos vegetales. Pueden ser detectados y el material vegetal descartado tan pronto como se introdujeron (Leifert y Waites, 1990 y Leifert *et al.*, 1991). En comparación, ciertos contaminantes bacterianos han sido encontrados latentes *in vitro* (no producen crecimiento visible en el medio de cultivo ni síntomas en las plantas) porque

precisan de nutrientes adicionales para su crecimiento o son inhibidos por la plantas *in vitro* (Leifert y Waites, 1992).

Varias bacterias no pueden ser detectadas en los medios de cultivos de proliferación o elongación pero aparecen y a menudo pueden ser letales en el medio de cultivo para el enraizamiento (Boxus y Terzi, 1987). Claramente, se requiere mucho trabajo para determinar el papel de las bacterias en el ecosistema de la micropropagación y para determinar si los daños al tejido vegetal son debido a un organismo simple o verdaderamente a la combinación de diferentes bacterias (Falkiner, 1997).

Algunas plantas *in vitro* son capaces de continuar creciendo en presencia de las bacterias. El campo de estudio sobre el efecto de las bacterias contaminantes en los ecosistemas *in vitro* ha sido poco explorado, son escasos los trabajos científicos que presentan análisis sobre las relaciones y el papel de los contaminantes bacterianos en los mismos (Herman, 1996).

2.4.2.1 Vitropatógenos

Bacterias que usualmente no son patógenas de las plantas en el campo pueden ser perjudiciales en sistemas de cultivo de células y tejidos debido a: mutaciones, porque no tienen competencia con otros microorganismos y por tanto, aumentan su número en la planta, ya que pueden obstruir los tejidos vasculares (Debergh y Maene, 1984), así como porque las condiciones ambientales y la fisiología de las plantas es diferente en este proceso (George y Sherrington, 1984; Leifert *et al.*, 1991 b).

Una de las cuestiones básicas a dilucidar es si todas las bacterias son o no potencialmente dañinas para las plantas cultivadas *in vitro*. Si todos los contaminantes lo son, entonces la esterilidad absoluta debe ser lograda, si no, se

convierte en imperativo identificar los patógenos de modo que ellos puedan ser eliminados específicamente. El término patógeno ha sido confinado para describir a un organismo que causa enfermedad a las plantas cultivadas en el campo y el término ° vitropatógeno °, introducido por Herman (1987), ha sido usado para aquellos organismos que no son necesariamente patógenos para las plantas en el campo pero si son perjudiciales para células, tejidos u órganos cultivadas *in vitro* .

Se ha sugerido que los vitrópatógenos pueden ser dañinos para el cultivo de tejidos vegetales porque compiten con estos por los nutrientes o porque son capaces de producir desechos tóxicos (Leifert *et al.*, 1994a), aunque no se encuentran muchos trabajos en la literatura científica que expliquen el mecanismo de acción de los contaminantes que lo hace perjudiciales para las plantas *in vitro* (Herman, 1996).

Leifert *et al.*, (1989 b) encontraron que la inoculación de plantas *in vitro* de *Hemerocallis* con la bacteria no patógena *Lactobacillus plantarum*, un contaminante frecuente del cultivo de tejidos, causaba una disminución del coeficiente de multiplicación seguido de un rápido deterioro de los cultivos. Ellos refirieron, además, que esto coincidió con el incremento del número de bacterias, y de la concentración de ácido láctico en el medio de cultivo. Estos autores demostraron que el efecto perjudicial de *L..plantarum* era un resultado directo de la producción de ácido láctico, más que del efecto general de la disminución del pH.

Los coeficientes de multiplicación de plantas infectadas con contaminantes bacterianos latentes pueden mantenerse inalterables pero reiteradamente se ha referido que decrecen (Long *et al.*, 1988, Leifert *et al.*, 1989 b, 1991 a). No obstante ,en el cultivo de células y tejidos vegetales el efecto de la presencia de organismos cultivables no ha sido ampliamente examinado (Long, 1997).

2.4.3 Métodos para el control de la contaminación bacteriana.

De acuerdo con el criterio de Reed y Tanprasert (1995), para obtener cultivos asépticos se requiere prestar atención a los siguientes aspectos muestreo de los explantes para detectar contaminantes y su cultivo, identificación o caracterización de los mismos y su eliminación a partir de mejorar las practicas en el laboratorio, uso de antibióticos u otros agentes químicos.

2.4.3.1 Detección temprana.

Muchos investigadores y productores en biotecnología de plantas a menudo utilizan la observación visual de sus cultivos como método para saber si están libres o no de contaminantes (Herman, 1996). En algunos casos los signos de contaminación solo aparecen después de que las plantas han sido subcultivadas en varias oportunidades. Esto puede relacionarse con que las bacterias contaminantes crecen muy lentamente en los medios de cultivo de la plantas o con que pueden encontrarse latentes (George, 1993).

Por estas razones se precisa de métodos de detección temprana rápidos y seguros. Entre los más utilizados se encuentran rozar la superficie cortada del explante sobre un medio de cultivo bacteriológico durante los subcultivos (De Fossard , 1988) y la transferencia de fragmentos de material vegetal a medios de cultivos bacteriológico (Knauss,1976;Leifert *et al.*,1994 a; Reed *et al.* ,1995;Borras *et al.*, 1996). Se ha referido también la modificación de los medios de cultivo de las plantas con la adicción de componentes de medios para el cultivo de bacterias (Boxus y Terzi,1988), agua de coco (Norman y Álvarez, 1994) y variando el pH (Tanprasert y Reed, 1998). Además, se han utilizado por algunos autores métodos turbidimetricos (Meyner y Arnould, 1989).

2.4.3.2 Uso de antibióticos.

El empleo de antibióticos en el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales para controlar la contaminación bacteriana ha sido muy discutido. Existen entre los autores diferencias de opinión con respecto a la factibilidad de su uso. El éxito de su aplicación en el medio de cultivo varia según los criterios, métodos de apreciación, microorganismos, etc. y depende en gran medida del desarrollo de un buen protocolo (Barrett y Cassells, 1994).

Así por ejemplo Falkiner (1990) planteó que los antibióticos no sustituyen las técnicas de asepsia y deben ser empleados solo cuando estas son inadecuadas y preferentemente como tratamiento profiláctico más que para tratamiento de la infección. Este mismo autor ha recalcado que, además, para que un compuesto antimicrobiano pueda ser usado en el medio de cultivo debe cumplir las siguientes condiciones: ser soluble, estable, no afectar el pH, no afectar el medio de cultivo, mínimos efectos secundario (no fitotóxico), amplio espectro, ser bactericida, debe poder ser usado sistemáticamente y en combinación con otras sustancias antimicrobianas, tener un modo de acción que nos permita a la bacteria desarrollar resistencia y preferiblemente no ser utilizados en medicina clínica.

Roca y Mroginski (1993) han manifestado el criterio de que el empleo de antibióticos solamente se justifica en casos de excepción y en cultivos de corta duración, ya que la alta especificidad de los mismos implica que no previenen la proliferación de todos los microorganismos. Además tales productos modifican la composición de los medios de cultivos y pueden ser metabolizados por los explantes.

Para el control de la contaminación bacteriana en la micropropagación a escala comercial de cualquier especie se requiere un análisis de la incidencia de los contaminantes y diseñar estrategias que no encarezcan el proceso e impliquen un incremento en gastos de tiempo y recursos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo fue realizado en la Biofábrica de Cienfuegos en el período comprendido entre de enero 2004 y julio de 2005 con el objetivo de disminuir los índices de pérdidas por contaminación bacteriana en la Biofábrica de Cienfuegos e incrementar su eficiencia productiva.

3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

En la Empresa de Cultivos Varios Juraguá (Abreus, Cienfuegos) se seleccionaron plantas del cultivar FHIA 18 (*Musa* spp. híbrido AAAB) después de la emisión del racimo y con adecuadas características fitosanitarias. De las mismas se tomaron los cormos los cuales fueron sembrados en canteros ubicados en la Biofábrica de Cienfuegos por un periodo de 20 días.

3.1.1 Fase de establecimiento

Al cabo de 20 días los cormos se trasladaron al Laboratorio para ser mondados hasta 2,5cm de diámetro y de 4 a 5cm de altura. Posteriormente se lavaron con agua potable y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3 % de cloro activo durante 20 minutos. Después de esto se procedió a un segundo mondado donde se redujo el ápice hasta 1,5 cm de diámetro de la base y de 2 a 3cm de alturas, según lo establecido en el Instructivo Técnico para la micropropagación de plátanos y bananos (MINAG 2004)

Estos ápices fueron colocados en frascos de polieturano (750 ml de capacidad) y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril por un tiempo de 3 minutos, en agitación. A continuación se procedió a una segunda desinfección similar pero en una cabina de flujo laminar horizontal. Concluida la misma se realizó la

extracción de los ápices. En esta fase de establecimiento se empleó un medio de cultivo líquido compuesto por las sales de MS (1962) al 70 % suplementadas con 30 g.l⁻¹ de sacarosa , 0.23 mg.l⁻¹ de AIB y 2.0 mg.l⁻¹ de 6BAP a pH 5.8±0.1 y se distribuyó a razón de 10ml en frascos de vidrio. En cada uno se colocó un ápice en el centro y se incubaron durante 15 días.

3.1.2 Fase de multiplicación

Se tomaron plantas *in vitro* bien formadas de tamaño uniforme procedentes de la fase de establecimiento (I), los cuales fueron subcultivados durante 21 días en un medio de cultivo que contenía las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS), suplementadas con 4 mg.l⁻¹ de 6 Bencilaminopurina (6 BAP), 0.65 mg.l⁻¹ de Acido indolacético (AIA), 3 % de sacarosa, pH 5.8 ± 0.1 en estado semisólido que fue gelificado con 3 g.l⁻¹ de agar-agar. Se utilizaron frascos de vidrio de 250 ml de capacidad hasta el cuarto subcultivo y partir de este, frascos de cultivo de policarbamato de 700 ml de capacidad. Se añadieron 30 y 70 ml de medio de cultivo respectivamente. En el primer tipo de frasco se colocaron 10 explantes por cada uno y en el segundo 25.

3.1.3 Fase de enraizamiento

Se utilizaron brotes uniformes procedentes de la fase de multiplicación y un medio de cultivo de enraizamiento que contenían las sales MS con 3 % de sacarosa y pH 5.8 ± 0.1. Los brotes mayores de 2,5 cm de altura se subcultivaron en un medio de cultivo en estado líquido con el 70 % de las sales y los menores, en otro en estado semisólido con el 100 % de las sales. La duración del subcultivo para los brotes mayores de 2,5 cm fue de 15 días y para los menores de 21 días

En todas las fases la incubación de los explantes se realizó en cámaras de crecimiento con luz solar con una intensidad de 3000 luxes y temperatura de 28 ± 2 °C durante el período del subcultivo.

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados con Vitrofur® (G-1) a una concentración de 0,114 g.l⁻¹ según lo establecido en el Instructivo del vitrofur (Castañeda, 2000) Para esta fase se emplearon frascos de cultivo de policarbamato de 700 ml de capacidad con 70 ml de medio de cultivo.

3.1.4 Manejo del material vegetal *in vitro*

En el año 2004 la desinfección se hacía en recipiente, donde se colocaban 50 ápices en la primera desinfección y la posterior se realiza en el área estéril 10 ápices por frascos a diferencia del 2005, donde se desinfectan 10 por frascos en ambos casos.

.

En el año 2004 los explantes después del segundo subcultivo de multiplicación se mezclaban sin tener en cuenta el material vegetal de origen. Sin embargo, en el 2005 se establecieron líneas a partir de cada planta donadora (los explantes resultantes de cada ápice caulinar establecido se nombraron y se mantuvieron separados del resto para cada subcultivo).

3.2 Efecto de contaminantes microbianos bacterianos sobre el material vegetal *in vitro*.

3.2.1 Efecto de contaminantes durante la fase I (Establecimiento)

Teniendo en cuenta que durante los años 2004 y 2005, se utilizaron procedimientos diferentes para el manejo del material vegetal en la desinfección (descrito más arriba) y con el objetivo de evaluar su influencia sobre la presencia de contaminantes microbianos en la fase de establecimiento, se evaluó la presencia de contaminantes microbianos durante los siete primeros meses (enero-julio) en ambos años. Para ello, se determinó visualmente la presencia de microorganismos en los frascos de cultivo y se cuantificó el número de explantes contaminados al final de la fase (15 días). Además, a partir de los caracteres culturales (tipo de crecimiento, color, forma, textura, etc.) y morfológicos (tipo de célula, forma, agrupación, presencia de estructuras de reproducción, etc.) de los microorganismos se determinaron los grupos microbianos presentes en cada uno de los meses (bacterias u hongos) y se describieron las principales características de los contaminantes bacterianos.

Los datos de explantes contaminados se expresaron en porcentajes y fueron procesados en el paquete estadístico Statgraphics Plus versión 5.0 para Windows donde se les realizó una prueba de proporción con un 95% de significación.

3.2.2 Efecto de contaminantes bacterianos durante seis subcultivos de multiplicación.

Con el objetivo de conocer la influencia de contaminantes bacterianos en la fase de multiplicación se cuantificó el número de explantes contaminados con bacterias (la presencia de este grupo microbiano se determinó por observación de los caracteres culturales en el medio de cultivo y por observación al microscopio óptico) durante seis subcultivos en el material vegetal establecido en cada uno de los meses del período evaluado en los años 2004 y 2005 (enero-julio).

Los datos de explantes contaminados se expresaron en porcentajes y fueron procesados en el paquete estadístico Statgraphics Plus versión 5.0 para Windows donde se les realizó una prueba de proporción con un 95% de significación.

3.2.3 Evaluación del efecto de la contaminación bacteriana sobre el material vegetal

Para verificar si la presencia de contaminantes bacterianos afectaba la calidad del material vegetal en la fase de multiplicación, se realizaron las evaluaciones de este epígrafe.

En la fase de establecimiento, se tomaron 10 explantes contaminados con bacterias y 10 no contaminados, con los cuales se constituyeron dos lotes que se subcultivaron por separado. La presencia de contaminantes bacterianos se detectó por observación visual y se corroboró por la observación al microscopio.

En cinco subcultivos de multiplicación (21 días cada uno) de cada lote de material vegetal procedente de la fase de establecimiento fueron evaluadas las siguientes variables: coeficiente de multiplicación (calculado como el número de explantes final entre el número de explantes inicialmente subcultivados), altura de los brotes (medida en centímetros desde la base del brote hasta la inserción de la primera hoja expandida) y el número total de hojas por explante.

Los datos fueron procesados en el paquete estadístico Statgraphics Plus versión 5.0 para Windows, previa comprobación de la homogeneidad de varianzas. Las medias de las variables analizadas para cada tipo de material vegetal se compararon en cada subcultivo mediante la Prueba t en un intervalo de confianza del 95%.

3.2.4 Evaluación del efecto de la contaminación bacteriana sobre el material vegetal en la fase de enraizamiento

El material vegetal procedente de la fase de multiplicación (acápite 3.3, lotes de plantas *in vitro* contaminadas y no contaminadas), se subcultivó en un medio de cultivo compuesto por las sales MS y 3% de sacarosa con pH $5,8 \pm 0,1$ para su enraizamiento. Este se manejó de la forma que se describió más arriba en el acápite correspondiente a material vegetal y condiciones de cultivo.

Se colocaron 25 plantas *in vitro* por frasco de cultivo (de 700ml de capacidad con 70 ml de medio de cultivo). A los 15 ó 21 días, después de realizarse el subcultivo se evaluaron las siguientes variables: altura de la planta (medida en centímetros desde la base hasta la inserción de la primera hoja expandida), número total de hojas y número de raíces por planta, así como la longitud de las raíces (medida de la raíz más larga en centímetros),

Se empleo un diseño experimental completamente aleatorizado de 10 réplicas por tratamiento de 25 muestras. Los datos fueron procesados en el paquete estadístico Statgraphics Plus versión 5.0 para Windows, previa comprobación de la homogeneidad de varianzas. A los resultados se les aplicó un análisis de varianza y las medias se compararon mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan.

3.3 Evaluación del efecto de la contaminación bacteriana sobre el material vegetal en fase de aclimatización (IV)

Las plantas *in vitro* enraizadas en la fase III (lotes de plantas *in vitro* contaminadas y no contaminadas) para ser transferidas a la fase de aclimatización fueron seleccionadas atendiendo a los parámetros de calidad establecidos por Suárez (1998) para este cultivo (tamaño mayor o igual a 4 - 5 cm, más de dos hojas, diámetro del pseudotallo entre 0,4- 0,8 mm, adecuado vigor, coloración y un sistema radicular sin presencia de daños físicos). Las mismas se plantaron en contenedores de polieturano de 66,5 x 34,3 cm de largo y ancho respectivamente, las cuales poseían 70 orificios de 5,5 cm de diámetro. Sobre cada uno de ellos se vertieron 80 cm³ de compost procedente del CAI 14 de Julio (Provincia Cienfuegos) enriquecido con humus de lombriz y se le incorporó además el biopreparado *Trichoderma* sp. a una concentración de 100 g/m².

La iluminación fue regulada a 70% con una tela de zarand. Se realizaron tres riegos diarios con microjet de 5 a 8 minutos. A partir de los 15 días, se realizaron aplicaciones de urea a razón de 5 g.l⁻¹ fraccionadas cada 4 días, siguiendo la metodología descrita en el Instructivo Técnico para la micropropagación de plátanos y bananos (MINAG, 2004).

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado, empleándose 700 muestras por tratamiento distribuidas en 10 replicas.

Al final del período de aclimatización (45 días) fueron evaluadas las siguientes variables: altura de las plantas (medida en centímetros desde la base de la planta hasta la inserción de la primera hoja expandida), número total de hojas, número de plantas vivas y caracteres cualitativos como color y vigor.

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado de 10 réplicas por tratamiento con 70 muestras cada una de ellas. Los datos del número de plantas vivas se expresaron como porcentaje de supervivencia y fueron procesados en el paquete estadístico Statgraphics Plus versión 5.0 para Windows donde se les realizó una prueba de proporción con un 95% de significación.

Los datos del número de plantas vivas se expresaron como porcentaje de sobrevivencia, siendo transformadas para su procesamiento estadístico mediante la ecuación de $2 \arcsin \sqrt{P}$.

3.4 Análisis económico de los aportes del trabajo en la eficiencia de la Biofábrica de Cienfuegos

Para este análisis se tuvo en cuenta el plan de producción (1 300 000) de la Biofábrica de Cienfuegos en el año 2006. La cantidad de ápices caulinares a establecer las pérdidas por contaminación, el ahorro de agar-agar con un precio de 64 MLC/kg durante las fases II y III así como aumento del número de plantas por área en las cámaras de incubación y la calidad de las mismas

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto de contaminantes durante la Fase I (Establecimiento)

Durante el año 2004 se establecieron 6145 explantes en un total de siete meses evaluados y 6418 en el año 2005. Se observó crecimiento microbiano alrededor de la base de los ápices y colonizando el tejido vegetal, fundamentalmente sobre las superficies cortadas, tanto la superior como la inferior que se encontraba en contacto con el medio de cultivo, lo cual implicó al explante inicial como la fuente más probable de introducción de los contaminantes.

Se comprobó la presencia de contaminantes bacterianos y bacterianos y fungos en los dos años, donde predominaron las bacterias sobre los hongos filamentosos (figura 1). Para los contaminantes bacterianos los porcentajes de contaminación de los explantes se mantuvieron con índices por encima 8,6% y hasta 22,8 durante los primeros 3 meses de ambos años. Se observa a partir del mes de abril una tendencia a aumentar la misma, siendo significativamente inferior en el año 2005. Es importante señalar que los porcentajes de contaminación por hongos no sobrepasaron el 5% en ninguno de los meses evaluados.

Los porcentajes de contaminación durante la fase de establecimiento en el período de 1995-1998 se reportaban entre un 40-45%. En esta etapa durante la primera desinfección no se establecía un número determinado de ápices por frascos (Martínez,2005.Comunicación personal). A pesar de no realizarse un estudio de numero de ápices por frascos durante la primera desinfección; al comparar los porcentajes de contaminación en los dos años se pudo comprobar que se incrementan las contaminaciones bacterianas. El hecho de que los donantes proceden de áreas de producción y no de bancos de germoplasma especializados,

aun siendo sembradas las yemas en canteros donde producto de su desinfección y manejo se eliminan la mayoría de los hongos que se desarrollan en los tejidos exteriores, aun se corre el riesgo que un grupo de microorganismos no sean eliminados. Entre estos microorganismos las bacterias pueden desarrollarse en los tejidos intercelulares.

Al aumentar el número de ápices caulinares por recipiente durante la primera desinfección, se corre el riesgo de disminuir la efectividad de la misma al no entrar uniformemente el agente desinfectante en los tejidos, quedando contaminantes latentes en los mismos. Cassel, (1991) señala que la superioridad de contaminantes bacterianos se debe a la presencia de estos en los espacios intercelulares constituyendo una vía para su introducción *in vitro*.

Este análisis permite aseverar que la contaminación bacteriana constituye la principal causa de pérdida por este concepto en la fase de establecimiento, sin embargo con una disminución del número de explantes que se manipulan en la primera desinfección lográndose disminuir de un 30,8 en el 2004 hasta un 23,8% en el 2005 ;es decir se reduce la misma en 7,5%. De igual forma se apunta el explante inicial como principal fuente de contaminación , toda vez que el mismo no proviene de un banco de donantes que garantice su calidad fitosanitaria(Jiménez 1998).

Los porcentajes de contaminación por hongos no sobrepasaron el 5% en ninguno de los meses de los periodos evaluados.

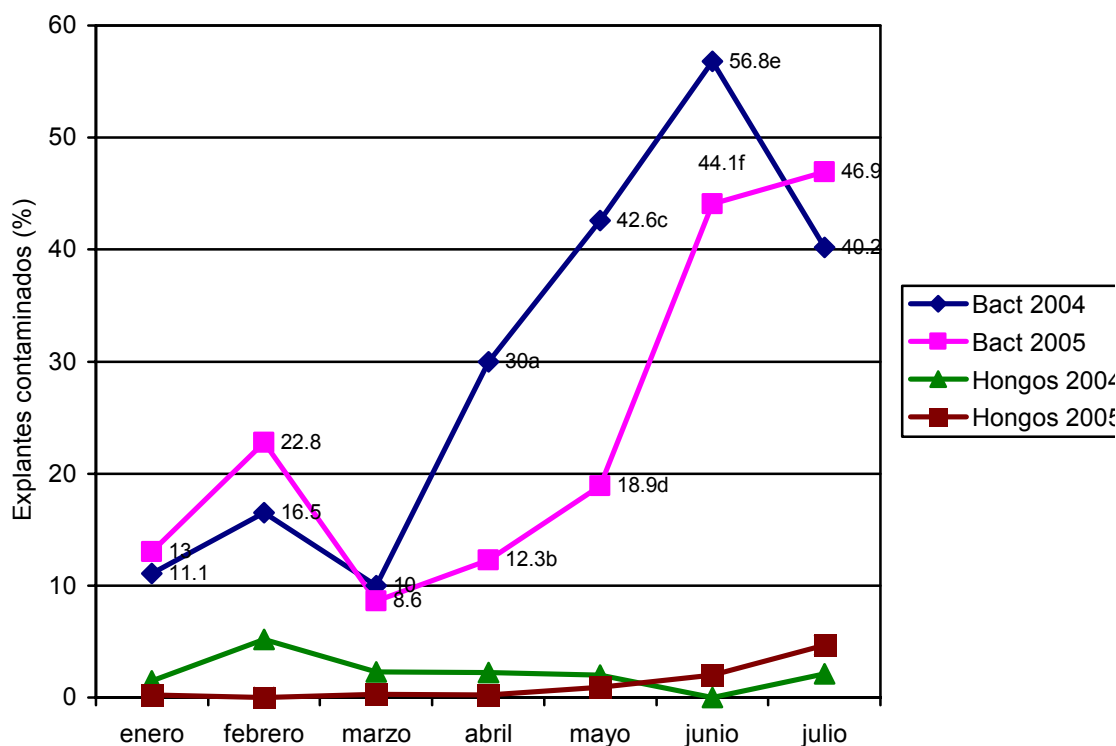
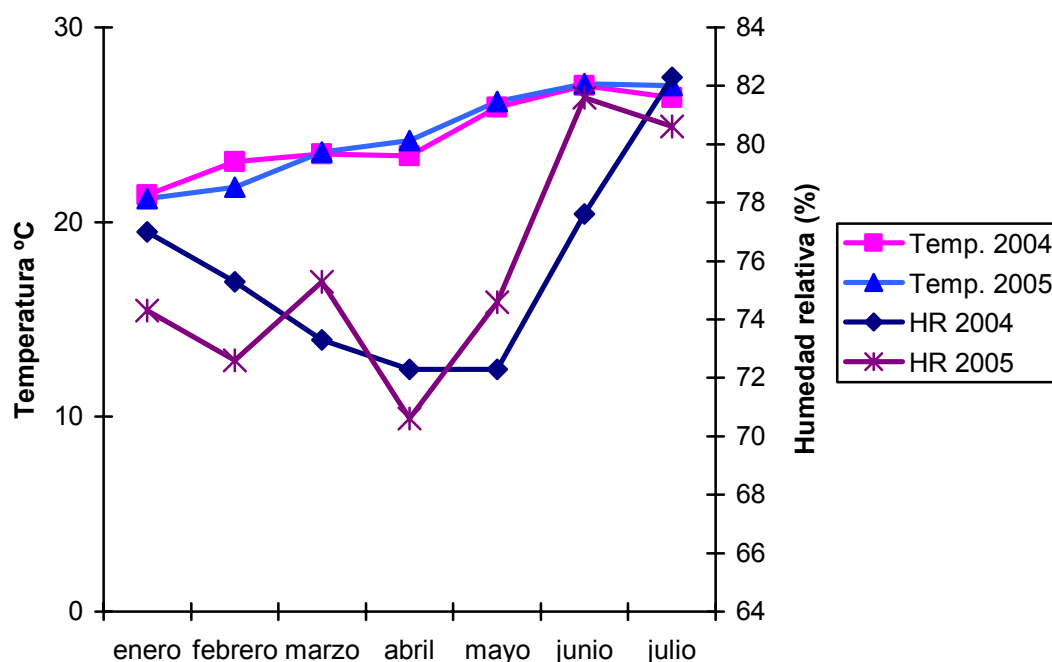


Figura 1. Estudio de contaminantes microbianos en la fase de establecimiento de FHIA 18 durante los siete primeros meses de los años 2004 y 2005.

Medias con letras no comunes en un mes difieren significativamente según la prueba de proporciones ($p < 0.05$).

El incremento de los porcentajes de contaminación a partir del mes de mayo para ambos años estudiados está relacionado con las condiciones ambientales como temperatura y humedad relativa, (Figura 2). El incremento de los porcentajes a partir de este mes está relacionado con las condiciones ambientales existentes, ya que al incrementarse los valores de temperatura y humedad en el ambiente se incrementan las temperaturas en el interior de las cámaras de crecimiento

oscilando entre 33 y 36⁰C para ambos años según los registros de calidad de la Biofábrica, así como en el ambiente de las cámaras de crecimiento donde empiezan a aparecer contaminantes en los controles de las mismas. Esto se corrobora por investigaciones realizadas por Leifert y colaboradores (1994) quienes encontraron una correlación entre especies y géneros de levaduras , bacterias y hongos en el interior del laboratorios con aquellos que se identificaban como contaminantes *in vitro*.



0

Figura 2. Registros mensuales de temperatura media y humedad relativa de la Estación agrometeorológica de Cienfuegos.

Entre las características de los contaminantes bacterianos encontrados en las plantas *in vitro* de bananos de FHIA-18 en la Biofábrica de Cienfuegos durante la Fase I se observó que la coloración que tomaba el medio de cultivo era de tres colores donde predominaba el color blanco con un 91% respecto al amarillo (5%) y rosado (3%). También se apreció turbidez en el 70% de los frascos de cultivo

contaminados con bacterias, formación de sedimento en el 27% y película en la superficie en el 3%.

Al ser observadas en el microscopio óptico las bacterias comúnmente encontradas en un 84 % presentaban morfología de cocos y un 16 % en forma de bacilos. Un aspecto de interés resultó que el 51% de los explantes contaminados había muerto a los 10 días después de establecidos. El tejido vegetal tomaba color negro y aspecto putrefacto. Autores como Herman (1996) se han referido al daño que ocasionan los contaminantes bacterianos sobre el material vegetal que puede ser desde una disminución del crecimiento hasta la muerte.

4.1.2 Efecto de contaminantes bacterianos durante seis subcultivos de multiplicación

El problema de la contaminación bacteriana se agrava en la fase de multiplicación por el hecho de que el material vegetal puede estar contaminado y no presentar ningún signo visible de la misma ni en tejidos ni en el medio de cultivo en estado líquido. La figura 3 muestra el comportamiento de la contaminación bacteriana durante 6 subcultivos de multiplicación partiendo de ápices procedentes de fase I sin síntomas visibles de contaminación.

El método de detección por observación visual no permite asegurarse de la ausencia de microorganismos contaminantes aún cuando no se aprecie turbidez en el medio de cultivo en estado líquido, pues los contaminantes pueden encontrarse endógenos en el tejido. Los datos mostrados indican que un gran número de explantes aparentemente libres de contaminantes bacterianos pasan a la fase de multiplicación y se observa su crecimiento sobre el medio de cultivo semisólido.

Es evidente que la microscopia óptica es necesaria implementarla en la Biofábrica de Cienfuegos como un método de detección temprana de la contaminación durante el establecimiento. No obstante el método de desinfección empleado durante el año 2005 y trabajando por líneas el material vegetal se disminuyo el porcentaje de perdidas en todos los subcultivos.

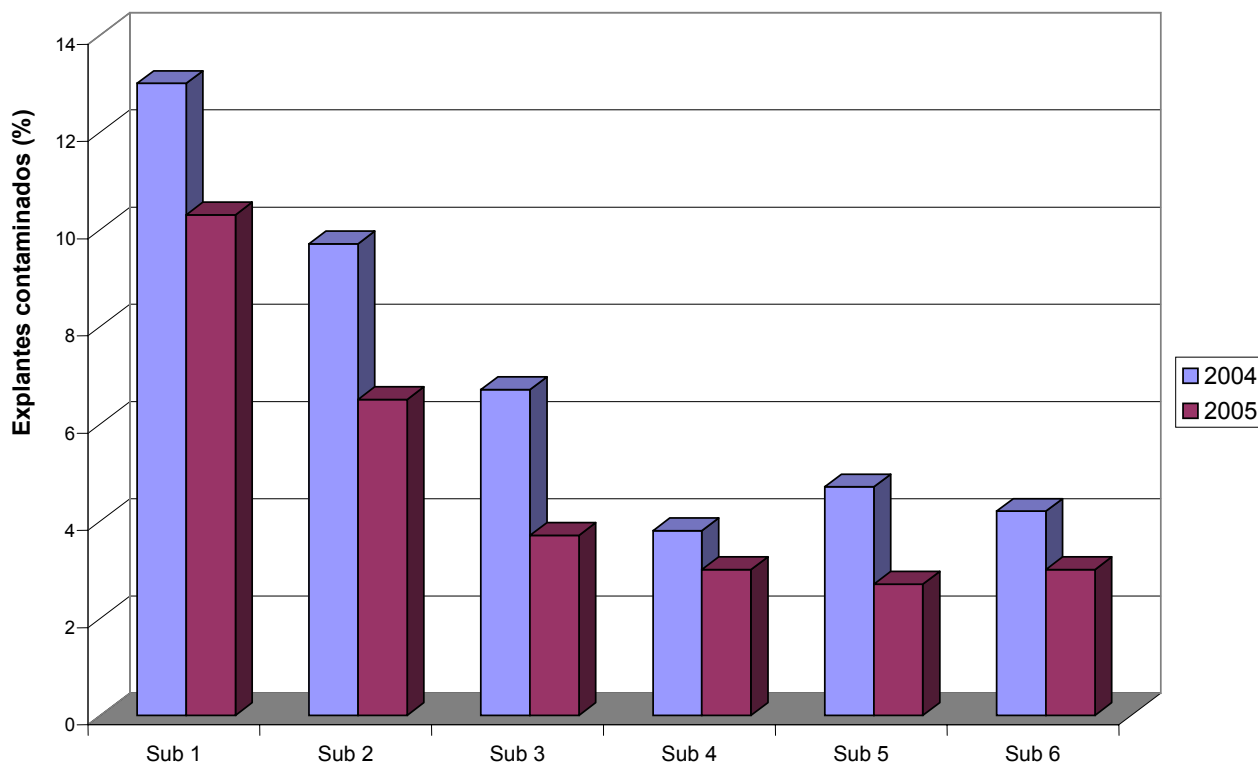


Figura 3. Efecto de contaminantes bacterianos en la fase de multiplicación de FHIA 18 durante los seis primeros meses de los años 2004 y 2005.

Al comparar los porcentajes de contaminación entre los años evaluados se observa que en el segundo año tiene diferencias significativamente inferiores al 2004 lo cual es dado porque el trabajo en líneas permite manipular el ápice caulinar y su descendencia de forma independiente, y evitar la mezcla de explantes contaminados y no contaminados en el mismo frasco de cultivo. De esta

forma toda línea que presente contaminación bacteriana puede ser separada del flujo tecnológico.

4.1.3 Evaluación del efecto de la contaminación bacteriana sobre el material vegetal en la fase de multiplicación.

Se comprobó que la presencia de contaminantes bacterianos afectó la calidad del material vegetal expresado en una disminución de los valores de las variables evaluadas (Figuras 4, 5 y 6).

El coeficiente de multiplicación (Figura 4) disminuyó significativamente desde el segundo al quinto subcultivo. Las afectaciones abarcaron decrecimientos del 38.5% en el segundo subcultivo, 45% en el tercer y cuarto y 49% en el quinto que indican una cantidad elevada de material vegetal que se deja de producir y afecta el cumplimiento de los planes de producción, para la micropropagación comercial de cualquier especie vegetal esto es de suma importancia.

Se ha estudiado que las afectaciones por la presencia de bacterias contaminantes pueden ir desde una disminución del coeficiente de multiplicación del 15,0% hasta la muerte inmediata de las plantas (Leifert *et al.*, 1994a). Autores como Alvarado (2003) corroboraron este criterio en la multiplicación de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido).

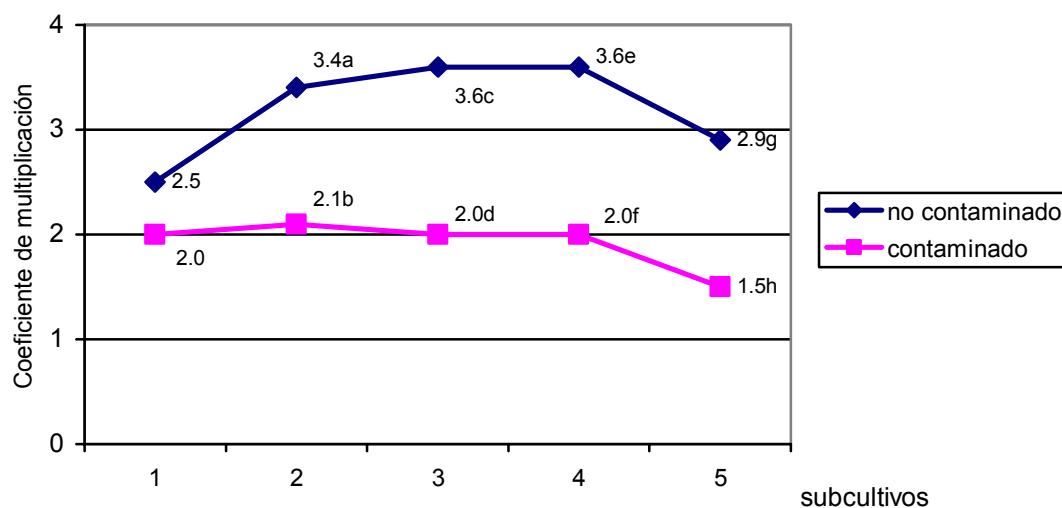


Figura 4. Coeficiente de multiplicación de dos lotes de explantes de FHIA 18 durante cinco subcultivos de la fase de multiplicación.

. Medias con letras no comunes en cada subcultivo difieren por la prueba *t* para un nivel de confianza del 95%.

Hempel *et al.* (1988) en *Gerbera* comprobaron que especies de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* provocaban una disminución del coeficiente de multiplicación. Por su parte, Savela y Uosukainen (1994) monitorearon la contaminación de cultivos aparentemente sanos en la Fase de Establecimiento y durante cinco subcultivos de la Fase de Multiplicación; el crecimiento bacteriano visible pudo ser detectado en tres subcultivos.

El efecto negativo de los microorganismos contaminantes sobre plantas *in vitro* puede ser considerable si se tiene en cuenta que compiten con ellas por los nutrientes del medio y les provocan daños directos e indirectos por colonización de sus tejidos o expulsión al medio de sus metabolitos tóxicos. Entre estos se mencionan: reducen el coeficiente de multiplicación, inhiben el enraizamiento, muerte de la planta, pérdidas del material vegetal, etc. (Leifert *et al.*, 1994a).

En cuanto a la altura de los brotes se encontró que también disminuyó significativamente durante los primeros tres subcultivos, lo que indica afectaciones en la calidad del material vegetal.

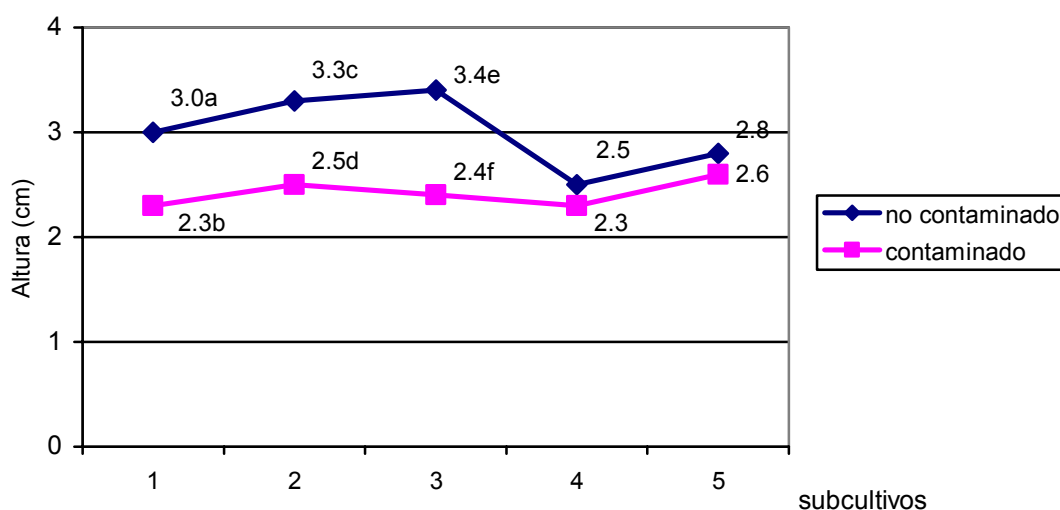


Figura 5. Altura de los brotes (cm) en dos lotes de explantes de FHIA 18 durante cinco subcultivos de la fase de multiplicación.

Medias con letras no comunes en cada subcultivo difieren por la prueba t para un nivel de confianza del 95%.

De igual forma el número de hojas por explante se afectó significativamente en el primer subcultivo ante la presencia de contaminantes bacterianos (Figura 6).

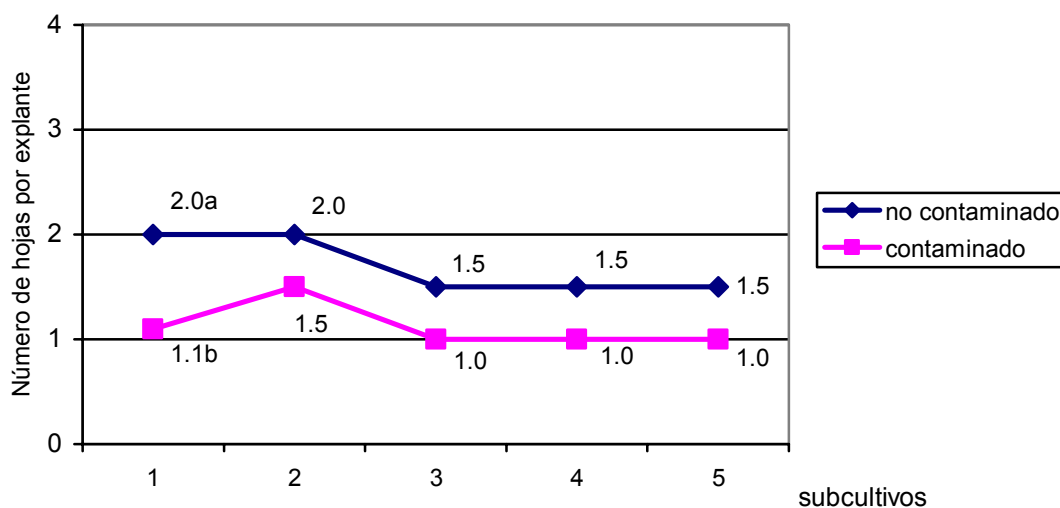


Figura 6. Número de hojas por explante de FHIA 18 durante cinco subcultivos de la fase de multiplicación.

Medias con letras no comunes en cada subcultivo difieren por la prueba t para un nivel de confianza del 95%.

4.1.4 Evaluación del efecto de la contaminación bacteriana sobre el material vegetal en la fase de enraizamiento.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de comparar las plantas *in vitro* no contaminadas con las contaminadas en la fase de enraizamiento. Al igual que en la fase anterior se observaron afectaciones en la mayoría de las variables evaluadas. De esta manera se encontró una reducción significativa de la altura, el número de raíces y la longitud de las raíces en los dos medios de cultivo (líquido y semisólido), aspectos esenciales en la calidad de las plantas en esta fase de la micropropagación.

Según el criterio de Debergh y Maene (1984) la propagación conjunta de plantas *in vitro* y bacterias contaminantes puede convertirse en una situación peligrosa. Bacterias no patógenas pueden volverse patógenas debido a mutaciones, porque no tienen competencia con otros microorganismos, por tanto, pueden incrementar su número en la planta durante los períodos de crecimiento lento, así como en la fase de enraizamiento o porque pueden taponar los tejidos vasculares.

Las afectaciones en la fase de enraizamiento tienen, además, un efecto directo sobre la fase de aclimatización ya que al reducir el porcentaje de enraizamiento y dañar todo el sistema radical pueden ocasionar una disminución de la supervivencia cuando las plantas *in vitro* se transfieren a condiciones *ex vitro* (Leifert *et al.*, 1994a).

Fontes (2005), al evaluar el comportamiento de plantas del híbrido FHIA 18 libre de contaminantes bacterianos encontró altos porcentajes de sobrevivencia y calidad de las vitroplantas al igual que en este trabajo.

Leifert *et al.* (1989b, 1991b) comprobaron que la introducción de bacterias en el cultivo estéril de plantas *in vitro* podía ocasionar reducciones en los coeficientes de multiplicación, afectaciones en el enraizamiento o la muerte de las mismas. Otras causan necrosis, alteran el potencial morfogénico, reducen el enraizamiento o la proliferación de brotes axilares.

En este estudio se corroboró este criterio al observarse una disminución del coeficiente de multiplicación, el número de brotes, el número de hojas por explante así como verse afectado también el enraizamiento en la micropropagación del FHIA 18. Los resultados obtenidos evidencian además, que el material vegetal contaminado con bacterias no debe ser manipulado en un proceso productivo porque además de los daños a la calidad se afectan indicadores cuantitativos

como el coeficiente de multiplicación. Ha sido práctica común en muchos laboratorios de cultivo de tejidos que como regla general las plantas *in vitro* contaminadas continúan multiplicándose o se transfieren a la fase de aclimatización.

Tabla 1. Efecto de la contaminación bacteriana sobre el material vegetal en la fase de enraizamiento de FHIA 18.

Tratamientos	Altura (cm)		No. hojas por explante		No. Raíces por explante		Longitud de raíces (cm)	
	Líqu.	Sól.	Líqu.	Sól.	Líqu.	Sól.	Líqu.	Sól.
No contaminado	4,6 a	4,2 a	4,2a	3,8 a	3,7a	3.5 a	4,3 a	3,8 a
Contaminado	3,8b	3,5b	3,9a	3,5 a	2,5 b	2,3 b	3,5 b	3,1b
x ± ES	4,2 ± 0,18	3,85 ± 0,20	4,05 ± 0,16	3,65 ± 0,44	3,1 ± 0,33	2.9 ± 0.29	3,9 ± 0,11	3,45 ± 0,21
C.V %	19 %	18,1	17,2	8,2	27,0	23,5	20,5	20,28

Medias con letras no comunes en cada columna difieren según la prueba de rangos múltiples de Duncan para $p \leq 0.05$.

4.2 Evaluación del efecto de la contaminación bacteriana sobre el material vegetal en fase de aclimatización (IV)

A esta fase llegaron las plantas *in vitro* que lograron pasar por las fases anteriores de la micropropagación. Se observó que las plantas procedentes de material vegetal libre de contaminantes bacterianos visibles mostraron valores significativamente superiores a las que provenían de material vegetal desarrollado bajo la influencia de bacterias contaminantes en cuanto a la altura y el número de hojas (tabla 2).

Es importante destacar que a los 45 días el material vegetal libre de bacterias logró alcanzar 19,5 cm de altura con 5 hojas formadas, parámetros óptimos de calidad para pasar a fase de campo, según el Instructivo técnico para la micropropagación de plátanos y bananos, mientras que las que procedían de material vegetal contaminado aun a los 45 días no alcanzan los parámetros para su comercialización.

La supervivencia en esta fase disminuyó en un 19,9% para las plantas contaminadas. Los resultados alcanzados en este trabajo en cuanto a porcentajes de supervivencia coinciden con los de Fontes (2005), quien al trabajar con material libre de contaminantes bacterianos en el medio de cultivo logró entre un 97,9 y un 98% de supervivencia en este mismo cultivar FHIA-18 (AAAB).

El mejoramiento en las condiciones del área de canteros unido la disminución del número de ápices que deben ser desinfectados a la vez en la fase de establecimiento y el trabajo por líneas en la fase de multiplicación redujeron las pérdidas por contaminación bacteriana. La comprobación de que las bacterias contaminantes causaron afectaciones en la calidad del material vegetal en todas las fases de la micropropagación de FHIA 18 indican lo negativo de continuar

multiplicando estas plantas *in vitro*, ya que además pueden convertirse en fuente de diseminación de la contaminación en la Biofábrica. Al igual que en otros cultivos la presencia de estos contaminantes debe ser atendida y diseñarse estrategias para su control.

Las estrategias de trabajo para la prevención y el control de la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de plátanos y bananos propuestas en el trabajo de tesis pueden aplicarse tanto en los procesos de propagación masiva de plantas *in vitro* vía organogénesis como en los proyectos de investigación sobre propagación vía embriogénesis.

Tabla 2.. Efecto de la contaminación bacteriana sobre el material vegetal en la fase de Aclimatización de FHIA 18.

Tratamiento	Altura (cm)	Número de hojas	Supervivencia %	Observaciones cualitativas
No contaminado	19,05a	5,0a	99	mayor vigor, color más verde
Contaminado	14,5 b	3,0 b	80	menor vigor, color menos int.
X ES	17,0 ± 0.33	4,0 ± 0,13	2,57 ± 0,85	
CV. %	23,3	14,8	33,7	

Medias con letras no comunes en una columna difieren entre sí según la prueba de proporciones para $p \leq 0.05$.

4.3 Análisis económico de los aportes del trabajo en la eficiencia de la Biofábrica de Cienfuegos

La Biofábrica de la provincia de Cienfuegos tiene para el año 2006 un plan de producción de 1 300 000, para cumplir este plan necesita establecer 312 ápices caulinares de forma que a partir de cada uno de ellos obtenga alrededor de 5000 plantas *in vitro*. En la tabla 3 se muestra la influencia del porcentaje de contaminación en fase I , observándose que con el tratamiento I en que se reduce el numero de ápices por frasco biotecnológico en la desinfección se obtiene un 23,7 % de contaminación , es decir un 5,84 % menos al compararse con el otro tratamiento. Con la reducción del porcentaje de contaminación se necesitan 20 ápices menos reduciéndose los gastos en \$640.

Tabla 3. Influencia del porcentaje de contaminación en la eficiencia económica en la fase I.

Tratamiento	Plan de producción	Necesidad de ápices	% de contaminación	Ápices necesarios	Precio Ápice \$	Importe
I (Año 2004)	1300 000	312	23,7	384	32,0	12 228
II(Año 2005)			29,54	404		12 928
Diferencia	1 300 000	312	5,84	20	32,0	640

I Año 2005 (10 apices por frasco)

II Año 2004(control)

Los porcentajes de contaminación durante la fase de multiplicación tienen una influencia directamente proporcional a las pérdidas económicas, como se observa en la tabla 4 donde se al trabajar por líneas se reduce a 5,1 % este porcentaje con relación al otro tratamiento; representando 27 586 explantes contaminados menos por este concepto con un importe de \$ 8827,60. Además al disminuir la contaminación se consumen 0,25 kg de agar-agar menos con un valor de 16,0 MLC.

Tabla 4. Influencia de las pérdidas por contaminación en fase II

Trat.	Plan Prod.	Exp. a manejar	Exp. Cont..	% de cont.	Precio Exp.(\$)	Importe	Agar Gastado kg	Precio MLC kg	Imp. MLC
I	1300000	573000	29289	5,1	0,32	9732,4	0,25	64,0	16
II		8125000	56875	7,0		18200	0,5		32
Dif.	1300000	238200	27586	1,9	0,32	8827,6	0,25	64,0	16

Los incrementos en los coeficientes de multiplicación durante la fase II juegan un papel importante en la eficiencia productiva de la Biofábrica al reducirse el número de frascos a manipular (Tabla 5). Al incrementarse en el tratamiento I en 1,28 se manipulan 44 295 frascos menos que con el tratamiento II y se incrementa la capacidad de incubación en cámaras de crecimiento. Es importante señalar que la cantidad de medios de cultivos a elaborar al incrementarse esta variable cuando

se trabaja por líneas se reduce en nuestra Biofábrica en 3129 litros para la fase II, además se reduce el consumo de agar –agar en 9,5 kg por un valor de 608 MLC.

Tabla 5. Influencia del incremento de los coeficientes de multiplicación en el ahorro del agar-agar en fase II.

Tratamientos	Plan de producción	Coeficiente de mult.	Numero de frascos	Necesidad de medio (L)	Necesidad de agar (kg)	Precio MLC	Importe
I	1300000	3,18	22 942	1606	4,8	64,0	307,2
II		1,9	67 237	4735	14,3		915,2
Diferencia	1300000	1,28	44295	3129	9,5		608

La fase de enraizamiento se caracteriza por ser la más voluminosa de todo el proceso, pues cada brote de forma individual formado en la fase II debe ser cultivado y manipulado *in vitro* de forma tal que al final de la fase se logre la uniformidad en la calidad de las vitroplantas. En la tabla 6 se muestra la influencia de porcentajes de plantas enraizadas *in vitro* optimas para pasar a la fase de aclimatización según los tratamientos evaluados. Como se puede observar al manipular durante la fase *in vitro* material libre de contaminantes en la Biofábrica de Cienfuegos para cumplir su plan de 1 3000 000 se podrán reducir las pérdidas de vitroplantulas con características optimas para pasar a la siguiente fase un total de 209 300 por valor de \$ 376 740.

Tabla 6. Influencia del porcentaje de plantas optimas en fase III

Tratamiento	Plan de producción	% plantas enr. Liq.	% plantas enr. Sol.	Necesidad de plantas A enraizar	Precio \$	Importe
I	1300000	100	97	13195000	0,18	237 510
II		83,7	81,1	1528800		275184
Diferencia	1300000			209300	0,18	37674,0

La fase de aclimatización es trascendental para la micropropagación comercial, pues del resultado de ella dependerá en gran medida la calidad final de las plantas y la eficiencia total del proceso. La tabla 7 muestra la influencia de la manipulación de vitroplantas procedentes de material no contaminado durante las fases in vitro sobre el porcentaje de plantas optimas para la comercialización al terminar la fase de aclimatización. Se puede observar que al emplear el material no contaminado en el tratamiento I se logra un 99,1 % de vitroplantas con parámetros óptimos de calidad para ser vendidas, superior en un 30,2% a las provenientes de material contaminado. Este porcentaje representa que tengan que aclimatizarse 392606 vitroplantas menos por valor de \$ 200226 para producir 13000 000.

Tabla 7. Influencia de la manipulación de vitroplantas en fase IV en la comercialización

tratamiento	Plan de producción	% de vitroplantas optimas para comerc.	Numero de vit. No aptas	Precio \$	Importe
I	1300000	99,1	11700	0,51	5967
II		68,9	404 300		206193
Diferencia	1300000	30,2	392606		200226

El empleo de los resultados del presente trabajo en el proceso de propagación in vitro en la Biofábrica de Cienfuegos, posibilita alcanzar altos niveles productivos y eficiencia económica permitiendo que para producir 1300 000 vitroplantas se puede ahorrar 9,75 kg de agar –agar por un valor de 624 MLC. Además se reducen los gastos en \$ 247367 por concepto de trabajar con líneas sanas al disminuirse los coeficientes de multiplicación, disminuir la contaminación y aumentar la calidad de las vitroplantas que se comercializan al final del proceso.

5.CONCLUSIONES

1. Se demostró la incidencia de contaminantes bacterianos en la fase de establecimiento de la Micropropagación del híbrido FHIA 18 con predominio de las formas de cocos de color blanco.
2. Fue posible disminuir en 7,5 el porcentaje de contaminantes bacterianos al reducir hasta 10 el número de ápices caulinares durante la primera desinfección.
3. El trabajo en líneas libres de contaminación bacteriana permite reducir la contaminación, aumentar los coeficientes de multiplicación y la calidad de las plantas.
4. El trabajo en líneas libre de contaminantes permitirá a la Biofábrica de Cienfuegos ahorrar 624 MLC por concepto de agar-agar para un plan de 1 300 000 y reducir los gastos de producción en \$246 367.

6.RECOMENDACIONES

1-Establecer en la Biofábrica de Cienfuegos un banco de germoplasma que garantice la calidad genética y fitosanitaria del material de propagación.

.

2-Instrumentar el método de microscopia óptica para la detección temprana de contaminantes in vitro de la Biofábrica.

3-Identificar las especies bacterianas que aparecen en nuestras condiciones in vitro.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agramonte, D.; F. Jiménez.; M. Dita., 1998. Aclimatización Pp. 193-206. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología (J. N. Pérez Ponce, ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. Santa Clara. Cuba.
- Aragón, N. 1991. Anteproyecto de Norma para la producción de vitroplantas de plátanos y bananos. Informe final de investigación. UCLV. Santa Clara. Cuba.
- Alvarado, Y. 2003. Influencia, Incidencia ,Identificación y Estrategia para prevención y control de contaminantes bacterianos en el cultivo in vitro de la caña de azúcar (*Sacharum* sp. Híbrido) Tesis doctorado UCLV . 98 p.
- Arias, O.; G. Valverde. 1987. Performance Somaclonal Variation of " *in vitro* propagated banana plants. Abst. Inter. Congr of plant tissue cultured tropical species (Colombia) Pp. 77-78.
- . Barrett, C y 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
- Benerjee , N.; D. Vuylsteke and E. De Langhe., 1985. Meristem. T. P. Culture of Musa. Histo morphological Studies of shoot bud prolifetation. In: L. A. Withers and P. G. Alderson (Eds): Plant tissue culture an its Agricultural Applications. Butter worths. London. Pp. 139-147.
- . Boxus, PH y Terzi JM (1988) Control of accidental contamination during mass propagation. Acta Horticulturae 225:189- 193
- Buckley, PM, De Wilde TN y Reed BM (1995) Characterization and identification of bacteria isolated from micropropagated mint plants. *In vitro* Cell. Dev. Biol. 31: 58-64

- Cassells, AC (1991) Problem in tissue culture: culture contamination. En: Debergh P. y Zimmerman RH. (Eds), Micropropagation, pp. 31-45. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Castañeda, N. 2000. Vitrofurax: Esterilizante químico en la producción de vitroplantas. Centro de Bioactivos Químicos. UCLV. Santa Clara. 4p.
- Cornu, D y Michel MF (1987) Bacterial contaminants in shoots cultures of *Prunus avium* L. choice and phytotoxicity of antibiotics. Acta Horticulturae 212: 413-86
- Cronauer S. S. and A. D. Krikorian, 1983. Somatic embryos from cultured tissues of triploid plantains (Musa ABB) Plant Cell Rep. 2. Pp. 289-291.
- Chanway, C P (1998) Bacterial endophytic: Ecological and practical implications. Sydowia 50(2): 149-170
- Damasco, O.; L. F. Pateña and C. E. Umali. 1984. "Tissue culture of banana". En: 15 th Scientific meeting of the Philippines. 21 p.
- Daquinta M.; L. Barrera., Y. Lezcano.; O. Mosqueda. ; M. Escalona.; C. Borroto, 1999. Efecto de la Oscuridad en la Multiplicación " *in vitro* " del banano FHIA-18(AAAB) en los Sistemas de Inmersión Temporal. 1999. Santa Clara, 16-19 Junio: V.C. 5^{to} Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. Pp. 123-125.
- Debergh, P. L and L. J. Maene, 1981. Ascheme for commercial propagation of Ornamental plant by tissue culture. Scientia Hort. 14: 335-345.
- De Fossard, RA y De Fossard, H (1988) Coping with microbial contaminants and other matter in small commercial micropropagation laboratory. Acta Hortic. 225: 167- 176
- Debergh, P y Maene L (1984) Pathological and physiological problems related to the *in vitro* culture of plants. Parasitica 40 (2-3): 69-75
- Dore Swany, R,N. K. Sirinasa., E; Chacko. 1983 Tissue-culture propagation of banana. Scientia Horticulturae, 18: 247-253

- FAO. 2001. El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo 2001. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación (disponible en línea: <http://www.fao.org/SOF/soti/index-es.htm>).
- Falkner, F (1997) Antibiotics in plant tissue culture and micropropagation what are we aiming at?. En: Cassells AC (Ed) Pathogen and Microbial Contamination Management in micropropagation. Kluwer Academic Publishers. pp155-160. Dordrecht.
- Fontes, M. 2005. Aportes a la tecnología para propagación in vitro del híbrido de banano FHIA 18 (AAAB) en las fases de multiplicación y enraizamiento. Tesis presentada en opción de título de Maestría en Ciencias Agrícolas. 57 pag.
- George, EF (1993) Plant propagation by tissue culture. Chapter 5, Part1. 2nd Ed., pp. 130-143. Exegetics Ltd.
- George, EF y Sherrington PD (1984) Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics Ltd., Eversley, Basingstoke.
- George, E. F and P. D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture hand book and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd; Basingstoke; England. 709 p.
- Hu, C. and S. Hwang. 1984. Meristem, shoot tip and bud culture. In: Handbook of plant cell culture. Ed. Sharp. Pp. 176-227..
- INIBAP. 2001. Muchos usos del banano. E-mail: INIBAP@cgiar.org <http://www.INIBAP.org>. [Consulta: 10 noviembre 2004]
- INIBAP. 2002. The Global *Musa* Genomes Consortium. A strategy for the global *Musa* Genomes Consortium. Report of a meeting held in Arlington, USA, 17-20 July 2001. International Network for the improvement of banana and plantain, Montpellier, France. Disponible. [http:// www.inibap.org](http://www.inibap.org) [Consulta: 3 enero 2005]

- INIBAP. 2004. Los bananos vuelven a casa en Asia. INIBAP Annual Report. International Network for the improvement of banana and plantain, Montpellier, France. 66 p.
- INIBAP. 2004. Disponible. <http://www.inibap.org/network/wkcane.wf>
- Isaza, L. Establecimiento *in vitro* con fines de producción masiva.(2004) Año 10 No 26 pp 193-198. <http://www.utp.edu.co/php/revistas-cienciaettecnica>
- Knauss, JF (1976) A tissue culture method for producing *Dieffenbachia picta* cv “ Prefection “ free of fungi and bacterial. Proc. Fla. State Hort. Soc. 89: 293- 296
- Krikorian, A. D. and S. S. Cronauer. 1984. Banana. In: W. R. Sharp. D. A. Evans, P Ammirato and y. Yamada (Eds): Handbook of plant cell culture. New York. Edith mac Millan Publ. Vol. 2 Pp. 327-348.
- Leifert, C, Waites W y Nicolas JR (1989a) Bacterial contaminants of micropropagates plant cultures. Journal of Applied Bacteriology 67: 353-361
- Leifert, C, Waites WM, Camotta H y Nicholas JR (1989b) *Lactobacillus plantarum*; a deleterious contaminant of plant tissue. J. App. Bacteriology 67: 363- 370
- Leifert, C y Woodward S (1998) Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. Plant Cell Tissue and Organ Culture 52 :83-88
- Leifert, C, Morris CE y Waites WM (1994a) 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
- Long, RD (1997) Photoautotrophic micropropagation a strategy for contamination control. En: Cassells, AC y Hayes B (Eds), Abstracts of

the Second International Symposium on Bacteria and Bacteria contaminants of Plants Tissue Cultures, pp. 21. University College, Cork.

- Long, RD, Curtin TF y Cassells AC (1988) An investigation of the effect of bacterial contaminants on potato nodal cultures. Acta Hort. 225: 83- 91
- López, M. 1989. El plátano. Edit. Pueblo y Educación. Pp. 5-6.
- Ma, S. S. and C. T. Shii. 1972. " Ma y Shii. 1972. " *in vitro* " formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation J. Chinese soc. Hort. Sci. 18 Pp. 135-142.
- Martínez, S.; C. González.; M. Fonte.; O. Pérez 1992. Evaluación de diferentes métodos de introducción de donantes en Biofábricas. Ponencia al 7^{mo} Forum de Ciencia y Técnica. MINAGRI. Mecanografiado 20 p.
- Martínez, S. 1995. Evaluación de poblaciones obtenidas por cultivo " *in vitro* " e inducción de mutaciones en plátanos (*Musa sp*). Centro Agrícola 19 (2-3): 93-96.
- Martínez, S.; J. Pérez.; M. Ruiz.; M. Fonte.; O. Pérez. 2000. Perfeccionamiento de la tecnología para la micropropagación " *in vitro* " de los clones de bananos y plátanos Gran enano (AAA) y FHIA-03 (AAAB) libres de CMV mediante la contra inmunolectroforesis. Ponencia al XIII Forum Nacional de Ciencia y Técnica. MINAGRI. Cienfuegos. 80 p.
- Ministerio de la Agricultura. 2004. Instructivo técnico para la micropropagación de plátanos y bananos. Grupo Empresarial de Cultivos Varios. Mecanografiado 23 p. E-Mail: impresos@ceniai.inf.cu
- Ministerio de la Agricultura. 2004. Sistema de Control de Calidad para la Micropropagación " *in vitro* " de Plátanos y Bananos. Grupo Empresarial de Cultivos Varios. Mecanografiado 20 p. E-mail: impresos@ceniai.inf.cu
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised Medium for rapid growth and biosays with tobacco tissue culture. Plant physiology 15 Pp. 473-497.

- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *ann. Rev. plant physiology.* 25: 135-166
- Norman, DJ y Alvarez, AM (1994) Latent infections of *in vitro Anthurium* caused by *Xanthomonas campestris* pv *dieffenbachiae*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 39: 55- 61
- Novak, F. J.; R. Afza.; M. Van Durein. 1988. Mutagenesis " *in vitro* " para el mejoramiento del banano y el plátano (*Musa sp*). Informe mensual UPEB. Panamá City. P. 36..
- Novak F.J.; R. Afza., M. Van Durein. 1998. Mutagenesis in vitro para el mejoramiento del banano y el plátano (*Musa sp*) informe mensual UPEB. Panamá City. P.36
- Orellana, P. 1994. Tecnología para la micropropagación " *in vitro* " de clones de *Musa sp*. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencia Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. 104 p.
- Parkinson, M, Predergast M y Sayegh AJ (1996) Sterilisation of explants and cultures with sodium dichloroisocyanurate. *Plant Growth Regulation* 20: 61- 66
- Pérez, J.; P. Orellana.; E. Jiménez.; V. Gil. 1989. Informe final de investigaciones, Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencia Agropecuarias. UCLV. Mecanografiado 5 p.
- Pérez, J.; M. Suárez.; P. Orellana. 2000. Posibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba. Instituto de Biotecnología de las Plantas. In: *Biotecnología Vegetal*. Pp. 3-12.
- Pye, J, Everaert K y Debergh P (1996) Contamination by micro-arthropods in tissue cultures. En: Cassells, AC y Hayes B (Eds), *Abstracts of the Second International Symposium on Bacteria and Bacteria contaminants of Plants Tissue Cultures*, University College, Cork.

- Rao, P. S.; T. R. Gana path.; P. Suprasanna and V.A. Bapal. 1993. Encapsulation of Somatic embryos for Artificial seed Production " *in vitro* " 20: 256.
- Sandoval, 1985. Determinación del tamaño del explante para la propagación *in vitro* en medio de cultivo de *Musa spp.* Turrialba. Universidad de Costa Rica. 50 p. Tesis de Licenciatura en Agronomía.
- Skirvin, S; S, Mutoike; M, Norton; M. Ozgur; K. Al Juboory and O, Mc Means. 1999. Workshop. On Micropropagation establishment of contaminant free perennial plants " *in vitro* ". " *in vitro* " cell. Biol – Plant 35: 278-280. Biotecnología Vegetal. Vol. 2. No. 2. Pp. 73-76.
- Stead, DE, Hennessy J y Wilson J (1998) Modern methods for identifying bacteria. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52: 17- 25
- Suárez, M, y Alvarado Y (1997) Sistema de control de calidad para biofábricas de múltiples cultivos. En Libro de resúmenes. Técnicas avanzadas aplicadas a la propagación masiva de plantas. BIOVEG 97.2-5 abril. Ciego de Avila.
- Van Peer, R, Punte HLM, De Wega LA y Schippers B (1990) Characterization of root surface and endorhizosphere *Pseudomonads* in relation to their colonization of root. Appl. Env. Microbiol. 137: 81-85
- Vuylsteke, D. and E, De Langhe. 1985.. Possibility of " *in vitro* " propagation of banana and plantain. Tropical Agricultura (Trinidad) Vol. 62 N^{ro} 4. Pp. 323-328.
- Weller, R (1997) Microbial communities on human tissues; an important source of contaminants in plant tissue cultures. En: Cassells AC (Ed). Pathogen and Microbial Contamination Management in micropropagation. Kluwer Academic Publishers. pp. 245-257. Dordrecht.
- Zamora, A.; C, Damasco.; E. Estaño.; R. Barba and L. Pataña. 1989. Note: Growth and yield of Micropropagate and sucker-derived banana plants

(*Musa spp.* Cu. Lakatan, Bongulan and Saba). De Philippine Agriculturist
72 (4): 458-465.

