



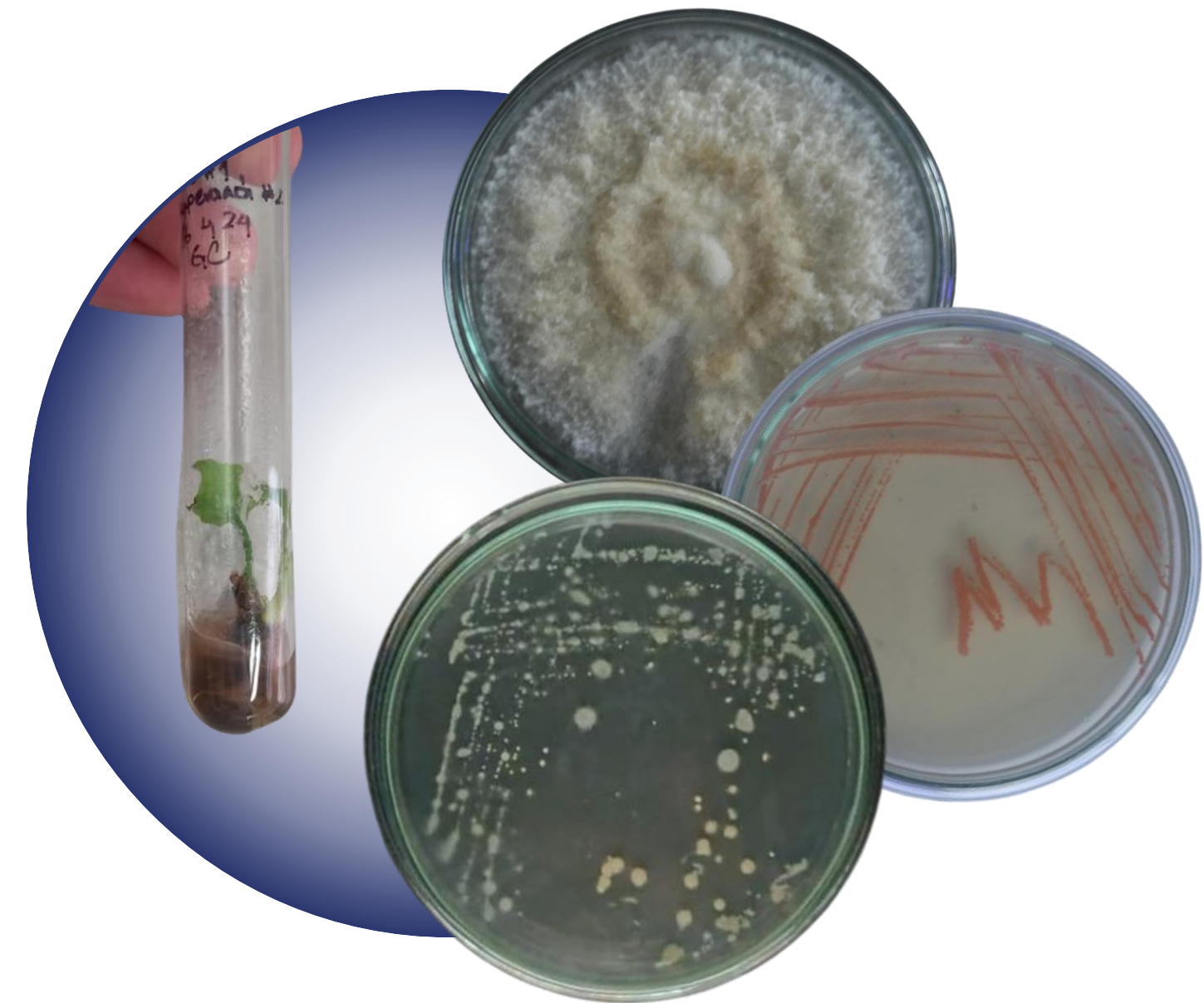
Cenicafé

Centro Nacional de Investigaciones de Café

Ciencia y Pasión en cada grano

CULTIVOS *IN VITRO*: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO, DESAFÍOS Y ESTRATEGIAS SOSTENIBLES DE CONTROL MICROBIANO

JHON ALEXIS HENAO CAMPIÑO



CONTENIDO

1

- ¿Qué es cultivo *in vitro*?
- Corta historia
- Actualidad
- Problemas y consecuencias

2

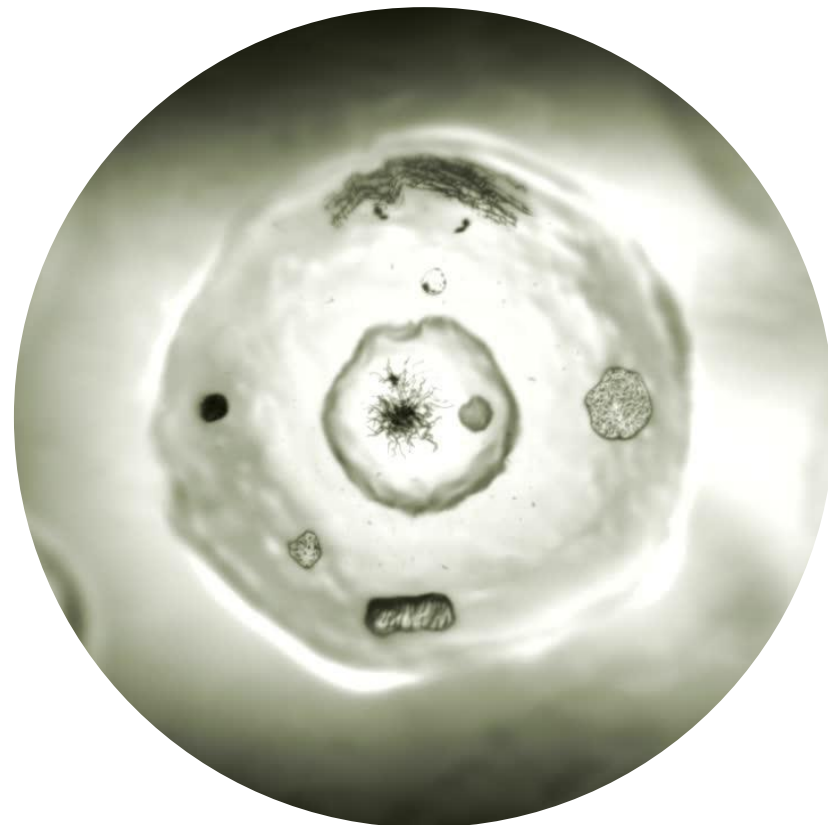
- Antecedentes
- Opción de control
- Alternativa
- Resultados
- Conclusiones



¿QUÉ ES EL CULTIVO *IN VITRO*?

El cultivo de tejidos vegetales es el cultivo aséptico de células, tejidos, órganos y sus componentes bajo condiciones físicas y químicas definidas *in vitro*.

Su principio fundamental es la **totipotencialidad**.



HISTORIA

Su desarrollo se remonta al siglo XX, con diversos **eventos pioneros**:



Gottlieb Haberlandt, 1902

Planteó por primera vez la idea de que una célula vegetal aislada podía desarrollarse y regenerar una planta completa.



Philip R. White, 1934

Medio nutritivo que permitió el crecimiento sostenido de raíces.



Gautheret y Nobécourt, 1941

Los primeros cultivos de tejido vegetal verdadero.

Década de 1950 +

Biología básica, agricultura, horticultura y silvicultura.

(Haberlandt, 1902; White, 1934; Gautheret & Nobécourt, 1941; Thorpe, 2007).

EN EL PRESENTE

El cultivo *in vitro* no solo es una herramienta esencial en la **investigación científica**, sino también una práctica habitual en la **agricultura moderna**.

APLICACIONES

- ✓ **Clonación masiva.**
- ✓ **Conservación.**
- ✓ **Mejoramiento genético.**
- ✓ **Estudios fisiológicos diversos**



DESAFÍOS

04

Aunque el cultivo *in vitro* es una herramienta poderosa, **aún enfrenta retos**.

- Baja eficiencia en especies recalcitrantes.
- Dependencia de protocolos específicos.
- Altos costos de infraestructura y operación.
- Aclimatación difícil.



DESAFÍOS

05

La **contaminación microbiana** es uno de los desafíos más frecuentes y limitantes.

Fuentes de contaminación:

- Explantes contaminados internamente (endófitos).
- Material vegetal mal desinfectado (superficial).
- Ambiente del laboratorio o manipulación humana.



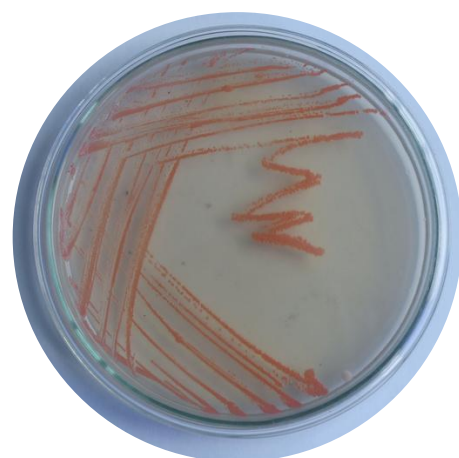
TIPOS DE CONTAMINANTES



HONGOS FILAMENTOSOS

Reportan entre 10 y 35% según tipo de planta y técnica.

- *Aspergillus*.
- *Penicillium*.
- *Fusarium*.
- *Cladosporium*.



BACTERIAS

Reportan 20-55% incidencia bacteriana.

Gram negativas

- *Pseudomonas*.
- *Agrobacterium*.
- *Enterobacter*.

Gram positivas

- *Bacillus*.
- *Straphylococcus*.



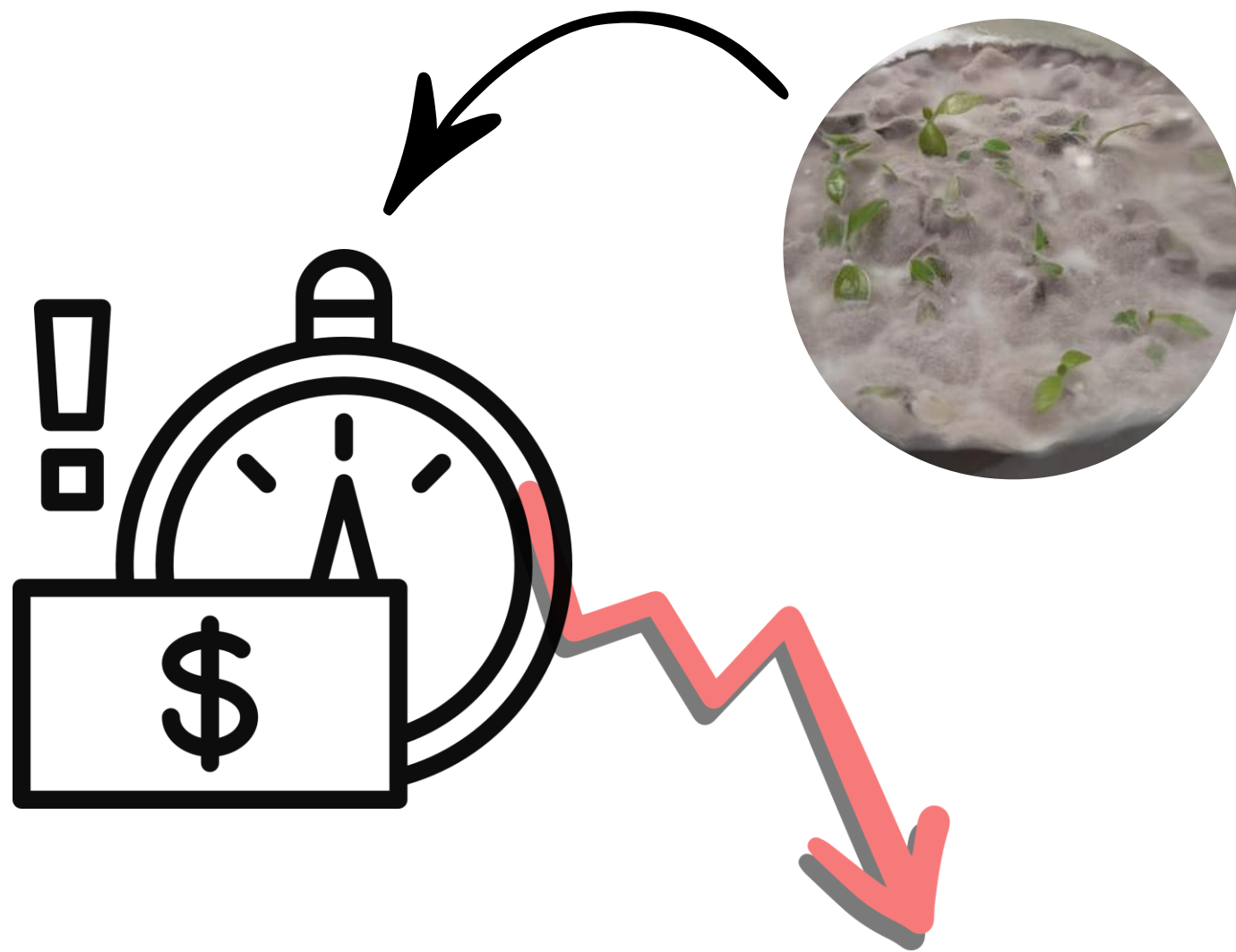
LEVADURAS

Reportan solo 5,88%.

- *Candida*.
- *Rhodotorula*.
- *Cryptococcus*.

CONSECUENCIAS

Cuando hablamos de contaminación microbiana no solo nos referimos a una mancha en un frasco.



- Pérdida total de los cultivos.
- Retrasos en los procesos de multiplicación.
- Costos adicionales por insumos y mano de obra.
- Baja eficiencia en protocolos de propagación.

¿ CUÁLES HAN SIDO LAS ESTRATEGIAS DE MANEJO?

08

A lo largo de los años se han desarrollado diversas estrategias para prevenir o controlar la contaminación microbiana en cultivo *in vitro*.

- Manejo de plantas madre.
- Adición de antibióticos al medio de cultivo: Cefotaxima, vancomicina, gentamicina, estreptomicina, entre otros.
- Termoterapia: Temperaturas altas y constantes.
- Crioterapia: Temperaturas bajas de aproximadamente -196°C .

Antecedentes

¿Qué estudios se han realizado en contaminación *in vitro* de café?

Comunicación Corta *Biotechnologia vegetal* Vol. 3, No. 2: 111 - 113, abril - junio 2003

Efecto del carbendazim para el control de *Colletotrichum* sp., contaminante del establecimiento *in vitro* de callos de café

Mileidy Cruz Martín*, Mayra Acosta Suárez, Alina Capote, Michel Leiva y Yelenys Alvarado. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. Carretera a Camajuani km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: mcruz@ibp.uclv.edu.cu

RESUMEN
Se identificó el género *Colletotrichum* como contaminantes frecuente en la formación de callos de café a partir de fragmentos de explantes foliares de plantas cultivadas en campo. La presencia de este género como contaminante en fragmentos de hojas de café utilizadas para la formación de callos implicó al explante inicial como posible fuente de contaminación. Se evaluó, además, el efecto del carbendazim para su control a partir de la determinación de su Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) en medio de cultivo PDA por el método de dilución en agar. El aislado CCIBP Co-1 utilizado para la determinación de la susceptibilidad fue controlado a una concentración de 1.0 mg.l⁻¹ del carbendazim.

Aunque se han utilizado fungicidas como **carbendazim** y tratamientos de desinfección agresiva, estos métodos son **costosos y pueden dañar el tejido vegetal**.

(Cruz–Martín *et al.*, 2003).

Procesos biotecnológicos In Vitro para la formación de callos a partir de tejidos foliares de cafeto (*Coffea arabica* L.)



Archivos
Tania del Pilar Díaz Sigcho.pdf (2.65 MB)

Fecha
2019-01-16

Autores
Díaz Sigcho, Tania del Pilar

Editor
Loja

Resumen
La presente investigación se desarrolló en el campo y una fase de laboratorio dentro el período comprendido entre mayo 2015 enero 2016. En el campo se realizó la recolección del material vegetal en un sector cafetalero de la parroquia Nambacola perteneciente al cantón Gonzanamá de la provincia Loja.
En el laboratorio de micropropagación vegetal se llevó a cabo dos fases de laboratorio las cuales comprendieron la desinfección del material vegetal traído del campo y la segunda fase en la aplicación de auxinas y citoquininas para la formación de callos.
Para la primera fase de desinfección se aplicó hipoclorito de calcio en tres concentraciones (15, 20 y 25 %) y en dos tiempos de inmersión (10 y 20 min), estableciendo un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de 3x2, con seis tratamientos y tres repeticiones evaluando la contaminación de los explantes.
El análisis mostró interacción entre el hipoclorito de calcio y el tiempo de inmersión, obteniendo el tratamiento con menor porcentaje de contaminación el T5 (25 % Ca (ClO)2 + 10 min) con valor de 37.62 % con diferencias significativas frente al T2 (15 % Ca (ClO)2 + 20 min) y T4 (20 % Ca (ClO)2 + 20 min), que presentaron una contaminación de 86.19 %; 74.76 % respectivamente. Destacando que los tratamientos T1, T3, Y T6 no mostraron diferencias significativas de porcentaje de contaminación.
En la segunda fase para a la formación de callos in vitro de explantes, se utilizó la mezcla de dos hormonas de crecimiento, la auxina: 2,4-ácido diclorofenoxiacético [2,4 -D] en concentraciones de 1.0; 3.0; 3.0 y 6.0 ppm y una citoquinina: benziladenina (BAP), en tres concentraciones 3.0; 10.0; 0 y 0.0 ppm respectivamente, para lo cual se estableció un diseño completamente al azar, donde se evaluó la formación de callo en explantes de *Coffea arabica* L.

Se encontró que el tratamiento con 25% de **hipoclorito de calcio** durante 10 minutos fue el más eficaz, reduciendo la contaminación hasta un 37,6 %, y mejorando el **establecimiento del cultivo *in vitro***.

(Díaz–Roa *et al.*, 2019).



Demostró que aplicar extracto de **jengibre** directamente a plantas madre de café en campo redujo el 100 % de la contaminación fúngica y el **90 % de la bacteriana antes del establecimiento *in vitro***.

(Joya–Dávila *et al.*, 2023).

Efectos antimicrobianos que evidencian algunos extractos utilizados en el estudio



E5: *Capsicum annuum* (Pimentón)

- Un extracto de semilla de C. annuum mostró inhibición frente a bacterias y hongos con halos de 9–13 mm
- Se identificaron compuestos activos como flavonoides, quercetina, capsaicina, entre otros

(Grojja *et al.*, 2023).



E8: *Citrus sinensis* (Naranja)

- En estudios de cáscara de cítricos, extractos ricos en flavonoides (hesperidina, sinensetina) han mostrado fuerte actividad antioxidante y capacidad de inhibir el crecimiento microbiano

(Xu *et al.*, 2023).

Una alternativa sostenible:

Aislamiento, caracterización y bioprospección de contaminantes microbianos de plántulas cultivadas en condiciones *in vitro*

Objetivos

- **General**

Evaluar la microbiota presente en material vegetal contaminado en condiciones *in vitro*.

- **Específicos**

Describir la morfología macroscópica y microscópica de la microbiota epífita aislada de material vegetal contaminado en condiciones *in vitro*.

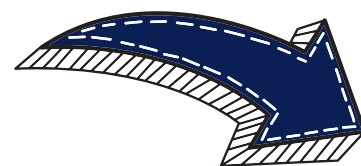
Evaluar extractos vegetales con actividad antimicrobiana, como estrategia para el control de contaminantes *in vitro*.

Metodología

12

01

Aislamiento de microorganismos



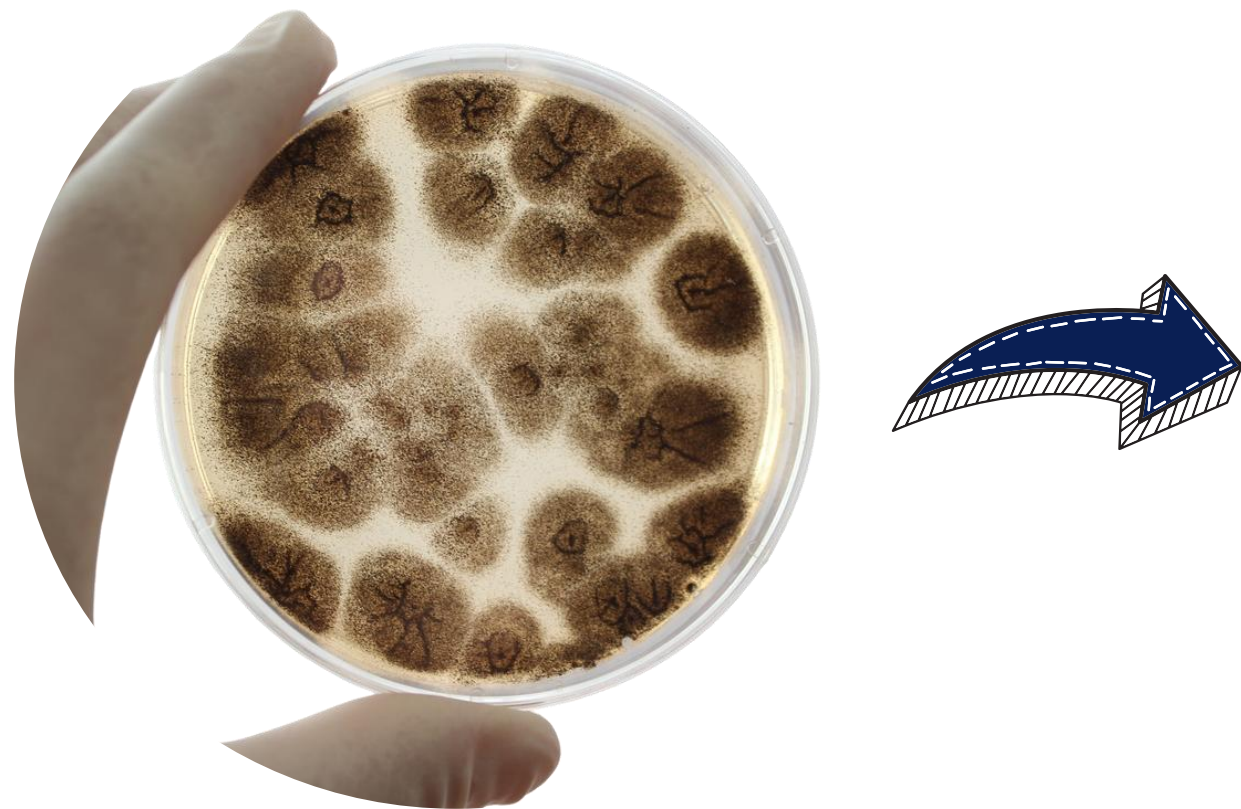
Cultivo contaminado.

Metodología

13

02

Caracterización macroscópica y microscópica de microorganismos



Observación de características macroscópicas.



Tinción de microorganismos.

Foto: Oscar de paz, 2010



Análisis microscópico.

(Brenner *et al.*, 2005).

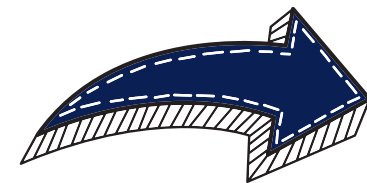
Metodología

14

03

Prueba de sensibilidad antimicrobiana

Selección de 8 especies



Extractos etanólicos



E1: Manzanilla

Chamaemelum nobile



E2: Cola de caballo

Equisetum arvense



E3: Ojo de poeta

Thunbergia alata



E4: Jengibre

Zingiber officinale



E5: Pimentón

Capsicum annuum



E6: Helecho

Pteridium aquilinum



E7: Boconia

Bocconia frutescens



E8: Naranja

Citrus sinensis

Metodología

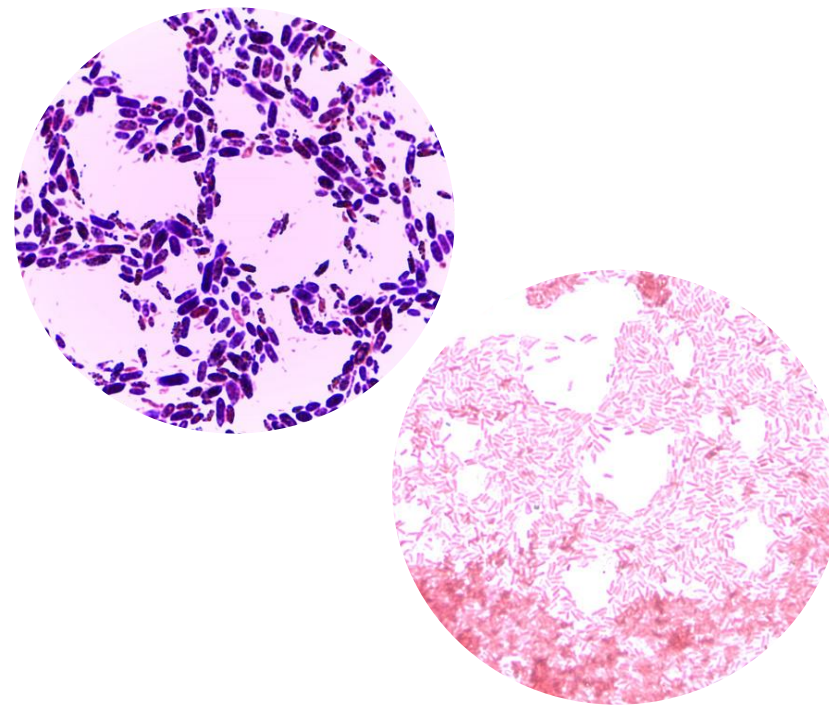
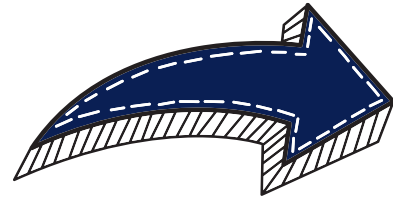
15

03

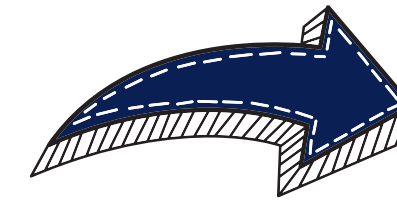
Prueba de sensibilidad antimicrobiana



8 extractos etanólicos
de origen vegetal.



Selección de dos levaduras
y nueve bacterias.



Para cada tratamiento
se realizaron tres
repeticiones y la unidad
experimental fue cada
caja de Petri.

Metodología

16

03

Prueba de sensibilidad antimicrobiana

Cada sensidisco fue impregnado con **10 µL** de extracto vegetal etanólico CLSI (2023).



Las cajas se inocularon con **100 µL** de cada uno de los microorganismos.

Tras la siembra, se colocaron los sensidiscos impregnados con los extractos vegetales.



Se midieron los halos de inhibición para cada extracto.

Metodología

17

04

Microscopia electrónica



Microscopía electrónica de barrido *Scanning Electron Microscope -SEM-*
Evaluaciones realizadas a tres microorganismos que tuvieron inhibición con todos los extractos.

Metodología

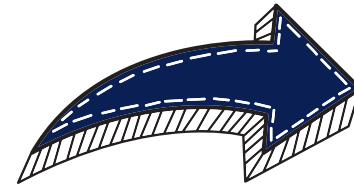
18

05

Análisis de datos

Diseño experimental

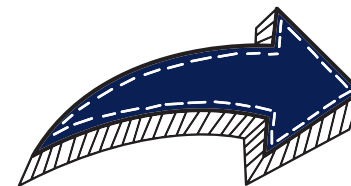
Diseño Completamente al Azar (DCA)



- **Factor de tratamiento:** Tipo de extracto vegetal (8 niveles).
- **Repeticiones:** 3 repeticiones por tratamiento.
- **Variable respuesta:** Diámetro del halo de inhibición (cm).

05

Análisis de datos



- Anova unifactorial para evidenciar diferencias entre los extractos en relación al radio del halo en cm.
- Paquete ggplot2 para las gráficas.

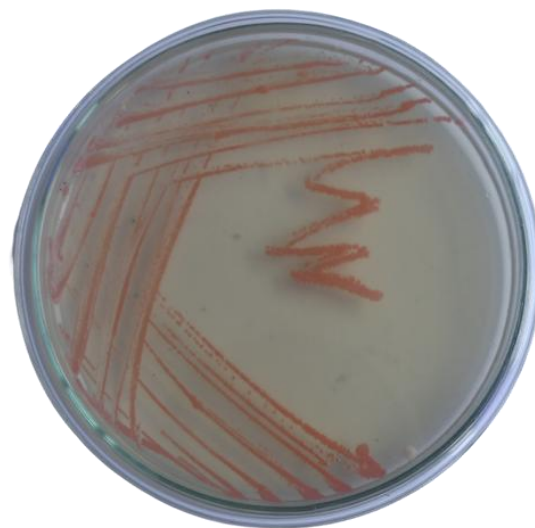
Análisis de datos con el software
Rstudio.

RESULTADOS

1. Aislamiento de microorganismos

De la siembra en medios de cultivo se obtuvo un total de 51 aislamientos de microorganismos contaminantes, entre los que se cuentan un total de:

- 36 bacterias



- 12 mohos



- 3 levaduras



RESULTADOS

2. Caracterización de microorganismos, macroscópica y microscópica

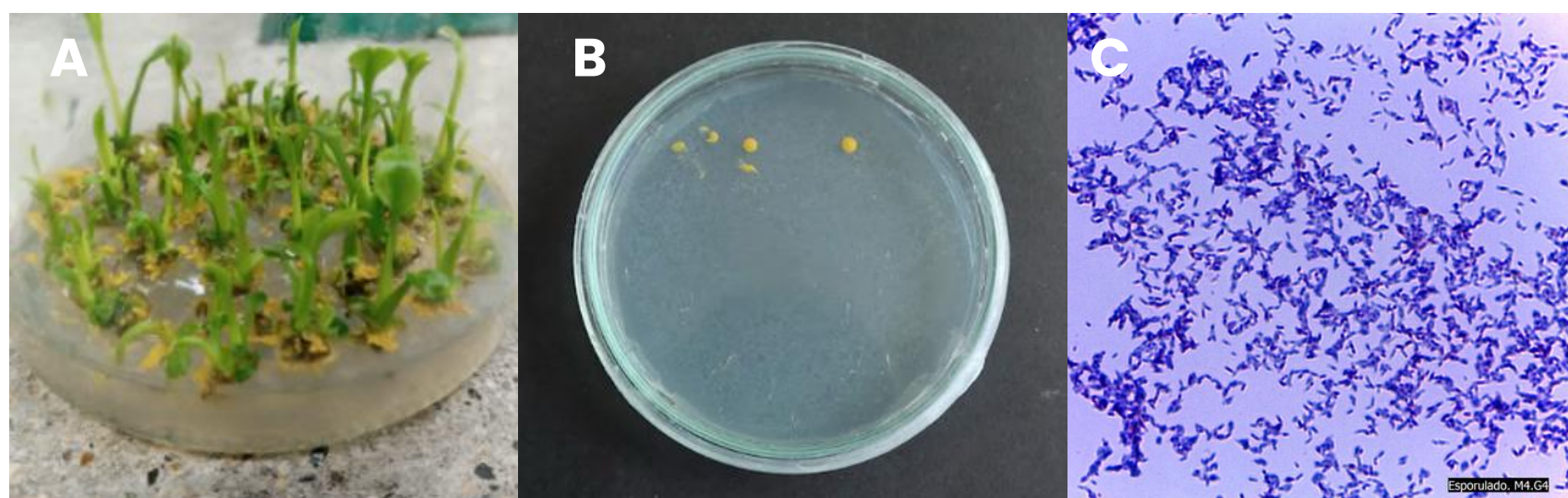


Fig. 1 : M4G4. A: Cultivo in vitro ; B: Colonia aislada en agar nutritivo; C: Bacteria gram positiva.

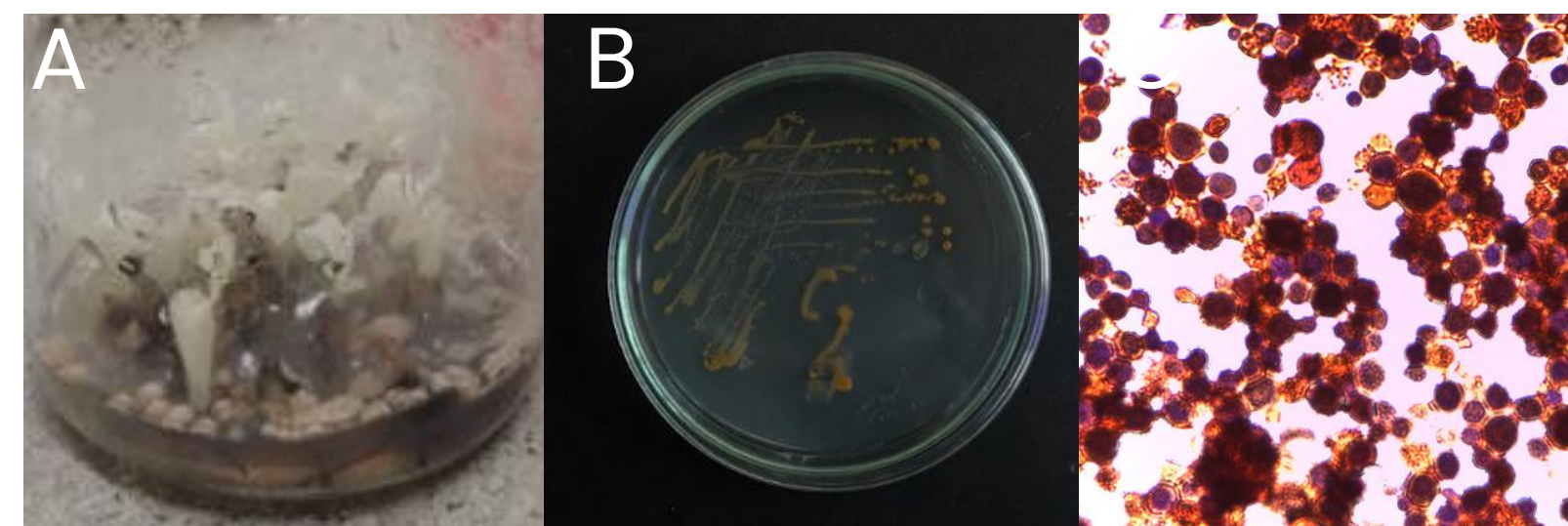


Fig. 2: M2G8. A: Cultivo in vitro ; B: Colonia aislada en agar PDA. C: Levadura.

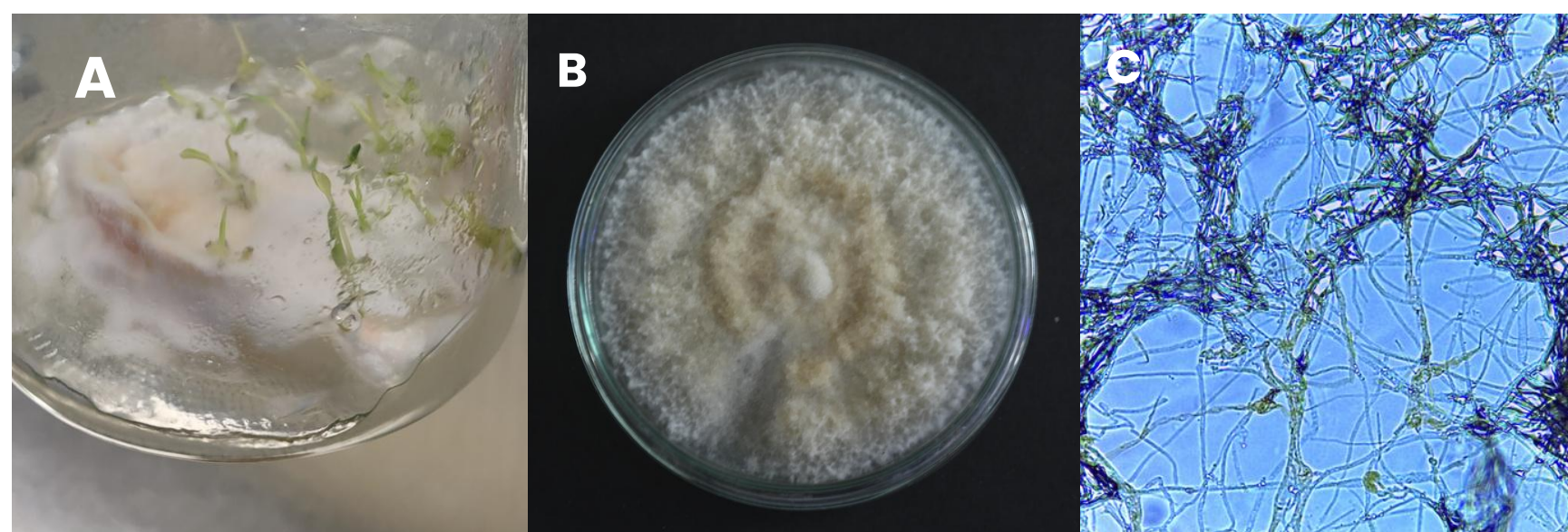


Fig. 3: M3L3. A: Cultivo in vitro; B: Hongo aislado en agar PDA; C: Tinción de azul de lactofenol.

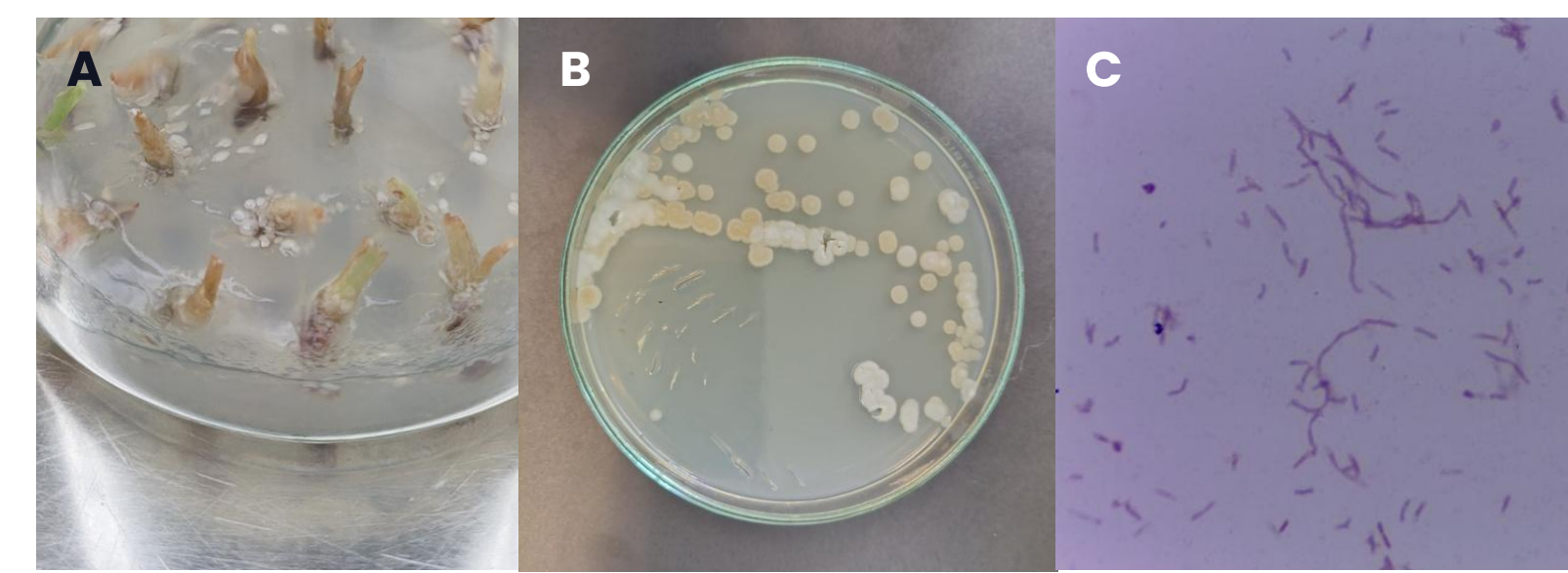


Fig. 4: M1L4. A: Cultivo in vitro; B: Colonia aislado agar PDA; C: Bacilos gram positivos.

RESULTADOS

2. Caracterización de microorganismos, macroscópica y microscópica

Color:

- Blanco
- Blanco hueso
- Amarillo
- Amarillo cremoso
- Naranja

Forma:

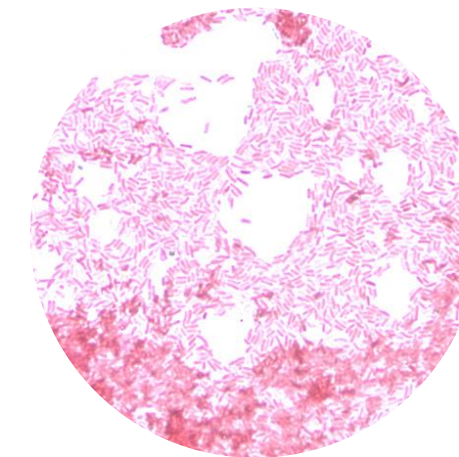
- Circular
- Puntiforme

Borde:

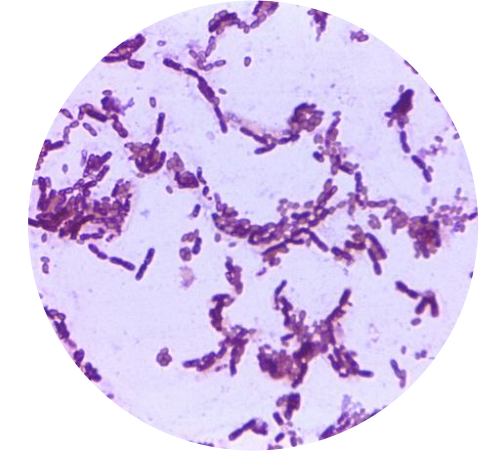
- Entero
- Crenado

Elevación:

- Elevada
- Plana
- Convexa
- Pulvinada



Gram (-): 27



Gram (+): 9

100x

Resultados

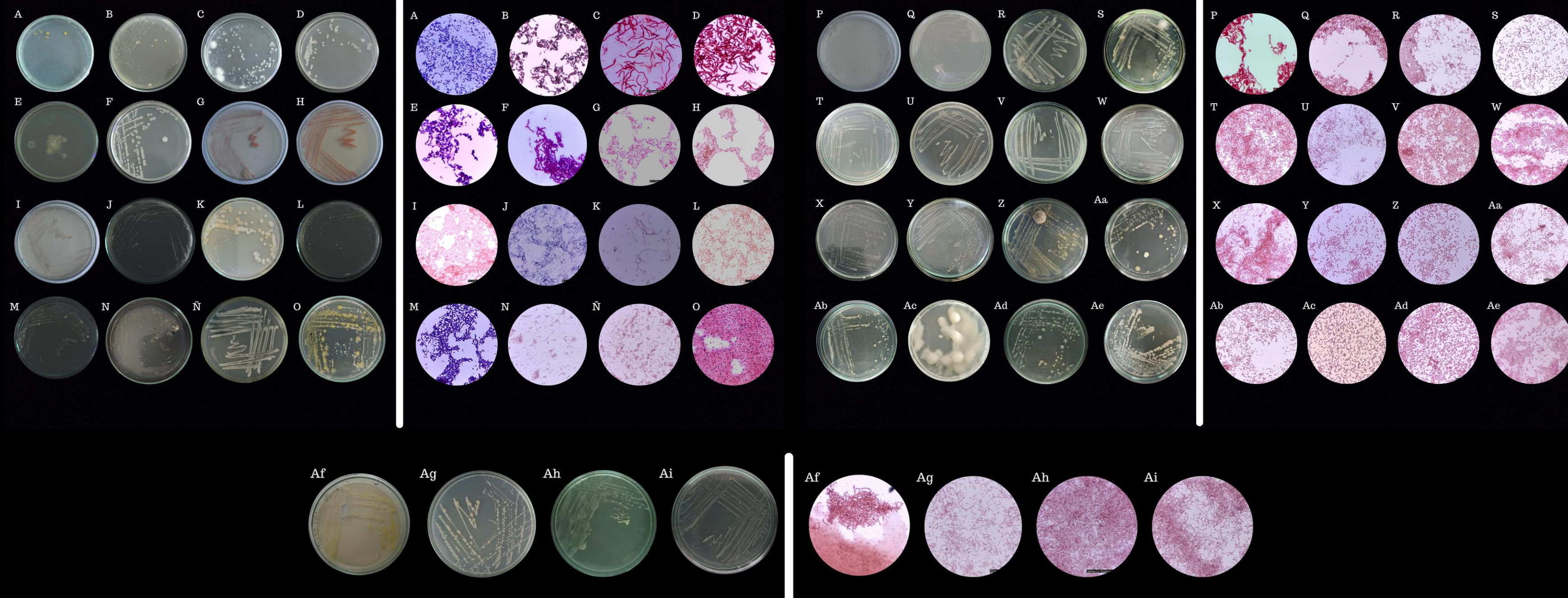


Fig. 5. Bacterias aisladas de plantas *in vitro* contaminadas.

Resultados

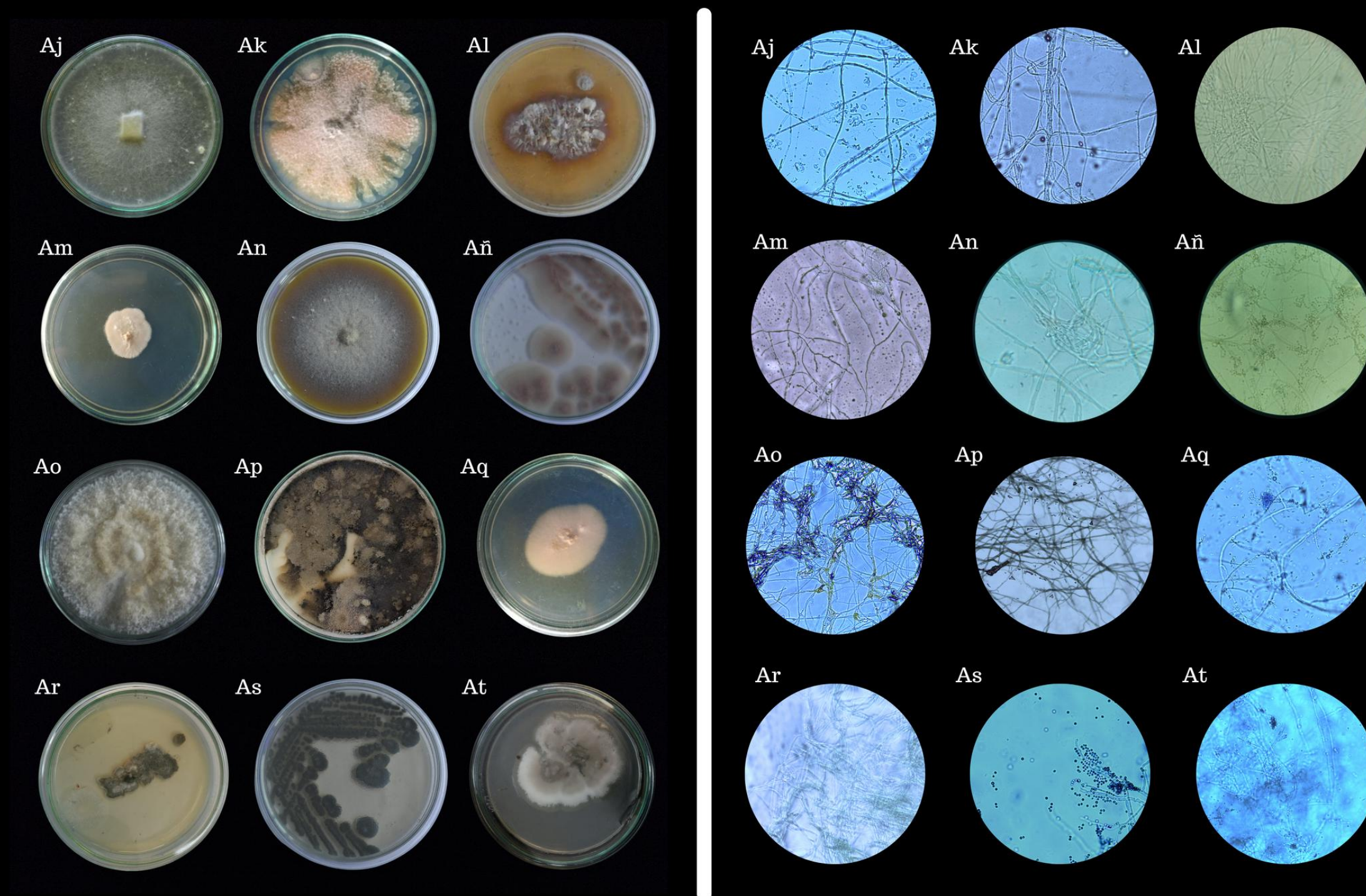


Fig. 6. Hongos aislados de plantas *in vitro* contaminadas.

Resultados

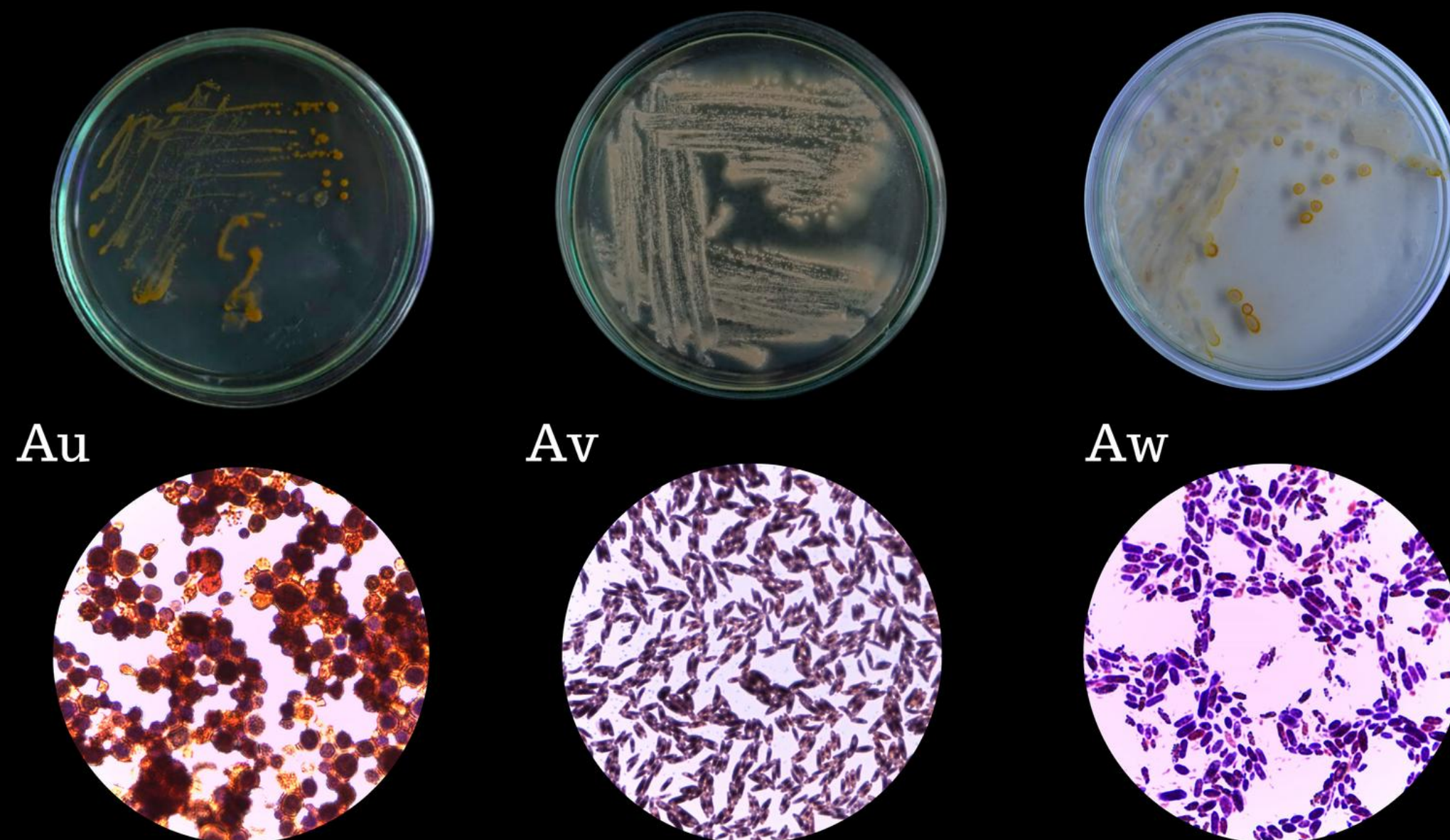


Fig. 7. Levaduras aisladas de plantas *in vitro* contaminadas.

3. Prueba de sensibilidad antimicrobiana

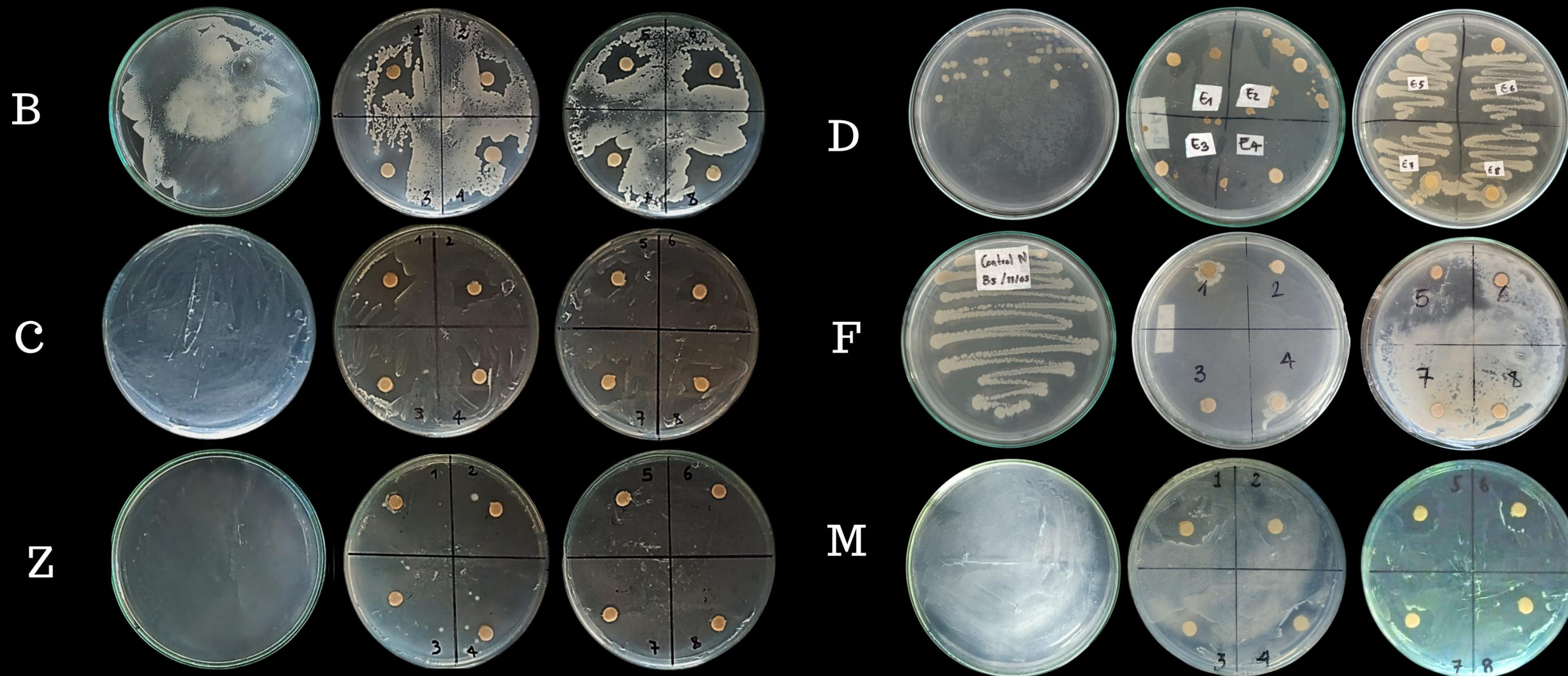


Fig. 8. Prueba de sensibilidad antimicrobiana.

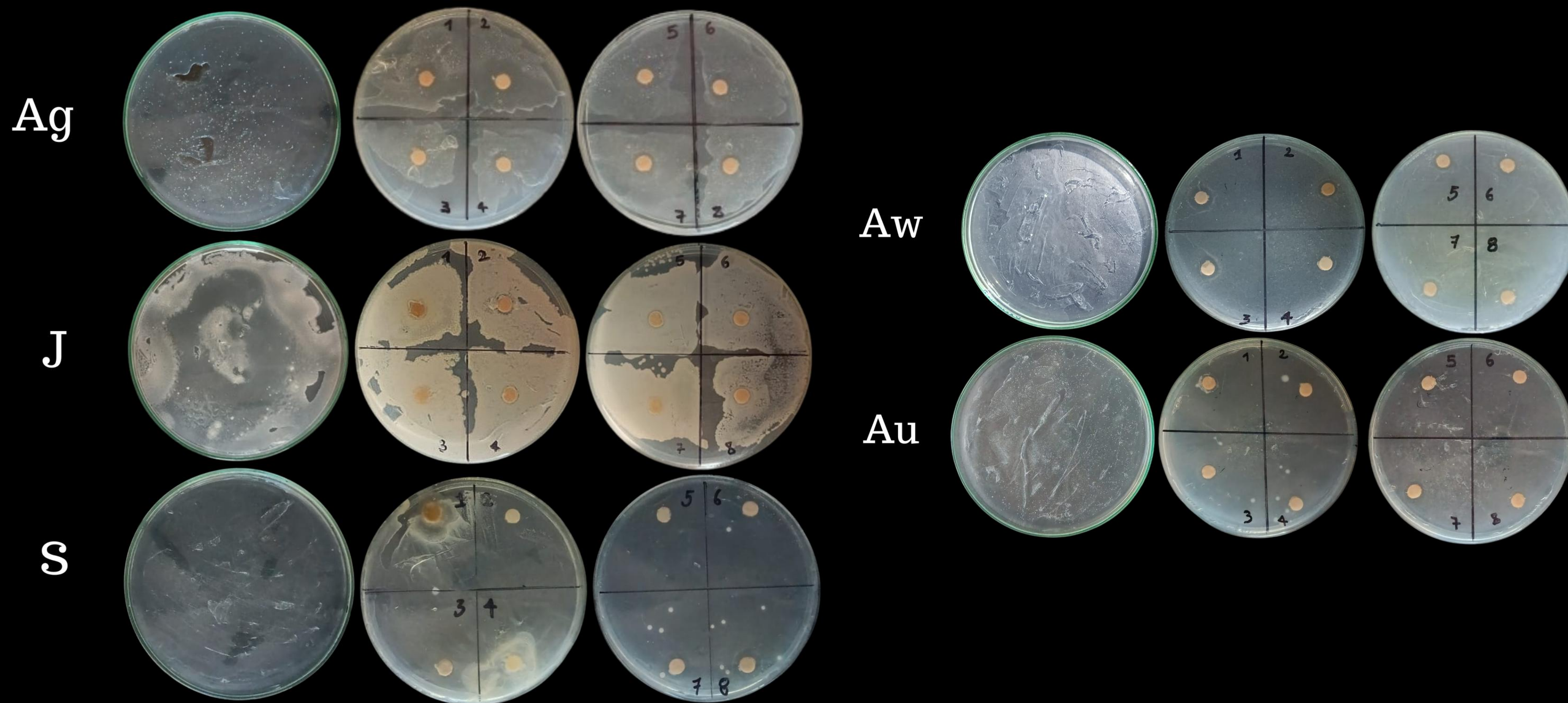


Fig. 8. Prueba de sensibilidad antimicrobiana.

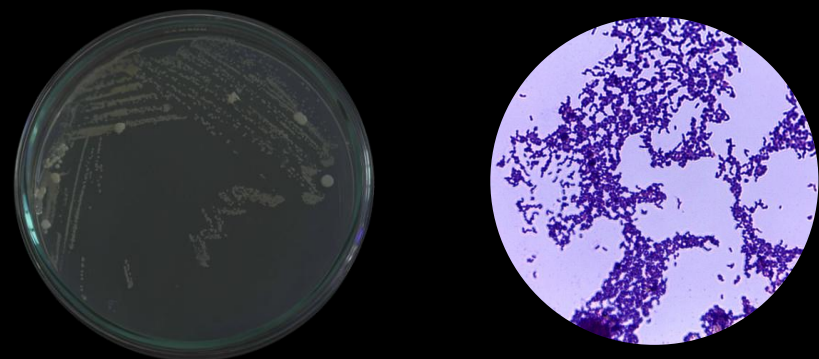
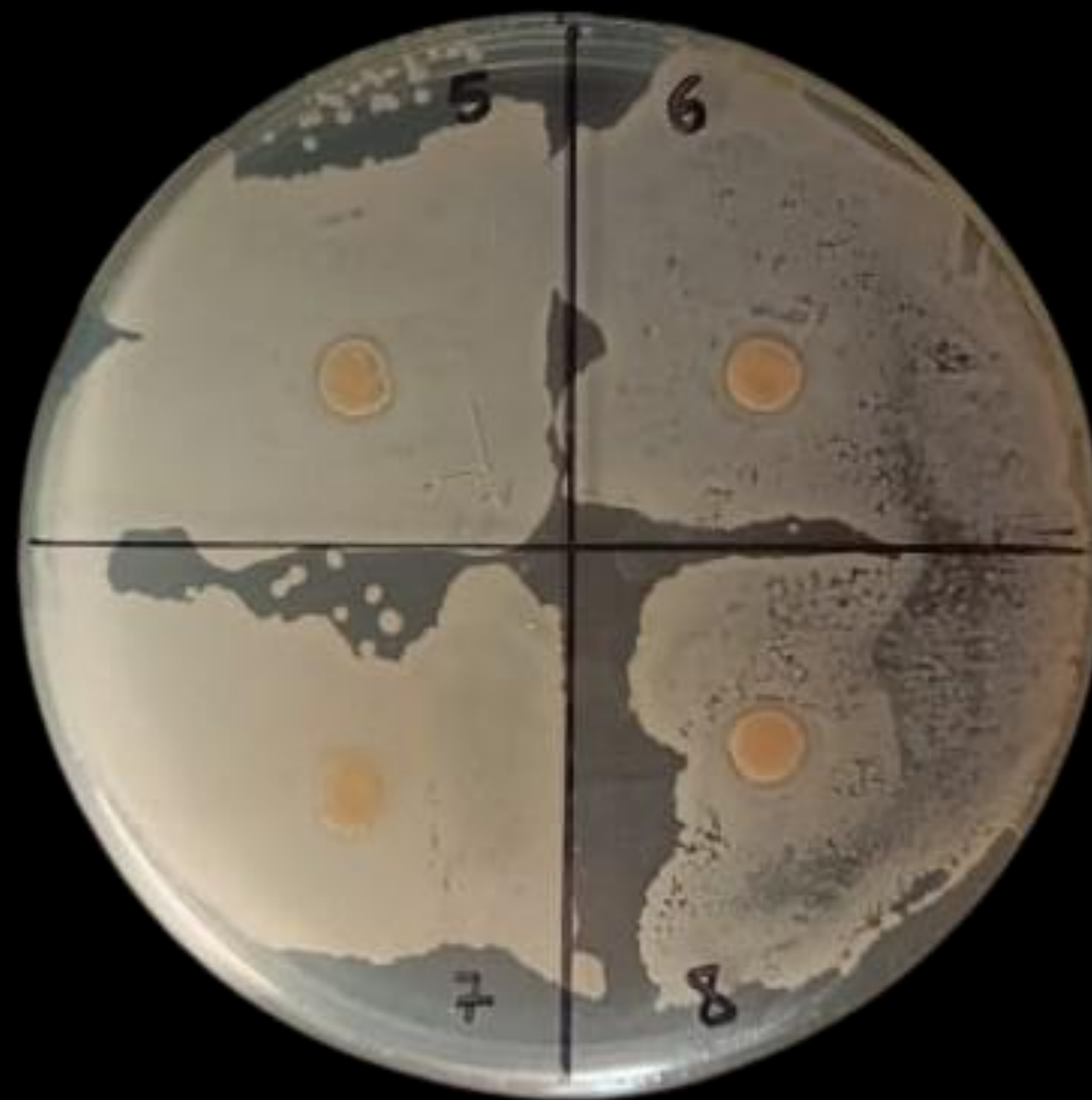
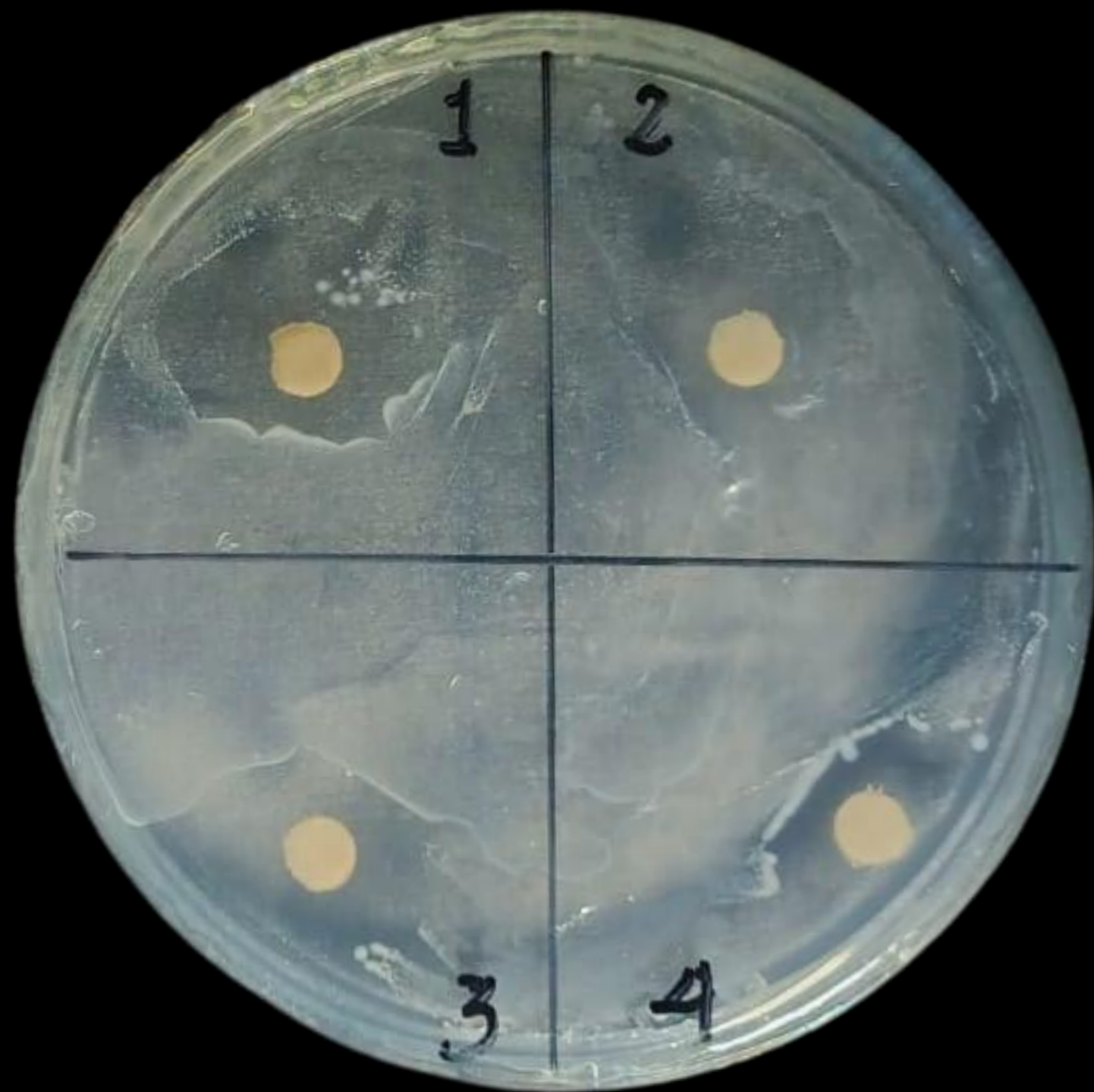
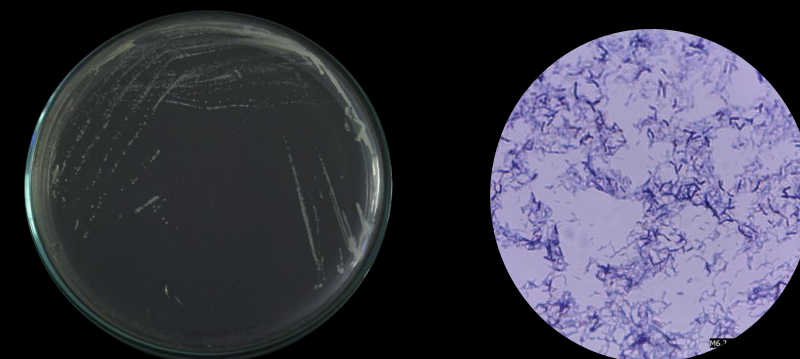
M**J**

Fig. 9. Comparación: M, presencia de halo de inhibición en los cuatro extractos. J, sin inhibición.

4. Microscopia electrónica de barrido

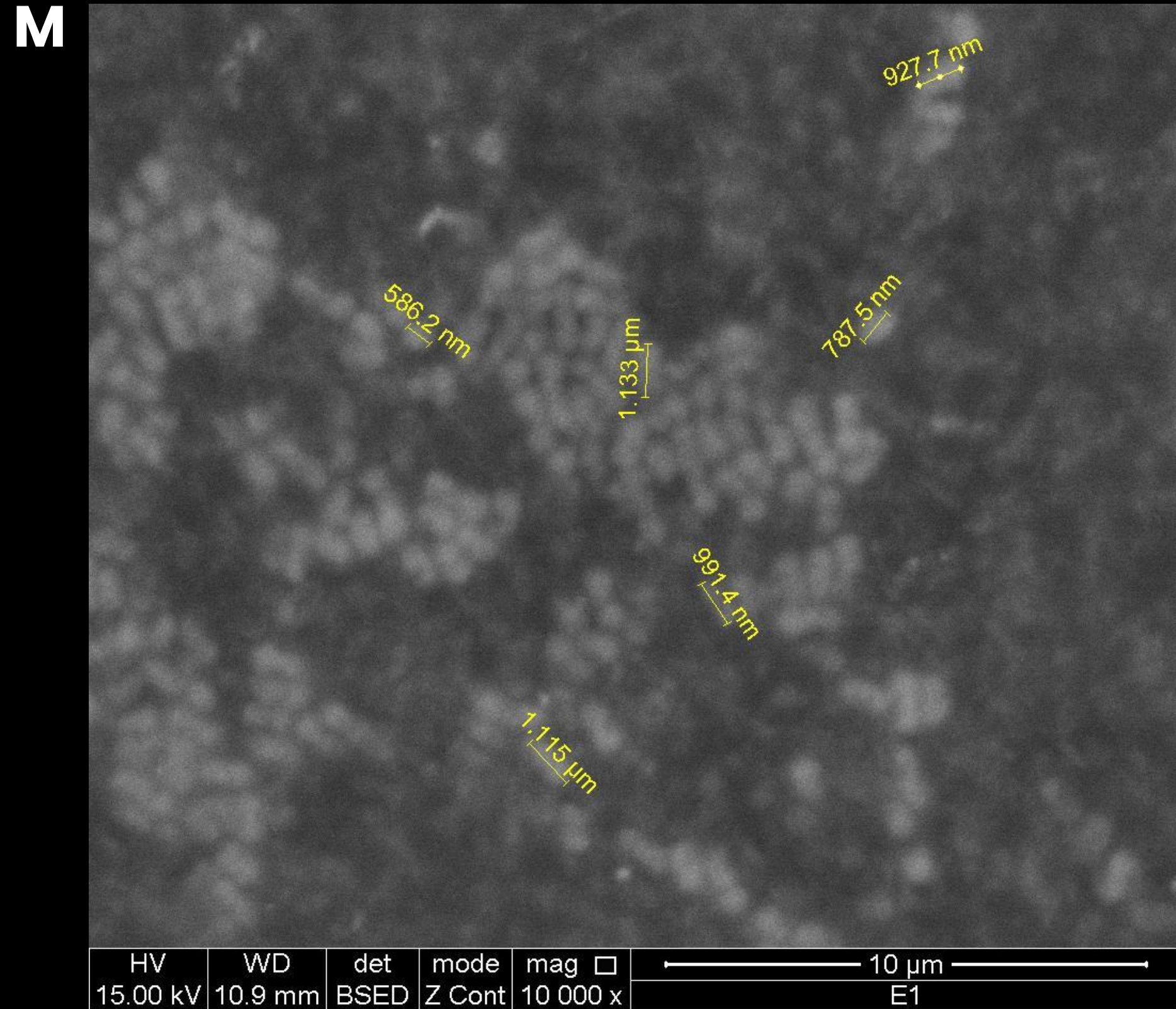
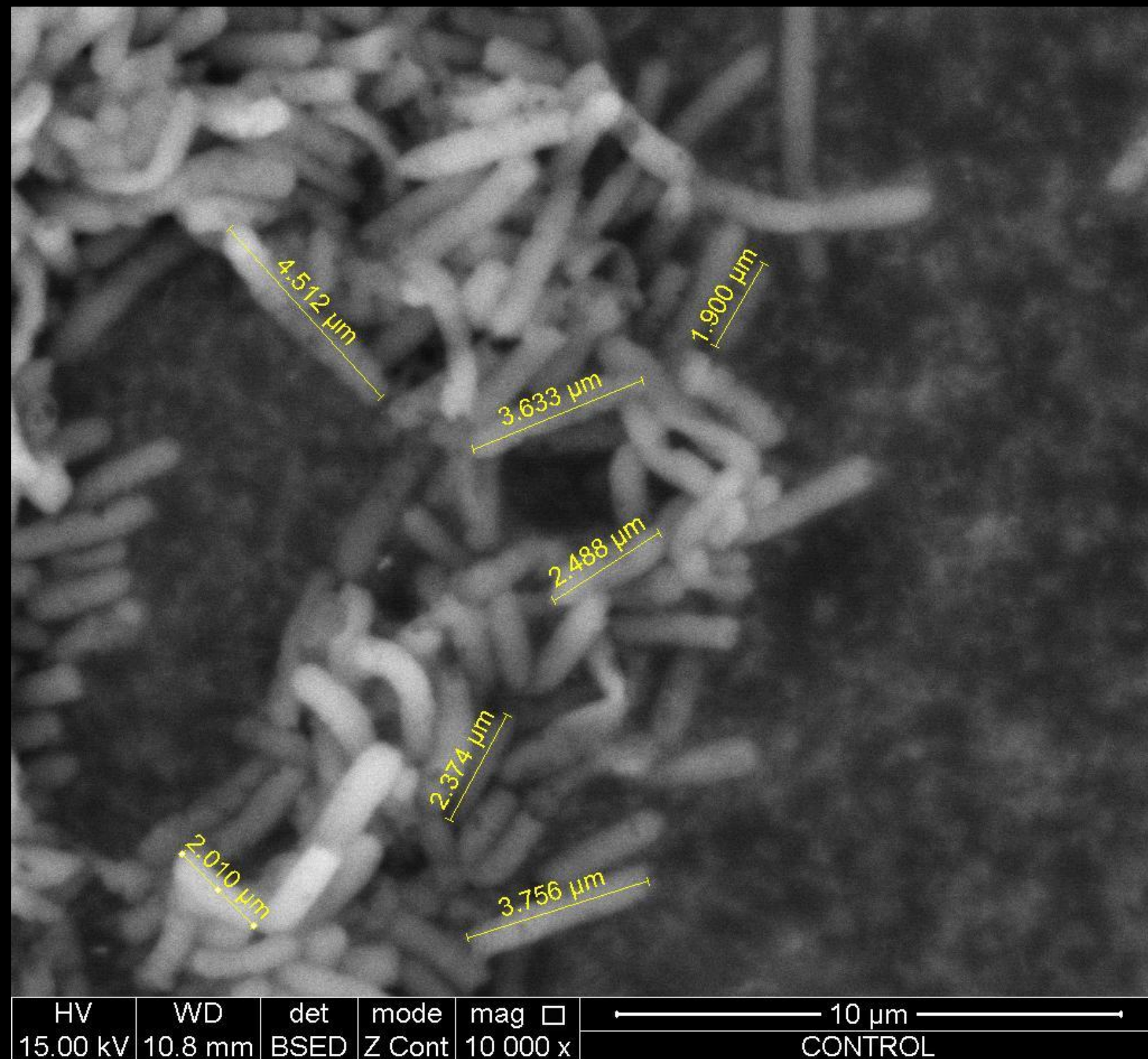
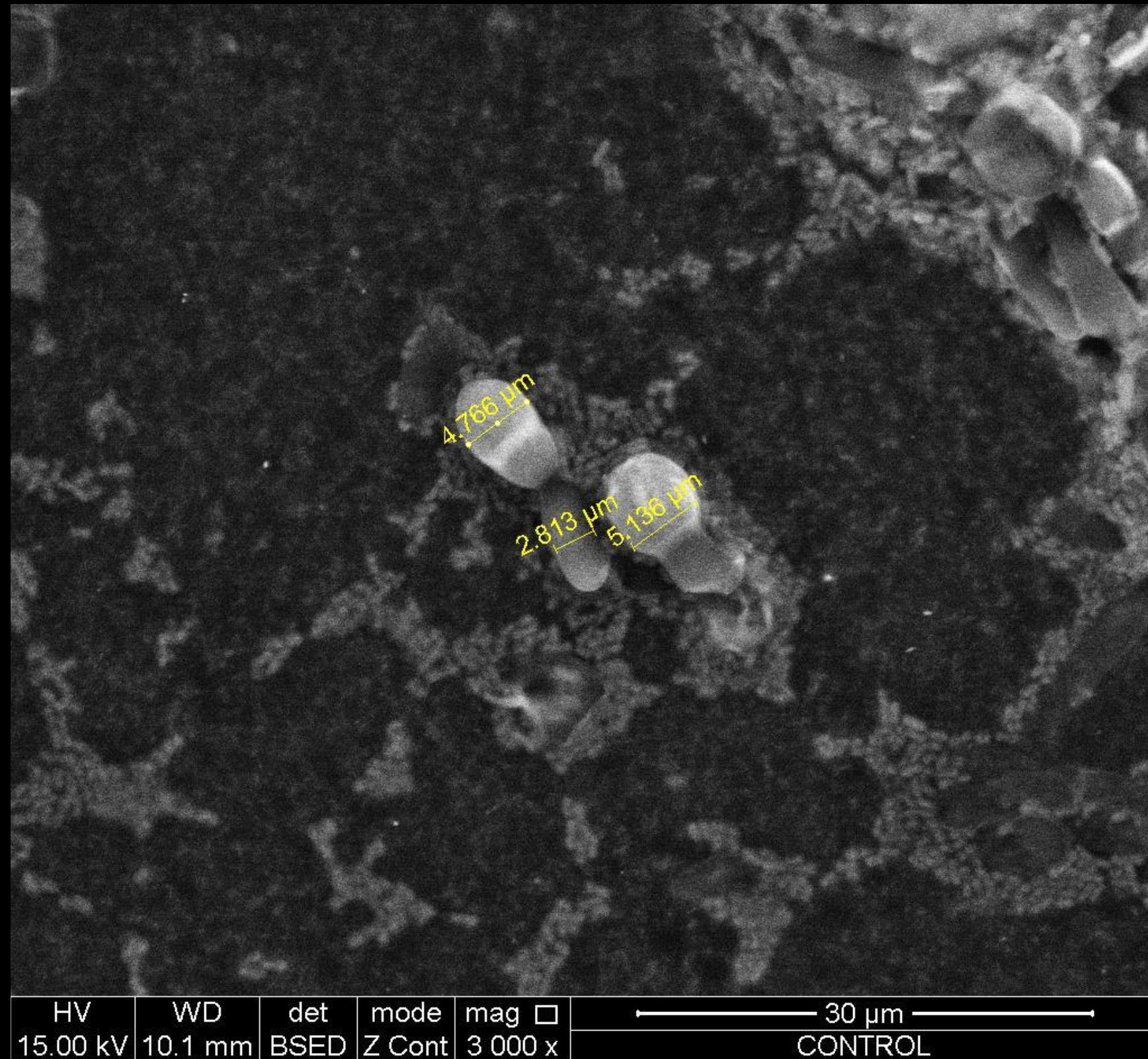


Fig. 9. Microscopia electrónica de bacteria (M), G+.

Promedios: **C: 2,94 μm ; E8: 0,89 μm**

4. Microscopia electrónica de barrido



AW

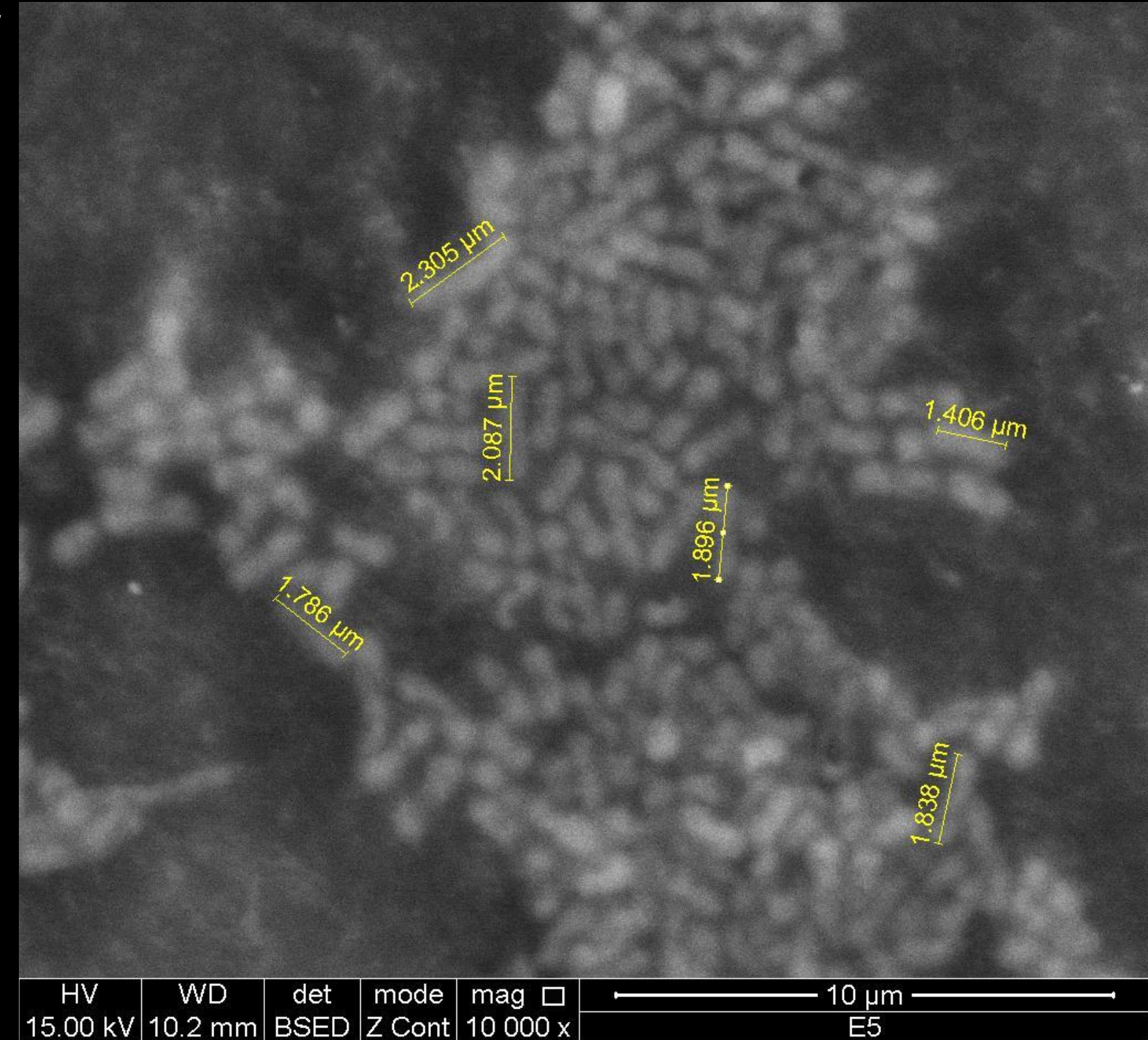


Fig. 10. Microscopia electrónica de levadura (Aw).

Promedios: **C: 4,24μm; E5: 1,85μm**

Resultados

Tabla 1. Mediciones de halo de inhibición en cada prueba

	Clasificación	Microorganismos	Medida del r del halo en cm							
			Extractos							
			E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Bacterias	Bacilos G +	B	0,6	0,5	0,8	-	0,5	0,7	0,6	0,8
	Bacilos G +	C	0,7	0,7	0,5	0,7	0,5	0,5	0,7	0,8
	Bacilos G -	Z	0,6	0,4	0,3	0,4	0,5	0,6	0,2	0,3
	Bacilos G -	D	-	0,4	-	0,4	0,4	0,5	-	0,2
	Bacilos G -	F	-	-	-	-	0,2	0,15	-	0,15
	Bacilos G +	M	0,4	0,3	0,5	0,3	0,3	0,4	0,3	0,5
	Cocos G -	Ag	-	-	-	-	-	-	0,1	0,2
	Bacilos G +	J	-	-	-	-	-	-	-	-
	Streptococos G -	S	-	-	-	-	-	-	0,2	0,15
Levaduras	Ovaladas	Aw	0,4	0,2	0,3	0,2	0,15	0,1	0,15	0,2
	Circulares	Au	-	-	-	-	0,1	-	-	0,15

5. Análisis de datos

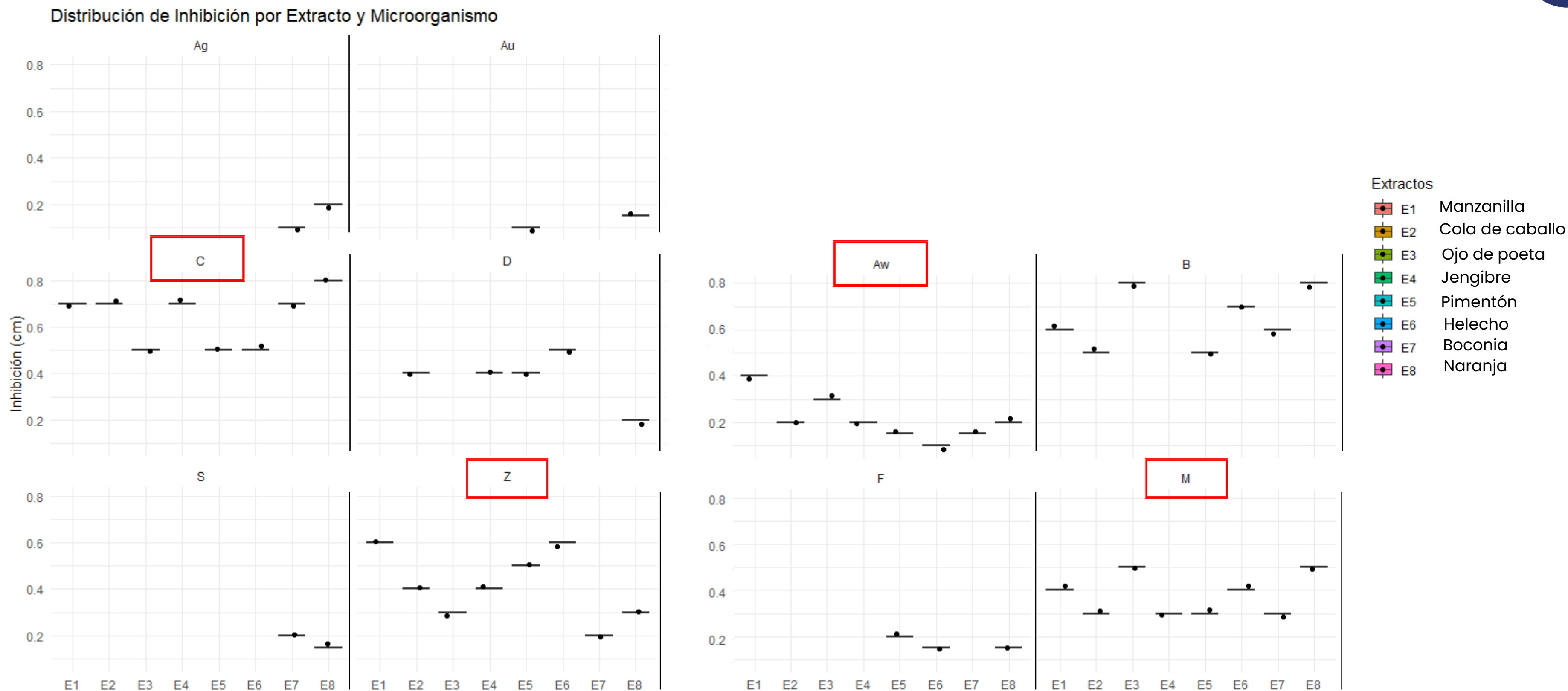


Fig. 11. Distribución de inhibición, por extractos y microorganismos. Donde el rectángulo rojo, está señalando los microorganismos con inhibición en todos los extractos.

Variación del halo de inhibición por microorganismo

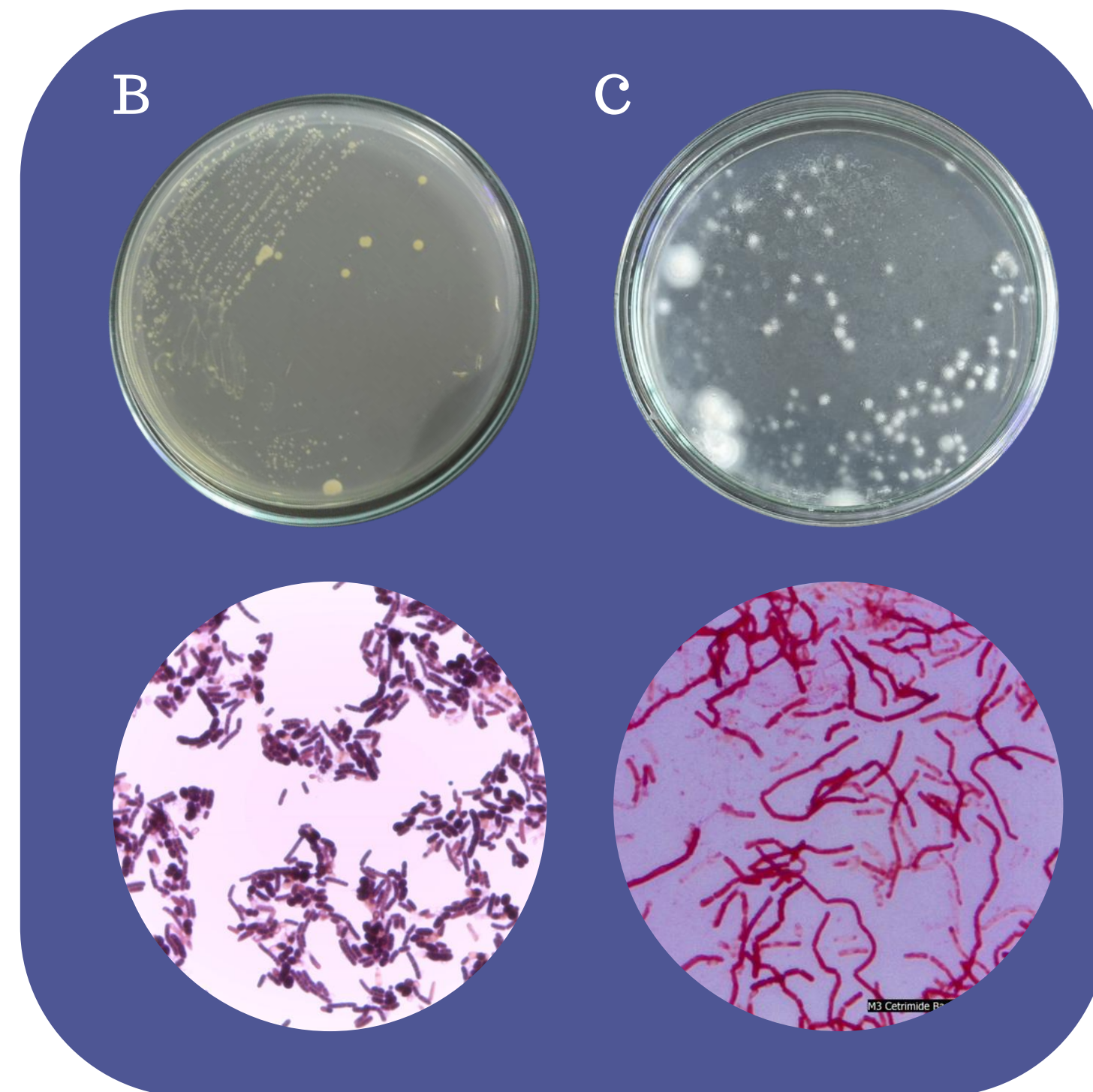
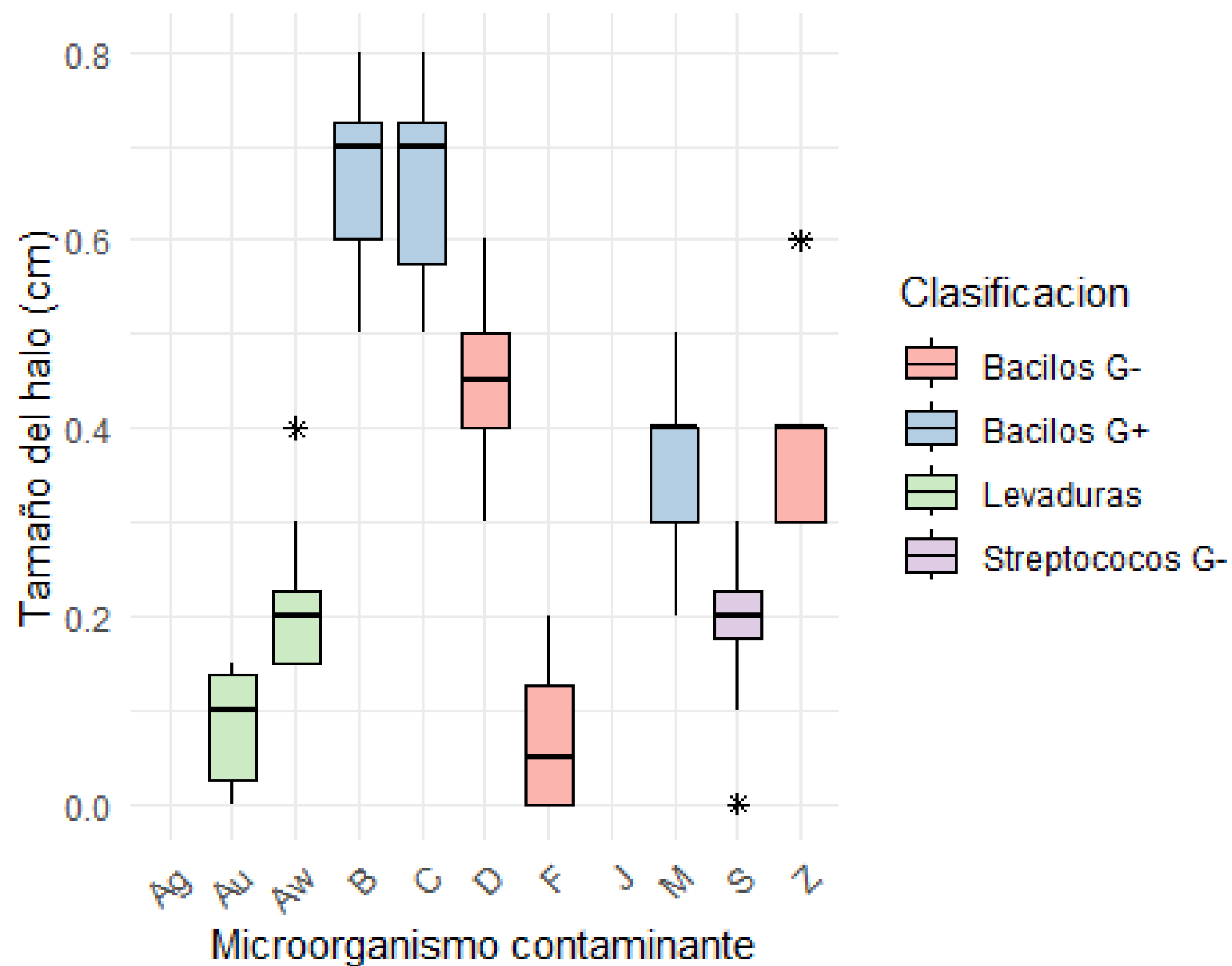


Fig. 12. Box-plot, Variación de tamaño de halo en todos los microorganismos seleccionados

5. Análisis de datos

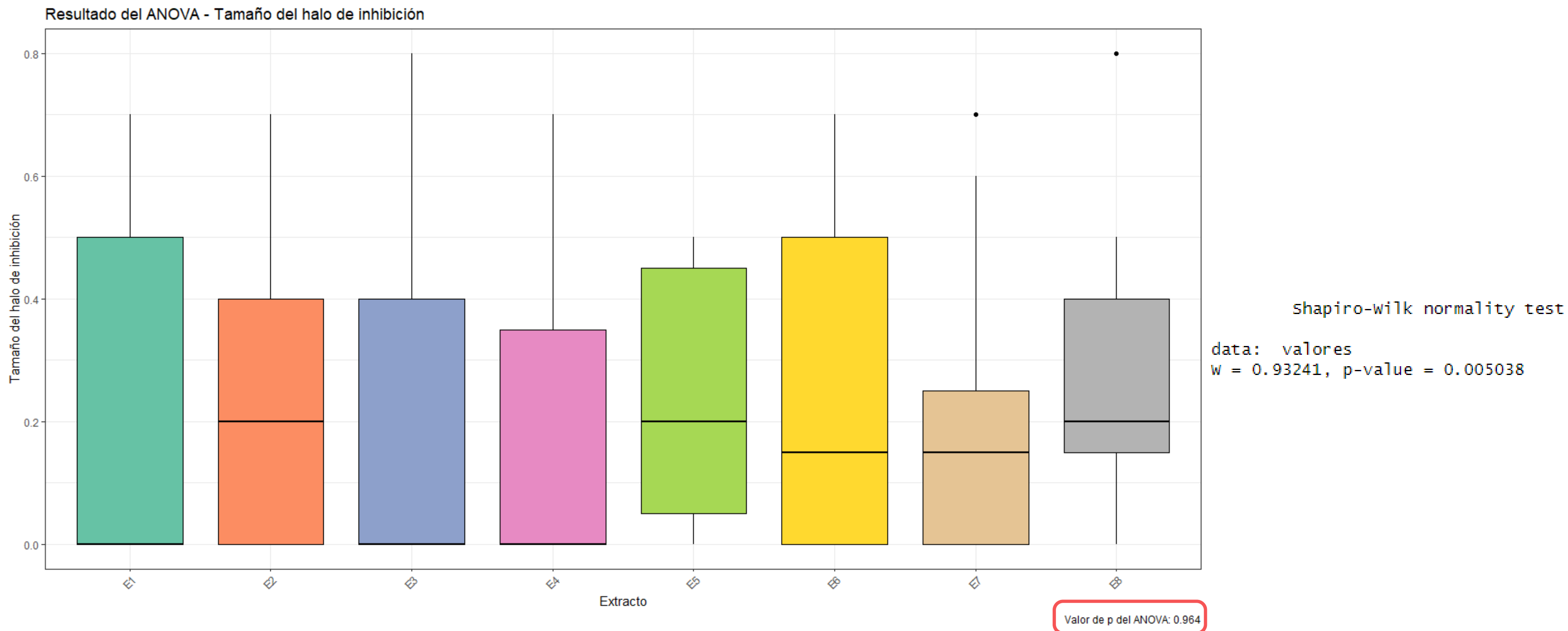
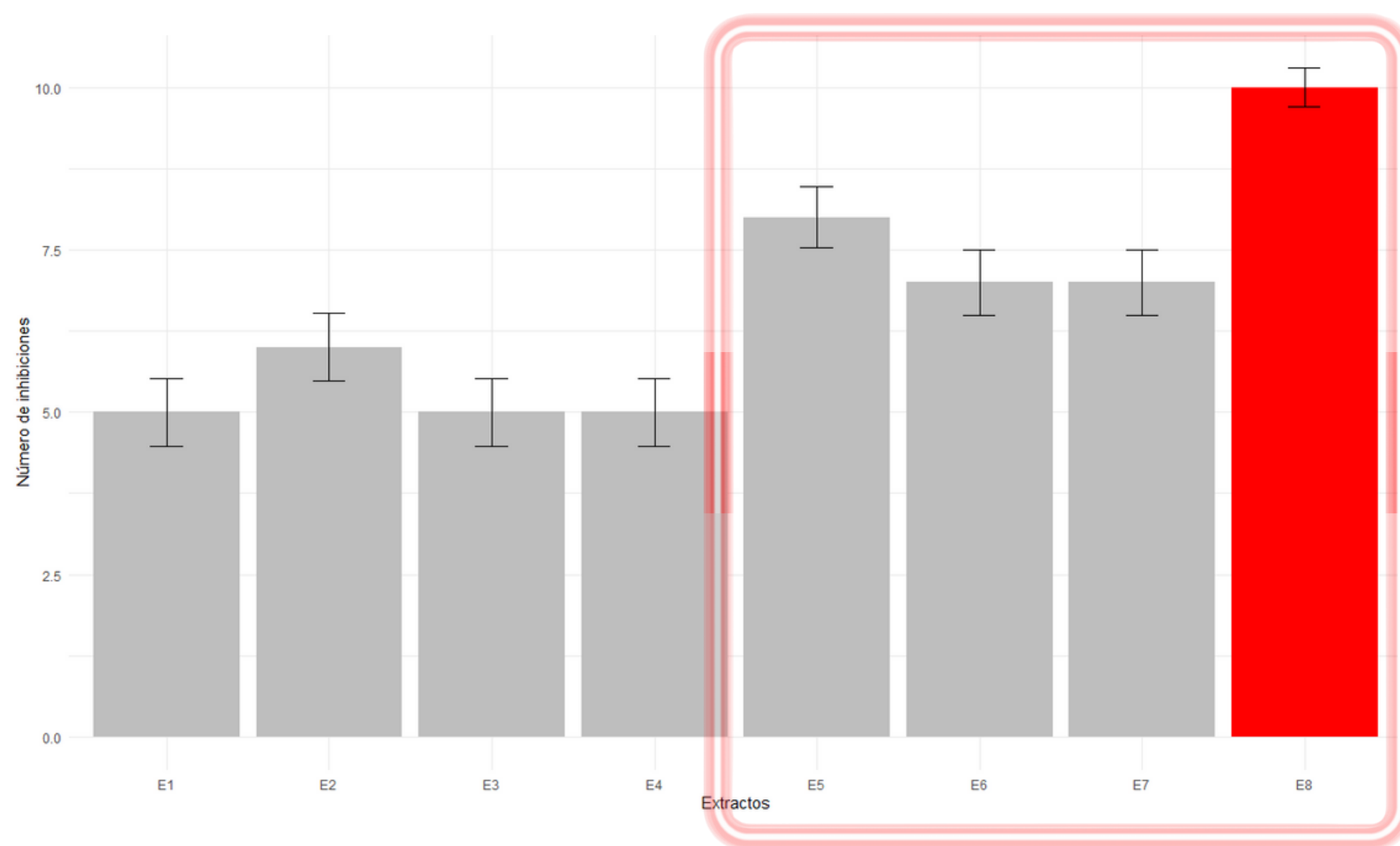


Fig. 12. Box-plot, comparación de los extractos frente a los tamaños del halo.

5. Análisis de datos



- El mejor extracto, es el **extracto 8, naranja (*Citrus sinensis*)**, que tuvo un total de 10 inhibiciones.

Fig. 13. Grafico de barras de los extractos con el total de inhibiciones en cada uno.

Discusión

- Del total de aislamientos microbianos obtenidos, se observó una mayor incidencia de contaminación por bacterias (69,2%), seguido por mohos (23%) y levaduras (0,058%), lo cual coincide con lo reportado por González *et al.*, (2003) el que hallaron un 76.47 % de contaminación bacteriana y un 5.88 % de contaminación por levaduras durante la fase de establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. (guayabo).
- Cárdenas-Burgos *et al.*, (2019) encontraron una incidencia de contaminación por bacterias de 57.8 % seguido por un 30,6 % de contaminación por hongos.



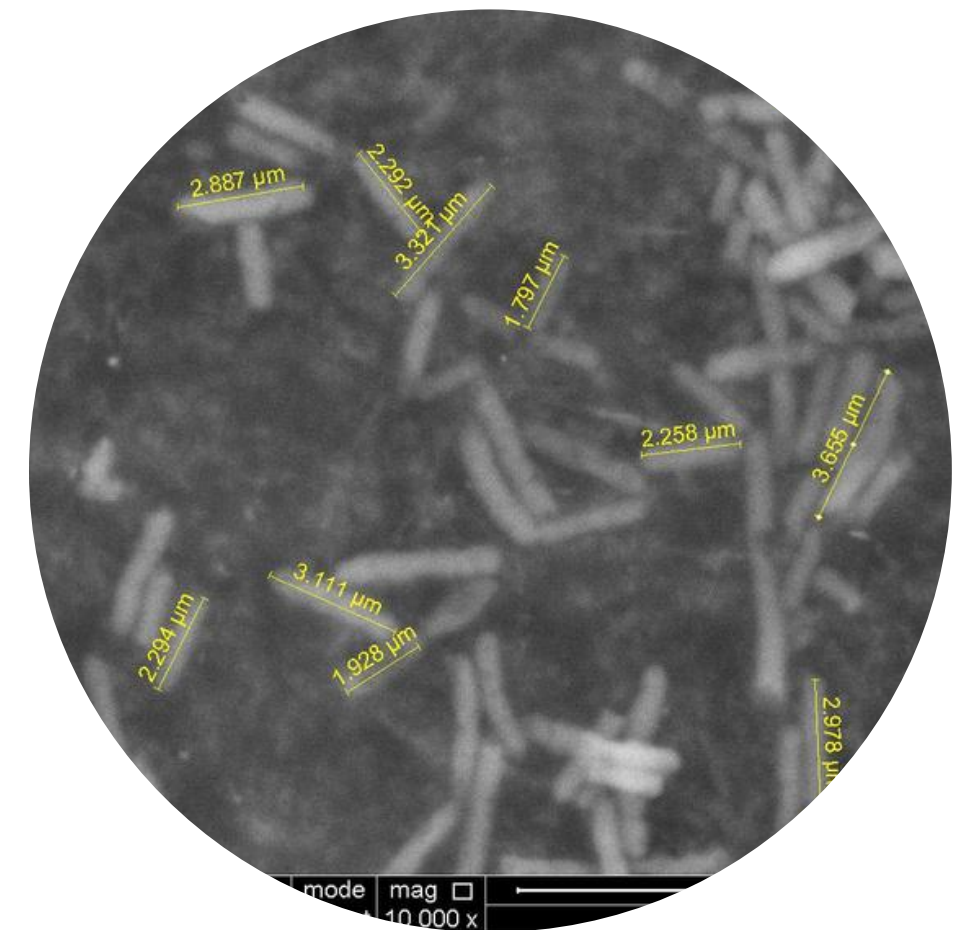
Discusión

- La prueba de sensibilidad mostró un resultado positivo, ya que, se observó inhibición de al menos 5 microorganismos del total de los extractos.
- De acuerdo con esto, el grupo de Rodríguez-Castro et al. (2020), reporta la utilización de aceites esenciales y extractos etanólicos de especies vegetales como una estrategia efectiva y amigable con los explantes y el ser humano.



Discusión

- Con ayuda de SEM, se observó una disminución de tamaño de la bacterias Gram positivas (M), coincidiendo con la información que proveen Nazzaro *et al.*, (2013) y Fernandes *et al.*, (2014).
- En este sentido, Dankert *et al.* (1979); y Zohri *et al.* (1995) reportan mayor eficiencia de la actividad antimicrobiana en bacterias Gram positivas lo cual reduce su tamaño, crecimiento y supervivencia, exponiéndolas en mayor medida al efecto de los ROS presentes en compuestos vegetales (Sahakyan, 2023).



Conclusiones

01

El aislamiento de microorganismos contaminantes del cultivo *in vitro* es una fase indispensable en la obtención del material necesario para estudiar de manera efectiva los microbios que afectan el desarrollo exitoso de todas las etapas que comprende el establecimiento de un cultivo *in vitro*.

02

La caracterización morfológica y microscópica de los contaminantes microbianos permite analizar y proponer estrategias de manejo basadas en la comprensión de los factores que influyen en la incidencia de contaminación por microorganismos en el cultivo *in vitro*.

Conclusiones

03

Los extractos vegetales muestran ser una herramienta efectiva para inhibir el crecimiento de los microorganismos principalmente en bacterias, esto sugiere que los extractos poseen compuestos antimicrobianos que pueden limitar o evitar el crecimiento de los microorganismos patógenos evaluados.

04

La microscopía electrónica reveló una disminución en el tamaño y desarrollo de los microorganismos expuestos a los extractos. Esto sugiere que, además de inhibir el crecimiento, los extractos tienen un impacto adicional en la morfología y fisiología de los microorganismos, posiblemente alterando sus estructuras celulares y procesos metabólicos.

Recomendaciones

- Hemos demostrado el prometedor potencial de los extractos vegetales, pero este es solo el comienzo. Necesitamos explorar más especies, optimizar sus métodos de aplicación y entender a fondo cómo actúan. Esto nos permitirá reducir la dependencia de químicos sintéticos, avanzando hacia prácticas biotecnológicas más respetuosas con el medio ambiente y la salud humana.
- La investigación de laboratorio, como la que hemos presentado hoy, genera conocimiento valioso, pero su verdadero impacto se materializa cuando se traduce en soluciones prácticas para el sector agrícola. El intercambio de experiencias y la co-creación de estrategias nos permitirán aplicar estos avances de manera más efectiva en viveros, laboratorios de micropropagación y, en última instancia, beneficiar directamente a los agricultores.
- Y finalmente, debemos promover la capacitación y la difusión de buenas prácticas en los laboratorios de cultivo in vitro. A pesar de los avances tecnológicos, la precisión y el cuidado en la manipulación siguen siendo insustituibles. Al fortalecer el conocimiento y las habilidades del personal, podemos minimizar los riesgos de contaminación desde su origen, maximizando la eficiencia y la rentabilidad de esta poderosa herramienta biotecnológica.

Participación de eventos y proyectos

- Proyecto de aula: Microbiología y Cultivo de tejidos vegetales.
- Proyecto de aula: Laboratorio de Bioquímica y Laboratorio de Biotecnología.
- Encuentro Departamental de semilleros de investigación, 2024.

CERTIFICA:

Que el investigador(a) Jhon Alexis Henao Campiño identificado(a) con el número de documento 1053868094 participó como ponente del proyecto Aislamiento, caracterización morfológica y bioprospección de contaminantes microbianos en plántulas cultivadas en condiciones in vitro bajo la modalidad de Trabajo de grado terminado e identificado con el código interno C55331-4333 presentado en el marco del XVI ENCUENTRO DEPARTAMENTAL DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN - RREDSI- REDCOLSI NODO CALDAS, desarrollado el 21 de mayo de 2024



Verificación de autenticidad

Agradecimientos

- Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación
- Vicerrectoría de Investigaciones y Posgrados de la Universidad de Caldas.
- Empresa, Artesanías y Vivero el Rosal.
- Cenicafé

Cenicafé

Centro Nacional de Investigaciones de Café

Reserva Forestal Protectora Planalto

www.cenicafe.org



Cenicafé FNC



@cenicafe



cenicafé



CenicaféFNC



@cenicafefnc



MÁS FEDERACIÓN