



Revista Industrial
y Agrícola de
Tucumán

ISSN 0370-5404

En línea
1851-3018

Tomo 102 (1):
16-19; 2025



ESTACION EXPERIMENTAL
AGROINDUSTRIAL
OBISPO COLOMBRES
Tucumán | Argentina

Av. William Cross 3150
T4101XAC - Las Talitas.
Tucumán, Argentina.

Trabajo
presentado en
el XXXII ISSCT
Centennial
Congress, 24
al 28 de agosto
de 2025, Cali,
Colombia,
traducido al
castellano.

Fecha de
recepción:
18/08/2025

Fecha de
aceptación:
19/08/2025

Control de vitropatógenos en el esquema de producción *in vitro* de caña de azúcar en la EEAOC

M. Elena Díaz*, Andrea N. Peña Malavera*, M. Francisca Perera* y Aldo S. Noguera*

* Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (ITANOA), Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), CCT NOA SUR. Email: mediazmicales@eeaac.org.ar

RESUMEN

Uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer cultivos *in vitro* es la contaminación endógena (virus, viroides, bacterias, hongos y levaduras presentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores), ya que no pueden ser eliminados por técnicas de desinfección química a las que es sometido el material vegetal al inicio del proceso de micropropagación. Cuando causan daño *in vitro* (aunque no necesariamente *in vivo*) se los denomina vitropatógenos. Entre estos microorganismos, las bacterias constituyeron el principal problema en 2024 en la micropropagación de caña de azúcar en la EEAOC, ya que ocasionaron pérdidas equivalentes al 20% de la producción total, lo que representó casi el 55% de las pérdidas totales de producción. Además de la muerte de las plantas, las bacterias producen una disminución de la tasa de multiplicación de las variedades micropropagadas y fallas en la etapa de enraizamiento. El objetivo de este trabajo fue evaluar dos antibióticos (cefotaxima y gentamicina) e identificar los géneros bacterianos presentes mediante la secuenciación de la región 16S, a fin de diseñar una apropiada estrategia de control. El uso de cefotaxima fue más efectivo en el control del crecimiento bacteriano, sin disminución de la tasa de multiplicación. El tratamiento con gentamicina no resultó efectivo para el control bacteriano y, además, las plantas manifestaron alteraciones fenotípicas (quimeras y albinismo) en el 2,7% del total de la producción. Las bacterias identificadas pertenecieron a los géneros *Bacillus* y *Microbacterium*. Considerando que el 73% del área cañera plantada en Tucumán está plantada con "caña semilla" de alta calidad provista por el Proyecto Vitroplantas de la EEAOC, la incorporación de estrategias de control beneficiará al esquema de producción y, en consecuencia, al sector productivo.

Palabras clave: antibiótico, bacteria, contaminación *in vitro*, tasa de multiplicación.

ABSTRACT

Vitropathogen control in EEAOC's sugarcane micropropagation scheme

One of the main inconvenient of *in vitro* culture is the endogenous contamination (viruses, viroids, bacteria, fungi or yeasts inside cells, in intercellular spaces or vascular bundles) since it cannot be eliminated by chemical disinfection before micropropagation process. When they cause *in vitro* damage (but not necessarily in *in vivo* conditions) they are called vitro pathogens. Among these microorganisms, bacteria were the main problem in EEAOC's sugarcane micropropagation since the losses they caused were 20% of the total production, representing almost 55% of the total production losses. Bacteria not only cause plant death but also decrease in multiplication rates, and even cause failures in rooting stage. The aim was to evaluate two antibiotics (cefotaxime and gentamicin) and identify by sequencing 16S region the genera present to design adequate strategy control. Cefotaxime proved to be more effective in controlling bacterial growth in *in vitro* sugarcane culture without decreasing the multiplication rates. The use of gentamicin was not effective

to bacterium control, besides some plants revealed phenotypic alterations (chimeras, albinism) in 2.7% of the total evaluated plants. The identified bacteria belong to the genera *Bacillus* and *Microbacterium*. Considering that 73% of the sugarcane area in Tucumán is planted with high quality seed cane obtained by Vitroplant Project, the incorporation of control strategies will positively affect in the production scheme, which directly will benefit the productive sector.

Key words: antibiotic, bacteria, *in vitro* contamination, multiplication rates.

INTRODUCCIÓN

En 2001, la EEAOC creó el Proyecto Vitroplantas, cuyo propósito es el de proveer caña de azúcar de alta calidad a los productores de la región. Para ello, se vale de herramientas biotecnológicas tales como cultivo de tejidos, termoterapia y diagnóstico molecular, mediante los cuales obtiene material sano, vigoroso y con pureza genética (Pérez Ponce, 1998). Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales permiten el establecimiento, la manipulación y el desarrollo de células, tejidos u órganos en condiciones asépticas, mientras que la micropropagación se refiere a la multiplicación a gran escala de plantas, mediante la proliferación o inducción de yemas en medios de cultivo *in vitro* en condiciones asépticas. El Programa de Mejoramiento de la EEAOC proporciona las variedades que son micropropagadas por el laboratorio de la Sección Biotecnología. Desde 2016, la producción en laboratorio de las vitroplantas de caña de azúcar está certificada con la norma internacional de calidad ISO 9001:2015.

El material resultante está libre de las principales enfermedades de la caña de azúcar en Tucumán (Argentina): escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*); raquitismo de la soca (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*); estría roja (*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*); mosaico de la caña de azúcar (SCMV y SrMV); y virus del amarillamiento de la hoja (YLS). La pureza genética asegura que las plántulas tienen el mismo perfil genético que el material donante (Díaz *et al.*, 2019).

La contaminación microbiana es una de las principales limitaciones en los sistemas de micropropagación. Provoca dificultades en la iniciación del cultivo, reducción de las tasas de multiplicación, dificultad en el enraizamiento, necrosis de tejidos y mortalidad del cultivo. Los contaminantes más comunes son hongos y bacterias.

Los hongos pueden controlarse fácilmente con protocolos adecuados de limpieza y desinfección. Sin embargo, estos protocolos son inefficientes para la eliminación de bacterias, ya que, al ser endógenas, pueden permanecer latentes y aparecer después de varios subcultivos. Cuando las contaminaciones bacterianas causan daños significativos o la muerte del material vegetal, se denominan vitropatógenos (Herman, 1987). En el ambiente natural, no son necesariamente patógenas ni perjudiciales para las plantas; incluso pueden ser beneficiosas para las plantas hospedantes, al favorecer su crecimiento o fortalecer sus defensas contra enfermedades. Para el control de la contaminación bacteriana *in vitro* pueden usarse antibióticos.

En 2024, el 36% de la producción se perdió debido a diferentes motivos, donde la presencia de vitropatógenos fue responsable del mayor porcentaje (Figura 1). Este grave problema se produjo por la falta de disponibilidad comercial de cefotaxima, que fue reemplazado por gentamicina. Los objetivos de este estudio fueron: (i) evaluar la eficacia de dos antibióticos para controlar el crecimiento bacteriano, (ii) identificar los géneros presentes en el cultivo *in vitro* de caña de azúcar, y (iii) diseñar una estrategia adecuada para el control de los vitropatógenos en el sistema de micropropagación de la caña de azúcar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron vitroplantas de dos variedades, TUC 95-10 (subcultivo 5) y TUC 03-12 (subcultivo 6), que fueron crecidas en medio Murashige and Skoog, al que se adicionó 3% sacarosa, 6-benzylaminopurina (BAP) y ácido naftaleacético (ANA).

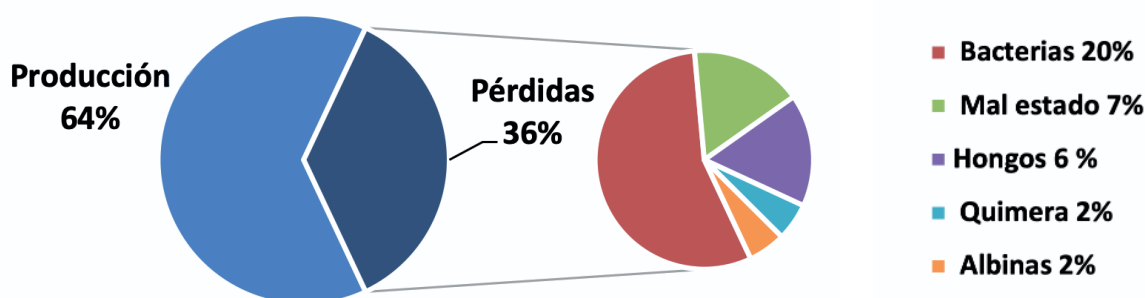


Figura 1. Pérdidas de producción de vitroplantas de caña de azúcar en 2024.

Los tres tratamientos evaluados fueron: cefotaxima (170 mg/L); gentamicina (30 mg/L), y control (sin antibiótico), con 15 repeticiones por tratamiento (TUC 95-10 en tres bloques y TUC 03-12 en dos bloques). El material fue incubado durante cuatro semanas a 24-28°C con un fotoperíodo de 16 h luz. Se registraron las tasas de multiplicación y alteraciones fenotípicas. Antes del ensayo, todas las plantas fueron cultivadas desde sus etapas iniciales con gentamicina, debido a la falta de disponibilidad de cefotaxima.

Aislamiento, crecimiento bacteriano e identificación

Se realizó una dilución 1:1000 del medio de cultivo de cada tratamiento, se sembraron 100 µL en placas Petri y se incubaron a 37°C durante dos días. Posteriormente, se contaron las unidades formadoras de colonias. La región 16S ADN de las colonias se amplificó mediante PCR y los fragmentos amplificados se purificaron y secuenciaron (Figura 2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tasa de multiplicación fue mayor con cefotaxima, mientras que el tratamiento con gentamicina disminuyó significativamente esa tasa comparada incluso con respecto al control, es decir sin antibiótico (Figura 3).

Las alteraciones fenotípicas fueron similares para ambas variedades 14,8% para TUC 95-10 y 11% para TUC 03-12. TUC 95-10 desarrolló más quimeras cuando fue tratada con cefotaxima, y la aparición de plantas albinas se observó tanto en el tratamiento con gentamicina, como en el tratamiento control. En TUC 03-12, el tratamiento con gentamicina mostró mayores niveles de quimeras y plantas albinas que en los tratamientos con cefotaxima y control (Figura 4). Sin embargo, el valor $p \leq 0,5$ indica que tales alteraciones morfológicas fueron independientes de los tratamientos.

En ambas variedades, el uso de cefotaxima disminuyó la contaminación bacteriana (Figura 5). TUC 03-12 tuvo mayor crecimiento de bacterias en todos los trata-

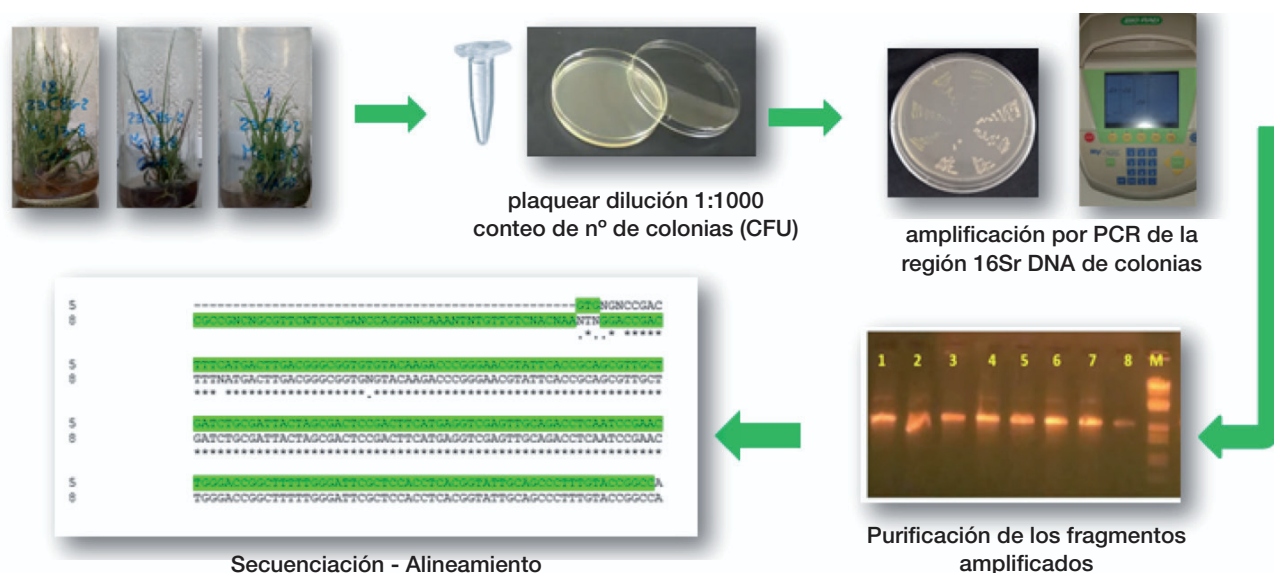


Figura 2. Esquema de aislamiento e identificación de contaminantes bacterianos.

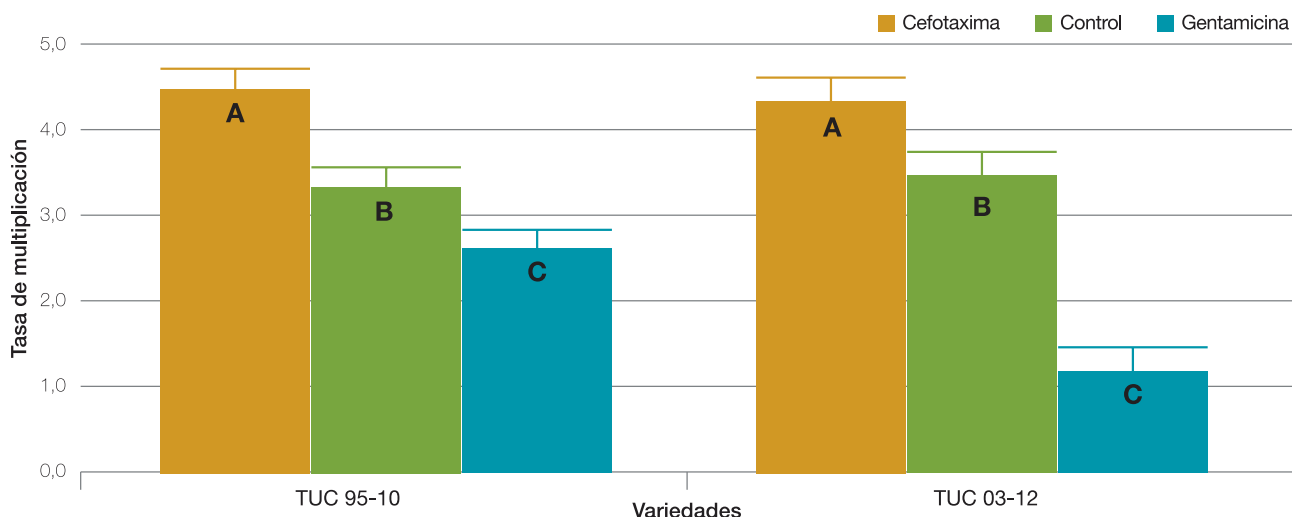


Figura 3. Tasa de multiplicación de las dos variedades en los tres tratamientos ensayados.

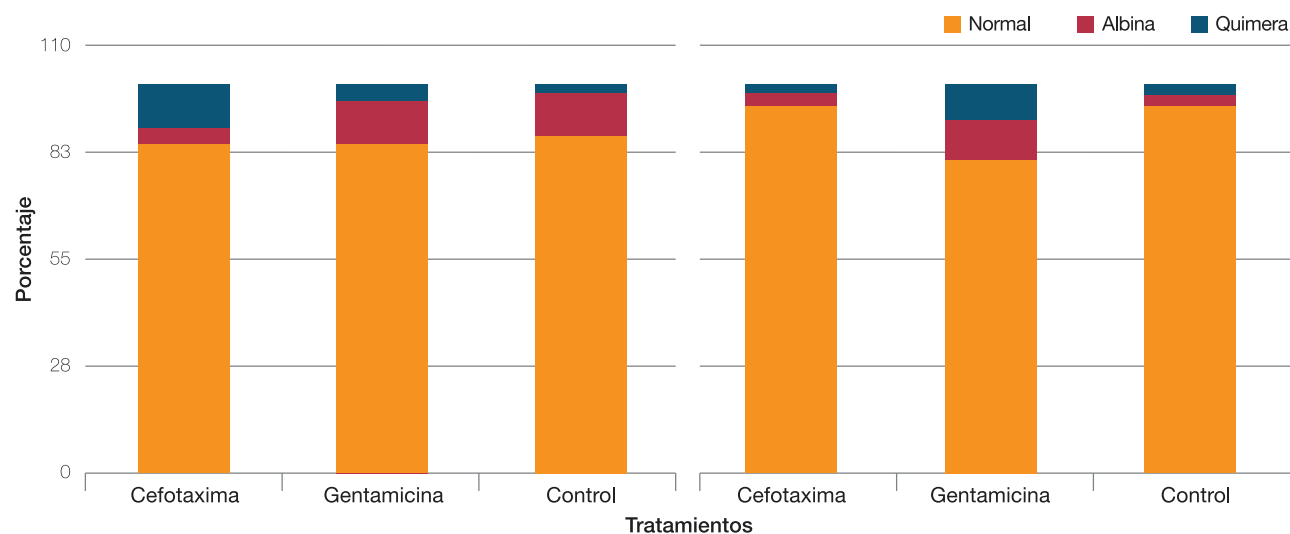


Figura 4. Alteraciones fenotípicas. Izquierda: TUC 95-10 (p -valor=0,31); Derecha: TUC 03-12 (p -valor=0,46).

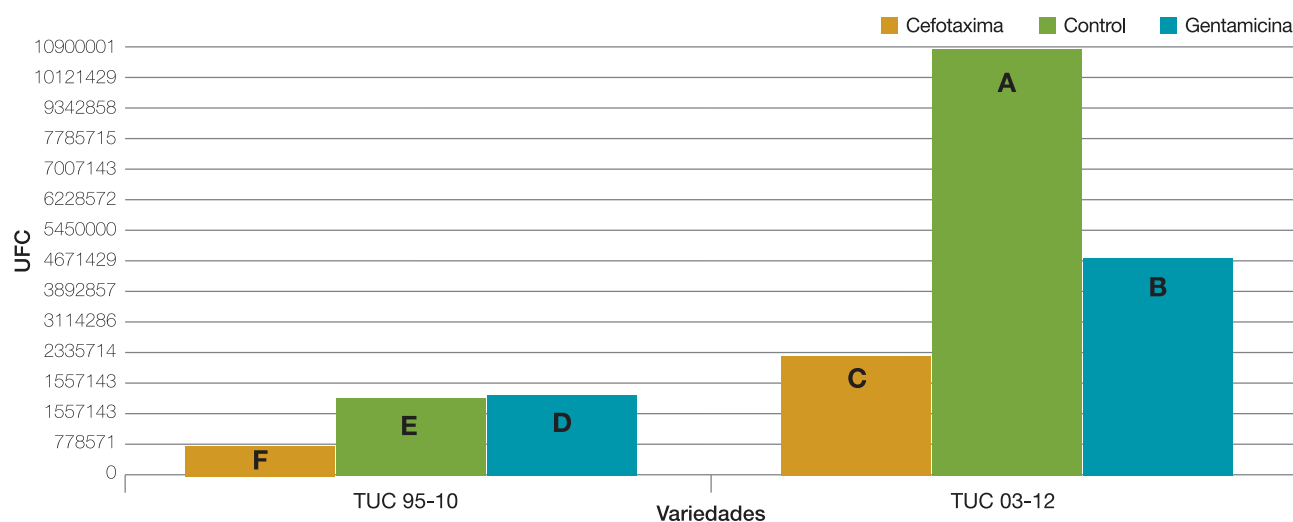


Figura 5. Unidades formadoras de colonias en TUC 95-10 y TUC 03-12 para los diferentes tratamientos.

mientos, lo que podría explicar su menor tasa de multiplicación bajo la aplicación de gentamicina.

Cuando los fragmentos de la región 16S DNAr fueron amplificados, purificados y secuenciados, se identificaron bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Microbacterium*. Ambos géneros están ampliamente distribuidos y reconocidos como endofíticos, además *Microbacterium* spp. es reconocida como fijadora de N₂ en plantas micropropagadas de caña de azúcar.

CONCLUSIONES

El uso de cefotaxima fue más efectivo en el control de contaminación bacteriana en las dos variedades de caña de azúcar cultivadas in vitro, sin afectar la tasa de multiplicación. El uso rutinario de gentamicina no solo falló en el control de la contaminación bacteriana, sino que

incrementó la aparición de alteraciones morfológicas.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Díaz, M. E.; N. V. Paz; M. P. Insaurralde Rocco; M. F. Perera; A. P. Castagnaro and A. S. Noguera. 2019. The sugarcane Vitroplantas project of the Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC, Tucumán, Argentina): production of healthy plantlets in the laboratory. Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists 30: 621-625.
- Herman, E. B. 1987. Towards control of micropropagation contamination. Agricell Report 9: 33-3
- Pérez Ponce, J. N. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas: Santa Clara.