

Uso de PPM (Plant Preservative Mixture) para controlar contaminantes bacterianos en la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar

P. Digonzelli, L. Díaz y S. Carrizo de Bellone.

Universidad Nacional de Tucumán. Facultad de Agronomía y Zootecnia. Cátedra de Caña de Azúcar. Av. Roca 1900. (4000) San Miguel de Tucumán. Argentina.

Resumen

La contaminación con hongos, bacterias y levaduras causa grandes pérdidas en la micropropagación comercial de especies vegetales y en los trabajos de investigación. El control de la contaminación *in vitro* es fundamental para aumentar la eficiencia de la micropropagación. Este trabajo evaluó la acción bacteriostática y/o bactericida del PPM (Plant Preservative Mixture) para controlar la contaminación con *Pseudomonas*, y su efecto sobre el crecimiento *in vitro* de caña de azúcar. La bacteria se aisló de material vegetal contaminado. Las concentraciones de PPM fueron: T1 (0,06); T2 (0,125); T3 (0,250); T4 (0,500); T5 (0,750); T6 (1,00) y T7 (0 mL/L), incorporadas al medio de cultivo MS (1962). La bacteria se sembró en tubos con 5 repeticiones. El crecimiento bacteriano se evaluó con extendidos microscópicos. Usando concentraciones inhibitorias del crecimiento bacteriano y un testigo sin PPM, se evaluó su efecto en el crecimiento de macollos. Se colocaron 6 macollos de 2-4 cm por frasco, con 10 repeticiones. Se evaluó el número, longitud y peso fresco de macollos. T3, T4, T5 y T6 inhibieron el crecimiento bacteriano, con acción bactericida. El PPM no tuvo efectos inhibitorios sobre longitud, peso fresco y número de macollos. T5 presentó mayor uniformidad en el desarrollo de los macollos.

Palabras clave: control, contaminación, micropropagación, *Saccharum* sp.

Introducción

La contaminación microbiana es uno de los problemas más graves en la micropropagación de especies vegetales en el mundo, produce cuantiosas pérdidas de material tanto en la micropropagación comercial

como en los trabajos de investigación. La misma puede tener dos orígenes: a) microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos) y b) fallas en los procedimientos de laboratorio (8). Los

contaminantes más frecuentes *in vitro* son los hongos, bacterias y levaduras, denominados por Herman (13) “vitro patógenos”, que en muchos casos no son patógenos en condiciones de campo. Su efecto es muy dañino, ya que compiten con el explanto por los nutrientes del medio y les producen daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o la eliminación al medio de metabolitos tóxicos (23, 25).

Las bacterias son los contaminantes más comunes y ocasionan serios problemas porque pueden ser sistémicas así como difíciles de detectar y de eliminar (12, 16, 23). Estos microorganismos escapan a los efectos de los esterilizantes superficiales y pueden ser inter o intracelulares. Entre los últimos, se encuentran virus, viroides y muchos géneros bacterianos como: *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* (12, 16, 18). Su distribución puede ser localizada o sistémica, por xilema o por floema (5, 8). Estos contaminantes no se manifiestan en los primeros subcultivos, ya que la alta presión osmótica, el pH y ciertas hormonas de los medios de cultivo, pueden inhibir su crecimiento. Debido a este efecto inhibitorio, muchos microorganismos requieren un periodo de adaptación a las nuevas condiciones antes de manifestar su presencia, esto se da por lo general en la fase de multiplicación (5, 23).

El tipo de cultivo (anual o perenne), la forma de propagación (sexual o asexual) y las condiciones

climáticas influyen en la gravedad de las contaminaciones. Los cultivos perennes que se multiplican asexualmente, como la caña de azúcar, y los climas tropicales favorecen la acumulación de contaminantes (8, 23). En esta especie, se ha determinado una abundante flora bacteriana en todos los tejidos de la planta y en los haces conductores. Dobereiner *et al.* (6, 9) y Bellone *et al.* (3) han demostrado que la caña de azúcar puede ser colonizada endofíticamente por bacterias de los géneros *Acetobacter*, *Herbaspirillum* y *Azospirillum*, los cuales se encuentran en la parte aérea de la planta, incluido el ápice (4).

Estas bacterias se introducen en el cultivo de tejidos y se propagan con el material vegetal, convirtiéndose, luego, en contaminantes de los cultivos *in vitro*.

En la micropropagación de la caña de azúcar, la contaminación bacteriana produce grandes pérdidas directas e indirectas como: reducción de la tasa de multiplicación, inhibición del enraizamiento y muerte de plantas en todas las etapas del proceso (2), trabajos realizados en Cuba (1, 2) demostraron que en la fase de establecimiento *in vitro* las bacterias son responsables del 15 al 34 % de las pérdidas producidas por microorganismos. De estas pérdidas, el 82 % se deben a géneros bacterianos que son patógenos sistémicos o saprófitos asociados al cultivo. Esto demuestra que fueron introducidos con el explante original. Para la micropropagación de la caña de azúcar, en la etapa de multiplicación se determinó un porcentaje de contaminación bacteriana

del 17,4 % (2).

En la micropropagación de especies vegetales, Meyer *et al.* (20) y Tanprasert y Reed (26) realizaron experiencias con el uso de sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano. Estas sustancias son antibióticos como: rifampicina, cefotaxima, gentamicina, estreptomycin, ampicilina, etc. También se han empleado otras sustancias como extractos filtrados de microorganismos. Entre estos, el extracto de *Pseudomonas fluorescens* ha mostrado una elevada actividad antimicrobiana (14). El G1 (1-(5-bromofur-2-il) -2-bromo-2-nitroeteno), es un producto, desarrollado en Cuba, con acción de esterilizante químico, que se incorpora a los medios de cultivo para eliminar los contaminantes microbianos (1, 23). El uso de Nitrato

de Plata en los medios de cultivo permitió controlar el crecimiento de contaminantes no patogénicos, sin afectar el crecimiento en plántulas de tomate (15).

El PPM, Plant Preservative Mixture, (5-Cloro-2-Metil-3[2H]-Isotiazolone 0,1350 % + 2-Metil-3[2H]-Isotiazolone 0,0412 % + ingredientes inertes 99,8238 %) es un preservante de amplio espectro, que puede tener acción biocida o biostática, recomendado para controlar la contaminación microbiana en el cultivo de tejidos (19). En el presente trabajo se evaluaron diferentes dosis de PPM para controlar la contaminación bacteriana, producida por una cepa de *Pseudomonas*, y su efecto sobre el crecimiento *in vitro* de caña de azúcar en la etapa de multiplicación.

Materiales y métodos

Micropropagación de caña de azúcar:

El explante inicial utilizado en la micropropagación fue el meristema apical con dos a tres primordios foliares; el medio de cultivo usado fue el Murashige y Skoog (MS) (21) modificado para cada etapa de la micropropagación (establecimiento, multiplicación y enraizamiento). Se trabajó con la variedad de caña de azúcar CP 48-103, en la etapa de multiplicación *in vitro*. El material vegetal empleado en este ensayo fue micropropagado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Cátedra de Caña de Azúcar de la Facultad de Agronomía y Zootecnia. UNT.

Tucumán. Argentina.

Aislamiento de la bacteria:

La cepa bacteriana perteneciente al género *Pseudomonas* se aisló de frascos de cultivo con vástagos de caña de azúcar contaminados. El aislamiento de la bacteria se realizó en el medio de Geels y Schirippers (11).

Ensayo de la acción bactericida o bacteriostática del PPM (Plant Preservative Mixture):

Se probaron las siguientes concentraciones de PPM: T1 (0,06 mL/L); T2 (0,125 mL/L); T3 (0,250 mL/L); T4 (0,500 mL/L); T5 (0,750 mL/L); T6 (1 mL/L); T7 (0 mL/L), incorporándolas

al medio de cultivo MS (1962) líquido, modificado para la etapa de multiplicación. En estos tratamientos se sembró la cepa bacteriana, con 5 repeticiones para cada tratamiento, se llevó a cámara de crecimiento y se evaluó el crecimiento bacteriano. Se realizaron extendidos microscópicos para determinar la presencia de la bacteria sembrada.

Para evaluar la acción bacteriostática o bactericida del PPM se resembró a partir de los cultivos previos, en el mismo medio MS pero sólido, con y sin PPM, con 5 repeticiones. A los 7 días, se observó si había desarrollo de colonias.

Ensayo del efecto del PPM sobre el crecimiento *in vitro* de los macollos:

Para evaluar el efecto del PPM sobre el crecimiento de los macollos, se utilizaron las concentraciones inhibitorias del crecimiento bacteriano: T3 (0,250 mL/L); T4 (0,500

mL/L); T5 (0,750 mL/L); T6 (1 mL/L) y un testigo sin PPM (T7: 0 mL/L). Las mismas se incorporaron al medio MS modificado para la etapa de multiplicación; se colocaron 6 macollos de 2-4 cm por frasco, se trabajó con 10 repeticiones. Los macollos empleados provenían de material micropropagado por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Cátedra de Caña de Azúcar de la Facultad de Agronomía y Zootecnia. UNT. Tucumán. Argentina. Cada 20 días se determinó: número, longitud y peso fresco de macollos. El diseño experimental fue totalmente aleatorizado. Para longitud de macollos se usó el test no paramétrico de Kruskal y Wallis y el test de comparación de medias no paramétrico tipo Tukey 5%. Para peso fresco y número de macollos se realizó análisis de covarianza, el número de macollos se empleó como covariable.

Resultados y discusión

En este trabajo se encontró que el PPM en las concentraciones T3, T4, T5 y T6 (cuadro 1) impidió el desarrollo de las bacterias del género *Pseudomonas* sembradas en el medio de cultivo empleado para la etapa de multiplicación, en la micropropagación de caña de azúcar. Esto concuerda con estudios previos de otros autores (17, 19, 22), que determinaron que el PPM, empleado en dosis de 0,5 a 2,0 mL/L, es eficiente en el control de contaminantes bacterianos y fúngicos, ya que es un preservante de amplio espectro, que

afecta enzimas fundamentales en el ciclo del ácido cítrico y en la cadena de transporte de electrones (19).

Las menores concentraciones ensayadas (T1 y T2) y el testigo (T7) no controlaron el crecimiento de *Pseudomonas*, esto coinciden con los resultados obtenidos en los trabajos citados precedentemente (17, 19), donde se recomienda el uso del PPM en concentraciones de 0,5 a 2 mL/L.

En el cuadro 2 se observa que en las concentraciones ensayadas, el PPM actuó como bactericida, ya que las resiembras en medio sin PPM,

Cuadro 1. Efecto de diferentes concentraciones de PPM en el desarrollo de bacterias del género *pseudomonas* en la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar.

Tratamientos	Desarrollo de bacterias en medio de cultivo con diferentes concentraciones de PPM				
T1	+	+	+	+	+
T2	+	+	+	+	+
T3	-	-	-	-	-
T4	-	-	-	-	-
T5	-	-	-	-	-
T6	-	-	-	-	-
T7	+	+	+	+	+

realizadas a partir de las concentraciones que no permitieron el crecimiento bacteriano (T3; T4, T5 y T6), fueron negativas. Similares resultados fueron obtenidos por otros autores, que determinaron que en concentraciones menores a 2mL/L el PPM tiene efecto biocida (19).

Por lo tanto, el uso de PPM en las dosis T3, T4, T5 y T6, controló la contaminación bacteriana causada por *Pseudomonas*.

En concordancia con lo expresado por numerosos investi-

gadores (1, 2, 20), cuando se trabaja con sustancias antibacterianas que se incorporan al medio de cultivo, es necesario analizar su efecto sobre el crecimiento de las plántulas, ya que muchas de estas sustancias modifican la composición del medio de cultivo y pueden resultar fitotóxicas (10, 24, 27). En relación al número de macollos, en el cuadro 3 se observa que no hay diferencias significativas entre los tratamientos, excepto en la primera evaluación, donde T4 y T3 fueron superiores a T5. Por lo tanto

Cuadro 2. Evaluación del efecto bactericida o bacteriostático de diferentes concentraciones de PPM en la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar.

Tratamientos	Desarrollo de bacterias en medio de cultivo con diferentes concentraciones de PPM				
T1	+	+	+	+	+
T2	+	+	+	+	+
T3	-	-	-	-	-
T4	-	-	-	-	-
T5	-	-	-	-	-
T6	-	-	-	-	-
T7	+	+	+	+	+

Cuadro 3. Comparación de medias para el efecto de diferentes concentraciones de PPM sobre el número de macollos en la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar.

Tratamientos	Primera evaluación	Segunda evaluación	Tercera evaluación
T4	35,800 ^a	37,125 ^a	29,900 ^a
T3	35,400 ^a	27,615 ^a	26,167 ^a
T7	28,200 ^{ab}	25,000 ^a	22,000 ^a
T6	27,600 ^{ab}	31,778 ^a	26,158 ^a
T5	24,600 ^b	30,000 ^a	28,368 ^a

Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05). Tukey 5%

el empleo del PPM no afectó el número final de macollos.

La figura 1 permite observar que la variabilidad en el número de

macollos fue menor para T5, al finalizar la etapa de multiplicación (última fecha de evaluación).

El cuadro 4 muestra que en

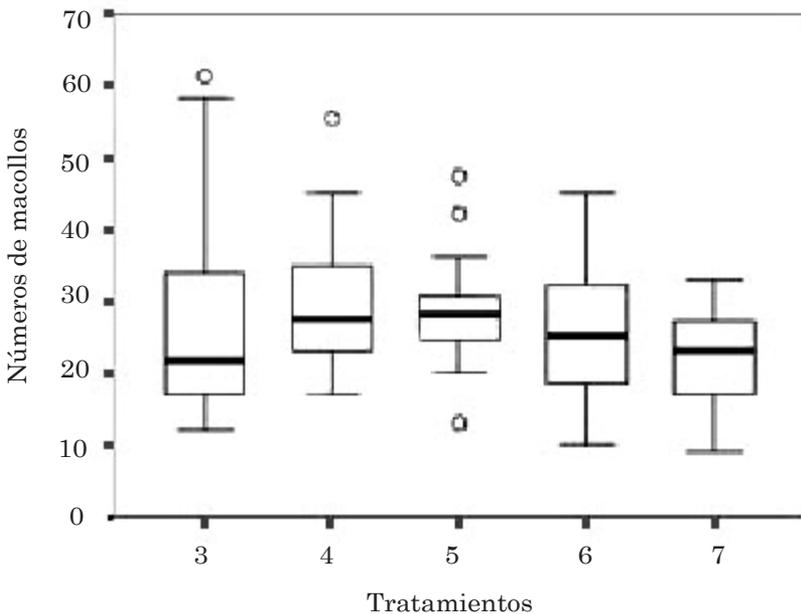


Figura 1. Diagrama de caja y extensión para el efecto de las diferentes concentraciones de PPM sobre el número de macollos en la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar para la última fecha de evaluación.

Cuadro 4. Comparación de medias para el efecto de diferentes concentraciones de PPM sobre el peso fresco de macollos (gramos) en la multiplicación in vitro de caña de azúcar.

Tratamientos	Primera evaluación	Segunda evaluación	Tercera evaluación
T3	2,3930 ^a	2,2606 ^a	2,3930 ^a
T4	2,5034 ^a	2,2537 ^a	2,5034 ^a
T5	2,3021 ^a	1,8413 ^a	2,3021 ^a
T6	2,3988 ^a	2,2811 ^a	2,3988 ^a
T7	2,1946 ^a	1,8393 ^a	2,1946 ^a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Tukey 5%

relación al peso fresco de los macollos no existen diferencias significativas entre los tratamientos, para las distintas fechas de evaluación. Por lo tanto, el PPM agregado a los medios de cultivo, en las concentraciones ensayadas, no estimuló ni restringió el crecimiento de los macollos de caña

de azúcar expresado como peso fresco.

La figura 2 muestra que en la última fecha de evaluación, T5 permitió; una mayor uniformidad del peso fresco de los macollos que los demás tratamientos y que el testigo sin PPM (T7).

Para la longitud de macollos

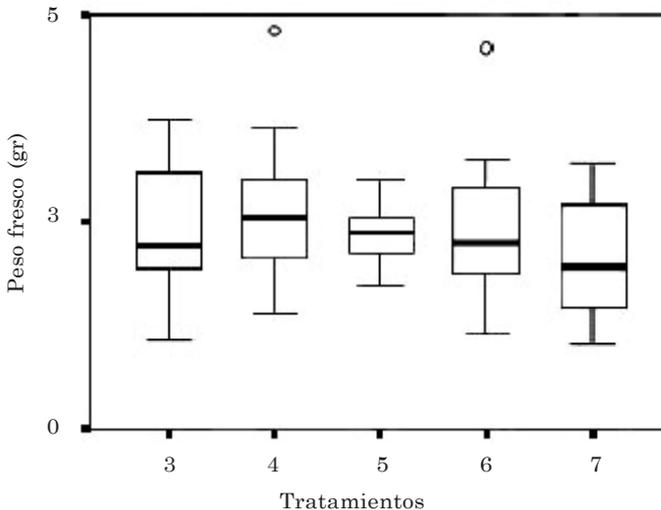


Figura 2. Diagrama de caja y extensión para el efecto de las diferentes concentraciones de PPM sobre el peso fresco de los macollos en la multiplicación in vitro de caña de azúcar para la última fecha de evaluación.

(cuadro 5) se encontró que el tratamiento con la mayor concentración de PPM (T6) fue significativamente superior al testigo sin PPM (T7), para las dos primeras fechas de evaluación. Esta diferencia desapareció en la tercera evaluación, donde T3 fue significativamente

superior a T4. Sin embargo al hacer los diagramas de caja y extensión se observó que T3 y T4 presentan muchos valores alejados de la media. Al eliminar estos valores, surge que ninguna de las medias difiere entre sí.

La figura 3 muestra que todos los tratamientos presentan una

Cuadro 5. Comparación de medias para el efecto de diferentes concentraciones de PPM sobre la longitud de macollos (centímetros) en la multiplicación in vitro de caña de azúcar.

Tratamientos	Primera evaluación	Segunda evaluación	Tercera evaluación
T6	29,000 ^a	32,825 ^a	28,117 ^{ab}
T5	28,455 ^{ab}	27,000 ^{bc}	29,367 ^{ab}
T4	24,629 ^{ab}	22,452 ^c	27,595 ^b
T3	23,697 ^b	29,102 ^{ab}	31,230 ^a
T7	22,563 ^b	23,333 ^{bc}	28,000 ^{ab}

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Tukey 5%

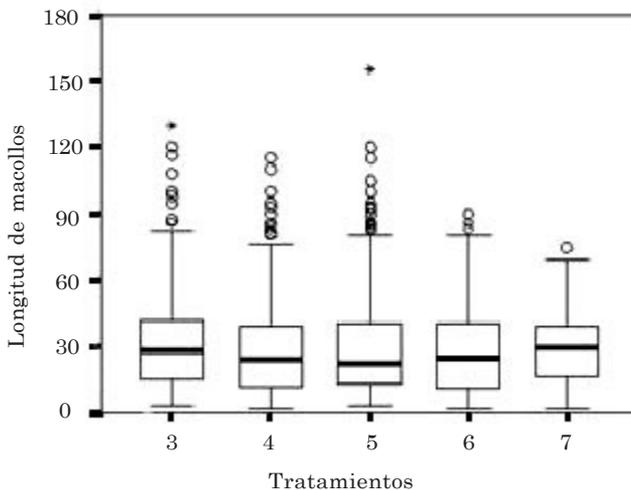


Figura 3. Diagrama de caja y extensión para el efecto de las diferentes concentraciones de PPM sobre la longitud de los macollos en la multiplicación in vitro de caña de azúcar para la última fecha de evaluación.

variabilidad similar en la longitud de macollos.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que no se observó un efecto perjudicial ni estimulante del PPM sobre el crecimiento de los macollos, en la etapa de multiplicación *in vitro* de caña de azúcar, salvo para la longitud de los mismos, pero este efecto desapareció al aumentar el número de repiques (cuadros 3, 4 y 5). Esto coincide con lo encontrado por otros investigadores, que determinaron que el PPM en

concentraciones de 0,5 a 1 mL/L, no afecta la germinación de semillas, la formación y proliferación de callos y el desarrollo de vástagos adventicios *in vitro* (7, 17, 19).

Del análisis de los gráficos, surge que T5 permite lograr una mayor uniformidad en la población de tallos, lo cual constituye una ventaja para la producción comercial a gran escala. Esta uniformidad en el desarrollo de la vitroplantas favorece su aclimatación y comercialización (23).

Conclusiones

El PPM incorporado al medio de multiplicación en las concentraciones de: 0,25; 0,50; 0,75 y 1 mL/L es eficiente para controlar la contaminación con bacterias del género *Pseudomonas* en la micropropagación de caña de azúcar. Las concentraciones de PPM menores a 0,25 mL/L, no controlan el crecimiento de *Pseudomonas*.

El efecto del PPM en las concentraciones de: 0,25; 0,50; 0,75 y

1 mL/L. fue bactericida.

En las concentraciones de: 0,25; 0,50; 0,75 y 1 mL/L el PPM no afectó el crecimiento (número, peso fresco y longitud) de los macollos de caña de azúcar, por lo cual puede ser agregado al medio de cultivo en forma rutinaria. El PPM en la concentración de 0,75 mL/L favoreció una mayor uniformidad en el desarrollo de los macollos de caña de azúcar.

Literatura citada

1. Acosta, M., Y. Alvarado y A. Flores. 1999. Contaminantes fúngicos en la micropropagación de plantas con el uso de la esterilización química de los medios de cultivo. Libro de reportes cortos "Biotecnología Vegetal". 5° Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal: 239-240.
2. Alvarado, Y., L. Garcia, Y. Martinez, D. Ramirez, T. Pichardo y N. Portal. 1999. Estudio de la influencia de la contaminación bacteriana en la micropropagación de caña de azúcar var. Cuba 87-51. Libro de reportes cortos "Biotecnología Vegetal". 5° Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal: 241-243.
3. Bellone, C., S. Carrizo de Bellone y R. Pedraza. 1995. Colonization of sugar cane roots by *Acetobacter diazotrophicus* and vesicular-arbuscular mycorrhiza. International symposium on sustainable agriculture for the tropics. The role of biological nitrogen fixation. Angra dos Reis. Brasil. 206-207.

4. Carrizo de Bellone, S. 2000. Microorganismos fijadores de Nitrógeno asociados a partes aéreas de la caña de azúcar en la provincia de Tucumán. 173 pp.
5. Cassells, A. 1988. Bacterial and bacteria-like contaminants of plant tissue cultures. *Acta Hort.* 225 pp.
6. Cavalcante, V. y J. Döbereiner. 1988. A new-acid tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and soil* 108:23-31.
7. Compton, M. y J. Koch. 1999. Influence of Plant Preservative Mixture (PPM) on adventitious organogenesis. *In Vitro- Plant* 35(3): 40-A.
8. Debergh, P. y R. Zimmerman. 1991. "Micropropagation Technology and Application". Ed. Kluwer Academic Publishers. 484 pp.
9. Döbereiner, J., V. Reis, M. Paula y F. Olivares. 1992. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. International Congress of Nitrogen Fixation. Cancún. México.
10. Falkiner, F. 1990. The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture. *Int. Soc. Plants tiss. Newsletter* 60:13-23.
11. Geels, S. y B. Schirippers. 1983. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their roots colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Phytopathology. Z.* 108:193-206
12. George, E. 1993. Plant propagation by tissue culture. Chapter 5, part 1. 2nd. pp: 130-143. Ed. Exergetics Ltd.
13. Herman, E. 1987. Toward control of micropropagation contamination. *Agricell Report* 9: 33-35.
14. Hussain, S., S. Lane y D. Price. 1994. A preliminary evaluation of the use of culture filtrates for the control of contaminants in plant tissue culture systems. *Plant cell, tissue and organ culture* 36: 45-51.
15. Kubota, C. y N. Tadokoro. 1999. Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. *In vitro Cell and Developmental Biol. Plant.* Vol. 35. N°4: 296-298.
16. Leifert, C., C. Morris y W. Waites. 1994. Ecology of microbial saprophyte and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13: 139-183.
17. Lunghusen, J. 1998. An effective biocide for plant tissue culture. *Australian Horticulture* (January 1998): 46-48.
18. Madoff, S. 1981. The L-forms of bacteria. In: Starr, M.; H. Stolp; H. Traper; A. Balows y H. Schlegel (Eds). *The prokaryotes Vol II* (pp 2225-2237). Springer-Verlag, A. Berlin.
19. Martin Kalin, M. y Guri Assaf. 1999. PPM Plant Preservative Mixture. Plant cell technology's new preservative biocide.
20. Meyer, H., Staden-j. Van, S. Allen y J. Van Staden. 1992. The use of antibiotics to control systemic bacteria *in vitro* cultures of *Piper nigrum* cv. Kuching. *South African Journal of Botany* 58-6:500-504.
21. Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* V 15: 473-497.
22. Niedz, R. 1998. Using isothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. *Hort Technology* 8-4: 598-601.
23. Perez Ponce, J.N. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología Ed. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 390 pp.
24. Roca, W. y L. Mrogrinski. 1993. Cultivo de tejido en la Agricultura. *Fundamentos y Aplicaciones.* CIAT. 969 pp.

25. Surga, J. y Y. Guevara. 1994. Pruebas de desinfección para controlar la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de ápices caulinares de banano (*Musa* AAA). Fitopatol. Venez. Vol 7 N°1:14-17.
26. Tanprasert, P y B. Reed. 1997. Determination of minimal bactericidal and effective antibiotic treatment concentrations for bacterial contaminants from micropropagated strawberries⁷. In vitro Cell and Developmental Biol. Plant. Vol. 33. N°3: 227- 230.
27. Yeoman, M y A. Macleod. 1977. Plant Tissue and Culture. 2nd. Ed. H.E. Street. England. 31-32.