

## Micobiota epifítica y contaminantes fúngicos del establecimiento *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L)

Mayra Acosta\*, Israel Caballero, Yelenys Alvarado y Michel Leiva. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5<sup>1/2</sup>. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. e.mail: yalvarado@uclv.edu.cu

### RESUMEN

Conocer la micobiota contaminante de la guayaba (*Psidium guajava* L.) pudiera permitir crear un esquema de tratamiento a las plantas madres y al explante dirigidos a prevenir o eliminar la contaminación fúngica durante la micropropagación de la guayaba (*Psidium guajava* L.), por ello los objetivos de este trabajo fueron: evaluar cualitativamente la micobiota epifítica de las plantas donadoras de guayaba, var. Enana Roja cubana EEA 18-40, tratadas y no tratadas con fungicidas y aislar, caracterizar e identificar los hongos filamentosos contaminantes de la fase de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales. Para la identificación de los hongos filamentosos se utilizó el método de la cámara húmeda y se realizaron preparaciones directas al microscopio óptico del crecimiento fúngico. Para el aislamiento de los contaminantes fúngicos identificados en la fase de establecimiento *in vitro* se utilizaron placas de Petri con medio de cultivo PDA y se incubaron a 28°C y oscuridad constante durante 7 a 14 días. En la caracterización e identificación se tuvieron en cuenta las características culturales y morfológicas. Se identificaron nueve géneros de hongos filamentosos en las plantas donadoras (sin aplicación de fungicidas) los cuales fueron: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium* y *Trichoderma*. La aplicación de los fungicidas Mancozeb PH 80 (7.5g.l<sup>-1</sup>) y Benomyl PH 50(4g.l<sup>-1</sup>) no fue efectiva en la eliminación de la micobiota epifítica. Todos estos géneros excepto *Nigrospora* fueron detectados durante la fase de establecimiento del material vegetal. Sin embargo, la desinfección con Hipoclorito de Sodio al 3% durante 10 minutos y con Biclورو de Mercurio al 0.05 y 0.1% lograron reducir el 50% de los géneros contaminantes.

Palabras clave: contaminación microbiana, desinfectantes superficiales, hongos filamentosos, micropropagación

### ABSTRACT

The studying of contaminats micobiote on guajaba (*Psidium guajava* L.) could help for creating schedule treatment of donator plants and its explants to eliminate or prevent the fungi contamination during guajaba micropropagation. The present work were focused on: qualitative evaluation of epiphytic micobiote from explants of Enana Roja cubana EEA 18-40 plants (treated and not treated with fungicide), to isolate, characterize and identify the filamentous fungi from *in vitro* establishment of nodal segments. For the filamentous identification was used the wet chamber method and preparations were observed in optic microscopic. PDA Petri dishes were used to cultivate the filamentous fungi at 28°C and dark during 7 to 14 days. The cultural and morphological characteristics were used to identifying each isolate. Nine filamentous fungi genera were identify on donator plants without any fungicide application, the principal genera's were: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium* and *Trichoderma*. The application of Mancozeb 80 PH (7.5g.l<sup>-1</sup>) and Benomyl 50 PH (4g.l<sup>-1</sup>) was not effective on epiphytic contaminants micobiote elimination. All these genera's with the exception of *Nigrospora* were detected during the establishment of nodal segments. However the disinfection with hypochlorite at 3% for 10 minutes and HgCl<sub>2</sub> solution at 0.05% and 0.1% could reduced the 50% of al contaminates genera's.

Key words: micropropagation, micobiote contamination, filamentous fungi, surface desinfectants.

### INTRODUCCIÓN

La contaminación microbiana, principalmente por hongos es una de las limitantes en el éxito del establecimiento aséptico de segmentos nodales de material adulto del guayabo (Ramírez-Villalobos *et al.*, 1999). La presencia de microorganismos contaminantes en la fase de establecimiento *in vitro*

ocurre sobre todo cuando la planta donante crece directamente en el campo y está expuesta a plagas, enfermedades, polvo y otros agentes, sin ningún tipo de control ambiental (Ramírez-Villalobos y Salazar 1997). También este fenómeno se favorece por las características anatómicas propias de este cultivo tales como la presencia de pelos en las hojas y tallos que impiden la

penetración de los desinfectantes lo cual dificulta en extremo la eliminación de los microorganismos (Barker *et al.*, 1979) o puede deberse a técnicas inadecuadas de trabajo en el laboratorio (Alvarado, 1998).

Desde la fase de establecimiento es necesaria la eliminación de estos microorganismos donde los daños son menores debido al reducido volumen de explantes que se manipulan (Hernández *et al.*, 1996 y Alvarado *et al.*, 1997).

Conocer la micobiota contaminante nos permite crear un esquema de tratamientos a las plantas madres y al explante dirigidos a prevenir o eliminar la contaminación fungosa durante la micropropagación de la guayaba (*Psidium guajava* L.), por ello los objetivos de este trabajo fueron:

- Evaluar cualitativamente la micobiota epifítica fungosa de las plantas donadoras de Guayaba (*Psidium guajava* L.) tratadas y no tratadas con fungicidas.
- Aislar, caracterizar e identificar los hongos filamentosos contaminantes de la fase de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Segmentos nodales de 1.5cm a 2.0cm provenientes de plantas donadoras de Guayaba (*Psidium guajava* L.) de la variedad Enana Roja Cubana EEA 18-40 sembradas en condiciones semicontroladas (Plantas sembradas en bolsas de

polietileno de 3.75 litros, con sustrato compuesto por humus de lombriz y zeolita, con 70% de sombra y que recibieron las atenciones culturales requeridas de fertilización foliar con Bayfolán forte).

### Fungicidas

Fungicida preventivo de contacto: Mancozeb PH 80 (7.5g.l<sup>-1</sup>) y fungicida preventivo curativo de acción sistémica: Benomyl PH 50 (4g.l<sup>-1</sup>).

### Evaluación cualitativa de la micobiota epifítica fungosa de las plantas donadoras de Guayaba (*Psidium guajava* L.)

Segmentos nodales tomados de plantas donadoras sin aplicación de fungicidas (Control) y con aplicación dos veces por semana de los fungicidas Mancozeb y Benomyl, fueron colocados en placas de Petri con papel de filtro previamente humedecido con agua destilada estéril. Las placas se incubaron a 28°C y oscuridad constante durante siete días. Para la identificación de los hongos filamentosos se realizaron preparaciones directas al microscopio clínico observando las características de las hifas, estructuras de reproducción y esporas. Para completar los análisis se utilizó el Manual de clasificación de hongos imperfectos de Barnett y Hunter (1987).

### Aislamiento, caracterización e identificación de los hongos filamentosos contaminantes de la fase de establecimiento *in vitro*

Segmentos nodales tomados de plantas donadoras con aplicación de fungicidas fueron desinfectados, antes de ser llevados a la fase de establecimiento, para ello se utilizaron los tratamientos que aparecen en la tabla 1:

Tabla 1. Tratamientos desinfectantes aplicados a segmentos nodales de Guayabo (*Psidium guajava* L.) para su establecimiento *in vitro*.

Tratamientos	Desinfectantes	Concentración (%)	Tiempo (min)	Referencia
1	NaOCl	1	10	Herrera <i>et al.</i> , 1990
2	NaOCl	2	10	
3	NaOCl	3	10	
4	HgCl <sub>2</sub>	0.05	5	Pérez, 1990 y Gil <i>et al.</i> , 1992
5	HgCl <sub>2</sub>	0.1	5	
6	HgCl <sub>2</sub>	0.15	5	
Control	-	-	-	-

Se colocó un explante por tubo de ensayo de 14.5 x 2.5 cm de largo y diámetro respectivamente, con tapones de gasa en los cuales se vertieron 10ml de medio de cultivo de establecimiento compuesto por las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), al cual se le añadió tiamina (1.0 mg.l<sup>-1</sup>),

mioinositol (100 mg.l<sup>-1</sup>) y sacarosa (30g.l<sup>-1</sup>) y solidificado con agar (SIGMA Chemical Co) a razón de 8.0 g.l<sup>-1</sup>. Posteriormente se incubaron en condiciones de luz solar, una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de 48.0-62.5 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (Agramonte, 1999) y una temperatura de 28±2°C.

La contaminación microbiana se evaluó diariamente por observación visual y los explantes contaminados por hongos filamentosos se retiraron de las cámaras de crecimiento para su posterior identificación.

El aislamiento de los contaminantes fungosos se realizó por siembra directa, con aguja, de fragmentos de micelio en placas de Petri que contenían medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) (Fluka) las cuales se incubaron a 28°C y oscuridad constante durante 7 a 14 días. Para la identificación se tuvieron en cuenta sus características culturales y morfológicas y se siguieron los criterios de los manuales de clasificación de Barnett y Hunter (1987).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación cualitativa de la micobiota epifítica fungosa de las plantas donadoras de Guayaba (*Psidium guajava* L.)

Se comprobó que las plantas donadoras de Guayabo a pesar de encontrarse en condiciones semicontroladas poseían una micobiota epifítica diversa integrada por géneros de hongos filamentosos que han sido descritos como saprofitos o patógenos de plantas. La aplicación de los fungicidas a las concentraciones y con la frecuencia utilizada solo eliminó dos de los géneros fungosos presentes en las plantas sin tratar (Tabla 2).

Tabla 2. Géneros de hongos filamentosos identificados en plantas donadoras de Guayabo.

Plantas sin tratamiento de fungicidas	Plantas con tratamiento de fungicidas
<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria</i>
<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum</i>
<i>Curvularia</i>	<i>Curvularia</i>
<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Aspergillus</i>	-
<i>Nigrospora</i>	-

Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Pérez *et al.* (1999) quienes estudiando la micoflora del ambiente de una plantación de guayabo en el municipio Mara, estado Zulia (Venezuela) colectaron esporas de nueve géneros de hongos: *Cladosporium*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Fusarium*, además encontraron otros géneros tales como: *Beltrania*, *Tetraploa*, *Pestalotiopsis*, *Dothiorella* y *Helminthosporium* que no se apreciaron en nuestro estudio.

Los géneros de hongos filamentosos encontrados en las plantas de guayabo también han sido hallados como micobiota epifítica de otros árboles leñosos, así tenemos que en el cultivo del café Arizaleta y Pineda (1999) identificaron nueve géneros de hongos *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Mucor*, *Pythium*, *Phomopsis*, *Rhizopus*, *Colletotrichum*, *Pestalotia* y *Nigrospora*. Por otra parte Mujica y Pineda (1999) estudiando la micoflora asociada al follaje de plantas de guanabana (*Annona muricata*) encontraron los siguientes géneros de hongos: *Lasiodiplodia*,

*Rhizopus*, *Fusarium* y *Cladosporium*; mientras que Montilla *et al.* (1999) evidenciaron la gran diversidad de microorganismos que conviven en forma epifítica en las hojas del Eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*). Estos autores identificaron 11 géneros de hongos resaltando por su importancia fitopatológica, los hongos *Alternaria* sp., *Botryodiplodia* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp, y *Trichoderma* sp., siendo los más numerosos *Aspergillus* sp, y *Rhizopus* sp.

### Aislamiento, caracterización e identificación de los hongos filamentosos contaminantes de la fase de establecimiento *in vitro*

Durante la fase de establecimiento *in vitro* se aislaron los géneros de hongos filamentosos que inicialmente aparecieron como constituyentes de la micobiota epifítica de las plantas donadoras, excepto el género *Nigrospora* (Tabla 3). Todos se ubican taxonómicamente dentro de la clase *Deuteromycetes* u hongos imperfectos (Barnett y Hunter, 1987).

Tabla 3. Géneros de hongos filamentosos identificados como contaminantes de la fase de establecimiento *in vitro* de Guayabo (*Psidium guajava* L.).

Tratamientos para la desinfección	Géneros de hongos filamentosos
1- NaOCl (1%)	<i>Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Curvularia y Trichoderma</i>
2- NaOCl (2%)	<i>Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Curvularia y Fusarium</i>
3- NaOCl (3%)	<i>Alternaria, Cladosporium, Curvularia y Fusarium</i>
4- HgCl <sub>2</sub> (0.05%)	<i>Alternaria, Cladosporium, Curvularia y Fusarium</i>
5- HgCl <sub>2</sub> (0.1%)	<i>Alternaria, Cladosporium, Curvularia y Trichoderma</i>
6- HgCl <sub>2</sub> (0.15%)	<i>Alternaria, Aspergillus, Curvularia, Cladosporium, Fusarium, Colletotrichum y Trichoderma</i>
Control	<i>Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Colletotrichum, Curvularia, Fusarium, Penicillium y Trichoderma</i>

Los tratamientos con Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 3% durante 10 minutos y con Biclورو de Mercurio (HgCl<sub>2</sub>) al 0.05 y 0.1% durante 5 minutos lograron eliminar el 50% de los géneros detectados en el material sin desinfectar. El Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 3% durante 10 minutos impidió el crecimiento micelial de los géneros *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Penicillium* y *Trichoderma*, mientras que el Biclورو de Mercurio (HgCl<sub>2</sub>) al 0.05 y 0.1% durante 5 minutos eliminó a los géneros *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium* y *Penicillium*. Los géneros *Alternaria*, *Cladosporium* y *Curvularia* no pudieron ser eliminados con los tratamientos ensayados.

Enjalric *et al.* (1988); George (1993); y Leifert *et al.* (1994), Danby *et al.* (1994) y Alvarado *et al.* (1998) refieren a los géneros *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia* y *Fusarium* como los microorganismos fungosos más comúnmente introducidos al cultivo de tejidos.

Se han descrito diferentes metodologías para el establecimiento aséptico de segmentos nodales de guayabo, tanto de material juvenil como adulto (Amin y Jaiswal, 1987; 1988; Broochijk, 1989; Fitchet, 1989; 1990; Jaiswal y Amin, 1987; Khattak *et al.*, 1990; Loh y Rao, 1989). Sin embargo, Vilorio, (1993) señaló problemas de contaminación microbiana durante la evaluación de varios métodos de desinfección utilizados en plantas leñosas y afirmó que el establecimiento *in vitro* del guayabo se ha caracterizado por un bajo porcentaje de explantes asépticos constituyendo uno de los principales problemas para la micropropagación de esta especie leñosa.

Ramírez-Villalobos y Salazar (1997) a fin de establecer *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.) tipo "Criolla Roja" provenientes de plantas regeneradas *in vitro* cultivadas en condiciones de macetas, o de plantas cultivadas en el campo, probaron inicialmente el efecto del tiempo de

exposición al Hipoclorito de Sodio (5.25%) y al Hipoclorito de Calcio (10%). Estos autores evaluaron el efecto de tratamientos con Sulfato de Gentamicina, Benomyl y solución de Ácido cítrico + Ácido Ascórbico como antioxidante, en el establecimiento y brotación de explantes provenientes de plantas de campo. Sus resultados mostraron que el Hipoclorito de Calcio al 10% resultó más eficiente que el Hipoclorito de Sodio en el control de la contaminación microbiana al utilizarlo por 15 min. Los segmentos nodales provenientes de plantas adultas lograron establecerse *in vitro*, mediante el uso del antibiótico, fungicida y antioxidantes en el medio de cultivo y/o mediante un lavado de los explantes inmediatamente antes de la siembra.

Ramírez-Villalobos *et al.* (1999) intentando implantar ápices de guanábana (*Annona muricata*), sumergieron en antioxidante estos explantes y realizaron una desinfección superficial con Hipoclorito de Sodio a cuatro concentraciones (0; 0,5; 1 y 2%) y tres tiempos de exposición (0, 5 y 10 min), luego enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada antes de la siembra en el medio nutritivo Murashige y Skoog (1962) y a los cinco días después de la siembra detectaron la presencia de los hongos *Alternaria*.sp., *Aspergillus* sp, *Aureobosidium*, sp., *Botryodiplodia* sp., *Curvularia* sp., *Helmitlhosporium* sp., así como otros no identificados.

## CONCLUSIONES

Se comprobó que la micobiota epifítica de las plantas donadoras de guayaba era muy diversa. Se identificaron nueve géneros de hongos filamentosos en las plantas donadoras (sin aplicación de fungicidas) los cuales fueron: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium* y *Trichoderma*. La aplicación de los fungicidas no fue efectiva en la eliminación de la micobiota epifítica pues solo los géneros *Nigrospora* y *Aspergillus* pudieron ser eliminados con

la aplicación de los mismos, todos los géneros excepto *Nigrospora* fueron detectados durante la fase de establecimiento *in vitro* del guayabo. Los tratamientos con Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 3% durante 10 minutos y con Bicloruro de Mercurio (HgCl<sub>2</sub>) al 0.05 y 0.1% fueron los más efectivos en la desinfección de los explantes logrando reducir en un 50% los géneros de hongos filamentosos.

## REFERENCIAS

- Alvarado, Y (1998) Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: Pérez Ponce, J.N. (Ed), Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cap 5 pp 81-104
- Alvarado, Y, Herrera L, Suárez M, Rivero O, García L. y Acosta M (1997) Control de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas. En: Resúmenes Tercer Seminario Internacional de Sanidad Vegetal, Palacio de las Convenciones, pp. 76-77. Ciudad de la Habana, Cuba
- Amin, MN y Jaiswal VS (1988) Rapid clonal propagation of through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of mature trees. *Plan Cell Tiss Org Cult* 9: 235-243
- Amin, MN y Jaiswal VS (1988) Micropropagation as an aid to rapid cloning of a guava cultivar. *Sci Horticultural* 36: 89-95
- Baker PK, de Fossard RA. y Bourne RA (1979) Progress towards clonal propagation of Eucalyptus species by tissue culture techniques
- Barnett, HL y Hunter BB (1987) Illustrated Genera of imperfect fungi. Fourth edition New York MacMillan Publishig Company London Collier
- Broochijk, M (1989) New sterilization method for the *in vitro* culture of guavas (*Psidium guajava* L.). *Information Bulletin Citrus and Subtropical Fruit Research Institute, South Africa* 202: 1-2
- Fitchet, PM (1989) Tissue culture of guava. *Information Bulletin, Citrus and Subtropical Fruit Research Institute, South Africa* 201: 4-5
- Fitchet, PM (1990) Dimple guava established in tissue culture. *Inligtings-bulletn Navorsinginstituut vir Sitrus en Subtropieses Vrugte* 212: 5
- Hernández, R, Alvarado Y y Sarría Z (1996) Micrométodo para la detección de contaminantes bacterianos latentes en el cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. Cuarto Coloquio Internacional de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba
- Jaiswal, VS y Amin MN (1987) *In vitro* propagation of guava from shoot cultures of mature trees. *J. of Plant Physiology* 130: 7-12
- Khattak, MS, Malik MN y Khan MA (1990) Effect of surface sterilization agents on *in vitro* culture guava (*Psidium guajava* L.) cv Safeda tissue. *Sarhad Jornal of Agriculture* 6 (2): 151-154
- Loh, CS. y Rao AN (1989) Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoots formation *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 39 (1): 31-39
- Pérez E, Santos R, Montiel A, Marín M y Sandoval L (1999) Micoflora del ambiente de una plantación de guayabo en el municipio Mara, estado Zulia. Centro Hortifrutícola. Departamento de Botánica, Apdo. 15205, Maracaibo 4005.Venezuela
- Ramírez-Villalobos M y Salazar E (1997) Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.) *Rev. Fac. Agrom. (LUZ)*. 1997, 14: 497-506
- Ramírez-Villalobos M, León de Sierralta S y Urdaneta A (1999) Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz
- Ramírez-Villalobos M, Isea F, Santos R, León de Sierralta S y Urdaneta A (1999) Hongos contaminantes en el cultivo *in vitro* de ápices de plantas adultas de *annonamuricata* tratados con hipoclorito de sodio, en el estado Zulia, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 16: 243-255 *Fac. Agronomía, Apdo. 15205 Maracaibo 4005 Venezuela*
- Viloría, Z (1993) Cultivo *in vitro* de nudos de guayabo (*Psidium guajava* L.). Fase I. La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. Trabajo de Ascenso 34 pp. Maracaibo, Venezuela.