



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas

**Control de bacterias presentes en los cultivos in vitro
del germoplasma de camote (*Ipomoea batatas* (L.)
Lam.)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en
Biología Celular y Genética

AUTOR

Carmen Rosa MAZA CÓRDOVA

ASESOR

Mg. Jorge LEÓN QUISPE

Lima, Perú

2006



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Maza, C. (2006). *Control de bacterias presentes en los cultivos in vitro del germoplasma de camote (Ipomoea batatas (L.) Lam.)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

***A Dios nuestro Señor por todas
las oportunidades que me ha
brindado, por su amor y por todo
lo que soy.***

***A mis padres y hermanos quienes
con su amor, paciencia y apoyo
han permitido conseguir mis
metas.***

***Al Ing. Santos Maza, mi padre, por
sus consejos, guía y apoyo en
todo momento de mi vida.***

***A mi madre por su amor
incondicional, aliento y confianza
en todo lo que hago.***

***A Julio, mi compañero y amigo
quien me ha apoyado y ha dado
fuerzas para seguir adelante.***

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su amor, apoyo, ayuda y paciencia en la espera del Título Profesional.

Al Centro Internacional de la Papa por la oportunidad y el financiamiento brindado el cual me permitió realizar y culminar este proyecto de tesis.

Al Dr. William Roca por permitirme desarrollar esta tesis, por sus consejos y guía durante todo este tiempo.

A mi Profesor Asesor Mg. Jorge León por sus consejos, orientación, apoyo en la parte experimental de esta tesis y por las correcciones hechas para culminarla satisfactoriamente.

A los miembros del Jurado, Mg. Susana Gutierrez, Mg. Domingo Iparraguirre y Mg. Debora Alvarado por las correcciones hechas a este trabajo.

A la Bióloga Ana Panta por su paciencia y orientación que me brindó para terminar satisfactoriamente este proyecto de tesis y por las correcciones hechas a este trabajo.

Al Dr. Felipe De Mendiburu por su apoyo en el análisis estadístico de esta tesis.

A todos los miembros del Laboratorio de Bacteriología del Centro Internacional de la Papa: Dra. Ames, Dra. Silvie Priu, Ing. Liliam Gutarra, Sras. Julia y Evita, Sr. Fernando y a las tesistas Pilar y María por los consejos, materiales y ayuda brindada durante el trabajo práctico de la tesis.

A todos los miembros de la División de Caracterización y Conservación de los Recursos Genéticos: Ing. Salas, Ing. Vargas, a la Sra. Mariana Martin y en especial a todos los miembros y amigos del Laboratorio de Cultivo de Tejidos *in vitro* del CIP: Catherine Espinoza, Miguel, Carla Bocanegra, Gianina Norberto, Henry Arteaga, Juan Cruzado, Martín Ramos, Alberto Inga, Olegario y Henry Robles; Sras. Rosalva, Sandra y Marlene; Sres. Nestor Bendezú, Julio Cañiñaupa, Eric Curasi, Mario Cruz, Eugenio y Leonardo por su orientación, colaboración y por compartir sus experiencias conmigo.

A la Dra. Maurtua de la Universidad Particular Peruana Cayetano Heredia por su orientación en el planteamiento del proyecto de tesis y por sus consejos que me permitieron desarrollar la parte práctica de esta tesis.

A los Biólogos, compañeros de clases y amigos míos Julio Reyes Chávez, Alfredo Rebaza Caballero, Onofre Lozano Rodas, Julián López Pacheco y Milagros Ponce por su motivación y por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias que me permitieron emprender, continuar y culminar este trabajo.

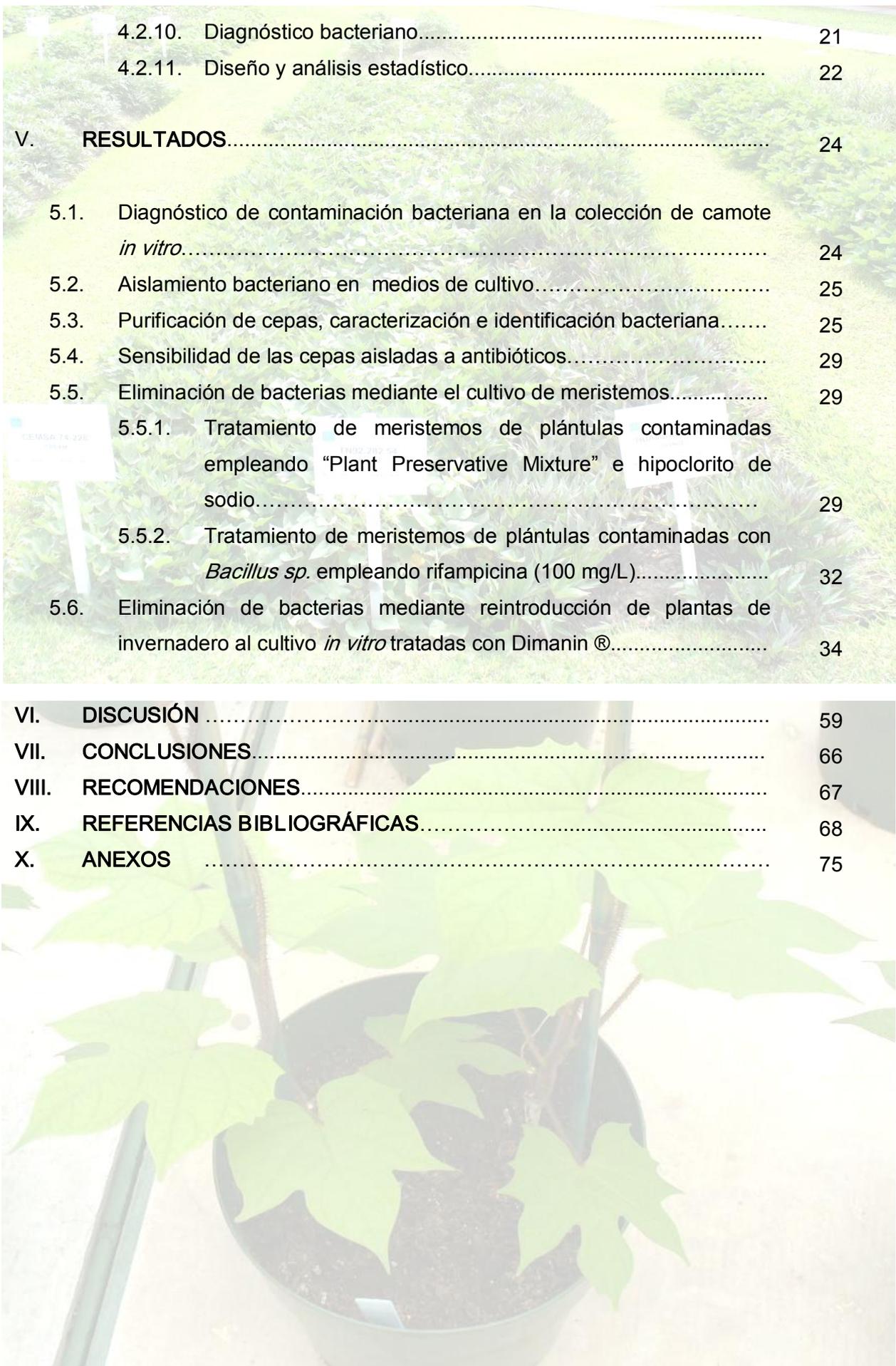
A mis profesores el Mg. Fernando Retuerto y la Blga. Elena Arbaiza Prado por su invaluable ayuda y apoyo.

A todos mis amigos Biólogos: Yojana Quiroz, María Vargas, Alicia Rosas, María Rivera, Nadia Vera, Cecilia Ynouye, Edisson Pascual y a quienes no menciono pero sin duda les debo mi agradecimiento y los llevo en mi corazón.

A todos MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE

	PAG
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.....	5
III. ANTECEDENTES.....	6
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
4.1. MATERIAL.....	12
4.1.1. Material biológico.....	12
4.2. MÉTODOS.....	12
4.2.1. Diagnóstico de contaminación bacteriana en la colección de camote <i>in vitro</i>	12
4.2.2. Aislamiento bacteriano.....	12
4.2.3. Purificación de cepas.....	14
4.2.4. Caracterización bacteriana.....	14
4.2.5. Identificación bacteriana.....	15
4.2.6. Sensibilidad a antibióticos.....	17
4.2.7. Micropropagación del material biológico.....	18
4.2.8. Tratamientos para la eliminación de bacterias de plántulas contaminadas mediante el cultivo de meristemos.....	18
4.2.8.1. Tratamiento de meristemos contaminados con bacterias empleando soluciones desinfectantes: Plant Preservative Mixture (PPM) e hipoclorito de sodio (lejía Clorox®).....	19
4.2.8.2. Tratamiento de meristemos contaminados con <i>Bacillus sp.</i> empleando rifampicina (100 mg/L).....	20
4.2.9. Tratamiento de plántulas contaminadas con bacterias mediante reintroducción a cultivo <i>in vitro</i> de plántulas transferidas y desarrolladas en invernadero.....	21



4.2.10.	Diagnóstico bacteriano.....	21
4.2.11.	Diseño y análisis estadístico.....	22
V.	RESULTADOS.....	24
5.1.	Diagnóstico de contaminación bacteriana en la colección de camote <i>in vitro</i>	24
5.2.	Aislamiento bacteriano en medios de cultivo.....	25
5.3.	Purificación de cepas, caracterización e identificación bacteriana.....	25
5.4.	Sensibilidad de las cepas aisladas a antibióticos.....	29
5.5.	Eliminación de bacterias mediante el cultivo de meristemos.....	29
5.5.1.	Tratamiento de meristemos de plántulas contaminadas empleando “Plant Preservative Mixture” e hipoclorito de sodio.....	29
5.5.2.	Tratamiento de meristemos de plántulas contaminadas con <i>Bacillus sp.</i> empleando rifampicina (100 mg/L).....	32
5.6.	Eliminación de bacterias mediante reintroducción de plantas de invernadero al cultivo <i>in vitro</i> tratadas con Dimanin ®.....	34
VI.	DISCUSIÓN	59
VII.	CONCLUSIONES.....	66
VIII.	RECOMENDACIONES.....	67
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
X.	ANEXOS	75

RESUMEN

La conservación *in vitro* de los recursos fitogenéticos implica entre otras actividades mantener los cultivos en estado de pureza y asegurar de esta manera la disponibilidad del germoplasma libre de microorganismos. En el Banco de Germoplasma del Centro Internacional de la Papa (CIP) en los cultivos de *Ipomoea batatas* “camote”, se han presentado casos de contaminantes bacterianos, los cuales ponen en peligro su conservación. Se desarrolló un estudio orientado a caracterizar, identificar y controlar a estas bacterias; para ello, se diagnosticó la contaminación microbiana en los cultivos de “camote” mediante la observación directa de signos de crecimiento bacteriano. De un total de 3545 entradas de la colección *in vitro* de *Ipomoea batatas* se encontraron 130 (3,7%) entradas sospechosas de contaminación, de las cuales se tomaron solamente 76 entradas para realizar el aislamiento bacteriano; encontrándose 61 entradas positivas. De los aislamientos se caracterizaron culturalmente 84 cepas de bacterias correspondientes a 45 entradas, habiéndose identificado al género *Bacillus sp.* (90,5%) como el principal causante de contaminación. Asimismo, empleando pruebas estandarizadas del API System Biomerieux®-France se logró identificar como otros contaminantes las especies de *Bacillus pumilus*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Sphingomonas paucimobilis*. Para lograr cultivos de camote libre de bacterias se realizó el cultivo de meristemas tratados con desinfectantes, siendo el hipoclorito de sodio (2,5%) el que permitió obtener un mayor porcentaje (97%) de meristemas sobrevivientes sin contaminantes bacterianos. Por otro lado, la mayor parte de los meristemas desinfectados y/o cultivados con Plant Preservative Mixture (PPM™) al 5% y/o 0,1% respectivamente, no lograron sobrevivir ni tampoco recuperarse. El tratamiento con rifampicina (100 mg/L) por 30 días, permitió obtener cultivos libres de *Bacillus sp.* cuando este se aplicó en meristemas de 0,5-0,8 mm de tamaño, resultando 62% de meristemas libres de bacterias del 100% de meristemas sobrevivientes. Asimismo, el cultivo de plántulas *in vitro* en el invernadero mas el tratamiento con una solución de 0,5 mL/L de cloruro de bencil-dimetil-alquil amonio (Dimanin®) reveló una mayor eficacia (100%) en la sobrevivencia y recuperación de plantas libre de contaminantes bacterianos. Se concluye, que entre los diversos tratamientos aplicados en este estudio en el control de contaminantes bacterianos del germoplasma de *Ipomoea batatas*, el método de la reintroducción *in vitro* es el mas eficiente, permitiendo recuperar el 100% de las plántulas sobrevivientes sometidas a tratamientos.

ABSTRACT

The *in vitro* conservation of the phylogenetic resources implies among other activities to maintain the cultures in state of purity and to assure this way the readiness of the germoplasm free of microorganisms. In the Germoplasm Bank of the International Potato Center (CIP) in the *Ipomoea batatas* "sweetpotato" cultures, cases of bacterial contaminants have been presented, which put in danger their conservation. A study was developed guided to characterize, to identify and to control these bacteria; for it, the microbial contamination was diagnosed in the "sweetpotato" cultures by means of the direct observation of signs of bacterial growth. Of a total of 3545 accessions of the *in vitro* collection of *Ipomoea batatas* were 130 (3,7%) accessions suspects of contamination, of which took only 76 accessions to carry out the bacterial isolation; being 61 accessions positive. Of the isolations they were characterized 84 strains of bacteria corresponding to 45 accessions culturally, there being identified to the genus *Bacillus sp.* (90,5%) as the main one causing of contamination. Also, using standardized tests of the API System Biomerieux®-France was possible to identify as other contaminants the species of *Bacillus pumilus*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Sphingomonas paucimobilis*. To achieve "sweetpotato" cultures free of bacteria it was carried out the meristem culture treated with disinfectant, being the sodium hypochlorite (2,5%) the one that allowed to obtain a bigger percentage (97%) of survivors meristems without bacterial contaminants. On the other hand, most of the meristems disinfected and/or cultivated with Plant Preservative Mixture (PPM™) to 5% and/or 0,1% respectively, they were not able to survive neither to recover. The treatment with rifampicina (100 mg/L) for 30 days, it allowed to obtain cultures free of *Bacillus sp.* when this it was applied in meristems of 0,5-0,8 mm of size, being 62% meristems free of bacteria of 100% of meristems survivors. Also, the culture of *in vitro* plantlets in the greenhouse and the treatment with a solution of 0,5 mL/L of chloride of bencil-dimetil-alquil ammonium (Dimanin®) revealed a bigger effectiveness (100%) in the survival and recovery of plants free of bacterial contaminants. It is possible to conclude that among the diverse treatments applied in this study in the control of bacterial contaminants from the *Ipomoea batatas* germoplasm, the method of the reintroduction *in vitro* is the most efficient, allowing to recover 100% from the plantlets subjected survivors to treatments.

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
Tabla 1.	Rango de sensibilidad bacteriana a antibióticos para interpretación del antibiograma (según NCCLS, 1997).	17
Tabla 2.	Tratamientos aplicados en ensayos para la eliminación de bacterias en clones de camote <i>in vitro</i> empleando soluciones desinfectantes.	19
Tabla 3.	Tratamientos aplicados en ensayos para la eliminación de <i>Bacillus sp.</i> en clones de camote <i>in vitro</i> empleando rifampicina (100 mg/L)	20
Tabla 4.	Signos bacterianos en plántulas de 76 entradas de camote <i>in vitro</i> conservadas en el Banco de Germoplasma del CIP.	36
Tabla 5.	Aislamiento bacteriano de 61 entradas de camote <i>in vitro</i>	39
Tabla 6.	Procedencia de las cepas bacterianas aisladas de 5 diferentes medios de cultivo.	41
Tabla 7.	Frecuencia de 84 cepas bacterianas procedentes de 45 entradas de camote.	41
Tabla 8.	Identificación de bacterias aisladas de 61 entradas de camote <i>in vitro</i> .	42
Tabla 9.	Caracterización de colonias de 84 cepas aisladas de plántulas <i>in vitro</i> .	43
Tabla 10.	Características culturales en medio TSA y principales características bioquímicas de 4 cepas de <i>Bacillus sp.</i> procedentes de entradas incluidas en los ensayos de eliminación de bacterias.	46
Tabla 11.	Características culturales en medio TSA de 4 cepas de <i>Bacillus sp.</i> identificadas según el Sistema API.	47
Tabla 12.	Características culturales en medio TSA y principales características bioquímicas de 2 cocos Gram positivos no identificadas.	48
Tabla 13.	Características culturales y bioquímicas de una cepa de bacilos no esporulados Gram positivos no identificada.	49

Tabla 14.	Características culturales en medio TSA y principales características bioquímicas de <i>Stenotrophomonas maltophila</i> (cepa N° 3) y <i>sphingomona paucimobilis</i> (cepa N° 4) identificada según el Sistema API.	50
Tabla 15.	Características culturales de una cepa de actinomiceto aislado de una entrada de camote.	51
Tabla 16.	Cepas bacterianas identificadas en plántulas de camote <i>in vitro</i> empleando la prueba de identificación rápida del Sistema API.	52
Tabla 17.	Sensibilidad a 14 antibióticos de 11 cepas de <i>Bacillus sp.</i> 1 cepa de bacilos Gram (+) y 2 cepas de cocos Gram (+) no esporulados, según NCCLS (1997).	53
Tabla 18.	Sensibilidad a antibióticos de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> y <i>Sphingomonas paucimobilis</i> .	53
Tabla 19.	Entradas ensayadas en los tratamientos de eliminación de bacterias.	54
Tabla 20.	Eliminación de bacterias mediante el cultivo de meristemos de plántulas tratadas con desinfectante aplicando 3 tratamientos.	55
Tabla 21.	Eliminación de bacterias mediante el cultivo de meristemos procedentes de plántulas de camote <i>in vitro</i> contaminada con <i>Bacillus sp.</i> tratados con una solución de rifampicina (100 mg/L) incorporada en medio de cultivo de meristemos durante 15 ó 30 días.	57
Tabla 22.	Eliminación de bacterias mediante la reintroducción <i>in vitro</i> de plantas tratadas en invernadero derivadas de plántulas de camote <i>in vitro</i> contaminadas.	58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
Figura 1.	Procesamiento de las muestras vegetales mediante la maceración de secciones representativas del tejido vegetal (tejido caulinar, foliar y radicular) mas muestras del medio de cultivo.	13
Figura 2.	Diagrama de flujo para la caracterización e identificación bacteriana.	16
Figura 3.	Esquema de procedimientos para la eliminación de la contaminación bacteriana mediante la reintroducción <i>in vitro</i> de plantas de camote tratadas con Dimanin®.	23
Figura 4.	Esquema de diagnóstico bacteriano de meristemas de camote de aproximadamente 2 meses de cultivo.	23
Figura 5.	Signos bacterianos.	24
Figura 6.	Cepas de <i>Bacillus sp.</i> de 24 h de cultivo en medio Agar Tripticasa Soya (TSA).	26
Figura 7.	Esporulación de <i>Bacillus sp.</i>	26
Figura 8.	Cepas se <i>Bacillus pumilus</i> de 24 h de cultivo en medio Agar Tripticasa Soya (TSA).	27
Figura 9.	Cepas de bacilos y cocos Gram positivos no esporulados.	27
Figura 10.	Eliminación de bacterias en cultivos de camote mediante cultivo de meristemas de explantes tratados con PPM e hipoclorito de sodio.	31
Figura 11.	Plántulas recuperadas libres de bacterias a partir del cultivo de meristemas.	31
Figura 12.	Eliminación de <i>Bacillus sp.</i> de cultivos de camote mediante el cultivo de meristemas en combinación con aplicación de rifampicina (100 mg/L).	33
Figura 13	Porcentaje de clones de camote libres de bacterias obtenidos mediante reintroducción <i>in vitro</i> de plantas tratadas con Dimanin®.	35

I. INTRODUCCIÓN

El camote o batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) es una planta tropical y el quinto cultivo en importancia a nivel mundial (FAOSTAT, 2001), por su alto valor energético, contenido en carbohidratos, vitaminas y su alta capacidad de producción (Clarck & Moyer, 1991).

Una de las formas actuales de conservación *ex-situ* del germoplasma es mediante el cultivo de tejidos *in vitro*, donde se conservan genotipos muy específicos. El término “germoplasma” de una especie vegetal según Sevilla & Holle (2004) incluye a cultivares nativos de la especie, cultivares mejorados, poblaciones en proceso de mejoramiento, especies silvestres relacionadas y especies cultivadas relacionadas. La conservación del germoplasma se hace con el objetivo de garantizar la disponibilidad del recurso cuando se le necesite y para mantener la diversidad y variabilidad genética de éste con fines de mejoramiento. Una colección de germoplasma se hace para conservar la diversidad de una especie, para evitar su pérdida por erosión genética y la búsqueda de nuevas formas. Un banco de germoplasma es el lugar físico de conservación *in vitro* donde una “entrada” o “accesión” es una unidad de conservación de una muestra de semilla o de cualquier órgano reproductivo que se identifica con un número o código que lo distingue del resto del germoplasma, lo cual significa que “accesa” a un banco de germoplasma (Sevilla & Holle, 2004).

El germoplasma de camote puede ser introducido a cultivo *in vitro* bajo la forma de esquejes uni o bi-nodales, cuyo cultivo se basa en el desarrollo de una estructura morfológica propagativa ya existente, el meristema de la yema axilar; siendo las condiciones del medio de cultivo favorables se induce la ruptura del reposo de la yema axilar y se promueve su rápido desarrollo en plántula (Lizárraga *et al.*, 1990). En el Centro Internacional de la Papa (CIP) se mantiene y conserva la colección del germoplasma de camote más grande del mundo, donde se tienen aproximadamente 4,923 entradas *in vitro* de *Ipomoea batatas* (L.) (CIP, 2004)

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, son empleadas ampliamente para la conservación de colecciones núcleo, y para lograr la eliminación de patógenos (Ashmore, 1997 citado por Isenegger *et al.*, 1997). Además existen dos razones principales para conservar asépticamente estos cultivos: primero se ha comprobado en muchos cultivos que los patógenos pueden reducir significativamente el

rendimiento y la calidad comerciable del producto; en segundo lugar, si el material vegetal va a ser distribuido internacionalmente, las disposiciones de cuarentena exigen que el material no sea portador de patógenos (Dodds *et al.*, 1991).

Así, el manejo del germoplasma vegetal mediante el cultivo de tejidos *in vitro* se hace siguiendo principios microbiológicos, los cuales nos permiten conservar los recursos genéticos de una manera eficiente. Por consiguiente el manejo del germoplasma en los laboratorios de cultivos de tejidos debe de ser muy cuidadoso y evitar la contaminación con microorganismos indeseables. Se debe de tener en cuenta que la mayoría de los patógenos son capaces de diseminarse sistémicamente a través de toda la planta. Más aún, el tejido vegetativo que se usa para la propagación, sea éste originario de raíces o de tallos, proporciona un casi perfecto vehículo para perpetuar los patógenos durante su desarrollo *in vitro* (Lizárraga *et al.*, 1991). Por otro lado, el manejo del germoplasma incluye el monitoreo y la detección temprana de microorganismos para evitar que lleguen a contaminar los cultivos *in vitro* (Leifert & Cassells, 2001).

Los microorganismos menos deseables del germoplasma vegetal son los hongos miceliales. A pesar que la mayoría de estos organismos no representan mayor problema por detectarse rápida y fácilmente, sin embargo merman el rendimiento exitoso de los cultivos (Kunneman & Faaij-Groenen, 1988).

Usualmente, las plántulas en cultivo *in vitro* pueden estar predisuestas a una infección directa con microorganismos, incluso con bacterias normalmente no patogénicas. El medio de cultivo de plantas puede contener diferentes nutrientes para las bacterias, ya sean los constituyentes originales del medio o exudados celulares. Patógenos endófitos, epífitos o contaminantes incidentales pueden ocurrir en los cultivos *in vitro*, y pueden interferir con el crecimiento del tejido vegetal en este tipo de condiciones (Bradbury, 1988).

Uno de los problemas en la conservación del germoplasma vegetal *in vitro* lo constituyen las bacterias, ello ocurre como consecuencia de su continua manipulación tras cada renovación o multiplicación, donde bacterias endófitas obligadas y/o endófitas facultativas-inducidas son diseminadas a causa de malas prácticas de asepsia o por falta de un diagnóstico oportuno. Otra causa para que ocurra este problema puede ser resultado de un proceso ineficiente de desinfección inicial de los

explantos introducidos *in vitro*, donde posiblemente sobreviven bacterias de origen endófito ya sean obligadas o facultativas-constitutivas (Gunson & Spencer, 1994). Es sabido que la mayoría de laboratorios de cultivo de tejidos vegetales comerciales tienen grandes pérdidas económicas a causa de este problema (Leifert & Woodward, 1998).

Una de las alternativas para salvaguardar el germoplasma vegetal es tratarlo con sustancias antimicrobianas, pues de lo contrario se puede perder. Sin embargo, el tratamiento de las plántulas de camotes con antibióticos *in vitro* ha sido considerado no recomendable debido a que causa resistencia en las bacterias y toxicidad en las plantas (Egúsqüiza, 1996).

Otro método alternativo de solución frente a este problema es el uso de la solución Plant Preservative Mixture (PPM™) de la firma Plant Cell Technology (Inc.) como desinfectante o como parte de los componentes del medio de cultivo *in vitro* de plántulas.

En el Banco de Germoplasma de camote *in vitro* del Centro Internacional de la Papa se han reportado casos de contaminación bacteriana de tipo sistémica que afectan el desarrollo normal de las plantas (Egúsqüiza, 1996; Maza *et al*, 2004). Este problema de contaminación bacteriana muchas veces afecta entradas o accesiones de camote que no pueden recuperarse. Para enfrentar este problema, el CIP ha estado empleando antibióticos como la cefotaxima y la rifampicina, los cuales a la fecha no han tenido éxito total y en la mayoría de los casos han servido para controlar el crecimiento microbiano, pero no eliminar y a la vez mantener viables las plantas afectadas; también se ha aplicado cultivo de meristemos y el método de la reintroducción *in vitro* de plantas tratadas con Dimanin® (0,5 mL/L) con aparentes resultados positivos.

Debido a que la conservación de los recursos fitogenéticos tiene la finalidad de asegurar la disponibilidad del germoplasma a corto, mediano y largo plazo ya sea para ser distribuido internacionalmente, para mejorarlo o como fuente de alimento, es necesario ensayar métodos rápidos y eficientes que logren que este germoplasma se conserve y se mantenga libre de microorganismos.

El presente trabajo de investigación está orientado a caracterizar e identificar las bacterias que frecuentemente contaminan los cultivos *in vitro* de camote y a su vez evaluar métodos de eliminación mediante técnicas de cultivo de meristemas en combinación con la aplicación de desinfectantes y antibióticos, y la reintroducción *in vitro* a partir de plantas transferidas a suelo y desarrolladas en invernadero.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

- Diagnosticar y controlar las bacterias presentes en cultivares de camote conservados *in vitro* en el Banco de Germoplasma mantenido por el Centro Internacional de la Papa (CIP).

2.2. Objetivos específicos.

- Aislar y caracterizar las bacterias cultivables detectadas en cultivos *in vitro* de camote.
- Determinar la sensibilidad a antibióticos de las bacterias aisladas de cultivos *in vitro* de camote.
- Evaluar métodos para la eliminación de bacterias presentes en cultivos *in vitro* de camote mediante el cultivo de meristemas tratados con el desinfectante PPM™ (una mezcla de dos isotiazolonas-metilcloroisotiazolinona y metilisotiazolinona) e hipoclorito de sodio y la sustancia antimicrobiana rifampicina.
- Evaluar métodos para la eliminación de bacterias presentes en cultivos *in vitro* de camote mediante el cultivo en invernadero y su posterior reintroducción a cultivo *in vitro* en combinación con una solución desinfectante de cloruro de bencil-dimetil-alquil amonio (Dimanin®).

III. ANTECEDENTES

Según el sistema de clasificación de 1981 (Cronquist, 1995) del botánico Arthur Cronquist, el camote es una Angiosperma (Magnoliophyta) de la Clase Magnoliatae, Subclase Asteridae, Orden Polemoniales (Cronquist, 2005). El camote pertenece a la Familia Convolvulaceae, Género *Ipomoea*, Especie ***Ipomoea batatas*** (L.) Lam. (Austin, 1988 y 1997).

El camote o batata es una planta hexaploide ($2n=30$) y bajo las mejores circunstancias, sólo produce un escaso conjunto de semillas viables. Muchos genotipos no florecen con facilidad o no lo hacen del todo. Algunos genotipos son estériles porque producen polen defectuoso (Clarck & Moyer, 1991). Es una planta perenne que se propaga vegetativamente y se cultiva como planta anual, nativa de los trópicos húmedos. El camote es uno de los cultivos más importantes del mundo por ser un alimento altamente energético, con un contenido de 25 a 30% de carbohidratos, y es además una excelente fuente de los carotenoides de la provitamina A; pero como otras raíces amiláceas y tubérculos, tiene un contenido relativamente bajo de proteína que varía dependiendo del genotipo. El camote también es fuente de vitamina C, potasio, hierro y calcio. El contenido de aminoácidos está relativamente bien balanceado con un mayor porcentaje de lisina que el arroz o el trigo, pero con contenido algo limitado de leucina. Es así, que una combinación de legumbres y batatas puede combatir la malnutrición proteína-caloría en algunas áreas. Los usos del camote incluyen el consumo de las raíces frescas o de las hojas procesadas como forraje, almidón, harina, caramelos y alcohol (Clarck & Moyer, 1991).

En el campo, el camote está expuesto al ataque de una gran variedad de plagas entre ellas las bacterias, hongos y en especial los virus. Entre las enfermedades del camote de origen bacteriano están la “pudrición” originada por *Streptomyces ipomoea*, la “pudrición bacteriana del tallo y la raíz” por *Erwinia chrysanthemi*, la “marchitez bacteriana” por *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas batatae*, *Xanthomonas batatas* y *Bacillus kwangsinensis*; y la enfermedad conocida como “escoba de brujas”, “hoja pequeña o ishuku-byo” producida por micoplasmas (Clarck & Moyer, 1991).

En 1985, se inició el establecimiento del Banco de Germoplasma mantenido por el Centro Internacional de la Papa (CIP). Este Banco incluye colecciones de entradas o accesiones silvestres, cultivares y líneas de mejoramiento procedentes de Perú y de

otros países. En sus inicios, por razones cuarentenarias, las entradas del Perú crecieron en campo, mientras que las entradas de otros países se mantuvieron en invernadero o fueron transferidas a *in vitro*. La colección *in vitro* de germoplasma de camote se ha logrado mediante la introducción a cultivo *in vitro* de materiales previamente mantenidos *in vivo* y mediante la transferencia o donaciones de entradas *in vitro* de otros países (CIP, 1988; CIP, 1990). Actualmente se mantiene y conserva la colección más grande del mundo, donde se tienen 4,923 entradas *in vitro* de *Ipomoea batatas* (CIP, 2004).

En los laboratorios de cultivo de tejidos *in vitro*, el germoplasma vegetal debe estar libre de cualquier microorganismo. Esto no siempre ocurre con las bacterias y los daños que pueden causar en las plantas pueden ser localizados o sistémicos (Leifert & Cassells, 2001), reduciendo la tasa de multiplicación y enraizamiento y llegando a causar la muerte (Reed & Tanprasert, 1995; Leifert & Woodward, 1998). Por otro lado, todo material vegetal que es llevado a cultivo *in vitro* previamente debe ser sometido a un proceso de desinfección para eliminar los microorganismos contaminantes (Lizárraga *et al.*, 1990). Para el camote el método de introducción a cultivo *in vitro* consiste en la toma de esquejes uninodales de tallo procedentes de plantas jóvenes y saludables, preferentemente de invernadero; las plantas a introducir no deben tener síntomas producidos por hongos, bacterias, virus o viroides; los esquejes de tallo se someten a un proceso de limpieza y desinfección inicial mediante el empleo de acaricidas-fungicidas y desinfectantes.

En el tratamiento para eliminación de contaminantes externos, en el CIP, se emplea hipoclorito de sodio al 2,25% (Lizárraga *et al.*, 1990) a diferencia de otros trabajos donde se reporta el uso de hipoclorito de sodio al 5,25% por 20 min, también para camote (Zamora & Gruezo, 1993). Es necesario saber que este proceso no garantiza la asepsia del explante, aunque ha tenido alta eficiencia en grandes colecciones (Lizárraga, 1990; Espinoza *et al.*, 1992), es posible encontrar cierta carga microbiana presente en la superficie vegetal porque es resistente o quizás por su establecimiento en el tejido interno vegetal ya que es un ambiente rico en nutrientes para estos microorganismos (Leifert & Cassells, 2001).

Luego del proceso de introducción, el manejo del germoplasma vegetal, implica propagar sólo plántulas libres de contaminación microbiana y el material afectado por bacterias u hongos se descarta. Una vez establecidas *in vitro* las plántulas son

renovadas aproximadamente luego de 4-6 meses en el caso del camote mediante una nueva micropropagación. La distribución internacional del germoplasma de camote requiere el uso de material clonal en condiciones libre de patógenos para cumplir con las regulaciones cuarentenarias. Para garantizar esto, especialmente en el caso de presencia de virus, una combinación de termoterapia de plantas y cultivo de meristemas se aplica para obtener plántulas libres de patógenos (Golmirzaie & Panta, 1997). En el caso de detectar la presencia de bacterias en plántulas *in vitro* de entradas que han sido conservadas por períodos largos de tiempo y no pueden volver a colectarse o recuperarse mediante una nueva introducción, se les trata con antibiótico (Egúsquiza, 1996; Toledo *et al.*, 1998).

En el CIP, las entradas de camote son agrupadas para su manejo según su estado sanitario. Cuando las plántulas de una entrada no presentan ningún tipo de signo visible de contaminación bacteriana u fúngica se le agrupa en un estatus sanitario "0". Una vez realizadas las pruebas de diagnóstico de virus y de bacterias, si los resultados son negativos para los virus de interés cuarentenario para Perú las entradas son agrupadas en un estatus sanitario superior "1" y están disponibles para distribución nacional, y cuando las entradas han sido determinadas como libres de todos los patógenos reportados, su estado sanitario es "2" y están disponibles para distribución internacional. El diagnóstico de virus se hace en plántulas libres de bacterias y hongos. Cabe señalar que el diagnóstico de bacterias se hace empleando medios bacteriológicos y los de virus empleando pruebas serológicas, moleculares y mediante injerto en plantas indicadoras. Actualmente, en el CIP se está realizando el diagnóstico de bacterias inmediatamente después del establecimiento *in vitro* de plántulas introducidas.

Las bacterias que pueden contaminar los cultivos de tejidos vegetales *in vitro* corresponden a las especies de *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus circulans*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Erwinia carotovora*, *Micrococcus kristinae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia plymuthica*, *Klebsiella oxytoca*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Alcaligenes denitrificans*, *Acinetobacter calcoaceticus iwoffii*, *Acinetobacter calcoaceticus anitratus* y *Agrobacterium radiobacter* (Leifert *et al.*, 1989). Egúsquiza en 1996 evaluó un grupo de plantas de camote *in vitro* (mantenidas en el Banco de Germoplasma del CIP) con signos de infección bacteriana de tipo

sistémica, logrando aislar e identificar a *Pseudomonas cepacia*, *Erwinia herbicola* y *Bacillus circulans*.

La detección temprana de estos contaminantes puede resultar difícil pero la inspección visual directa en la base de la planta puede proveer evidencia de algún signo de crecimiento microbiano. Algunos signos de contaminación son muy evidentes y otros son difíciles de detectar sobre todo cuando se trata de bacterias que se encuentran latentes o bacterias de crecimiento retardado como bacterias endófitas o bacterias que no se expresan aunque estén presentes en la planta y sólo se manifiestan hasta que las condiciones ambientales y nutritivas cambian. La dificultad en detectar visualmente signos de contaminación bacteriana radica también en la permanencia de las bacterias en el tejido vegetal posiblemente en las uniones celulares o en los espacios intercelulares del parénquima cortical (Reed & Tanprasert, 1995). La mayoría de los contaminantes pueden ser detectados agregándole peptona (265 mg/L) y extracto de levadura (88 mg/L) al medio de propagación (Boxus & Terzi, 1988). Otra alternativa es cultivar porciones de plántulas en medios bacteriológicos como el Agar Extracto de Levadura con Glucosa, Agar Sabouraud Glucosado y Caldo AC incubados por tres semanas a 30 °C (Kane, 1995). El caldo nutritivo con sucrosa al 5% permite evidenciar mejor el desarrollo microbiano (Leggat & Waites, 1988).

Una forma de conservar el germoplasma de camote libre de contaminantes bacterianos y patógenos es aplicando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, como la de cultivo de ápices y de meristemos o la reintroducción *in vitro* o el empleo de sustancias antimicrobianas. En banano el empleo de rifampicina a 100 mg/L en combinación con el cultivo de ápices logra eliminar a *Bacillus sp.* sin afectar el crecimiento de la planta y a su vez el cultivo de meristemos de 1 mm de tamaño a partir de plántulas contaminadas ha tenido éxito para eliminar a *Bacillus sp.* (Van Den Houwe & Swennen, 2000). Éste método requiere de mucha habilidad y puede ser complementado con la desinfección inicial de los meristemos a cultivar (Tahmatsidou & Cassells, 1997). El cultivo de ápices se está aplicando para conseguir la eliminación de los patógenos. Esta técnica implica manipular al explante en condiciones asépticas evitando incorporar alguna otra carga microbiana. Al cultivar meristemos se logra una eliminación ciertamente efectiva de los virus y otros microorganismos restringidos al sistema vascular de la planta pero existe aún la posibilidad de la presencia de bacterias en los meristemos (Cassells & Tahmatsidou, 1996).

Plant Preservative Mixture (PPMTM) (patente N° 5,750,402; Plant Cell Technology, Washington, D.C.) contiene una mezcla de dos isotiazolonas-metilcloroisotiazolinona y metilisotiazolinona, las cuales son una clase de biocida de amplio espectro, usado ampliamente en la industria y previene la formación de esporas. La empresa reporta que las isotiazolonas usadas en PPM no son fitotóxicas a concentraciones 0,5-1,0 mL/L disponibles para el control profiláctico de contaminantes microbianos en el cultivo de tejidos vegetales. Además recomiendan que en caso de la contaminación endógena, los explantes de 1 cm (o más pequeños deben ser agitados por 4-12 h en una solución de PPM a 4-5% V/V y suplementado con sales de Murashigue-Skoog sin medir la acidez. Inmediatamente sin enjuagar, se insertan en un medio suplementado con 0,05-0,1% (V/V) de PPM para plantas herbáceas. Otros mencionan que las isotiazolonas son ampliamente clasificadas como electrófilas y que reaccionan con la cisteína y glutatióna (Chapman & Dile, 1995 y Collier *et al.*, 1990; citado por Niedz, 1998). La efectividad del PPM ha sido ensayada por otros investigadores. Niedz (1998) encontró que PPM puede agregarse rutinariamente al medio de cultivo de tejidos vegetales para controlar de manera efectiva contaminantes ambientales como hongos y bacterias en bajas densidades y sugiere que, como el PPM puede ser autoclavado con el medio, es mejor usarlo como un agente preventivo en el medio de cultivo para controlar bajos niveles de contaminación (Niedz, 1998). PPM se ha empleado para prevenir la contaminación ambiental en cultivos *in vitro*, como suplemento del medio de cultivo al 0,2% (V/V) antes de autoclavarlo (Babaoglu & Yorgancilar, 2000). También se ha empleado en cultivos *in vitro* de caña de azúcar donde se ensayó el efecto bactericida del PPM y a su vez su efecto fitotóxico (Digonzelli *et al.*, 2005).

Los antibióticos se clasifican de acuerdo a su estructura química en: antibióticos que contienen carbohidratos (estreptomicina), lactonas macrocíclicas (eritromicina, rifampicina), quinonas y antibióticos relacionados (tetraciclina), aminoácidos y antibióticos peptídicos (penicilina), antibióticos heterocíclicos que contienen oxígeno, derivados alicíclicos, antibióticos aromáticos y antibióticos alifáticos (Berdy, 1985 citado por Egúsqiza, 1996). Algunos antibióticos tienen una acción letal sobre las células, mientras que otros solamente inhiben el desarrollo de los patógenos, aunque en algunos esta acción inhibitoria llega a ser irreversible. En general puede decirse que los agentes que dañan la pared o membrana celular son bactericidas, y los que interfieren con una acción enzimática son bacteriostáticos (Brock & Medigan, 1991 citado por Egúsqiza, 1996). El excesivo uso de los antibióticos genera resistencia. El

efecto de los antibióticos se ve incrementado cuando se emplean en combinación sinérgica de 2 ó 3 antibióticos.

En el CIP los antibióticos se vienen empleando desde 1988, mediante el uso de secciones de papel filtro impregnados con soluciones de antibióticos estériles e incorporados en el medio semisólido de cultivo de camote (Egúsqiza, 1996). Egúsqiza en 1996 determinó que la combinación de estreptomina y cefotaxima es el mejor método que logra eliminar las bacterias de los cultivos *in vitro* de camote estudiados, sin causar toxicidad.

La mejor forma de controlar el problema de contaminación es adaptando un sistema de seguridad de calidad microbiológica a las necesidades de los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales (Leifert & Cassells, 2001), donde se planteen métodos para lograr un diagnóstico rápido y efectivo, y estrategias preventivas, ya que resulta difícil y costoso eliminar contaminación ambiental de origen bacteriano.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Materiales.

4.1.1. Material biológico.

Se utilizaron plántulas de *Ipomoea batatas* “camote” de 2, 4, 6 y 12 meses de cultivo *in vitro*, conservadas en el Banco *in vitro* del Centro Internacional de la Papa (CIP) y pertenecientes a la colección mundial de germoplasma mantenido por el CIP.

4.2. Métodos.

4.2.1. Diagnóstico de contaminación bacteriana en la colección de camote *in vitro*.

El diagnóstico de contaminación bacteriana de la colección de camote *in vitro* se basó en la detección de signos de crecimiento microbiano en todos los clones de una entrada, mediante la inspección visual directa en un total de 3 545 entradas del Banco de Germoplasma del CIP. Las plántulas contenidas en los tubos de ensayo fueron examinadas con la ayuda de luz blanca-día artificial, proveída por fluorescente de 40 watts, para detectar la presencia de algún signo de crecimiento microbiano (película con alguna coloración, halos blanquecinos o incoloros, mucosidad) sobre la planta, la base del tallo, paralelo a la raíz, sobre el medio y/o en el medio.

4.2.2. Aislamiento bacteriano.

El aislamiento bacteriano se realizó a partir de muestras vegetales procedentes de entradas de camote contaminadas. El tiempo de cultivo de las plántulas al momento del aislamiento fue de 6 a 12 meses. Asimismo no recibieron ningún tratamiento con antibiótico previo a este trabajo.

En condiciones de esterilidad, las muestras fueron procesadas mediante la maceración de secciones representativas del tejido vegetal (tejido caulinar, foliar y radicular) mas muestras del medio de cultivo. Una planta por entrada fue pesada y macerada en un mortero estéril utilizando agua fosfatada (0,085 g/L de KH_2PO_4 a pH 7,2) como se puede apreciar en la Figura 1. Se hicieron 4 diluciones al décimo. De la dilución 10^{-1} se tomaron 100 μL que fueron sembrados en caldo nutritivo enriquecido (CNe) conteniendo 0,2% de extracto de levadura (Difco), con 5% de sucrosa (Sigma). De la mayor dilución 10^{-4} otros 100 μL fueron sembrados en 7 diferentes medios: Agar Sabouraud Glucosado 4% (Merck) con 0,15 g/L de telurito potásico (Sigma); Agar Czapex Dox (CzDx), Duchefa Biochemie; Agar Mac Conkey (MCK), Merck; Agar Tripticasa Soya (TSA), Merck; agar nutritivo enriquecido (ANe) con 0,2% de extracto de levadura (Difco) y con 5% de sucrosa (Sigma); Agar Nutritivo Extracto de Levadura (NBY) y Agar Extracto de Levadura, Peptonado y Glucosado (YPGA). El pH de los medios de cultivo fue neutro (7,0) salvo el medio CzDx el cual se preparó a pH 6,8 y el Agar Sabouraud Glucosado 4% (Sb) a pH 5,6. La preparación de los medios por componentes se indica en el Anexo 10.1.



Figura 1. Procesamiento de las muestras vegetales mediante la maceración de secciones representativas del tejido vegetal (tejido caulinar, foliar y radicular) mas muestras del medio de cultivo.

La siembra se realizó por el método de difusión en superficie. Los cultivos fueron incubados a 30 °C por 15 días salvo los cultivos de Mac Conkey que fueron incubados a 37 °C por 72 h y los de Sabouraud y Czapex Dox que fueron incubados a temperatura ambiente por 15 días. Cuando no se evidenció crecimiento microbiano los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente y evaluados diariamente por 1 mes.

El crecimiento bacteriano se evidenció mediante la observación de turbidez en medio líquido o de colonias sobre medio sólido.

4.2.3. Purificación de cepas.

Las colonias fueron evaluadas bajo una lupa, se contó el número de colonias morfológicamente diferentes desarrolladas en cada medio por entrada procesada. La caracterización se hizo en base al comportamiento cultural teniendo en cuenta la descripción de las colonias (forma, tamaño, elevación, tipo de borde, textura de la superficie, cromogénesis y aspecto).

Todas las colonias bacterianas diferentes morfológicamente se subcultivaron en el medio TSA, e incubaron a 30 °C por 24 h, las cuales luego del crecimiento fueron conservadas con 10% de glicerol a 4 °C para estudios posteriores.

4.2.4. Caracterización bacteriana.

La caracterización de las cepas se realizó en base a los protocolos descritos en el Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology (1986).

A partir de cultivos de 24 h de incubación se hizo la tinción Gram, siguiendo la metodología indicada en la Figura 2. Se anotaron los caracteres culturales (turbidez, formación de película y sedimento) en Caldo Trypticasa Soya (TSB) (Merck). Complementario a la tinción Gram se realizaron pruebas de solubilidad de las colonias en KOH 3% (P/V). Otras pruebas fueron oxidasa, catalasa, formación de endoespora, reducción de nitratos (NO_3) en nitritos (NO_2) o en nitrógeno atmosférico (N_2). Se observó la motilidad microscópica de las cepas mediante el método de “gota pendiente” a 400X, para lo cual se colocó unas gotas de un cultivo de 24 h en caldo TSB sobre un portaobjetos con unas finas fibras de algodón bajo un cubreobjetos.

4.2.5. Identificación bacteriana.

La identificación de las cepas se realizó siguiendo el flujo de trabajo mostrado en la Figura 2. Además se emplearon pruebas de identificación rápida estandarizadas del API20 NE, API20 E y API50 CHB (API-System Biomerieux®-France). Para estas pruebas se realizaron cultivos mediante la siembra de un inóculo bacteriano en cada uno de los medios deshidratados de las galerías correspondientes a cada API. El inóculo se tomó a partir de colonias bacterianas de cultivos de 24 h en el medio TSA, las cuales fueron homogenizadas en una solución de 0,85% cloruro de sodio (Merck). La turbidez de los caldos se ajustó a 0,5 de la escala de Mac Farland (Anexo 10.2) para el API 20 NE y de 2 para el API 20E y API 50CHB. Las galerías fueron incubadas a 30 °C por 24 h y hasta 48 h cuando fue necesario. Estas pruebas fueron complementadas con la evaluación del metabolismo de azúcares (glucosa, sucrosa y manitol) en medio Hugh Leifson (Anexo 10.1) de 24 h hasta los 15 días de cultivo. Se cultivaron en aerobiosis y en microaerofilia, utilizando 500 µL de aceite mineral estéril para sellar los tubos. Además se realizaron cultivos en Agar Sangre y en Agar Almidón (Anexo 10.1) para determinar la capacidad hemolítica y amilolítica respectivamente. Finalmente se realizaron cultivos en gradiente de cloruro de sodio (2, 5, 7 y 10% de NaCl) en caldo nutritivo (Anexo 10.1) de acuerdo a lo descrito por el Bergey's Manual of Determinative Systematic Bacteriology (1986).

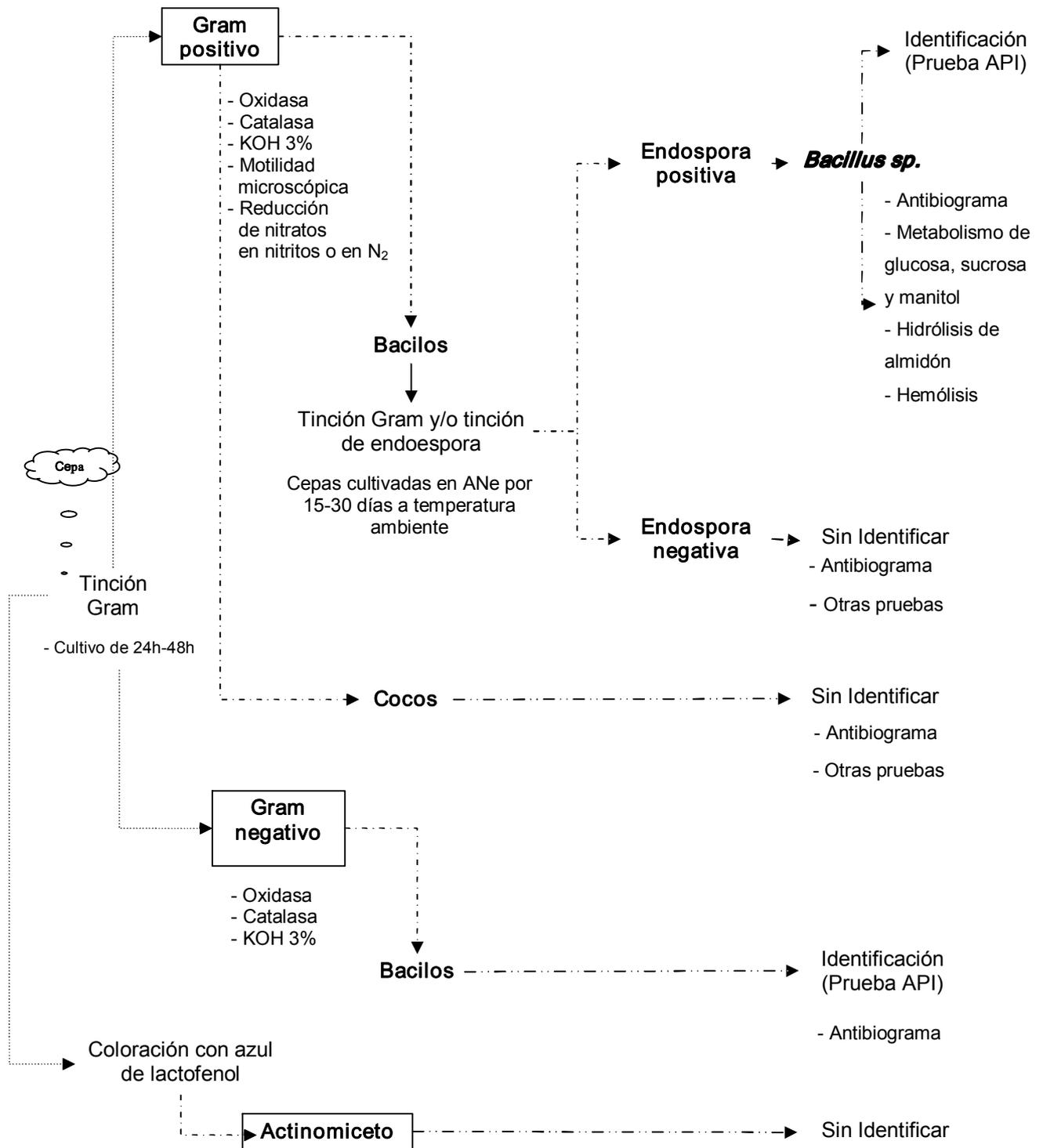


Figura 2. Diagrama de flujo para la caracterización e identificación bacteriana.

4.2.6. Sensibilidad bacteriana a antibióticos.

La sensibilidad a antibióticos de las cepas identificadas se realizó mediante el método de disco difusión de Kirby & Bauer en el medio TSA (pH 7,0), empleando discos de 17 antibióticos. El inóculo bacteriano se ajustó a una turbidez de 0,5 de la escala de Mac Farland (Anexo 10.2) tomando 1-2 colonias bacterianas de 24 h de cultivo en el medio ANe y luego se homogenizaron en caldo (CNe). En la Tabla 1 se muestra el rango de sensibilidad por antibiótico tomado del documento del Nacional Comité for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1997).

Tabla 1. Rango de sensibilidad bacteriana a antibióticos para interpretación del antibiograma (según NCCLS, 1997).

Nombre del Antibiótico	Siglas	Concentración (µg)	Sensibilidad (S) ^(*)	Intermedio (I) ^(*)	Resistencia (R) ^(*)
Kanamicina	KN	30	≥18	14-17	≤13
Ampicilina	AM	10	≥17 o ≥29	14-16	≤13 o ≤28
Nitrofurantoina	FD	30/300	≥17	15-16	<14
Trimetropin sulfametoxazol	SXT	25/23.75	≥16	11-15	≤10
Estreptomina sulfato	S	10	≥15	12-14	≤11
Cefotaxima	CTX	30	≥23	15-22	≤14
Ceftriaxona	CRO	30	≥21	14-20	≤13
Rifampicina	RA	5	≥20	17-19	≤16
Eritromicina	ER	15	≥18	14-17	≤13
Cloranfenicol	CLF	30	≥18	13-17	≤12
Tetraciclina	T	30	≥19	15-18	≤14
Gentamicina	GM	10	≥15	13-14	≤12
Penicilina G	P	10 U	≥29 o ≥15	-	≤28 o ≤14
Metiiciclina	M	5	≥14	10-13	≤9
Lincomicina	L	2	≥21	15-20	≤14
Doxiciclina	DO	30	≥16	13-15	≤12
Polimixina B	PB	10	(**)	-	(***)

(S): Sensible, (I) : Intermedio, (R): Resistente

(*): mm de diámetro de halos de inhibición, (**): ≥20 mm y (***) : Ausencia de halo.

4.2.7. Micropropagación del material biológico.

El procedimiento de la micropropagación del material vegetal tuvo como base, el protocolo desarrollado para “camote” por Lizárraga *et al.* (1990) el que consiste en segmentar 2-3 nudos con yemas axilares y sembrar asépticamente en el medio básico de Murashige & Skoog a pH 5,8; preparado y suplementado según Anexo 10.3. El material se incubó en un cuarto de cultivo con fotoperíodo de 16\8 horas (luz-oscuridad) a 45 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{seg}^2$ ó 3000 lux de intensidad luminosa y a 21-23 °C, durante 8 semanas.

Teniendo en cuenta esta metodología se tomaron plántulas de 10 entradas contaminadas y conservadas *in vitro* (Número CIP: 440317, 420358, 443019, 420916, 420978, 422581, 440415, 440238, 442121 y 440048), a partir de las que, mediante sucesivos subcultivos se logró micropropagar 60 a más plántulas por entrada que fueron utilizadas en la experimentación para la eliminación de bacterias. Cada 15 días se realizó evaluaciones visuales de los cultivos con el objeto de detectar contaminación por hongos.

4.2.8. Tratamientos para la eliminación de bacterias de plántulas contaminadas mediante el cultivo de meristemas.

En la cámara de flujo laminar, bajo condiciones asépticas, con ayuda del estereoscopio y siguiendo las pautas desarrolladas por Lizárraga *et al.* (1990) se procedió al aislamiento de meristemas, a partir de la porción apical con 2 a 3 yemas de plántulas de 2 meses de cultivo. Los meristemas disectados fueron transferidos al medio de cultivo preparado para tal fin MMB-1 (medio de meristemas de batata 1). Los meristemas fueron transferidos a medio fresco 3 veces interdiariamente para luego permanecer en este medio por una semana. Los meristemas que no desarrollaron de manera adecuada se les renovó el medio hasta lograr crecer de manera que no formaran callos. Al cabo de 2 semanas el medio fue cambiado por el medio MMB-2 (medio de meristemas de batata 2) y renovado semanalmente, en el cual al cabo de 4 meses los meristemas se diferenciaron en plántula, que a su vez fue propagada en MPB (medio de multiplicación de batata) con agar y finalmente en MPB con phytigel (Anexo 10.4).

4.2.8.1. Tratamiento de meristemas contaminados con bacterias empleando soluciones desinfectantes: Plant Preservative Mixture (PPM) e hipoclorito de sodio (lejía Clorox®).

Los explantes (porción apical con 2 a 3 yemas) y los meristemas disectados de 0,2-0,3 mm fueron sometidos a 3 tratamientos empleando soluciones desinfectantes más un control (Tabla 2). En los tratamientos, se incluyeron 9 entradas contaminadas de las cuales una no fue sometida al tratamiento 3, debido a que no se contó con suficiente material vegetal.

Como se muestra en la Tabla 2 se usó hipoclorito de sodio a 2,5% (Tratamiento 1) y PPM (Tratamiento 2) en los explantes antes de la disección de los meristemas. Adicionalmente se incluye PPM como parte del medio de cultivo en los Tratamientos 2 y 3. Se disectaron entre 6-23 meristemas por entrada y por tratamiento.

Tabla 2. Tratamientos aplicados en ensayos para la eliminación de bacterias en clones de camote *in vitro* empleando soluciones desinfectantes.

Nº Tratamiento	Desinfección superficial ^{1/} Tiempo	Suplemento del medio de cultivo	Duración del tratamiento (días)
1	Lejía 2,5%/ (8-10min)	-----	-----
2	5%(V/V) PPM ² + MS ^{3/} (12 horas) ⁴	0,1% (V/V) PPM ²	30
3	-----	0,1% (V/V) PPM ²	30
Control	-----	-----	-----

(1) Desinfección superficial de la porción apical (con 2 a 3 yemas) de la plántula antes de la disección del meristemo.

(2) PPM: Solución de Plant Preservative Mixture.

(3) MS: sales de Murashige and Skoog (4,3 g/L).

(4) Agitación constante.

Los explantes tratados con lejía fueron enjuagados 4 veces con agua destilada estéril antes del aislamiento del meristemo. Los explantes tratados con PPM no se enjuagaron y luego del aislamiento de los meristemas fueron cultivados en oscuridad (cubiertos con papel aluminio) por 30 días para evitar su oxidación.

Los resultados de los tratamientos fueron evaluados a los 60 días.

4.2.8.2. Tratamiento de meristemos contaminados con *Bacillus sp.* empleando rifampicina (100 mg/L).

Los meristemos disectados fueron sometidos a 4 tratamientos empleando rifampicina 100 mg/L (Van Den Houwe & Swennen, 2000). Se tomaron 3 entradas contaminadas con colonias del género *Bacillus sp.*, de las cuales 1 entrada no se sometió al tratamiento 2 debido también a la falta de material vegetal propagado. Se disectaron entre 6-9 meristemos por entrada y por tratamiento. Los meristemos fueron sembrados en el medio de cultivo semi sólido, al cual se le agregó 100-200 µL de medio de cultivo líquido de meristemos de camote con adición de rifampicina (100 mg/L) de Marfan®. El medio líquido fue renovado interdiariamente (durante todo el tiempo que duró cada tratamiento) evitando su evaporación total. Los cultivos fueron mantenidos en agitación constante hasta suspender el antibiótico. El tamaño del meristemo disectado y el tiempo de duración de cada uno de los tratamientos con rifampicina se muestran en la Tabla 3. Los resultados de estos tratamientos fueron evaluados a los 30 días de suspendido el antibiótico.

Tabla 3. Tratamientos aplicados en ensayos para la eliminación de *Bacillus sp.* en clones de camote *in vitro* empleando rifampicina (100 mg/L).

Nº Tratamiento.	Tamaño del meristemo (mm)	Duración del tratamiento (días)
1	(0,5-0,8)	30
2	(0,5-0,8)	15
3	(0,2-0,4)	30
4	(0,2-0,4)	15
Control	(0,2-0,3)	0

4.2.9. Tratamiento de plántulas contaminadas con bacterias mediante reintroducción a cultivo *in vitro* de plántulas transferidas y desarrolladas en invernadero.

El procedimiento de trabajo puede apreciarse en la Figura 3. Plántulas de 9 entradas contaminadas fueron transplantadas (2 plántulas por entrada) de *in vitro* a un sustrato tratado con una solución desinfectante de cloruro de bencil-dimetil-alquilamonio al 0,5 mL/L (Dimanin® de Bayer) siguiendo las pautas del protocolo desarrollado por Dodds *et al.* (1991). Se mantuvo 2 grupos de experimentación donde uno de ellos no fue tratado. El tratamiento se efectuó semanalmente con esta solución durante el riego. Una vez que las plántulas se establecieron en invernadero, aproximadamente a los 45 días, fueron transferidas a macetas.

A los 3 meses de cultivo las plantas fueron reintroducidas *in vitro* de acuerdo al procedimiento de introducción a condiciones *in vitro* basado en el método descrito por Lizárraga *et al.* (1990), donde los esquejes uninodales de tallo fueron sumergidos en una solución acaricida-fungicida (1 g/L Nissorum, 1 g/L Peropal, 2 g/L Farmathe y 3 gotas/L de Tween 20) por 15 min y luego fueron enjuagados con alcohol al 70% por 30 s. En condiciones estériles fueron desinfectados con lejía al 2,5 % por 15 min. Finalmente los explantes fueron enjuagados 4 veces con agua destilada estéril. Los esquejes se sembraron en el medio MPB y cultivaron por 45 días. Luego de este tiempo, las plántulas fueron micropropagadas. Posteriormente, a los 2 meses del primer subcultivo se realizó una segunda micropropagación. Los cultivos fueron evaluados para detección de bacterias en cada subcultivo.

4.2.10. Diagnóstico bacteriano.

En los dos experimentos con meristemas el diagnóstico bacteriano se realizó a los 30 días de suspendidos los tratamientos antes indicados, aproximadamente a los 2 meses de cultivo. La sobrevivencia de los meristemas fue evaluada hasta los 4 meses de cultivo aproximadamente cuando se logra su recuperación (diferenciación del meristemo en plántula de 2 a más yemas).

En el caso de las plántulas reintroducidas, el diagnóstico bacteriano se realizó a los 45 días de cultivo y al segundo subcultivo.

Dependiendo del desarrollo y estado de los meristemos, se realizaron cortes transversales pequeños y finos, los cuales fueron sembrados en el medio ANe y cultivados por 72 h a 30° C y a temperatura ambiente de 15 días a 1 mes de acuerdo al esquema mostrado en la Figura 4.

4.2.8. Diseño y análisis estadístico.

Para los experimentos aplicando el cultivo de meristemos, se utilizó un diseño completamente al azar, siendo las entradas consideradas como repeticiones por tratamiento.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) considerando 2 factores el número de meristemos y los tratamientos. Asimismo se determinó el coeficiente de variabilidad para cada variable analizada, siendo éstas la sobrevivencia y el número de meristemos vivos sin bacteria a las 2 meses de cultivo. El nivel de significancia utilizado para contrastar la hipótesis de que no existían diferencias entre los tratamientos fue de $p < 0,05$. Además se realizó un análisis de comparación de medias de los datos evaluando las dos variables. Los resultados se procesaron por el programa estadístico "System Analysis Statistics" (SAS versión 8) para diseño completamente al azar (DCA).

Para el experimento en invernadero se utilizó la prueba de comparación de medias (Prueba de T) entre las plantas tratadas con Dimanin y el control. La variable evaluada fue el número de esquejes negativos a bacterias durante el primer subcultivo a partir del número de esquejes introducidos *in vitro*. Los resultados se analizaron en el programa de cálculos de Microsoft Office Excel.

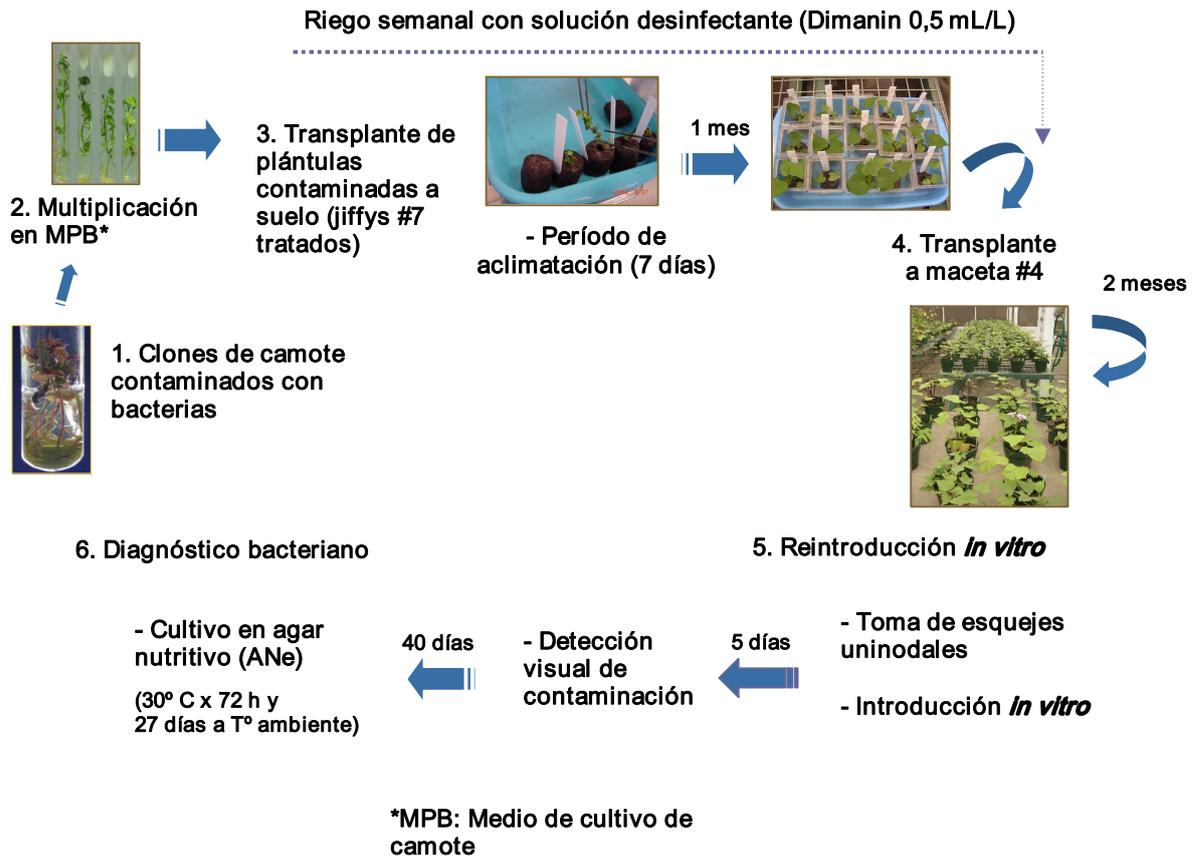


Figura 3. Esquema de procedimientos para la eliminación de la contaminación bacteriana mediante la reintroducción *in vitro* de plantas de camote tratadas con Dimanin®.

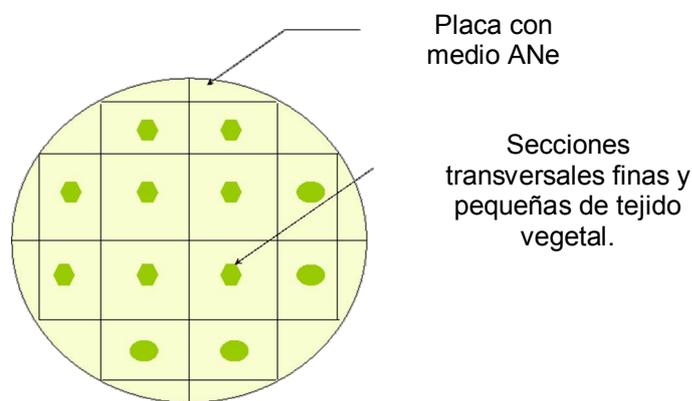


Figura 4. Esquema de diagnóstico bacteriano de meristemos de camote de aproximadamente 2 meses de cultivo.

V. RESULTADOS

5.1. Diagnóstico de contaminación bacteriana en la colección de camote *in vitro*.

De 3 545 entradas de camote conservado *in vitro* en el Banco de germoplasma del CIP que fueron evaluadas visualmente para detección de contaminantes bacterianos, se encontró 130 entradas (3,7%) positivas. No se pudo precisar la contaminación de 1154 entradas (32,6%) debido a la presencia de signos dudosos de crecimiento microbiano en uno o más, pero no en todos los clones de una entrada. El resto de entradas (63,8%) se encontraron libres de contaminantes.

No todas las 130 entradas contaminadas presentaron un buen desarrollo y varias además, habían sido tratadas con antibiótico previamente a esta evaluación. Sólo 76 entradas se encontraron disponibles para este estudio.

Los tipos de signos de contaminación detectados en las 76 entradas de camote *in vitro* se muestran en la Tabla 4, entre éstos se observó el crecimiento bacteriano con diferentes pigmentaciones sobre el medio de cultivo de camote en 72% de las entradas. Además, el 28% de las entradas presentaron signos incipientes de crecimiento bacteriano, los cuales se pueden apreciar en la Figura 5.

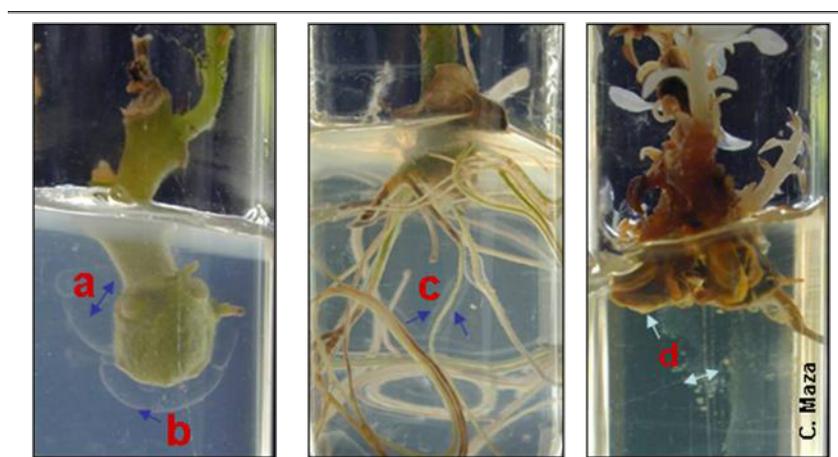


Figura 5. Signos bacterianos. Incipientes: (a) nubosidad y (b) halo. Crecimiento bacteriano evidente y pigmentado: (c) blanco-beige y (d) anaranjado.

En la Tabla 4 también se puede apreciar que de las 76 entradas de camote con signos de crecimiento bacteriano, 49 proceden de países como Nigeria (NGA), Taiwán (TWN), Papúa Nueva Guinea (PNG), África del Sur (ZAF), Brasil (BRA), Colombia (COL), Puerto Rico (PRI), China (CHN), Japón (JPN), Tonga (TON), Tailandia (THA), Netherlands (NLD), Bolivia (BOL), Cuba (CUB), Guatemala (GTM), EE.UU (USA) y 27 de Perú (PER). En esta pequeña muestra de entradas contaminadas, además de Perú, la mayor parte proceden de Nigeria, 15 entradas; Taiwán, 11 entradas y de Papúa Nueva Guinea, 7 entradas.

5.2. Aislamiento bacteriano en medios de cultivo.

El aislamiento bacteriano se realizó a partir de las 76 entradas contaminadas disponibles para este estudio. El aislamiento resultó positivo sólo para 61 (80,3%) de todas las analizadas.

En la Tabla 5 se muestra los resultados de los aislamientos bacterianos logrados en 5 de los 7 medios de cultivo empleados. Se aislaron diferentes tipos de colonias según el medio empleado. En el medio ANe se aislaron 81 colonias; en NBY, 73 colonias; en TSA, 70 colonias y en YPGA 67 colonias. Sólo 1 tipo de colonia se obtuvo en agar Mac Conkey. No se logró ningún aislamiento bacteriano en Agar Sabouraud 4% Glucosado y sólo se observaron colonias diminutas de aspecto deshidratado en Agar Czapek Dox las cuales no prosperaron al intentar su subcultivo en el mismo medio.

5.3. Purificación de cepas, caracterización e identificación bacteriana.

Los diferentes tipos de colonias bacterianas aisladas en diferentes medios de cultivo por cada entrada fueron subcultivadas y comparadas en base a sus características culturales en el medio TSA. Sólo se tomaron 84 cepas procedentes de 45 entradas representativas de todos los aislamientos.

La procedencia de cada una de las 84 cepas aisladas con respecto al medio de cultivo de su aislamiento se muestra en la Tabla 6. Se destaca que en el medio TSA se pudieron diferenciar 35 cepas; ANe, 25 cepas; en NBY, 15 cepas; en YPGA, 8 cepas y en agar Mac Conkey 1 cepa.

En la Figura 6 se pueden observar colonias planas o con poca elevación y de borde irregular características de *Bacillus sp.* Cepas con estas características culturales se clasificaron como *Bacillus sp.* principalmente debido a la formación de endospora (Figura 7).



Figura 6. Cepas N° 7, 54 y 26 de *Bacillus sp.* de 24 h de cultivo en medio Agar Tripticasa Soya (TSA).

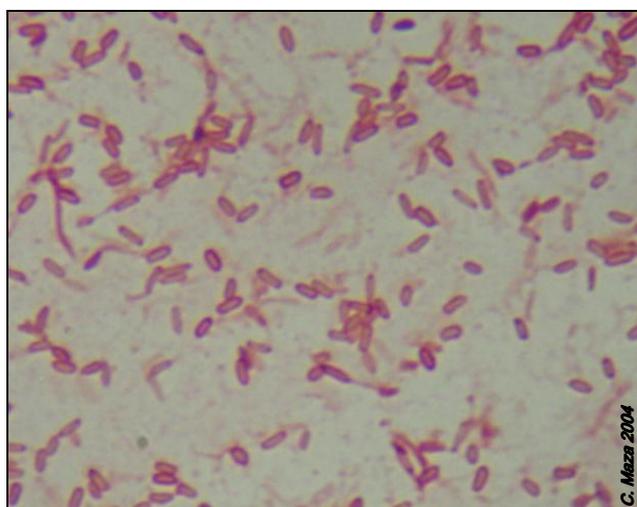


Figura 7. Esporulaci3n de *Bacillus sp.* Observaci3n mediante la Tinci3n GRAM (1 000X).

El 90,5% de las 84 cepas fueron caracterizadas como *Bacillus sp.*, procedentes de 40 entradas (89%) de camote *in vitro*. En una de estas entradas se encontr3 contaminaci3n mixta de *Bacillus sp.* con cepa N° 50 de cocos Gram positivos, en otras 2 entradas, cada una con colonias de cocos Gram positivos similares a la cepa N° 1 y a la cepa N° 50. Tambi3n en una de estas entradas se encontr3 cepas de *Bacillus sp.* con bacilos Gram positivos no esporulados (cepas N° 29 y 30). En un menor n3mero de entradas se encontraron 2 cepas de bacilos Gram negativos (cepa N° 3 y 4), 1 de bacilos (cepa N° 5) y otra de cocos Gram positivos (cepa N° 1) no esporulados; y 1 de actinomiceto (cepa N° 2) a3n sin identificar (Tabla 7). El resto de aislamientos de las

otras 16 entradas correspondieron a bacilos Gram positivos (12 entradas) y a bacterias filamentosas con colonias anaranjadas similares culturalmente a la cepa N° 2 de actinomiceto (4 entradas: 440237, 440234, 440242, 440048) y debido a ese pigmento anaranjado se observaron fácilmente en el medio de cultivo de la plántula (Tabla N° 4).

En la Figura 8 se observa el tipo de colonia presentado por las cepas de *Bacillus pumilus*, y en la Figura 9 se muestran colonias de bacilos y cocos Gram positivos.

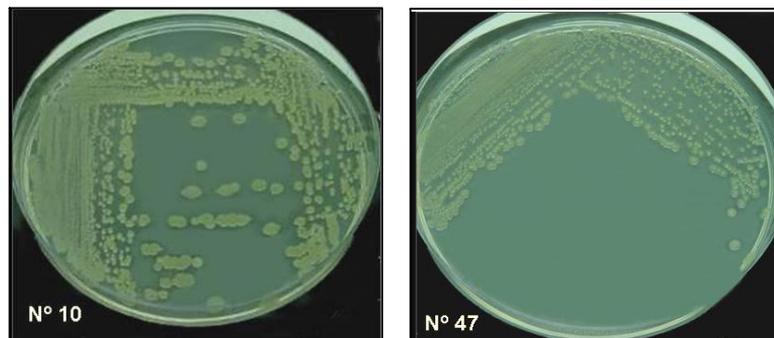


Figura 8. Cepas N° 10 y 47 de *Bacillus pumilus* de 24 h de cultivo en medio Agar Tripticasa Soya (TSA).

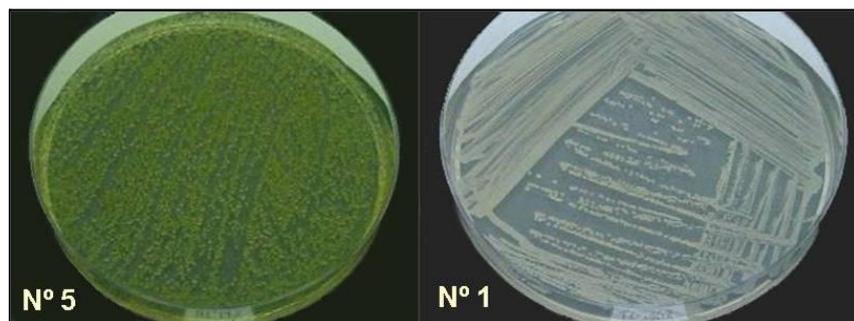


Figura 9. Cepas de bacilos (N° 5) y cocos (N° 1) Gram positivos no esporulados. Cultivos de 24 h en medio Agar Tripticasa Soya (TSA).

En la Tabla 8 se presentan los tipos de contaminantes bacterianos en relación a los aislamientos obtenidos de 45 entradas de camote *in vitro*.

Características culturales de las 84 cepas en medio TSA se muestran en la Tabla 9. Asimismo se anotaron las características culturales de 78 cepas en caldo TSB, resaltando que 91% de las cepas formaron sedimento y 15% formaron película superficial (Anexo 10.6).

Las diferentes cepas se caracterizaron por producir catalasa, no producir oxidasa, no reducir el nitrato. Excepto la cepa N° 4 que fue oxidasa positiva, la N° 50 que fue catalasa negativa y la N° 1 que redujo los nitratos en nitritos. Además de 79 cepas, 81% fueron mótils (Anexo 10.7).

En las Tablas 10 al 13 se muestran los resultados de la caracterización bacteriana de 4 cepas de bacterias Gram positivos procedentes de las entradas ensayadas en los tratamientos de eliminación de bacterias. En estas tablas se resaltan las principales características culturales de estas cepas incluyendo los resultados de las pruebas de oxidación y fermentación de los azúcares glucosa, sucrosa y manitol. La cepa N° 7 de *Bacillus sp.* oxidó la glucosa, y las cepas N° 7, 48 y 54 hidrolizaron el almidón (Tabla 10). La Tabla 11 muestra el comportamiento cultural de 4 cepas de *Bacillus* identificadas por el sistema API. Las cepas N° 46 y 47 no fueron mótils y sólo la cepa N° 26 hidrolizó el almidón, asimismo las cepas N° 10 y 47 fermentan la sucrosa, la cepa N° 46 fermenta la glucosa, y la cepa N° 26 sólo oxida la sucrosa. La Tabla 12 muestra los resultados de caracterización de 2 cocos Gram positivos. Se resalta que ninguna de las cepas produce hemólisis. Por su parte la cepa N° 5 (bacilos Gram positivos no esporulados) no hidrolizó el almidón y observada al microscopio de campo oscuro resultó diflagelado (Tabla 13). En la Tabla 14 se muestran las principales características de *Stenotrophomonas maltophilia* y de *Sphingomonas paucimobilis*. La cepa de actinomiceto se caracterizó principalmente por su color anaranjado y porque las condiciones de cultivo implicó un período de incubación largo de 1 mes (Tabla 15). A 5 cepas (N° 5, 7, 10, 26 y 47) se les cultivó en concentraciones crecientes de cloruro de sodio (2, 5, 7 y 10% de NaCl). Todas desarrollaron turbidez al 2% de concentración y ninguna desarrolló turbidez a la concentración más alta (10%). Las cepas N° 7 y 5 crecieron con 5% de NaCl. Sólo la cepa N° 10 creció en un medio con 7% de NaCl.

El perfil bioquímico de 7 cepas aisladas de entradas de camote *in vitro* e identificadas según las prueba del Sistema API (API 20NE, API 50CHB y 20E) se muestra en los Anexos 10.8 y 10.9 respectivamente. Se muestra también el perfil bioquímico de dos cepas de bacilos empleando API 20E (uno de ellos identificados como *Bacillus sp.*, Anexo 10.10). Con los resultados obtenidos de estos perfiles bioquímicos se identificaron sólo 4 cepas (Tabla 16) y los detalles se muestran en el Anexo 10.11. Las cepas N° 10 y 47 fueron identificadas como *Bacillus pumilus*; la cepa N° 3 como *Stenotrophomonas maltophilia* y la cepa N° 4 como *Sphingomonas paucimobilis*. Las cepas N° 5, 7, 26, 46 y 48 no se lograron identificar.

5.4. Sensibilidad de las cepas aisladas a antibióticos.

La sensibilidad a antibióticos se estudió en 16 cepas, de estas, 7 corresponden a las entradas ensayadas en la eliminación de bacterias.

Seis cepas de *Bacillus sp.* fueron resistentes a los siguientes antibióticos: penicilina, estreptomicina, cloranfenicol, ceftriaxona, trimetropin sulfametoxazol, cefotaxima y meticiclina. Siete cepas fueron sensibles a rifampicina, 3 presentaron grado intermedio de resistencia a rifampicina y 1 fue resistente (Tabla 17).

En la Tabla 17 también se observa que 1 cepa de bacilos Gram positivos y 2 de cocos Gram positivos fueron sensibles a diez de los catorce antibióticos probados, y únicamente presentaron grado intermedio de resistencia a uno o dos antibióticos (cepa N° 5, a estreptomicina; cepa N° 1, a cloranfenicol; y cepa N° 50 a rifampicina y nitrofurantoína).

Las cepas, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Sphingomonas paucimobilis* fueron sensibles a kanamicina únicamente (Tabla 18).

5.5. Eliminación de bacterias mediante el cultivo de meristemos.

Los resultados obtenidos en estos dos experimentos empleando soluciones desinfectantes (PPM e hipoclorito de sodio) y el antibiótico (rifampicina) se presentan en los Anexos 10.12 y 10.13 respectivamente. En estas tablas se muestran los datos originales de sobrevivencia de los meristemos a los 2 y 4 meses de cultivo, así como la sobrevivencia de meristemos sin bacterias a los 2 meses de cultivo hasta lograr su recuperación a los 4 meses.

5.5.1. Tratamiento de meristemos de plántulas contaminadas empleando “Plant Preservative Mixture” e hipoclorito de sodio.

De las 9 entradas tratadas (440317, 420358, 443019, 420916, 420978, 422581, 440415, 440238 y 440048), 5 estuvieron contaminadas con cepas de bacilos Gram positivos y las otras restantes, con cocos Gram positivos (cepa N° 1), actinomiceto (cepa N° 2), *Sphingomonas paucimobilis* y una no identificada (Tabla 19).

Los resultados de sobrevivencia de este experimento son expresados en porcentaje en base al total de meristemas aislados, y los de eliminación de bacterias en base al número de meristemas sobrevivientes a partir de los 2 meses de cultivo.

Al comparar los resultados obtenidos (Anexo 10.12) considerando el número de entradas libres de bacterias obtenidas con cada tratamiento se tiene que con el Tratamiento 1 se controló la contaminación de 8 entradas de las 9 tratadas, este resultado coincidió con el del control. La diferencia la marcaron los tratamientos 2 y 3 los cuales fueron efectivos sólo para 7 entradas de las 9 tratadas.

El análisis estadístico de los resultados muestra que no hubo efecto de genotipo y sí entre tratamientos y el número de meristemas aislados (Anexos 10.14.a y 10.14.b).

El análisis de varianza se realizó considerando a los genotipos o entradas como repeticiones de los tratamientos y del control. La diferencia existente en la sobrevivencia de los meristemas a los 2 meses de cultivo (Anexo 10.14.c), es significativa con coeficiente de variabilidad del 30%. Además la diferencia ocurrida entre los datos para la variable meristemas sin bacterias fue significativa y el coeficiente de variabilidad fue del 31% (Anexo 10.14.d).

En la Tabla 20 se muestra una variación de 0-100% en la sobrevivencia de los meristemas aislados a los 2 meses de cultivo en todas las entradas tratadas. El porcentaje total de meristemas sin bacterias por tratamiento varió de 56-97%.

En este experimento, la eliminación de bacterias fue exitosa en 97% de los meristemas tratados con hipoclorito de sodio (Tratamiento 1) que comparado con el control (56%) no resultó significativamente diferente, pero si lo fue de los tratamientos 2 y 3. En este tratamiento se obtuvo 44% de sobrevivencia, que comparado con el control (66%), resultó ser severo. Esta diferencia no fue significativa en el análisis de medias de los datos, en cambio los tratamientos 2 y 3, donde se empleó Plant Preservative Mixture, la diferencia si fue significativa diferente del control (Anexo 10.14.e). Estos tratamientos 2 y 3 fueron los más severos. Si se compara la distribución de las medias de los datos, mostrados en la Figura 10, se tiene que con el control se obtuvo un mejor resultado de meristemas sobrevivientes sin bacterias.

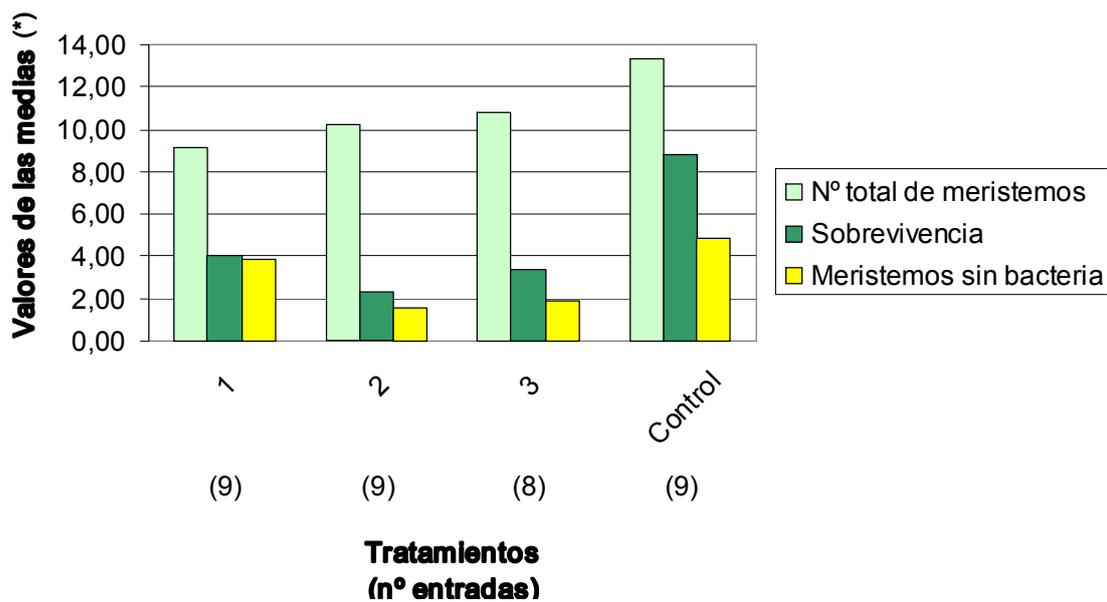


Figura 10. Eliminación de bacterias en cultivos de camote mediante cultivo de meristemos de explantes tratados con hipoclorito de sodio (Tratamiento 1) y PPM (Tratamiento 2 y 3). (*): Valores de medias mostrados en Anexo 10.14.f.

Los resultados de sobrevivencia y recuperación de los meristemos sin bacterias al cuarto mes de cultivo no se analizaron estadísticamente debido a la alta mortalidad observada desde el segundo mes de cultivo. La sobrevivencia y la recuperación disminuyeron drásticamente fluctuando de 0-100% y de 0-75% respectivamente. El mayor porcentaje total de plántulas recuperadas sin bacterias fue de 36% para el control (Tabla 20).

En la Figura 11 se puede apreciar las plántulas recuperadas libres de bacteria a partir de éste ensayo.



Figura 11. Plántulas recuperadas libres de bacterias a partir del cultivo de meristemos.

5.5.2. Tratamiento de meristemas de plántulas contaminadas con *Bacillus sp.* empleando rifampicina (100 mg/L).

Las 3 entradas (420358, 443019 y 420978) tratadas estuvieron contaminadas con *Bacillus sp.* y también fueron incluidas en el anterior experimento aplicando PPM e hipoclorito de sodio.

Así como en el anterior experimento, los resultados de sobrevivencia son expresados en porcentaje en base al total de meristemas aislados, y los de eliminación de bacterias en base al número de meristemas sobrevivientes a partir de los 2 meses de cultivo.

En todas las entradas se logró la eliminación de la bacteria aplicando cualquiera de los 4 tratamientos o el control (Anexo 10.13).

En este experimento no hubo efecto del genotipo (Anexo 10.15.a y 10.15.b). Al analizar la influencia de los tratamientos y del número de meristemas, se encontró que no existe efecto de tratamiento para las dos variables (sobrevivencia y meristemas sin bacterias), pero si existe influencia estadística en la sobrevivencia debido a la variación en el número de meristemas aislados (Anexo 10.15.c y 10.15.d).

El análisis de varianza de los datos evidenció que la diferencia existente en la sobrevivencia de los meristemas a los 2 meses de cultivo es significativa y el coeficiente de variabilidad fue del 7,6% (Anexo 10.15.c). El número de meristemas sin bacterias obtenido en este experimento no influyó significativamente en los resultados. Los resultados presentaron un coeficiente de variabilidad del 17,7% (Anexo 10.15.d).

En la Tabla 21 se muestra que la sobrevivencia de los meristemas a los 2 meses de cultivo varió de 60-100% a través de todos los tratamientos. El porcentaje total de meristemas sobrevivientes sin bacterias entre los tratamientos varió de 36-75%.

El tratamiento con rifampicina en meristemas de 0,5-0,8 mm de tamaño por 30 días (Tratamiento 1) permitió obtener el porcentaje (100%) más alto del total de sobrevivencia entre cada tratamiento comparado con el control. Del análisis de medias se obtuvo que las diferencias entre el Tratamiento 1 y el control (60%), y entre el tratamiento 4 (69%) fueron las únicas significativas estadísticamente (Anexo 10.15.e).

El tratamiento con rifampicina en meristemos de 0,2-0,4 mm de tamaño por 30 días (Tratamiento 3) presentó el porcentaje más alto (73%) de meristemos sin bacterias que comparado con el control (75%) no son significativamente diferentes. La única diferencia significativa se presenta entre el Tratamiento 1 (62%) y el control (Anexo 10.15.e). Al comparar la distribución de las medias de los datos, mostrados en la Figura 12, se tiene que el tratamiento 1 fue el mejor método par lograr meristemos sin bacterias.

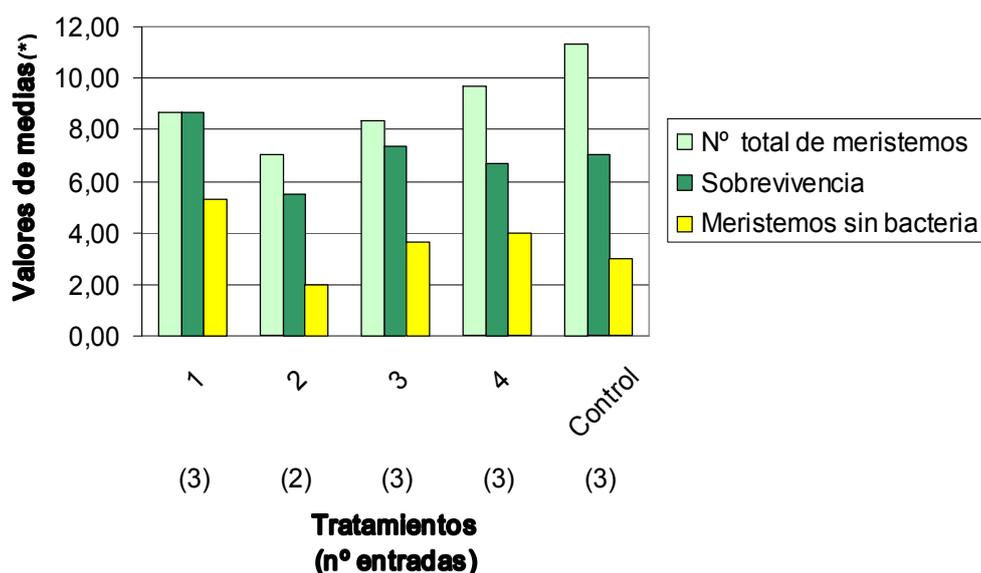


Figura 12. Eliminación de *Bacillus sp.* de cultivos de camote mediante el cultivo de meristemos tratados con rifampicina (100 mg/L) de acuerdo a los métodos indicados en la Tabla 3. (*): Valores de medias mostrados en Anexo 10.15.f.

La mayor parte de los meristemos sobrevivientes sin bacterias a los 4 meses de cultivo se diferenciaron en plántulas normales. Esta disminución fluctuó entre 0-75%. El porcentaje total de recuperación del control fue el mayor (56%). Estos resultados no fueron analizados estadísticamente debido a la poca sobrevivencia observada desde los primeros 2 meses de cultivo (Tabla 21).

La recuperación de meristemos sin bacterias se observó mejor al evaluar la eficiencia en el número de entradas con plántulas recuperadas. El tratamiento 1 fue efectivo para todas las entradas ensayadas, el tratamiento 3 fue efectivo para 1 entrada y los tratamientos 2 y 4 fueron efectivos para 1 sola entrada en contraste al control que fue efectivo para 2 entradas.

5.6. Eliminación de bacterias mediante reintroducción de plantas de invernadero al cultivo *In vitro* tratadas con Dimanin®.

En la Tabla 22 se muestran los resultados de las 9 entradas (440317, 420358, 443019, 420978, 422581, 440415, 440238, 442121 y 440048) tratadas en este experimento, 8 de las cuales también fueron el objeto de estudio en los 2 primeros experimentos y la entrada 442121 contaminada con *Stenotrophomonas maltophilia*.

Las plántulas contaminadas con hongos durante el cultivo fueron descartadas del diagnóstico de bacterias y sólo se analizaron los cultivos que se observaron libres de contaminación a excepción de la entrada con N° CIP 440048 que aún presentando signos de crecimiento bacteriano, “incipientes”, se le realizó el análisis.

En la Tabla 22 se observa que el porcentaje de plántulas sin bacterias obtenidas a partir de los esquejes reintroducidos a *in vitro*, varió de 60-100% tanto para los tratados y el control. El análisis estadístico demostró que el éxito logrado en la eliminación de bacterias no fue significativamente diferente entre el tratamiento y el control (Anexo 10.16). Estos resultados se observan mejor en la Figura 13, donde se aprecia la mínima diferencia existente en el porcentaje de plántulas libres de bacterias por entrada tratada y el control, donde la media fue de 83% para ambos casos (Anexo 10.16). Luego del segundo subcultivo el 100% de las plántulas se mantuvieron sin bacterias.

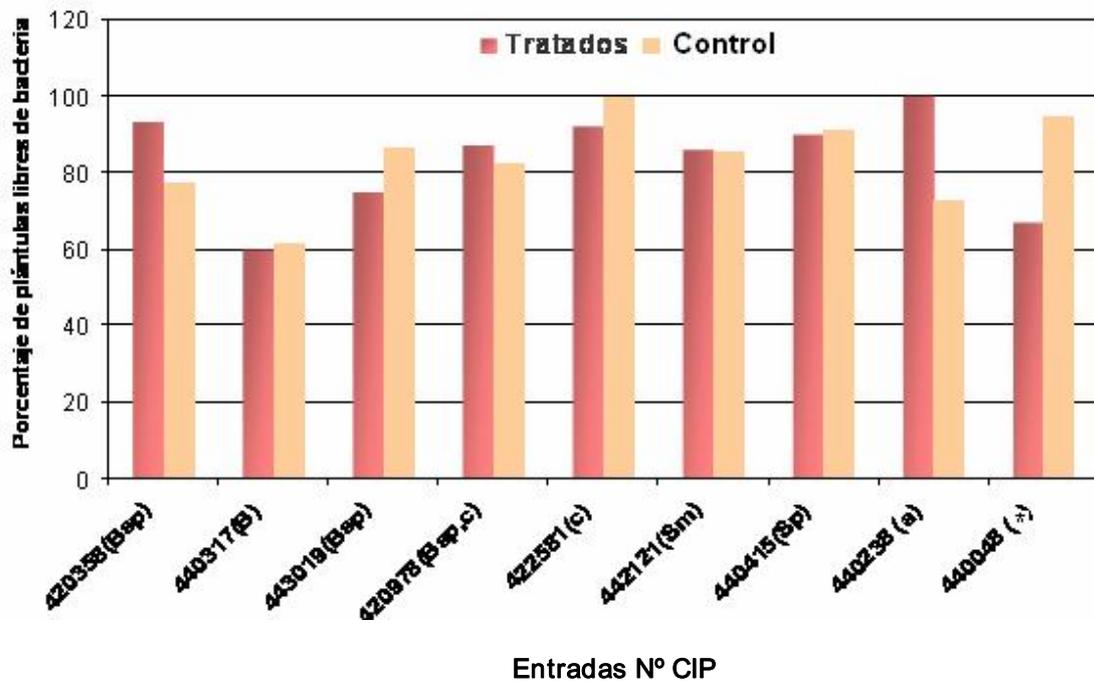


Figura 13. Porcentaje de clones de camote libres de bacterias obtenidos mediante reintroducción a *in vitro* de plantas tratadas con Dimanin®. (Bsp): *Bacillus sp.* (B): Bacilos Gram positivos no esporulados. (c): Cocos Gram positivos. (Sm): *Stenotrophomonas maltophilia*. (Sp): *Sphingomonas paucimobilis*. (a): Actinomiceto. (*): Cepa no identificada con colonias similares al actinomiceto.

Tabla 4. Signos bacterianos en plántulas de 76 entradas de camote *in vitro* conservadas en el Banco de Germoplasma del CIP.

Entradas Nº CIP	País	Signos bacterianos	
		Crecimiento bacteriano ⁽²⁾	Signos incipientes ⁽³⁾
400246	BRA	blanco	-
400467	COL	blanco	halo
420078	PER	blanco	-
420134	PER	beige	nubosidad
420201	PER	-	nubosidad
420213	PER	blanco	-
420296	PER	blanco	-
420358	PER	crema	-
420374	PER	crema/beige	-
420488	PER	beige	-
420520	PER	crema	-
420771	PER	crema/beige	-
420787	PER	crema	-
420788	PER	blanco	-
420898	PER	blanco	-
420912	PER	blanco	-
420916	PER	-	halo
420942	PER	beige	-
420950	PER	crema	nubosidad
420952	PER	blanco	halo
420978	PER	blanco	-
421385	PER	blanco	halo
421851	PER	crema	-
422258	PER	beige	halo
422571	PER	crema/beige	-
422581	PER	-	nubosidad
422655	PER	beige	-
440048	PRI	anranjado	-
440234	TWN	anranjado	-
440237	TWN	anranjado	-
440238	CHN	anranjado	-
440242	TON	anranjado	-

(continúa...)

Tabla 4 (continuación)

Entradas Nº CIP	País	Signos bacterianos	
		Crecimiento bacteriano ⁽²⁾	Signos incipientes ⁽³⁾
440317	TWN	blanco	-
440415	PNG	beige	halo
440517	JPN	-	nubosidad
440702	PNG	blanco	halo
440705	PNG	blanco	halo
440730	PNG	-	halo
440991	PNG	blanco	nubosidad
441219	THA	-	nubosidad
441288	TWN	blanco	-
441290	TWN	-	nubosidad
441336	TWN	-	nubosidad
441373	TWN	blanco	-
441455	TWN	blanco	nubosidad
441467	TWN	blanco	-
441470	TWN	blanco	-
441494	ZAF	blanco	nubosidad
441525	TWN	crema	-
441793	NLD	blanco	-
442121	NGA	blanco	-
442318	NGA	beige	-
442807	NGA	blanco	nubosidad
442846	NGA	blanco	-
443019	NGA	blanco	nubosidad
443025	NGA	blanco	halo
443027	NGA	-	halo/ nubosidad
443088	NGA	blanco	nubosidad
443101	NGA	blanco	nubosidad
443120	NGA	blanco	halo
443129	NGA	crema	nubosidad
400155 ⁽¹⁾	BOL	amarillo	halo
400430 ⁽¹⁾	COL	-	halo
400456 ⁽¹⁾	COL	-	halo/ nubosidad
400591 ⁽¹⁾	CUB	-	halo

(continúa...)

Tabla 4 (continuación)

Entradas Nº CIP	País	Signos bacterianos	
		Crecimiento bacteriano ⁽²⁾	Signos incipientes ⁽³⁾
401094 ⁽¹⁾	GTM	-	halo
420102 ⁽¹⁾	PER	-	halo
422524 ⁽¹⁾	PER	-	halo
440009 ⁽¹⁾	USA	blanco	-
440492 ⁽¹⁾	JPN	-	halo
440717 ⁽¹⁾	PNG	-	halo
440758 ⁽¹⁾	PNG	-	nubosidad
442627 ⁽¹⁾	NGA	crema	nubosidad
442915 ⁽¹⁾	NGA	-	halo
443052 ⁽¹⁾	NGA	-	halo
443062 ⁽¹⁾	NGA	-	halo

(1) Entradas sin ningún aislamiento bacteriano.

(2) Crecimiento bacteriano: manifestación física de la bacteria mediante la observación de pigmentos sobre el medio.

(3) Signos no evidentes: Halo: formación de un arco blanco a nivel de la base del tallo. Nubosidad: formación de una masa nubosa a nivel de la base del tallo.

Tabla 5. Aislamiento bacteriano de 61 entradas de camote *in vitro*.

Entradas N° CIP	N° de colonias por medio de aislamiento						
	TSA	NBY	ANe	YPGA	MCK	Sb	CzDx
400246	1	1	1	1	0	0	0
400467	1	1	1	1	0	0	0
420078	1	1	1	1	0	0	0
420134	1	1	1	1	0	0	0
420201	1	1	1	1	0	0	0
420213	1	1	1	1	0	0	0
420296	1	1	1	1	0	0	0
420358	1	1	1	0	0	0	0
420374	1	1	1	1	0	0	0
420488	1	1	1	1	0	0	0
420520	1	1	1	1	0	0	0
420771	2	2	2	2	0	0	0
420787	1	1	1	1	0	0	0
420788	1	1	1	1	0	0	0
420898	1	1	1	1	0	0	0
420912	1	1	1	1	0	0	0
420916	1	1	1	1	0	0	0
420942	1	1	2	1	0	0	0
420950	1	1	1	1	0	0	0
420952	1	1	1	1	0	0	0
420978	1	1	1	1	0	0	0
421385	1	1	1	1	0	0	0
421851	3	1	1	1	0	0	0
422258	1	1	1	1	0	0	0
422571	1	1	1	1	0	0	0
422581	1	1	1	0	0	0	0
422655	2	2	2	2	0	0	0
440048	1	1	1	1	0	0	0
440234	1	1	1	1	0	0	0
440237	1	1	1	1	0	0	0
440238	1	1	1	1	0	0	0
440242	1	1	1	1	0	0	0
440317	1	1	1	1	0	0	0
440415	1	1	1	1	0	0	0
440517	1	2	1	1	0	0	0
440702	1	1	1	1	0	0	0
440705	1	1	2	1	0	0	0
440730	1	1	1	1	0	0	0
440991	2	2	2	2	0	0	0

(continúa...)

Tabla 5 (continuación)

Entradas N° CIP	N° de colonias por medio de aislamiento						
	TSA	NBY	ANe	YPGA	MCK	Sb	CzDx
441219	1	1	2	1	0	0	0
441288	1	3	2	2	0	0	0
441290	1	1	1	1	0	0	0
441336	1	1	1	1	0	0	0
441373	1	1	1	1	0	0	0
441455	1	1	1	1	0	0	0
441467	1	1	1	1	0	0	0
441470	2	4	1	1	0	0	0
441494	1	1	1	2	0	0	0
441525	1	1	1	1	0	0	0
441793	1	1	1	1	0	0	0
442121	1	1	1	1	1	0	0
442318	2	2	2	2	0	0	0
442807	1	1	1	1	0	0	0
442846	1	1	5	1	0	0	0
443019	3	3	3	3	0	0	0
443025	1	1	1	1	0	0	0
443027	1	1	1	1	0	0	0
443088	1	1	7	1	0	0	0
443101	1	1	1	1	0	0	0
443120	1	1	1	1	0	0	0
443129	1	1	1	1	0	0	0
Total	70	73	81	67	1	0	0

TSA: Agar Tripticasa Soya.

NBY: Agar Nutritivo Extracto de Levadura.

ANe: Agar nutritivo enriquecido con 0,2% extracto de levadura y 5% sucrosa.

YPGA: Agar Extracto de Levadura, Peptonado y Glucosado.

MCK: Agar Mac Conkey.

Sb: Agar Sabouraud 4% Glucosado.

CzDx: Agar Czapex Dox.

Tabla 6. Distribución de las cepas bacterianas de acuerdo al medio estudiado.

Código de cepa por medio de cultivo				
TSA	ANe	NBY	YPGA	MCK
5 – 10, 11 – 15, 19, 23 – 26, 29, 30, 33, 37 – 38, 44 – 48, 53 – 56, 62, 64, 67 – 69	1-2, 16, 31, 34, 39 – 40, 43, 50*, 51 – 52, 57 – 61, 66, 73, 77 – 81, 83 – 84	20 – 22, 27, 32, 35, 42, 49, 65, 71 – 72, 74 – 76, 82	4, 17 – 18, 28, 36, 41, 63, 70	3
TOTAL: 35	25	15	8	1

TSA: Agar Tripticasa Soya. **NBY:** Agar Nutritivo Extracto de Levadura. **ANe:** Agar nutritivo enriquecido con 0,2% extracto de levadura y 5% sucrosa. **YPGA:** Agar Extracto de Levadura, Peptonado y Glucosado. **MCK:** Agar Mac Conkey. (*) No se observaron colonias similares en otros medios.

Tabla 7. Frecuencia de 84 cepas bacterianas procedentes de 45 entradas de camote *in vitro*.

	Contaminantes bacterianos					Total Entradas
	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilos Gram negativos	Cocos Gram positivos	Bacilos Gram positivos no esporulados	Actinomiceto	
Total de Entradas	40 ⁽¹⁾	2	1	1	1 ⁽²⁾	45
(%)	(89)	(4,4)	(2,2)	(2,2)	(2,2)	(100)
Total de Cepas (%)	76 (90,5)	2 (2,4)	2 (2,4)	3 (3,6)	1 (1,1)	84 (100)

(1) Contaminación mixta con cocos Gram positivos: 3 entradas y con bacilos Gram positivos no esporulados: 1 entrada.

(2) En otras entradas se observaron colonias con similares características a esta cepa del actinomiceto.

Tabla 8. Identificación de bacterias aisladas de 45 entradas de camote *in vitro*.

Tipo de contaminantes bacterianos	Entradas N° CIP	
<i>Bacillus sp.</i> (Sin identificar)	400246	440517
	400467	440705
	420078	440730
	420134	441288
	420201	441373
	420296	441455
	420358	441467
	420488	441470
	420771	441494
	420787	441525
	420788	442318
	420898	442807
	420942	442846
	420950	443019
	420978	443025
	421851	443088
422258	443120	
422571	443129	
<i>Bacillus pumilus</i>	422655(*)	420374
Bacilos Gram positivos (no esporulados)	440317	440991(*)
Cocos Gram positivos	422581	420916(*)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	442121	
<i>Sphingomonas paucimobills</i>	440415	
Actinomiceto	440238	

(*): Contaminación mixta con *Bacillus sp*

Tabla 9. Caracterización de colonias de 84 cepas aisladas de plántulas *in vitro* de camote. Características culturales y celulares.

Código Cepa	Nº Entrada	Tamaño (mm de diámetro)	Borde	Textura (superficie)	Brillo	Forma	Elevación	Cromogénesis	Espora	Forma Celular	Gram
1	422581	3	entero	lisa	+	circular	convexo	melón	-	cocos	+
2	440238	ND	entero	lisa	+	circular	convexo	anaranjado	-	filamentos	+
3	442121	1	entero	lisa	++	circular	convexo	amarillo	-	bacilos	-
4	440415	0,5	entero	lisa	++	circular concéntrica	plano	-	-	bacilos	-
5	440317	1	entero	lisa	++	circular	convexo	amarillo intenso	-	bacilos	+
6	422571	2	irregular	rugosa	+	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
7	420358	6	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
8	400467	2	entero	lisa	+	circular	convexo	-	+	bacilos	+
9	400246	1	entero	lisa	+	circular	convexo	-	+	bacilos	+
10	420374	3	irregular	rugosa	+	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
11	420488	2	entero	lisa	+	ovoide	convexo	-	+	bacilos	+
12	420134	2	Irregular	rugosa	+	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
13	443120	2	entero	lisa	+	ovoide	convexo	-	+	bacilos	+
14	443129	2	entero	lisa	+	ovoide	convexo	-	+	bacilos	+
15	443025	6	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
16	442807	6	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
17	440730	6	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
18	441494	2,5	Irregular	rugosa seca	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
19	441494	6	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
20	441494	6	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
21	420787	2	entero	lisa	+	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
22	420078	2	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
23	441467	1,5	entero	lisa	+	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
24	420788	4	irregular	rugosa seca	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+

(continúa...)

Tabla 9 (continuación)

Código Cepa	Nº Entrada	Tamaño (mm de diámetro)	Borde	Textura (superficie)	Brillo	Forma	Elevación	Cromogénesis	Espora	Forma Celular	Gram
25	420771	3	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
26	420898	1,5	entero	lisa	+	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
27	440991	2,5	Irregular	rugosa	+	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
28	440991	2	Irregular	rugosa	+	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
29	440991	2	Irregular	rugosa	+	ovoide	plano	-	-	bacilos	+
30	440991	1,5	entero	rugosa	+	circular	plano	-	-	bacilos	+
31	420201	2	irregular	lisa	+	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
32	420201	2	irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
33	420978	1	Irregular/ entero	lisa	+	ovoide	convexo	-	+	bacilos	+
34	420950	1,5	entero	lisa	+	circular	convexo	-	+	bacilos	+
35	420950	2	Irregular	rugosa	+	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
36	441373	1	irregular	rugosa seca	opaco	circular	plano	-	+	bacilos	+
37	441373	2	entero	rugosa	+	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
38	441525	3	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
39	441525	3	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
40	441455	6	Irregular	rugosa seca	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
41	441455	6	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
42	440517	3	Irregular	rugosa	+	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
43	440705	8	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
44	442318	1	entero	lisa	opaco	circular	convexo	-	+	bacilos	+
45	442318	2	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
46	422655	2,5	irregular	rugosa	+	ovoide	convexo	-	+	bacilos	+
47	422655	5	irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
48	420916	1,5	entero	lisa	+	ovoide	convexo	-	+	bacilos	+
49	420916	1,5	entero	lisa	+	ovoide	convexo	amarillo	+	bacilos	+
50	420916	rocío	entero	lisa	++	circular	convexo	-	-	cocos	+
51	420942	2	irregular	rugosa	+	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
52	420942	3	Irregular	rugosa seca	+	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
53	420942	1	entero	lisa	+	ovoide	convexo	-	+	bacilos	+
54	443019	5	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+

(continúa...)

Tabla 9 (continuación)

Código Cepa	Nº Entrada	Tamaño (mm de diámetro)	Borde	Textura (superficie)	Brillo	Forma	Elevación	Cromogénesis	Espora	Forma Celular	Gram
55	443019	2	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
56	443019	6	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
57	442846	5	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
58	442846	7	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
59	442846	4	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
60	442846	6	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
61	442846	6	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
62	422258	2	irregular	rugosa seca	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
63	420296	3	entero	lisa	+	ovoide	convexo	-	+	bacilos	+
64	420296	3	entero	lisa	+	ovoide	convexo	-	+	bacilos	+
65	420296	3	entero	lisa	+	ovoide	convexo	-	+	bacilos	+
66	421851	2	entero	lisa	+	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
67	421851	0,5	entero	lisa	+	ovoide	convexo	amarillo	+	bacilos	+
68	421851	1	irregular	rugosa	+	circular	plano	-	+	bacilos	+
69	421851	2,5	irregular	rugosa seca	opaco	ovoide	plano	melón	+	bacilos	+
70	441288	2	Irregular	rugosa seca	+	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
71	441288	1	irregular	lisa	opaco	circular	convexo	-	+	bacilos	+
72	441288	<1	entero	lisa	+	circular	convexo	-	+	bacilos	+
73	441288	2	Irregular	rugosa	+	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
74	441470	3	entero	lisa	+	ovoide	convexo	-	+	bacilos	+
75	441470	1	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
76	441470	3	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
77	443088	6	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
78	443088	6	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
79	443088	6	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
80	443088	4	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
81	443088	6	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
82	443088	6	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
83	443088	6	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+
84	443088	6	Irregular	rugosa	opaco	ovoide	plano	-	+	bacilos	+

Tabla 10. Características culturales en medio TSA y principales características bioquímicas de 4 cepas de *Bacillus sp.* procedentes de entradas incluidas en los ensayos de eliminación de bacterias.

Nº CIP	420358	420916	443019	420978
Cepa	Nº 7	Nº 48	Nº 54	Nº 33
Características de colonia				
Diámetro (mm)	6	1-2	5-6	1
Borde	irregular festoneado	irregular festoneado	irregular	entero/irregular
Superficie	rugosa	rugosa	rugosa	lisa
Brillo ^(*)	opaco	+	opaca	+
Forma de colonia	ovoide	ovoide	ovoide	ovoide
Elevación	plano	plano	plano	convexo
Aspecto	seco	cremoso	seco	seco
Forma celular	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos
Tinción Gram	+	+	+	+
Características Bioquímicas				
Catalasa	+	ND	+	+
Oxidasa	-	-	-	d
Motilidad	+	ND	+	+
Reducción de nitratos en nitritos o en N ₂	-	-	-	-
Hidrólisis de Almidón	+	+	+	ND
Hemólisis	β	ND	β	ND
O/F glu	O	-	-	-

ND: No determinado, (*): Intensidad de brillo +++>++++, O/F: O, Oxidación; F, Fermentación; glu: Glucosa.

Tabla 11. Características culturales en medio TSA de 4 cepas de *Bacillus sp.* identificadas según el Sistema API.

Nº CIP Cepa	420374 Nº 10	422655 Nº 47	422655 Nº 46	420898 Nº 26
Características de colonia				
Diámetro (mm)	3	5	2,5	1,5
Borde	irregular ondeado	irregular ondeado	irregular	entero
Superficie	rugosa	rugosa	rugosa	lisa
Brillo(*)	+	opaco	+	+
Forma	ovoide	ovoide	ovoide	ovoide
Elevación	plano	plano	convexa	plano
Aspecto	cremoso	seco	semi cremoso	aceitoso
Forma celular	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos
Tinción Gram	+	+	+	+
Características bioquímicas				
Catalasa	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-
Motilidad	+	-	-	+
Reducción de nitratos en nitritos o en N ₂	-	-	-	-
Hidrólisis de Almidón	-	-	-	+
Hemólisis	-	β	β	-
Microaerofilia	ND	+	+	ND
Anaerobiosis	ND	-	ND	ND
O/F glu	-	-	F	-
O/F suc	F	F	ND	O
Nombre Científico	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>

ND: No determinado, (*): Intensidad de brillo +++>++++, O/F: O, Oxidación; F, Fermentación; glu: Glucosa; suc: Sucrosa.

Tabla 12. Características culturales en medio TSA y principales características bioquímicas de 2 cocos Gram positivos no identificados.

Nº CIP Cepa	422581 Nº 1	420916 Nº 50
Características de colonia		
Diámetro (mm)	2-3	diminutas
Borde	entero	entero
Superficie	lisa	lisa
Brillo ^(*)	+	++
Forma	circular	puntiforme
Elevación	convexo	convexo
Aspecto	cremoso	cremoso
Color	melón	incoloro
Forma celular	cocos en racimo, tétradas y pares	cocos en racimos, cadenas y tétradas, diminutos
Tinción Gram	+	+
Espora	-	-
Características Bioquímicas		
Catalasa	+	-
Reducción de nitratos en nitritos o en N ₂	+	ND
Motilidad	-	ND
Oxidasa	-	-
Liquefacción Gelatina	+	-
Hidrólisis de Almidón	-	-
Hemólisis	-	-
O/F glu	F	F
O/F suc	F	-
O/F man	F	-
TSI	A/K	ND

ND: No determinado, (*): Intensidad de brillo +++>+>+, A: Acidez, K: Básico, O: Oxidación; F: Fermentación; glu: Glucosa; suc: Sucrosa; man: Manitol.

Tabla 13. Características culturales y bioquímicas de una cepa de bacilos no esporulados Gram positivos no identificada.

Nº CIP	440317
Cepa	Nº 5
Características de colonia	
Diámetro (mm)	1
Borde	entero
Superficie	lisa
Brillo ^(*)	++
Forma	redonda
Elevación	convexo
Aspecto	con microfilm
Color	amarillo
Forma celular	bacilos
Tinción Gram	+
Características bioquímicas	
Catalasa	+
Reducción de nitratos en nitritos o en N ₂	-
Oxidasa	-
Liquefacción Gelatina	-
Hidrólisis de almidón	-
Hemólisis	-
Campo oscuro	diflagelado
Crecimiento en microaerofilia	+
Crecimiento en anaerobiosis	+
O/F glu	F

(*): Intensidad de brillo +++>++++, O/F: O, Oxidación; F, Fermentación; glu: Glucosa.

Tabla 14. Características culturales en medio TSA y principales características bioquímicas de *Stenotrophomonas maltophilia* (cepa N° 3) y *Sphingomonas paucimobilis* (Cepa N° 4) identificadas según el Sistema API.

N° CIP Cepa	442121 N° 3	440415 N° 4
Características de colonia		
Diámetro (mm)	1	0,5
Borde	entero	entero
Superficie	lisa	lisa
Brillo ^(*)	++	++
Forma	circular	circular concéntrica
Elevación	convexo	plano
Aspecto	cremoso	aceitoso
Color	amarilla	-
Forma celular	bacilos diminutos	bacilos curvos
Tinción Gram	-	-
Espora	-	-
Características bioquímicas		
Catalasa	-	+
Oxidasa	-	+
Motilidad	d	ND
Reducción de nitratos en nitritos o en N ₂	-	ND
Desarrollo en agar Mac Conkey	+	-
Hidrólisis de Almidón	ND	+

ND: No determinado, (*): Intensidad de brillo +++>++++, d: Dudoso

Tabla 15. Características culturales de una cepa de actinomiceto aislado de una entrada de camote.

Nº CIP Cepa	440238 Nº 2*
Características de colonia	
Diámetro (mm)	1-2
Borde	entero
Superficie	lisa
Brillo ^(*)	+
Forma	redonda
Elevación	convexo
Aspecto	cremoso
Color	anaranjado
Forma celular	filamentosa
Tinción Gram	+
Observación con Azul de lactofenol	filamentosa

Condiciones de cultivo: Incubación por 15 días a 30 °C y 15 días más a temperatura ambiente, (): Intensidad de brillo +++>+++>+

Tabla 16. Cepas bacterianas identificadas en plántulas de camote *in vitro* empleando la prueba de identificación rápida del Sistema API.

Código de cepa	Sistema API	Nivel de Identificación (%)	Identificación
7	API 50CHB	Perfil inaceptable	No determinado (<i>Bacillus sp.</i>)
26	API 50CHB	Débil discriminación	No determinado (<i>Bacillus sp.</i>)
48	API 50CHB	Débil discriminación	No determinado (<i>Bacillus sp.</i>)
10	API 50CHB	Muy adecuada discriminación (99,8)	<i>Bacillus pumilus</i>
47	API 50CHB	Muy adecuada identificación (99,8)	<i>Bacillus pumilus</i>
3	API 20E	Muy adecuada identificación (99,9)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
4	API 20NE	Muy adecuada identificación (95,9)	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>

Tabla 17. Sensibilidad a antibióticos de 11 cepas de *Bacillus sp.*, 1 cepa de bacilos Gram (+) y 2 cepas de cocos Gram positivos no esporulados, según NCCLS (1997)

Tipo bacteriano	Código de cepa	Tipo de Antibiótico													
		RA	Cif	P	S	T	Er	GM	DO	L	FD	CRO	SXT	CTX	M
<i>Bacillus sp.</i>	7*	I	I	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
	56	I	I	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
	10	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	47	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
	46	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ND	S	S	S	S
	26	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
	33*	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S
	48*	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S
	58	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
	29	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
79	R	R	R	R	S	S	S	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Bacilos Gram (+)	5*	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cocos Gram (+)	1*	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	50*	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S

(*) Cepas procedentes de entradas ensayadas en los tratamientos de eliminación de bacterias.

S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente, ND: no determinado.

Tabla 18. Sensibilidad a antibióticos de *Stenotrophomonas maltophilia* y *Sphingomonas paucimobilis*

Cepa	Tipo de Antibiótico											
	Cif	AM	S	KN	RA	CRO	CTX	PB	M	P	T	
<i>Stenotrophomonas maltophilia*</i>	I	R	S	S	S	S	S	S	ND	ND	S	
<i>Sphingomonas paucimobilis*</i>	I	R	R	S	R	I	I	R	S	I	ND	

(*) Cepas procedentes de entradas ensayadas en los tratamientos de eliminación de bacterias.

S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente, ND: no determinado.

Tabla 19. Entradas ensayadas en los tratamientos de eliminación de bacterias mediante el cultivo de meristemas empleando Plant Preservative Mixture (PPM) e hipoclorito de sodio.

Entradas N° CIP	Nombre del Cultivar	País	Tipo de bacteria
440238	Fong-su #1	China	Actinomiceto (no identificado)
440048	Francia	Puerto Rico	No identificada(*)
422581	El Padre Morado	Perú	Cocos Gram positivos (no identificados)
440317	AVRDC-CN 1489- 89	Taiwán	Bacilos Gram positivos (no identificados)
420358	Jacallino	Perú	<i>Bacillus sp.</i>
420916	Morado	Perú	
443019	-	Nigeria	
420978	no conocido	Perú	
440415	Wanmunamb	Papua Nueva Guinea	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>

(*): Bacterias con colonias similares a la cepa del actinomiceto.

Tabla 20. Eliminación de bacterias mediante el cultivo de meristemos de plántulas tratadas con desinfectantes aplicando 3 tratamientos.

Tratamiento	Entradas N° CIP	Total meristemos	Meristemos (2 meses de cultivo)		Meristemos (4 meses de cultivo)	
			Sobrevivencia ⁽¹⁾ (%)	Sin bacterias ⁽²⁾ (%)	Sobrevivencia sin bacterias ⁽³⁾ (%)	Recuperación ⁽⁴⁾ (%)
1. Hipoclorito de Sodio (2,5%)	440317	6	33	100	0	0
	420358	10	60	100	0	0
	443019	10	50	100	20	0
	420916	10	100	100	0	0
	420978	14	50	86	17	17
	422581	12	8	100	0	0
	440415	8	0	0	0	0
	440238	6	50	100	0	0
	440048	6	33	100	0	0
	Total	82	44	97	6	3
2. PPM 5% y PPM 0,1%	440317	10	0	0	0	0
	420358	8	13	0	0	0
	443019	9	33	33	0	0
	420916	11	9	100	0	0
	420978	13	62	50	100	75
	422581	13	31	100	25	25
	440415	12	17	100	0	0
	440238	8	0	0	0	0
	440048	8	25	100	0	0
	Total	92	23	67	36	29
3. PPM 0,1%	440317	9	11	100	0	0
	420358	11	45	40	0	0
	443019	12	25	33	0	0
	420916	10	20	50	0	0
	420978	11	82	44	75	75
	422581	10	40	100	50	50
	440415	11	18	100	0	0
	440238	12	8	0	0	0
		6	31	56	0	0
<i>Tabla 20 (continuación)</i>						
	Entradas N° CIP	Total meristemos	Meristemos (2 meses de cultivo)		Meristemos (4 meses de cultivo) (continúa...)	

Tratamiento			Sobrevivencia ⁽¹⁾ (%)	Sin bacterias ⁽²⁾ (%)	Sobrevivencia sin bacterias ⁽³⁾ (%)	Recuperación ⁽⁴⁾ (%)
Control	440317	17	100	41	43	43
	420358	14	64	44	75	75
	443019	10	60	67	50	50
	420916	7	43	100	0	0
	420978	10	60	17	0	0
	422581	23	48	100	73	73
	440415	17	59	100	0	0
	440238	6	17	0	0	0
	440048	16	100	25	0	0
Total	120	66	56	36	36	

(1) Sobrevivencia del total de meristemos. (2) Meristemos sin bacterias de los sobrevivientes. (3) Meristemos sobrevivientes y (4) meristemos recuperados del total de meristemos sin bacterias.

PPM: Plant Preservative Mixture.

Tabla 21. Eliminación de bacterias mediante el cultivo de meristemos procedentes de plántulas de camote *in vitro* contaminadas con *Bacillus sp.*, tratados con una solución de rifampicina (100 mg/L) incorporada en medio de cultivo de meristemos durante 15 ó 30 días.

Tratamiento	Entradas Nº CIP	Total de meristemos	Meristemos (2 meses de cultivo)		Meristemos (4 meses de cultivo)	
			Sobrevivencia ⁽¹⁾ (%)	Sin bacterias ⁽²⁾ (%)	Sobrevivencia sin bacterias ⁽³⁾ (%)	Recuperación ⁽⁴⁾ (%)
1. Meristemos (0,5-0,8 mm) tratados 30 días	420358	10	100	80	38	38
	443019	8	100	50	25	25
	420978	8	100	50	25	25
	Total	26	100	62	31	31
2. Meristemos (0,5-0,8 mm) tratados 15 días	420358	5	63	40	0	0
	420978	6	100	33	50	50
	Total	11	79	36	25	25
3. Meristemos (0,2-0,4 mm) tratados 30 días	420358	7	78	71	0	0
	443019	8	100	50	75	50
	420978	7	88	29	50	50
	Total	22	94	73	36	27
4. Meristemos (0,2-0,4 mm) tratados 15 días	420358	9	60	56	0	0
	443019	3	60	100	33	33
	420978	8	89	50	0	0
	Total	20	69	60	8	8
Control	420358	9	64	44	75	75
	443019	6	60	67	50	50
	420978	6	60	17	0	0
	Total	21	60	75	56	56

(1) Sobrevivencia del total de meristemos. (2) Meristemos sin bacterias de los sobrevivientes.

(3) Meristemos sobrevivientes y (4) meristemos recuperados del total de meristemos sin bacterias.

Tabla 22. Eliminación de bacterias mediante la reintroducción a *in vitro* de plantas tratadas en invernadero derivadas de plántulas de camote *in vitro* contaminadas.

	Entradas Nº CIP	Total Esquejes reintroducidos	Total Esquejes sin bacterias	Plántulas sin bacterias ⁽¹⁾ (%)	Éxito ⁽²⁾ (%)
Control	420358	13	10	77	100
	440317	18	11	61	100
	443019	15	13	87	100
	420978	17	14	82	100
	422581	12	12	100	100
	442121	7	6	86	100
	440415	11	10	91	100
	440238	11	8	73	100
	440048	18	17	94	100
1. Plantas tratadas con 0,5 mL/L Dimanin	420358	14	13	93	100
	440317	10	6	60	100
	443019	8	6	75	100
	420978	15	13	87	100
	422581	12	11	92	100
	442121	7	6	86	100
	440415	10	9	90	100
	440238	6	6	100	100
	440048	9	6	67	100

(1) Porcentaje de plántulas sin bacterias sobre el total de esquejes reintroducidos. (2) Porcentaje de plántulas sin bacterias en el segundo subcultivo.

VI. DISCUSIÓN

Van den Houwe & Swennen (2000) diagnosticó en banano que 4,5 % de la colección mundial conservada *in vitro* presentaba contaminación bacteriana. En el presente trabajo, como resultado de un diagnóstico visual de contaminación, se encontró contaminados 3,7% de las 3545 entradas de la colección de camote *in vitro*. Este resultado podría ser relativamente diferente si se realizarán pruebas bacteriológicas de diagnóstico en toda la colección de camote *in vitro*. De esta manera se podría tener un diagnóstico apropiado y específico, a fin de detectar los microorganismos que causan deterioro de los materiales en conservación *in vitro*. Mediante el empleo de medios de cultivo apropiados y la práctica de esta prueba bacteriológica en repetidas veces, ya sea antes o durante cada subcultivo, se obtendría un diagnóstico que facilite la eliminación total de los contaminantes (Holdgate & Zandvoort, 1997).

Leifert *et al.* (1994) sugirió que el cultivo de piezas de material vegetal en medios bacteriológicos favorece la detección de bacterias latentes y un amplio rango de diferentes contaminantes de origen bacteriano (Leifert & Woodward, 1997). Así, al realizar el aislamiento bacteriano, el medio de cultivo empleado que destacó por facilitar la expresión de todas las cepas de bacterias aisladas fue el medio agar nutritivo enriquecido con 0,2% extracto de levadura y 5% sucrosa (ANe). Lo que podría ser debido a que el caldo nutritivo con 5% de sucrosa permite evidenciar mejor el desarrollo microbiano (Leggatt & Waites, 1988). Este resultado coincide a lo recomendado por Reed *et al.* (1997), Niedz (1998) y Van den Houwe & Swennen (2000) para lograr la detección de microorganismos contaminantes, además es de fácil preparación en cualquier laboratorio de cultivo de tejidos vegetales y es más económico. En cambio Leifert *et al.*, 1989, detectó 20 especies de bacterias contaminantes empleando Caldo Nutritivo Extracto de levadura (NBY; Shaad, 1988). El uso del caldo nutritivo enriquecido de la misma manera que el ANe es una alternativa apropiada en el diagnóstico bacteriano de cultivos sospechosos de contaminación o para el descarte de la misma. La temperatura de cultivo recomendada es de 30 °C y el tiempo de cultivo debe de extenderse de 15 días hasta 1 mes en casos de dudoso diagnóstico e incluso deberían desarrollarse pruebas complementarias de diagnóstico.

La contaminación bacteriana estudiada en sólo 61 entradas de camote *in vitro* de las 76 procesadas, es causada por bacterias cultivables. Las otras 15 entradas (19,7%) contaminadas al no producir ningún tipo de aislamiento bacteriano, posiblemente pueda

deberse a: 1) que los signos observados aunque evidentes en 13 de estas entradas (presencia de un halo blanquecino o una nubosidad en la base del tallo de poca expansión) no se produjeron por microorganismos sino por algún exudado de la planta; y 2) que la manifestación de los signos observados se debieron a la presencia de algún tipo de bacteria no cultivable o muy exigente (Debergh & Vanderschaeghe, 1988). Esto podría explicarse si los medios de cultivo empleados no cumplen con todas las exigencias nutricionales de los microorganismos presentes, o quizás la técnica empleada pudo no ser la adecuada en el caso de tratarse de microorganismos no cultivables. Para confirmar estas hipótesis debería realizarse estudios más minuciosos que impliquen técnicas microscópicas o serológicas (Holdgate & Zandvoort, 1997).

Al analizar el origen de procedencia de las 76 entradas de camote estudiadas se tiene que las entradas contaminadas de Perú representan el 36%. En el caso de entradas procedentes de otros países, Nigeria presenta el mayor porcentaje de entradas contaminadas (20 %). Al revisar los antecedentes se sabe que las entradas de Perú antes de ser introducidas a *in vitro* fueron cultivadas en campo, en cambio las entradas procedentes de otros países, fueron transferidas directamente a *in vitro* o introducidas desde invernadero por transferencias o donaciones (CIP, 1988; CIP, 1990). Podría ser quizás una de las causas de contaminación que el material extranjero transferido a *in vitro* portara ya sea una carga bacteriana latente o tal vez la contaminación ocurrió en campo pasando inadvertida luego de su introducción a *in vitro*, en el caso de entradas procedentes de Perú.

La caracterización de las cepas aisladas procedentes de 45 entradas reveló que *Bacillus sp.* es el responsable del 89% de la contaminación presente en los cultivos de camote *in vitro*. Esto se asemeja a lo reportado por Egúsqiza (1996), donde *Bacillus circulans* fue el responsable de la mayor parte de la contaminación de 50 entradas analizadas.

Bacillus sp. además representa el 90,5% del total de cepas aisladas y se caracteriza por ser catalasa positivo y oxidasa negativa. El perfil dado por la prueba de API dio como resultado una buena identificación de 2 cepas de *Bacillus pumilus*, bacteria que también fue aislada de cultivos *in vitro* de plantas acuáticas (Kneifel *et al.* 1997), de papa (Isenegger *et al.*, 2003) y de banano (Van den Houwe & Swennen, 2000). Las cepas aisladas de *B. pumilus* en banano fueron oxidasa positivo a diferencia del presente

trabajo. Esta diferencia podría explicarse a la variabilidad que existe entre cepas de una misma especie.

Bacillus sp. fue la principal causa de contaminación en los cultivos *in vitro* de camote del presente estudio, así también representa uno de los contaminantes más comunes reportados por otros autores para laboratorios de cultivo de tejidos *in vitro* de diversas especies vegetales. Así también, se le relaciona a *Bacillus sp.* como un microorganismo endófito (Zenkter *et al.*, 1997; Isenegger *et al.*, 2003).

Se encontró como responsables de la menor parte de la contaminación de camote *in vitro* a cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* y *Sphingomonas paucimobilis* identificadas empleando API 20NE. Asimismo se encontró cepas no identificadas 2 de cocos y 2 de bacilos Gram positivos y 1 cepa de actinomicetos, las cuales también han sido reportados como contaminantes *in vitro* (Leifert *et al.*, 1989; Tahmatsidou & Cassells, 1997; Zenkter *et al.*, 1997; Tanprasert & Reed, 1997; Mantell, 1997).

Stenotrophomonas maltophilia ha sido reportado como patógeno ocasional de humanos, sin embargo, es un saprófito que se encuentra en el ambiente, en el agua y como parte de la flora del suelo y en las plántulas, aunque no es considerado parte de la flora normal humana de la piel o de la flora gastrointestinal (Kingston General Hospital Infection Control Service, www.kgh.on.ca/kgh/). Esta bacteria también se encuentra presente en las pudriciones bacterianas pero no como el agente causal (Hayward, A. 1983). Zenkter *et al.* (1997) presenta a *Stenotrophomonas maltophilia* como patógeno de plantas, más de acuerdo a nuestros resultados, esta bacteria no se comporta en invernadero como un patógeno de camote. Referencias clínicas para esta bacteria muestran que es sensible a trimetropin sulfametoxazol, ciprofloxacino y gentamicina, antibiogramas que no fueron probados para esta cepa, pero si se encontró que ésta cepa y *Sphingomonas paucimobilis* fueron sensibles a kanamicina.

Bacillus sp. y las otras bacterias comúnmente encontradas en los cultivos de tejidos que no son patógenas en campo, ven favorecido su desarrollo en *in vitro* gracias a la presencia de su espora y al gran enriquecimiento de los medios de cultivo de plantas por la sucrosa (3%), crecimiento que se ve manifestado en la mayoría de signos microbianos detectados en los cultivos *in vitro*. El hábitat u origen de *Bacillus sp.* es diverso pues puede aislarse de todo tipo de ambiente natural incluyendo el de plantas como parte de la filoplana (Epton, 1997) y hasta en el mismo ambiente de laboratorio. La

diseminación de esta bacteria se ve favorecida por las esporas que son capaces de sobrevivir y resistir a condiciones extremas ambientales como altas temperaturas e incluso resistir a procesos de autoclave a 121 °C por 20 min en el caso de *B. circulans* (Trick & Lingens, 1985 citado por Van den Houwe & Swennen, 2000).

La posible fuente de contaminación con las esporas de *Bacillus sp.* en el cultivo de camote podría estar en el agua de riego o en el suelo durante su cultivo en campo o invernadero; en recipientes o en medios de cultivo insuficientemente esterilizados como *B. pumilus* (Leifert & Woodward, 1997).

Es posible, que los cultivos de camote pudieran haberse contaminado durante la renovación del germoplasma mediante prácticas inadecuadas de asepsia durante su manipulación o propagación durante largos periodos de tiempo (Leifert *et al.*, 1989; Leifert & Woodward, 1997; Van den Houwe & Swennen, 2000). Una fuente de contaminación la constituye la piel de los operadores, debido a que *Bacillus sp.* puede llegar ha ser un microorganismo transitorio en la piel (Weller, 1997); otra fuente pudo ser el alcohol que al usarse como desinfectante de las herramientas e incineradas por periodos insuficientes de tiempo, las esporas de *Bacillus sp.*, como *B. circulans*, lograron resistir y contaminar los cultivos (Leifert & Woodward, 1997).

Otra posibilidad podría ser que la contaminación se hubiese manifestado luego de un largo periodo de latencia desde su transferencia a *in vitro*, posiblemente debido a que las plantas permanecieron infectadas con microorganismos localizados internamente en el tejido vegetal (Gunson & Spencer, 1994; Tanprasert & Reed, 1997; Leifert & Cassells, 2001) ya sea vegetativamente o en forma esporulada, haciendo difícil que un proceso de desinfección superficial pudiera eliminarla (Leifert & Woodward, 1997). Estas bacterias pudieron permanecer latentes en el caso de *Stenotrophomonas maltophilia* y *Sphingomonas paucimobilis* hasta que las condiciones ambientales *in vitro* favorecieron su crecimiento, o hasta que, en el caso de *Bacillus sp.*, las esporas germinaron.

En el presente trabajo se ensayó el cultivo de meristemos de tamaño menor a 1 mm (con 2 primordios a más) de plántulas contaminadas *in vitro*. La sobrevivencia y recuperación de meristemos libres de bacteria fue baja, posiblemente debido a daños sufridos durante su manipulación, por ser un proceso delicado al requerirse aislar meristemos muy pequeños (Toledo *et al.*, 1998) donde el riesgo está en no disectar los primordios acompañantes al domo del meristemo, pues de lo contrario se le daña

(Holdgate & Zandvoort, 1997). La tasa de sobrevivencia y de recuperación de meristemos infectados tiende a ser baja en términos de porcentaje (2-40%) (Holdgate & Zandvoort, 1997) dependiendo del tipo de contaminante; del tamaño y genotipo del meristemo; de la habilidad del operador para aislarlos y del pre-tratamiento empleado (Holdgate & Zandvoort, 1997; Van den Houwe & Swennen, 2000). Posiblemente, donde la bacteria aún persistió no permitió el establecimiento de los meristemos, y el período de tiempo en el cual los meristemos se vieron afectados fue en las primeras semanas, tal y como lo demuestran los resultados de sobrevivencia de meristemos contaminados de *Hidrangea sp.*, donde el período de sobrevivencia osciló entre 5 a 15 días de cultivo (Tahmatsidou & Cassells, 1997).

Los resultados de sobrevivencia y recuperación de meristemos cultivados obtenidos en este trabajo se diferencian a los obtenidos por Van den Houwe & Swennen (2000) en plántulas *in vitro* de banano de 4 entradas contaminadas con *Bacillus circulans* donde el cultivo de meristemos (1 mm) de plántulas *in vitro* y el cultivo de meristemos (1-10 mm) de plantas mantenidas en invernadero con 10-20 réplicas por entrada permitió obtener 72-85% de sobrevivencia siendo su mejor resultado para una entrada el de 72% de sobrevivencia con el 100% de éxito en la eliminación de bacterias.

Según los resultados del cultivo de meristemos empleando soluciones desinfectantes, el mejor tratamiento fue el cultivo de meristemos aplicando hipoclorito de sodio (2,5%). Con este tratamiento se obtuvo 97% de éxito del 44% de meristemos sobrevivientes. Esta diferencia al no ser significativa implica que aplicar el cultivo de meristemos para lograr la eliminación de bacterias es mejor con un 56% del 66% de meristemos sobrevivientes.

Según los resultados de la eliminación de bacterias de 3 entradas mediante el cultivo de meristemos aplicando rifampicina a 100 mg/L no se obtuvo diferencia estadística alguna entre los tratamientos y el control. Estos resultados se contrastan a los obtenidos por Van den Houwe & Swennen (2000) quienes ensayaron el uso de rifampicina a 100 mg/L en ápices cultivados, obteniendo mejores resultados a los 30 días con el 100 % de sobrevivencia y el 100% de éxito en la eliminación de *Bacillus circulans*. Se logró obtener plántulas libres de bacterias a partir de todas las entradas con rifampicina durante el cultivo de meristemos. El mejor resultado similar al del control se obtuvo en meristemos de 0,2-0,4 mm de tamaño tratados con rifampicina por 30 días (Tratamiento 3) donde el porcentaje de sobrevivencia fue de 94% de los cuales en 73% se logró la eliminación de bacterias. Al comparar las medias de los resultados, esto cambia, el mejor resultado

diferente del control fue obtenido con el Tratamiento 1 (tratamiento con rifampicina en meristemos de 0,5-0,8 mm de tamaño por 30 días). Este tratamiento permitió obtener 62% de sobrevivencia de los meristemos aislados y de éstos el 100% no presentaron bacterias. En este trabajo se observó que una de éstas entradas contaminadas con *Bacillus sp.* presentó resistencia intermedia a rifampicina, sin embargo en este experimento se logró obtener meristemos libres de bacterias, lo que posiblemente pueda deberse a la concentración de rifampicina (100 mg/L) en combinación del éxito que se tiene con el cultivo de meristemos donde la carga bacteriana suele ser mínima o nula.

Szendrak *et al.* (1997) señaló que plantas frescas provenientes de invernadero, usadas como fuente de explantes, proveen material vegetal vigoroso y mucho más limpio que de campo. Según esto y de acuerdo al protocolo de trabajo del CIP, los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que la mejor alternativa para controlar el problema de contaminación de origen bacteriano producido por *Bacillus sp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Sphingomonas paucimobilis*, cocos y bacilos Gram positivos y actinomicetos es llevar plántulas contaminadas a invernadero y cultivarlas sin necesidad de aplicar ningún desinfectante como tratamiento, para luego realizar su reintroducción a *in vitro* previa desinfección y desinfestación. De acuerdo a los resultados de 9 entradas ensayadas durante el primer subcultivo se obtiene 83% de plántulas libres de bacterias del total de explantes reintroducidos; y durante el segundo subcultivo se obtiene 100% de éxito de plántulas recuperados libres de bacterias. El éxito en la eliminación de bacterias mediante una nueva introducción *in vitro* de las entradas, también nos indica que probablemente hay problemas en la manipulación de los cultivos durante su propagación y mantenimiento durante largos períodos de tiempo. Son necesarios mayores ensayos donde se realice el seguimiento de las entradas durante 4 o más subcultivos y además de evaluaciones periódicas subsiguientes.

Como resultado de los 2 primeros experimentos realizados para lograr la eliminación de bacterias en entradas de camote contaminadas, se tiene que en cualquier caso ya sea aplicando desinfectantes (PPM o hipoclorito de sodio) o antibiótico (rifampicina), el cultivo de meristemos resulta útil sin necesidad de aplicar algún tratamiento complementario. El problema de aplicar el cultivo de meristemos radica en el bajo porcentaje de sobrevivencia de los meristemos, a lo cual se le suma el tiempo prolongado de cultivo y la mano de obra invertida en su mantenimiento. Debido a esto también se tiene un bajo porcentaje de recuperación de las plántulas ensayadas aplicando el cultivo de meristemos, por lo que no se pudo incluir estos datos en el análisis estadístico. Además

para concluir que el cultivo de meristemos es efectivo en la eliminación de bacterias se requeriría de mayores pruebas en entradas afectadas con otro tipo de contaminantes. En cambio en el tercer experimento donde las plántulas de entradas contaminadas se transplantan y cultivan en condiciones de invernadero para luego ser reintroducidas a *in vitro*, se tienen mejores resultados de sobrevivencia y 100% de éxito en la eliminación de bacterias. Si aceptamos que la mayoría de estas bacterias no son patogénicas en plantas cultivadas en invernadero, posiblemente no encuentran las condiciones adecuadas para su crecimiento y translocación en la planta, lo cual favorece su eliminación mediante el cultivo *in vitro*. Esta hipótesis deberá ser tratada mediante investigaciones adicionales.

Así, para eliminar al tipo de bacterias aisladas en este trabajo, la reintroducción *in vitro* resulta ser el mejor método, no siendo necesario el uso de algún tipo de desinfectante durante el crecimiento en invernadero.

VII. CONCLUSIONES

1. Se detectó contaminación bacteriana en 3,7% de cultivos *in vitro* de camote conservados en el Banco de germoplasma mantenido por el Centro Internacional de la Papa.
2. El agar Trypticasa Soya y el agar nutritivo enriquecido con 0,2% extracto de levadura y 5% sucrosa permitieron discriminar un mayor número de colonias distintas, siendo los contaminantes bacterianos identificados como *Bacillus sp.*, *Bacillus pumilus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Sphingomonas paucimobilis* y otros sin determinar, donde *Bacillus sp.* predominó en 89% de las entradas *in vitro* de camote analizadas.
3. Todas las cepas estudiadas fueron sensibles a 5 antibióticos (tetraciclina, eritromicina, gentamicina, doxiciclina y lincomicina), excepto *Stenotrophomonas maltophilia* y *Sphingomonas paucimobilis* que sólo fueron sensibles a kanamicina.
4. El cultivo de meristemas sin ningún tratamiento con desinfectantes, aplicado como método de eliminación de bacterias fue mejor en cuanto a mayor número de meristemas sobrevivientes libres de bacterias obtenidos.
5. El tratamiento con hipoclorito de sodio fue el que mejor eliminó a las bacterias de los meristemas cultivados a comparación del control y de los otros dos tratamientos empleando PPM; estos últimos fueron los más severos ocasionando un número reducido de meristemas sobrevivientes.
6. En el tratamiento con rifampicina de meristemas de 0,5-0,8 mm por 30 días se obtuvo mayor número de meristemas sobrevivientes libres de bacterias en comparación al control.
7. El método de reintroducción *in vitro* es el más eficiente, dado que permite obtener plántulas libres de bacterias sin necesidad de tratamientos durante el crecimiento en invernadero.

VIII. RECOMENDACIONES

- Es recomendable estudiar la naturaleza de las cepas aisladas de *Bacillus sp.* para determinar si son endófitas, patogénicas o antagonistas.
- Para confirmar la ausencia de contaminantes se debe realizar evaluaciones periódicas de detección bacteriana en la colección de germoplasma de camote mantenido *in vitro* en el CIP.
- Se recomienda evaluar la eficiencia del protocolo de reintroducción *in vitro* con un mayor número de entradas que incluya una mayor variedad de contaminantes bacterianos.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUSTIN, D. 1988. Nomenclatural changes in the *Ipomea batatas* complex (Convolvulaceae). Reprinted from Taxon. Vol. 37, No. 1, February. The International Association for Plant Taxonomy. United States of America.
- AUSTIN, D. F. 1997. Convolvulaceae (Morning Glory Family). Published on at <http://www.fau.edu/divdept/biology/people/paper.htm>
- BABAOGU, M. & YORGANCILAR. 2000. TDZ-specific plant regeneration in salad burnet. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 440: 31-34.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. 1986. Ed. William & Wilkins. Vol. 1: 964 pp., Vol. 2: 965-1599 pp. Baltimore. USA.
- BOXUS & TERZI, J.M. 1988. Control of accidental contaminations during mass propagation. Acta Horticulturae, 225: pp.189-191.
- BRADBURY, J.F. 1988. Identification of cultivable bacteria from plants and plant tissue cultures by use of simple classical methods. Acta Horticulturae, 225: pp. 27-37.
- CASSELLS, A. C. & TAHMATSIDOU. 1996. The influence of local plant growth conditions on non-fastidious bacterial contamination of meristem-tips of *Hydrangea* cultured in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 47: 15-26.
- CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. 1988. Informe Anual del CIP, 1988. Lima, Perú. 226 p.
- CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. 1990. Informe Anual del CIP, 1990. Lima, Perú. 284 p.
- CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. 2004. CIP Annual Report, 2004. Lima, Perú. 86 p.
- CLARK, C. A. & MOYER, J. W. 1991. Compendio de enfermedades de la batata (camote, boniato). Traducido de "Compendium of Sweet Potato Disease", 1988,

por Teresa Ames de Icochea. Publicado por Centro Internacional de la Papa, pp.1-14. Lima-Perú.

- CRONQUIST, A. 1995. Botánica Básica. Ed. Continental, S. A. de C. V. ed. 2^{da}. Pág. 491-507. México.
- CRONQUIST, A. 2005. Clasificación Taxonómica de las Angiospermas. Fuente en la Web: <http://thierry.jouet.free.fr/Sommaire/cronquist.htm>.
- DEBERGH & VANDERSCHAEGHE. 1988. Some symptoms indicating the presence of bacterial contaminants in plant tissue cultures. *Acta Horticulturae*, 225: 77-81.
- DIGONZELLI, P.; DÍAZ, L. Y CARRRIZO DE BELLONE, S. 2005. Uso del PPM (Plant Preservative Mixture) para controlar contaminantes bacterianos en la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 22:22-32.
- DODDS, J; A. PANTA; J. BRYAN. 1991. Transporte, recepción y propagación de plántulas de batata *in vitro*. Guía de investigación Centro Internacional de la Papa, Lima-Perú. 17pp.
- EPTON, H. A. S. 1997. Epiphytic bacteria: activities, risks and benefits. In: Cassells, A. C., ed. *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, pp. 299-308.
- ESPINOZA, N., LIZÁRRAGA, R., SIGUEÑAS, C., BUITRÓN, F., BRYAN, J. & DODDS, J. H. 1992. Tissue culture: Micropropagation, conservation, and export of potato gemoplasm. CIP Research Guide 1. International Potato Center, Lima, Perú.
- EGÚSQUIZA FLORES, VERÓNICA. 1996. Erradicación bacteriana del germoplasma de camote *Ipomoea batatas* L. (Lam). Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo. Universidad Ricardo Palma. Lima-Perú.
- FAOSTAT. 2001. Statistics Database (Online). Available HTTP: <http://apps.fao.org>

- GOLMIRZAI, A. M. & PANTA, A. 1997. Tissue culture methods and approaches for conservation of root and tuber crops. In M. K. Razdan and E. C. Cocking. Conservation of Plant Genetic Research *in vitro*. Vol. 1. General aspects. Science Publishers JNC, USA, p. 123-152.
- GUNSON, H. E. & SPENCER-PHILLIPS, P.T.N. 1994. Latent bacterial infections: epiphytes and endophytes as contaminants of micropropagated plants. In P. J. Lumsden, J. R. Nicholas and W. J. Davies (eds). Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. p. 379-396. Kluwer Academic Publishers in the Netherlands.
- HOLDGATE & ZANDVOORT. 1997. In: Cassells, A. C., ed. Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, p.15-22.
- HAYWARD, A. 1983. Primary differentiation of the genera of plant pathogenic bacteria. In: Plant bacterial diseases. Academy Press Australia. pp. 13-26.
- ISENEGGER, D. A.; TAYLOR, P. W.; MULLIS, K.; MCGREGOR, G. R.; BARLASS, M. & HUTCHINSON, J. F. 2003. Molecular detection of a bacterial contaminant *Bacillus pumilus* in symptomless potato plant tissue cultures. Plant Cell Rep. 21: 814-820.
- KANE, M. 1995. Bacterial and fungal indexing of tissue cultures. Department of Environmental Horticulture. University of Florida.
www.hos.ufl.edu/mooreweb/tissueCulture/May%2014/indexing.htm
- Kingston General Hospital Infection Control Service, www.kgh.on.ca/kgh/
- KNEIFEL, W; LEONHARDT, W. & FASSLER, M. 1997. Identification and antibiotic sensitivity of bacterial contaminants isolated from *in vitro* of some tropical aquatic plants. In: Cassells, A. C., ed. Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, p.193-199.

- KUNNEMAN, B. P. A. M. & FAAIJ-GROENEN, G. P. M. 1988. Elimination of bacterial contaminants: A matter of detection and transplanting procedures. *Acta Horticulturae*, 225: 183-188.
- LEGGATT & WAITES. 1988. Characterization of microorganism isolated from plants during micropropagation. *Acta Horticulturae*, 225: 93-102.
- LEIFERT, C.; WAITES, W.M. & NICHOLAS, J.R. 1989. Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. *Journal of Applied Bacteriology*, 67: 353-361.
- LEIFERT, C. & CASSELLS, A. C. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 37:133-138, March-April.
- LEIFERT, C. & WOODWARD, S. 1998. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52: 83-88.
- LEIFERT, CARLO & WOODWARD, STEPHEN. 1997. Laboratory contamination management; the requirement for microbiological quality assurance. In: Cassells, A. C., ed. *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, pp. 237-244.
- LEIFERT, CARLO; MORRIS, CINDY E. & WAITES, WILL M. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: rehasnos for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(2): 139-183.
- LIZÁRRAGA, R.; PANTA, A.; ESPINOZA, N. & DODDS, J. H. 1990. Cultivo de tejidos de *Ipomoea batatas*. Micropropagación y conservación. Guía de Investigación CIP 32. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 22 p.
- LIZARRAGA, R., PANTA, A., JAYASINGHE, U. & DOODS, J.H. 1991. Tissue culture for elimination of pathogens. CIP Research Guide 3. International Potato Center. Lima, Perú, p. 21.

- MAZA, C.; LEÓN, J.; PANTA, A. & ROCA, W. 2004. Caracterización de bacterias contaminantes en el germoplasma *in vitro* de camote, *Ipomoea batatas* L. (Lam.). XVIII Congreso Peruano de Fitopatología. Libro de Programa y Resúmenes. Asociación Peruana de Fitopatología, pág. 28. Facultad de Ciencias Agrarias-UNASAM. Huaraz-Perú.
- MANTELL, SINCLAIR H. 1997. Microbes intimately associated with tissue and cell cultures of tropical *Dioscorea* yams. In: Cassells, A. C., ed. Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, pp.131-138.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15, 473-497.
- NCCLS. 1997. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility test. NCCLS Document M2-A6. 5th edition. Approved standard. Vol. 17. N°1.
- NIEDZ, R. P. 1998. Using isothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. *Hort Technology* 8(4), October-December. pp. 598-601.
- REED, B & TANPRASERT, P. 1995. Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. December, Vol. 1 No.3. pp. 137-142.
- REED, BARBARA M., MENTZER, JESSICA, TANPRASERT, PIYARAK & YU, XIAOLING. 1997. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: Identification and antibiotic treatment. In: Cassells, A. C., ed. Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, pp. 169-174.
- SEVILLA, R & HOLLE, M. 2004. Recursos genéticos vegetales. Ed. Luis León Asociados S. R. L. ed. 1^{era}. Perú. 445 p.

- SHAAD, N. W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2nd edition. APS PRESS, The American Phytopathological Society. Minnesota.
- SZENDRAK, ERIKA; READ, PAUL E. & YANG, GUOCHEN. 1997. Prevention and elimination of contamination for *in vitro* culture of several woody species. In: Cassells, A. C., ed. Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, pp.233-236.
- TAHMATSIDOU, V. I. & CASSELLS, A. C. 1997. Elimination of several bacterial isolates from meristem tips of *Hedera* spp. In: Cassells, A. C., ed. Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, pp. 175-181.
- TANPRASERT, PIYARAK & REED, BARBARA. 1997. Detection and identification of bacterial contaminants of strawberry runner explants. In: Cassells, A. C., ed. Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, pp. 139-143.
- TOLEDO, J., EGÚSQUIZA, V., & GOLMIRZAIE, A. 1998. Limpieza de bacterias sistémicas en plántulas *in vitro* de camote *I. batata* (Elimination of systemic bacterial infection in sweetpotato plantlets). Abstracts of III Latin-American Meeting on Plant Biotechnology, La Habana, Cuba, pp. 146.
- VAN DEN HOUWE, I. & SWENNEN, R. 2000. Characterization and control of bacterial contaminants in *in vitro* cultures of banana (*Musa sp.*). *Acta Horticulturae*, 530: 69-79.
- WELLER, RICHARD. 1997. Microbial communities on human tissues; an important source of contaminants in plant tissue cultures. In: Cassells, A. C., ed. Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, pp.245-257.
- ZAMORA, A. B. & GRUEZO, S. SM. 1993. Meristem culture of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *FAO/IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter*. 91/92:25-28.

- ZENKTELER, E.; WLODARCZAD, K & KLOSOWSKA, M. 1997. The application of antibiotics and sulphonamide for eliminating *Bacillus cereus* during the micropropagation of infected *Dieffenbachia picta schott*. In: Cassells, A. C., ed. Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, pp.183-191.

X. ANEXOS

Soluciones y medios de cultivo utilizados.

10.1. Medios de aislamiento bacteriano.

Medio ⁽¹⁾ (pH)	Componentes	g/L
Agar nutritivo (7,0 ± 0,1)	Peptona	5
	Extracto de carne	1
	NaCl	5
	Agar	15
	Agua destilada	1000 mL
Caldo-Agar nutritivo (enriquecido) ⁽²⁾ (7,0 ± 0,1)	Peptona	5
	Extracto de carne	1
	Extracto de levadura	2
	Sucrosa	50
	Agar (opcional)	15
	Agua destilada	1000 mL
Agar con levadura, peptona y glucosa (YPGA) ⁽²⁾ (7,0 ± 0,1)	Extracto de levadura	5
	Proteosa peptona	5
	D-Glucosa	1
	Agar	8
	Agua destilada	1000 mL
Agar nutritivo con levadura (NBY) ⁽²⁾ (7,0 ± 0,1)	Peptona	5
	Extracto de carne	3
	Extracto de levadura	2
	K ₂ HPO ₄	2
	KH ₂ PO ₄	0,5
	D-Glucosa	2,5
	Agar	15
	MgSO ₄ ·7H ₂ O (1M)	1mL/L
	Agua destilada	1000 mL
Agar almidón (7,0 ± 0,1)	Extracto de carne	3
	Almidón soluble	10
	Agar	12
Caldo nitrato (7,0 ± 0,2)	Peptona	5
	Extracto de carne	3
	Nitrato potásico	1
Agar sangre (6,8 ± 0,2)	Medio base	
	Sangre estéril (después de autoclavar)	50mL/L

Medio ⁽¹⁾ (pH)	Componentes	g/L
Medio de Hugh Leifson (6,8 ± 0,2)	Fosfato dipotásico	0,3
	Cloruro sódico	5
	Triptona	2
	Azul de bromotimol	0,08
	Agar	2
	Sol. estéril sucrosa 10% ó	100mL/L
	Sol. estéril manitol 10% ó	100mL/L
	Sol. estéril glucosa 10%	100mL/L

(1) Los medios de cultivo fueron autoclavados a 121 °C por 20 minutos. (2) Formulación según Shaad, 1988.

10.2. Escala de Mac Farland, utilizado en la determinación del Sistema API y antibiograma.

Escala	Sol. BaCl ₂ 1%	Sol. H ₂ SO ₄ 1%	Concentración Bact/mL
0,5	60 µL	9,94 mL	2 x 10 ⁸
1	100 µL	9,99 mL	3 x 10 ⁸
2	200 µL	9,8 mL	6 x 10 ⁸

10.3. Medio de cultivo para propagación *in vitro* de camote (MPB) utilizado en el CIP ⁽¹⁾.

Componentes	mg/L
Macronutrientes⁽²⁾	
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes⁽²⁾	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,3
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .H ₂ O	0,025
Pantotenato de calcio	2
Nitrato de calcio	100
L-Arginina	100
Ácido ascórbico	200
Putrescina HCl	20
Ácido giberélico	10
Sucrosa	30
Phytigel	3

(1) Lizárraga, R; Panta, A; Espinoza, N.; Dodds, J. H. 1992.

(2) 4,3g/L de sales Murashigue & Skoog (1962) comercializadas por Duchefa Biochemie.

10.4. Medio de cultivo para el cultivo *in vitro* de meristemos de camote utilizado en el CIP ⁽¹⁾.

Componentes	Concentración			
	MMB ₁	MMB ₂	MMB ₃ ⁽³⁾	MPB ₂ ⁽³⁾
Macronutrientes y Micronutrientes (MS ⁽²⁾) (g/L)	4,3	4,3	4,3	4,3
Pantotenato de calcio (mg/L)	2	2	2	2
Nitrato de calcio (mg/L)	100	100	100	100
L-Arginina (mg/L)	100	100	100	100
Putrescina HCl (mg/L)	20	20	20	20
Ácido ascórbico (mg/L)	200	200	200	200
Ácido giberélico (mg/L)	20	15	10	20
Agua de coco (mL/L)	10	10	10	10
Sucrosa (g/L)	40	30	30	30
Agar (g/L)	7	7	7	8

(1) Formulación basada en Lizárraga *et al.* (1990)

(2) MS: Sales de Murashigue & Skoog (1962) comercializadas por Duchefa Biochemie.

(3) Una vez diferenciados los meristemos en plántulas son propagados en MM₃ Y MPB₂ hasta tener un buen enraizamiento para luego ser propagados en MPB.

10.5. Estado de plántulas contaminadas de 76 entradas de camote *in vitro* conservadas en el Banco de Germoplasma del CIP.

Entradas Nº CIP	Estado de la plántula (2)	Enraizamiento (3)	Síntoma de pudrición (4)
400246	medio	bueno	-
400467	bueno	medio	-
420078	medio	medio	+
420134	medio	medio	+
420201	medio	malo	-
420213	bueno	medio	+
420296	bueno	malo	-
420358	medio	bueno	+
420374	medio	medio	+
420488	medio	medio	+
420520	medio	medio	+
420771	medio	bueno	+
420787	medio	bueno	+
420788	medio	malo	+
420898	medio	malo	+
420912	bueno	malo	+
420916	medio	bueno	+
420942	bueno	medio	-
420950	bueno	medio	+
420952	bueno	medio	-
420978	bueno	medio	-
421385	bueno	malo	-
421851	bueno	medio	+
422258	bueno	malo	-
422571	medio	malo	+
422581	bueno	malo	-
422655	medio	malo	+
440048	bueno	bueno	-
440234	bueno	bueno	-
440237	bueno	bueno	-
440238	malo	malo	-
440242	malo	malo	-
440317	bueno	bueno	-
440415	bueno	bueno	-
440517	medio	medio	+
440702	medio	bueno	+
440705	bueno	malo	-
440730	bueno	malo	-
440991	medio	medio	+
441219	medio	medio	+
441288	bueno	malo	-
441290	bueno	malo	-
441336	bueno	medio	-
441373	bueno	medio	+

(continúa ...)

Anexo 10.5. (continuación)

Entradas Nº CIP	Estado de la plántula (2)	Enraizamiento (3)	Síntoma de pudrición (4)
441455	bueno	malo	-
441467	bueno	malo	-
441470	bueno	medio	-
441494	medio	medio	+
441525	bueno	medio	-
441793	bueno	medio	-
442121	medio	bueno	+
442318	bueno	medio	-
442807	bueno	medio	-
442846	bueno	medio	+
443019	medio	medio	+
443025	bueno	medio	-
443027	bueno	medio	-
443088	bueno	bueno	+
443101	bueno	medio	+
443120	bueno	medio	-
443129	bueno	medio	+
400155 ⁽¹⁾	bueno	bueno	-
400430 ⁽¹⁾	bueno	bueno	+
400456 ⁽¹⁾	bueno	medio	-
400591 ⁽¹⁾	medio	malo	-
401094 ⁽¹⁾	medio	medio	+
420102 ⁽¹⁾	bueno	medio	+
422524 ⁽¹⁾	bueno	bueno	-
440009 ⁽¹⁾	malo	medio	-
440492 ⁽¹⁾	bueno	malo	-
440717 ⁽¹⁾	bueno	malo	-
440758 ⁽¹⁾	bueno	malo	-
442627 ⁽¹⁾	medio	medio	+
442915 ⁽¹⁾	bueno	medio	-
443052 ⁽¹⁾	bueno	bueno	-
443062 ⁽¹⁾	bueno	malo	-

(1) Entradas sin ningún aislamiento bacteriano.

(2) Estado de la plántula:

Bueno: cuando se observaron viables la mayoría de las yemas axilares y cuando el tallo ha crecido fuerte (con vigor) alcanzando gran parte de la longitud del tubo.

Medio: cuando se observó fenolización y/o zonas marrones en alguna parte de los tejidos.

Malo: cuando se observaron pocas yemas viables, poco crecimiento del tallo con zonas marrones y/o fenolización en gran parte de los tejidos caulinar y foliar.

(3) Enraizamiento:

Bueno: cuando se observó gran proliferación de las raíces.

Medio: cuando se observó poca fenolización o manchas radiculares.

Malo: cuando hubo poco o ningún enraizamiento.

(4) Pudrición: presencia de descomposición a nivel del tallo.

Caracterización bacteriana de 84 cepas aisladas de plántulas *in vitro* de camote.

10.6. Características culturales en medio TSB de las cepas bacterianas.

Código de cepa	Sedimento	Tipo sedimento	Turbidez	Película
1	+	mucoide	++	-
3	+	mucoide	++	-
4	-	-	+	-
5	-	mucoide	++	-
6	+	granular	++	+
7	+	granular	++	-
8	+	granular	++	-
9	+	mucoide	+	-
10	+	mucoide	+	-
11	+	granular	++	-
12	+	mucoide	++	-
13	-	-	+	-
14	+	granular	++	-
15	+	grumoso	++	-
16	+	granular	++	-
17	+	mucoide ^(no adh)	+++	-
18	+	granular	+++	-
19	+	granular	+++	-
19	+	granular ^(h)	+	+
20	+	granular	+++	-
21	+	mucoide ^(no adh)	++	-
22	+	mucoide ^(no adh)	++	-
24	+	mucoide	++	-
25	+	granular	++	-
26	+	granular	++	-
27	-	-	++	-
28	+	granular	++	-
29	+	mucoide	++	-
30	+	granular	+++	+
31	+	mucoide	+	-
32	+	mucoide	+	+
33	+	granular	+	-
34	+	mucoide	+	-
35	+	granular	+++	-
36	+	granular ^(h)	++	+
37	+	mucoide ^(no adh)	+	+
38	+	ND	ND	ND
39	-	-	++	-
40	+	granular	++	-
41	+	granular	+++	-
42	+	grumoso	++	-
43	+	granular	++	-
44	+	mucoide	++	-
45	+	mucoide	++	-
48	+	grumoso	+	-

(continúa...)

Anexo 10.6. (continuación)

Código de cepa	Sedimento	Tipo sedimento	Turbidez	Película
49	+	mucoide ^(no adh)	++	-
50	+	granular	+++	-
51	+	granular	++	-
52	+	algodonoso	+	-
53	+	granular	++	-
54	+	granular	+++	-
55	+	mucoide ^(no adh)	+++	-
56	+	grumoso	++	-
57	+	mucoide	+++	-
58	+	granular	++	-
59	+	mucoide ^(no adh)	+	-
60	+	mucoide ^(no adh)	+++	-
61	+	mucoide ^(no adh)	+++	-
62	+	granular	++	-
63	+	granular	++	-
65	+	grumoso	+	-
66	+	ND	ND	ND
67	+	ND	++	+
68	+	mucoide	+	+
70	+	mucoide	++	+
71	+	mucoide	++	+
72	-	-	+	+
73	+	mucoide ^(no adh)	++	+
74	+	granular	+++	-
75	+	granular	+	-
76	+	granular	++	-
77	+	granular	+	-
78	+	grumoso	+	-
79	+	mucoide ^(no adh)	+	-
80	+	mucoide	+	-
81	+	granular	++	-
83	+	mucoide ^(no adh)	+	-
84	-	-	++	-

ND: no determinado, (no adh): no adherente, (h): homogéneo, Intensidad de turbidez: +++>+++>+

10.7. Características enzimáticas y motilidad.

Código de cepa	Oxidasa	Catalasa	Reducción NO ₃ en NO ₂ o N ₂	Motilidad
1	-	+	+	-
2	ND	ND	ND	ND
3	-	-	-	-
4	+	+	ND	ND
5	-	+	ND	ND
6	-	+	-	+
7	-	+	-	+
8	-	+	-	-
9	-	+	-	-
10	-	+	-	+
11	-	+	ND	d
12	ND	+	-	+
13	-	+	-	+
14	-	+	-	-
15	-	+	-	+
16	-	+	-	+
17	-	+	-	+
18	-	+	-	+
19	-	+	-	+
20	-	+	-	+
21	-	ND	-	-
22	-	+	-	+
23	ND	ND	-	+
24	ND	+	-	+
25	ND	+	-	+
26	-	+	-	+
27	-	+	-	+
28	-	+	-	+
29	-	+	-	+
30	ND	+	-	+
31	ND	+	-	+
32	ND	+	-	+
33	d	+	-	+
34	-	+	-	-
35	-	+	-	+
36	ND	+	-	+
37	-	+	-	+
38	-	+	-	+
39	ND	+	ND	ND
40	-	+	-	+
41	-	+	-	+
42	-	+	-	+
43	-	+	-	+
44	-	+	-	-
45	-	+	-	+
46	-	+	-	-
47	-	+	-	-

(continúa...)

Anexo 10.7. (continuación)

Código de cepa	Oxidasa	Catalasa	Reducción NO ₃ en NO ₂ o N ₂	Motilidad
48	+	+	-	+
49	d	+	ND	ND
50	-	n	ND	ND
51	-	+	-	+
52	-	+	-	+
53	-	ND	-	-
54	ND	+	-	+
55	-	+	-	+
56	-	+	-	+
57	-	+	-	+
58	-	+	-	+
59	-	d	-	+
60	-	+	-	+
61	-	+	-	+
62	-	+	-	+
63	-	+	ND	-
64	-	+	ND	+
65	-	+	-	-
66	-	+	-	+
67	ND	+	-	-
68	ND	+	-	+
69	ND	+	-	+
70	-	+	-	+
71	-	+	-	+
72	-	+	-	+
73	-	+	-	+
74	ND	+	ND	+
75	-	+	-	+
76	-	+	-	+
77	-	+	-	+
78	-	+	-	+
79	-	+	-	+
80	-	+	-	+
81	-	+	-	+
82	-	+	-	+
83	-	+	-	+
84	-	+	-	+

d: duda

10.8. Perfil bioquímico (API 20NE) de *Sphingomonas paucimobilis* (cepa N° 3) y *Stenotrophomonas maltophilia* (cepa N° 4).

Ensayo	Componente activo	Reacciones/Enzimas	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (N° 3)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (N° 4)
NO ₃	nitrato potásico	Reducción de Nitratos en nitritos	-	-
TRP	L-triptófano	Reducción de Nitratos en nitrógeno	-	-
GLU	D-glucosa	formación de indole (triptófano)	-	-
ADH	L-arginina	fermentación (glucosa)	-	-
URE	úrea	Arginina Dihidrolasa	-	-
ESC	esculina citrato férrico	Ureasa	-	-
GEL	gelatina (origen bovino)	hidrólisis (β-glucosidasa) (Esculina)	+	+
ONPG	4-nitrofenil-βD-galactopiranosida	hidrólisis (proteasa) (gelatina)	-	+
GLU	D-glucosa	β-galactosidasa (Para-nitrofenil-βD-galactopiranosidasa)	+	+
ARA	L-arabinosa	asimilación	+	-
MNE	D-manosa	asimilación	+	+
MAN	D-manitol	asimilación	+	-
NAG	N-acetil-glucosamina	asimilación	+	+
MAL	D-maltosa	asimilación	+	+
GNT	gluconato potásico	asimilación	+	-
CAP	ácido cáprico	asimilación	-	-
ADI	ácido adípico	asimilación	-	-
MLT	ácido málico	asimilación	-	+
CIT	citrato trisódico	asimilación	-	+
PAC	ácido fenilacético	asimilación	-	-
OX		citocromo-oxidasa	+	-

10.9. Perfil bioquímico (API 50CHB y API 20E) 5 de cepas de *Bacillus sp.*, aisladas de entradas: N° 7 (420358), N° 26 (420898), N° 48 (420916), N° 10 (420374), N° 47 (422655).

Prueba	N° tubo	Ensayo	Componente activo	Cepas				
				N° 7 ^(*)	N° 26 ^(*)	N° 48 ^(*)	N° 10	N° 47
API 50CHB	0	testigo	Nada	-	-	-	-	-
	1	Gly	glicerol	+	+	+	+	+
	2	Ery	eritrol	-	-	-	-	-
	3	Dara	d-arabinosa	-	-	-	-	-
	4	Lara	l-arabinosa	-	+	+	+	+
	5	Rib	d-ribosa	+	+	+	+	+
	6	Dxyl	d-xilosa	-	+	+	d	+
	7	Lxyl	l-xilosa	-	-	-	-	-
	8	Ado	d-adonitol	-	-	-	-	-
	9	Mdx	metil-βD-xilopiranosida	-	-	-	-	-
	10	Gal	D-galactosa	d	+	+	+	+
	11	Glu	D-glucosa	+	+	+	+	+
	12	Fru	D-fructuosa	+	+	+	+	+
	13	Mne	D-mamnosa	-	+	+	+	+
	14	Sbe	L-sorbosa	-	-	-	-	-
	15	Rha	L-rhamnosa	-	+	+	-	-
	16	Dul	Dulcitol	-	-	-	-	-
	17	Ino	Inositol	-	-	-	-	-
	18	Man	D-manitol	-	-	+	-	+
	19	Sor	D-sorbitol	d	-	-	-	-
	20	Mdm	Metil-ad-manopiranosida	-	-	-	+	+
	21	Mdg	Metil-ad-glucopiranosida	-	+	+	+	+
	22	Nag	N-acetilglucosamina	+	+	+	+	+
	23	Amy	Amigdalina	+	+	+	+	+
	24	Arb	Arbutina	+	+	+	+	+
	25	Esc	Esculina Citrato férrico	+	+	+	+	+
	26	Sal	Salicina	+	+	+	+	+
	27	Cel	D-celobiosa	+	+	+	+	+
	28	Mal	D-maltosa	+	+	+	d	+
	29	Lac	D-lactosa (origen bovino)	d	+	+	-	+
	30	Mel	D-melibiosa	-	+	+	-	+
	31	Sac	D-sacarosa	-	+	+	+	+
	32	Tre	D-trehalosa	+	+	+	+	+
	33	Inu	Inulina	-	-	-	-	-
	34	Mlz	D-melezitosa	-	-	-	-	-
	35	Raf	D-rafinosa	-	+	+	-	+
	36	Amd	Almidón	+	+	+	-	-
	37	Glyg	Glicógeno	+	+	+	-	-
	38	Xit	Xilitol	-	-	-	-	-
	39	Gen	Gentiobiosa	-	+	+	+	+
40	Tur	D-turanosa	-	+	+	-	+	

(continúa...)

Anexo 10.9. (continuación)

Prueba	Nº tubo	Ensayo	Componente activo	Cepas				
				Nº 7	Nº 26	Nº 48	Nº 10	Nº 47
API 50CHB	41	Lyx	D-lixosa	-	-	-	-	-
	42	Tag	D-Tagatosa	-	-	-	+	+
	43	Dfuc	D-fucosa	-	-	-	-	-
	44	Lfuc	L-fucosa	-	-	+	-	-
	45	Darl	D-arabitol	-	-	-	-	-
	46	Larl	L-arabitol	-	-	-	-	-
	47	Gnt	Gluconato potásico	-	-	+	-	-
	48	2kg	2-Cetogluconato potásico	-	-	-	-	-
	49	5kg	5-Cetogluconato potásico	d	-	-	-	-
API 20E	1	ONPG	2-nitro fenil-βD-galactopiranosida	+	+	+	+	+
	2	ADH	L-arginina	+	-	-	-	-
	3	LCD	L-lisina	-	-	-	-	-
	4	ODC	L-ornitina	-	-	-	-	-
	5	CIT	citrato trisódico	-	-	-	-	-
	6	H2S	tiosulfato sódico	-	-	-	-	-
	7	URE	úrea	+	-	-	-	-
	8	TDA	L-triptófano	-	-	-	-	-
	9	IND	L-triptófano	-	-	-	-	-
	10	VP	piruvato sódico	+	+	+	+	+
	11	GEL	gelatina (origen bovino)	+	-	-	+	+
	12	OX	Prueba de oxidasa	-	-	-	-	-

^(*) Cepas de entradas tratadas en los experimentos de eliminación de bacteria

d: duda

10.10. Perfil bioquímico (API 20E) de un grupo de bacilos no esporulados (cepa N° 5) no identificados y *Bacillus sp.* (Cepa N° 46).

Ensayo	Componente activo	Reacciones/Enzimas	Cepa N° 5	<i>Bacillus sp.</i>
ONPG	2-nitro fenil-βD-galactopiranosida	β-galactosidasa (orto-nitrofenil-βD-galactopiranosidasa)	+	+
ADH	L-arginina	Arginina-dihidrolasa	-	-
LCD	L-lisina	Lisina Descarboxilasa	-	-
ODC	L-ornitina	Ornitina Descarboxilasa	-	-
CIT	citrato trisódico	utilización de citrato	-	-
H2S	tiosulfato sódico	producción de H ₂ S	-	-
URE	úrea	Ureasa	-	-
TDA	L-triptófano	Triptófano desaminasa	-	-
IND	L-triptófano	producción de indole	-	-
VP	piruvato sódico	producción de acetoína (Voges Proskauer)	+	+
GEL	gelatina (origen bovino)	Gelatinasa (gelatina)	-	+
GLU	D-glucosa	fermentación/oxidación	-	-
MAN	D-manitol	fermentación/oxidación	-	-
INO	Inositol	fermentación/oxidación	-	-
SOR	D-sorbitol	fermentación/oxidación	-	-
RHA	L-ramnosa	fermentación/oxidación	-	-
SAC	D-sacarosa	fermentación/oxidación	-	-
MEL	D-melibiosa	fermentación/oxidación	-	-
AMY	Amigdalina	fermentación/oxidación	-	-
ARA	l-arabinosa	fermentación/oxidación	d	-
OX		citocromo-oxidasa	-	-

d: duda

10.11. Resultados del Software APILAB PLUS para API 50CHB.

1. Cepa N° 7: Perfil inaceptable.

2. Cepa N° 10: MUY ADECUADA DISCRIMINACIÓN: *Bacillus pumilus*

Especie	ID%	T	Prueba en contra
<i>Bacillus plumilus</i>	99.8	0.56	MAN 99% MDG 22%

3. Cepa N° 26: DÉBIL DISCRIMINACIÓN: *Bacillus circulans*

Especie	ID%	T	Prueba en contra
<i>Bacillus circulans</i>	86.6	0.74	MAN 82%, VP 15%
<i>Paenib. macerans</i>	12.4	0.72	MAN 95%

4. Cepa N° 47: MUY ADECUADA IDENTIFICACIÓN: *Bacillus pumilus*

Especie	ID%	T	Prueba en contra
<i>Bacillus pumilus</i>	99.8	0.60	MDG 22%, LAC 7%, MEL 10%

5. Cepa N° 48: DEBIL DISCRIMACION: *Paenibacillus macerans*

Especie	ID%	T	Prueba en contra
<i>Paenibacillus. macerans</i>	57.7	0.82	-----
<i>Bacillus circulans</i>	12.4	0.72	Lcfuc 19%

10.12. Meristemas tratados con desinfectantes (PPM e hipoclorito de sodio), sobrevivientes y recuperados sin bacteria a los 2 y 4 meses de cultivo.

Tratamiento	N° CIP	Total de meristemas	Total de meristemas (2 meses de cultivo)		Total de meristemas (4 meses de cultivo)		
			Sobrev.*	Sin bacterias	Sobrev.*	Sobrev.* sin bacterias	Recuperados
1. Hipoclorito de Sodio (2,5%)	440317	6	2	2	0	0	0
	420358	10	6	6	0	0	0
	443019	10	5	5	1	1	0
	420916	10	10	10	0	0	0
	420978	14	7	6	1	1	1
	422581	12	1	1	0	0	0
	440415	8	0	0	0	0	0
	440238	6	3	3	0	0	0
	440048	6	2	2	0	0	0
2. PPM 5% y PPM 0,1%	440317	10	0	0	0	0	0
	420358	8	1	0	0	0	0
	443019	9	3	1	0	0	0
	420916	11	1	1	0	0	0
	420978	13	8	4	7	4	3
	422581	13	4	4	1	1	1
	440415	12	2	2	0	0	0
	440238	8	0	0	0	0	0
	440048	8	2	2	0	0	0
3. PPM 0,1%	440317	9	1	1	0	0	0
	420358	11	5	2	0	0	0
	443019	12	3	1	1	0	0
	420916	10	2	1	0	0	0
	420978	11	9	4	4	3	3
	422581	10	4	4	2	2	2
	440415	11	2	2	0	0	0
	440238	12	1	0	0	0	0
	Control	440317	17	17	7	3	3
420358		14	9	4	4	3	3
443019		10	6	4	2	2	2
420916		7	3	3	0	0	0
420978		10	6	1	0	0	0
422581		23	11	11	8	8	8
440415		17	10	10	0	0	0
440238		6	1	0	0	0	0
440048		16	16	4	0	0	0

*Sobrevivencia

10.13. Meristemos tratados con una solución de rifampicina (100 mg/L), sobrevivientes y recuperados sin bacteria a los 2 y 4 meses de cultivo.

Tratamiento	N° CIP	Total de meristemos aislados	Total de meristemos (2 meses de cultivo)		Total de meristemos (4 meses de cultivo)		
			Sobrev.*	Sin bacterias	Sobrev.*	Sobrev. * sin bacterias	Recuperación
1. Meristemos (0,5-0,8 mm) tratados 30 días	420358	10	10	8	4	3	3
	443019	8	8	4	2	1	1
	420978	8	8	4	1	1	1
2. Meristemos (0,5-0,8 mm) tratados 15 días	420358	8	5	2	1	0	0
	420978	6	6	2	1	1	1
3. Meristemos (0,2-0,4 mm) tratados 30 días	420358	9	7	5	0	0	0
	443019	8	8	4	3	3	2
	420978	8	7	2	1	1	1
4. Meristemos (0,2-0,4 mm) tratados 15 días	420358	15	9	5	0	0	0
	443019	5	3	3	1	1	1
	420978	9	8	4	0	0	0
Control	420358	14	9	4	4	3	3
	443019	10	6	4	2	2	2
	420978	10	6	1	0	0	0

*Sobrevivencia

Análisis de varianza de los resultados de los tratamientos empleados para la eliminación de bacterias de plántulas de camote contaminadas.

10.14. Eliminación de bacterias de meristemas tratados con PPM e hipoclorito de sodio.

a. Análisis de varianza de la variable sobrevivencia.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fcal
Modelo	12	19,99739348	1,66644946	4,35 ⁽¹⁾
Error	22	8,42373666	0,38289712	
Total	34	28,42113014		

(1) significativo

C.V. 29.68524%

• Análisis del modelo.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fcal
Genotipo	8	0,43975164	1,15 ⁽¹⁾
Tratamiento	3	1,22348991	3,20 ⁽²⁾
Meristemas	1	5,51340917	14,40 ⁽³⁾

(1) no significativo

(2) significativo

(3) significativo

b. Análisis de varianza de la variable sin bacterias.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fcal
Modelo	12	11,25307959	0,93775663	2.54 ⁽¹⁾
Error	22	8,11265332	0,36875697	
Total	34	19,36573292		

(1) significativo

C.V. 34.87196%

• Análisis del modelo.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fcal
Genotipo	8	0,10873466	0,29 ⁽¹⁾
Tratamiento	3	1,15041960	3,12 ⁽²⁾
Meristemas	1	3,77405949	10,23 ⁽³⁾

(1) no significativo

(2) significativo

(3) significativo

c. Análisis de varianza de la variable sobrevivencia.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fcal
Modelo	4	16.47938033	4.11984508	10.35 ⁽¹⁾
Error	30	11.94174981	0.39805833	
Total	34	28.42113014		

(1) significativo

C.V. 30.26725%

- Análisis del modelo.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fcal
Tratamiento	3	1.31282417	3.30 ⁽¹⁾
Meristemas	1	7.38488782	18.550 ⁽²⁾

(1) significativo

(2) significativo

d. Análisis de varianza de la variable sin bacterias

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fcal
Modelo	4	10.38320232	2.59580058	8.67 ⁽¹⁾
Error	30	8.98253060	0.29941769	
Total	34	19.36573292		

(1) significativo

C.V. 31.42280%

- Análisis del modelo.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fcal
Tratamiento	3	1.12754033	3.77 ⁽¹⁾
Meristemas	1	6.19619803	20.69 ⁽²⁾

(1) significativo

(2) significativo

e. Análisis de medias (datos transformados)

- Sobrevivencia

Tratamiento	Medias
1	2.23499534
2	1.64015013 ^(*)
3	1.89443664 ^(*)
Control	2.54727205

(*) significativo, diferente del control

- Meristemos sin bacterias

Tratamiento	Medias
1	2.19273598 ^(*)
2	1.41488167
3	1.48749884
Control	1.84219821

(*) significativo, diferente del tratamiento 2 y 3

f. Medias originales

Nivel de Trat	N	-----Sobrevivencia-----		-----Sin bacterias-----	
		Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
1	9	4.00000000	3.24037035	3.88888889	3.14024061
2	9	2.33333333	2.50000000	1.55555556	1.58989867
3	8	3.37500000	2.66926956	1.87500000	1.45773797
Control	9	8.77777778	5.42627353	4.88888889	3.75647589

Nivel de Trat	N	-----Total meristemos-----	
		Mean	Std Dev
1	9	9.11111111	2.84800125
2	9	10.22222222	2.10818511
3	8	10.75000000	1.03509834
Control	9	13.33333333	5.5226805

10.15. Eliminación de bacterias de meristemas tratados con rifampicina 100 mg/L.

a. Análisis de varianza de la variable sobrevivencia.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fcal
Modelo	7	1.38253691	0.19750527	4.83 ⁽¹⁾
Error	6	0.24522723	0.04087120	
Total	13	1.62776413		

(1) significativo

C.V. 7.369018%

- Análisis del modelo.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fcal
Genotipo	2	0.05342097	1.31 ⁽¹⁾
Tratamiento	4	0.17303053	4.23 ⁽²⁾
Meristemas	1	0.53360113	13.06 ⁽³⁾

(1) no significativo

(2) no significativo

(3) no significativo

b. Análisis de varianza de la variable sin bacterias.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fcal
Modelo	7	1.66745692	0.23820813	2.24 ⁽¹⁾
Error	6	0.63919484	0.10653247	
Total	13	2.30665177		

(1) no significativo

C.V. 16.21956%

- Análisis del modelo.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fcal
Genotipo	2	0.18566411	1.74 ⁽¹⁾
Tratamiento	4	0.22508564	2.11 ⁽²⁾
Meristemas	1	0.01692686	0.16 ⁽³⁾

(1) no significativo

(2) no significativo

(3) no significativo

c. Análisis de varianza de la variable sobrevivencia.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fcal
Modelo	5	1.27569496	0.25513899	5.80 ⁽¹⁾
Error	8	0.35206917	0.04400865	
Total	13	1.62776413		

(1) significativo

C.V. 7.646627%

- Análisis del modelo.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fcal
Tratamiento	4	0.15684453	3.56 ⁽¹⁾
Meristemas	1	0.81137751	18.44 ⁽²⁾

(1) no significativo

(2) significativo

d. Análisis de varianza de la variable sin bacterias.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fcal
Modelo	5	1.29612871	0.25922574	2.05 ⁽¹⁾
Error	8	1.01052306	0.12631538	
Total	13	2.30665177		

(1) no significativo

C.V. 17.66144%

- Análisis del modelo.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fcal
Tratamiento	4	0.25295577	2.00 ⁽¹⁾
Meristemas	1	0.36704091	2.91 ⁽²⁾

(1) no significativo

(2) no significativo

e. Análisis de medias (datos transformados).

- Sobrevivencia

Tratamiento	Medias
1	3.07630776 ^(*)
2	2.68376037
3	2.88687443
4	2.56505017
Control	2.48542058

(*) significativo, diferente del tratamiento 4 y del control

- Meristemos sin bacterias.

Tratamiento	Medias
1	2.42137213 ^(*)
2	1.74013845
3	2.07595554
4	2.07358573
Control	1.65992891

(*) significativo, diferente del control

f. Medias originales

Nivel de Trat	N	-----Sobrevivencia-----		-----Sin bacterias-----	
		Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
1	3	8.66666667	1.15470054	5.33333333	2.30940108
2	2	5.50000000	0.70710678	2.00000000	0.00000000
3	3	7.33333333	0.57735027	3.66666667	1.52752523
4	3	6.66666667	3.21455025	4.00000000	1.00000000
Control	3	7.00000000	1.73205081	3.00000000	1.73205081

Nivel de Trat	N	-----Total meristemos-----	
		Mean	Std Dev
1	3	8.66666667	1.15470054
2	2	7.00000000	1.41421356
3	3	8.33333333	0.57735027
4	3	9.66666667	5.03322296
Control	3	11.33333333	2.30940108

10.16. Eliminación de bacterias mediante la reintroducción de plantas de invernadero al cultivo *in vitro*.

Prueba de "T- Student".

Análisis Estadístico	Control	Tratamiento
Media	0,834277	0,831746
Varianza	0,014046	0,0173824
Nro. de Observaciones	9	9
Correlación de Pearson	0,207727	
Dirregularerencia de medias hipotetizada	0	
df	8	
t Stat	0,048074	
P(T<=t) una cola	0,481418(*)	
t Crítica una cola	1,859548	
P(T<=t) dos colas	0,962836(*)	
t Crítica dos colas	2,306006	

(*) no significativo