Evaluación del efecto del complejo carbendazim- β -ciclodextrina para el control de hongos filamentosos contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas

Mileidy Cruz, Mayra Acosta, Michel Leiva, Yelenys Alvarado y Minerva Lezcano. *Autor para correspondencia.

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

RESUMEN

La mayoría de los contaminantes que afectan el cultivo de tejidos de plantas son bacterias y hongos. Estos están comúnmente en las plantas *in vivo* pero pueden provocar efectos devastadores en las plantas en condiciones *in vitro*, la búsqueda de nuevas alternativas para su prevención y control es una tarea que se impone. El carbendazim es el componente activo de varios fungicidas sistémicos ampliamente utilizados en el mundo para el control de enfermedades fungosas en el campo. Su aplicación para el control de la contaminación fungosa en el cultivo *in vitro* de plantas se ve limitada por su escasa solubilidad en agua, lo cual se soluciona al presentarse en forma de complejo con una β -ciclodextrina. Con el objetivo de evaluar el efecto del complejo carbendazim- β -ciclodextrina sobre hongos filamentosos contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas se determinó su Mínima Concentración Inhibitoria (MCI). Para ello se empleó el método de dilución en Agar. Se analizaron 34 cepas pertenecientes a 14 géneros de hongos contaminantes. El complejo carbendazim- β -ciclodextrina mostró una adecuada actividad antifúngica frente a los contaminantes expresada en la capacidad de inhibir el crecimiento micelial del 78.78% de los aislados probados a una concentración de 64 μgml^{-1} . Estos resultados pueden constituir una alternativa importante ya que este producto pudiera utilizarse en el control de la contaminación fungosa en el cultivo *in vitro* de plantas.

Palabras clave: compuestos antifúngicos, contaminación fungosa, mínima concentración inhibitoria

ABSTRACT

The majority of *in vitro* contaminant microorganisms affecting plant *in vitro* culture are bacteria and fungus. These are commonly observed *in vivo* on plants, but they could cause harmful effect on plant propagated *in vitro*. The search of new alternatives for their prevention and control is a priority. Carbendazim is the active ingredient of some systemic fungicides, it's application for fungus contamination on *in vitro* propagation of plant it has been constrained for their low solubility on water. This problem could be solved by combining this product with a β -ciclodextrina. This paper was focused to determine the effect of carbendazim- β -ciclodextrina versus the contaminant fungi of plant *in vitro* culture. It was determined the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by the agar dilution method. Thirty four strains were analysed. The carbendazim- β -ciclodextrina complex showed an acceptable antifungal activity versus contaminant. This result could be an useful alternative to control the fungi contamination on plant propagated *in vitro*.

Key words: fungal contamination, antifungal compounds, minimum inhibitory concentration

INTRODUCCIÓN

La contaminación microbiana es un problema constante que compromete el desarrollo de todas las técnicas *in vitro* (Enjalric *et al.*, 1988). Las pérdidas causadas por microorganismos contaminantes principalmente hongos y bacterias constituyen un serio problema a escala mundial en los numerosos laboratorios (Kannan y Srinivasan, 1994; Carrasana *et al.*, 1997). Estos están comúnmente en las plantas *in vivo* pero pueden provocar efectos devastadores en las plantas en condiciones *in vitro* (Skirvin *et al.*, 1999). Existen muchas fuentes que pueden introducir contaminantes al cultivo *in vitro* de plantas estas incluyen al personal, el ambiente del laboratorio y el tejido vegetal a propagar (Leifert *et al.*, 1994; Falkner, 1997).

Se han establecido numerosos procedimientos tecnológicos para controlar o disminuir la presencia de contaminantes, y el empleo de productos químicos (fungicidas y antibióticos) ha constituido una vía rápida tanto para atenuar como para eliminar estos microorganismos (Carrasana *et al.*, 1997).

El uso de fungicidas en el proceso de micropropagación de especies vegetales no ha tenido amplia difusión a escala masiva debido quizás, a los riesgos de fitotoxicidad, sus elevados costos y su alta especificidad. No obstante, se conocen varios ejemplos del empleo del Benomyl con estos fines (Ramírez y Salazar, 1997; García y Rafael, 1990). Este fungicida ha sido empleado antes del autoclaveo con buenos resultados puesto que se transforma en

carbendazim y bitilisocianato, ambos con efectividad biológica (Thurston, 1979, Hauptmann *et al.*, 1985 y Haldeman 1987, citados por George, 1993).

El carbendazim (Bencimidazol 2-il carbamato de metilo) es el componente activo de varios fungicidas sistémicos ampliamente utilizados en el mundo para el control de un gran número de enfermedades fungosas en campo (Benomyl, Fundazol, Agrodazim, Bavistin, Chemcarb, Delsene), su mayor dificultad radica en su escasa solubilidad en agua. Este problema queda solucionado al presentarse en forma de complejo con una β -ciclodextrina la cual es un derivado de la descomposición parcial del almidón. Las ciclodextrinas, aumentan en gran medida la solubilidad de este producto y esto hace posible su utilización en pruebas *in vitro* para evaluar el efecto de este, sobre los diferentes microorganismos. Este trabajo tuvo como objetivo:

Evaluar el efecto del complejo carbendazim- β -ciclodextrina para el control de hongos filamentosos contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fungicida

Se empleó el Carbendazim en forma de un complejo con β -ciclodextrina (Complejo I), el cual fue suministrado por la Facultad de Química Farmacia de la Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas.

Microorganismos

Se utilizaron 34 cepas de hongos filamentosos contaminantes pertenecientes a 14 géneros (Tabla 1) procedentes de la colección de cultivos del laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biotecnología de las Plantas.

Tabla 1. Géneros de hongos filamentosos utilizados para evaluar el efecto del Complejo I (Carbendazim- β -ciclodextrina) sobre contaminantes fungosos del cultivo *in vitro* de plantas.

Géneros	Número de cepas
<i>Aspergillus</i>	8
<i>Fusarium</i>	4
<i>Cladosporium</i>	2
<i>Curvularia</i>	2
<i>Colletotrichum</i>	2
<i>Chaetomium</i>	1
<i>Helminthosporium</i>	1
<i>Monilia</i>	1
<i>Oidiodendron</i>	1
<i>Penicillium</i>	7
<i>Pestalotia</i>	1
<i>Rhizopus</i>	1
<i>Spicaria</i>	1
<i>Trichoderma</i>	1
Total	34

Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI)

Se determinó la MCI del complejo Carbendazim- β -ciclodextrina frente los hongos filamentosos. Para ello se empleó el método de dilución en Agar. Las soluciones del complejo se prepararon a una concentración de $1\ 280\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (p/v) en agua bidestilada y desionizada y se esterilizaron por filtración con membranas de $0.45\ \mu\text{m}$. Se ensayaron concentraciones decrecientes de este en diluciones seriadas dobles desde 512.0 a $0.0625\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA)(BioCen).

Las soluciones se prepararon al doble de las concentraciones deseadas y se añadieron al Agar fundido ($48-50\ ^\circ\text{C}$) después de autoclaveado. Se siguió un esquema de dilución que incluyó una dilución final de la concentración del fungicida en el Agar de 1:10.

Se utilizaron placas de Petri de 70mm de diámetro. El agar con la solución antifúngica se distribuyó sobre una superficie niveladora, hasta lograr una capa de cuatro milímetros de espesor, preparándose dos repeticiones de cada concentración. Además se incluyeron placas de Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa libres de fungicida para ser usadas como controles de crecimiento.

En el centro de cada placa se colocó un disco de micelio de siete milímetros de diámetro proveniente de colonias crecidas durante 7-14 días. Las mismas se incubaron a 28°C y oscuridad constante. Se midió diariamente, con regla graduada, el diámetro de crecimiento del hongo filamentoso hasta los 14 días. La mínima concentración que logró inhibir totalmente el crecimiento se tomó como la MCI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El complejo I (Carbendazim-β-ciclodextrina) mostró una adecuada actividad antifúngica frente a los contaminantes expresada en la capacidad de inhibir el crecimiento micelial del 78.78% de las cepas probadas a las concentraciones ensayadas (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones Mínimas inhibitorias del Complejo Carbendazim-β-ciclodextrina frente a cepas de hongos filamentosos contaminantes del cultivo *in vitro* de las plantas.

Cepas	MCI (mg.l ⁻¹)
<i>Aspergillus</i> sp1	4
<i>Aspergillus</i> sp2	8
<i>Aspergillus</i> sp3	4
<i>Aspergillus</i> sp4	4
<i>Aspergillus</i> sp5	8
<i>Aspergillus</i> sp6	2
<i>A. niger</i>	64
<i>A. terreus</i>	2
<i>Penicillium</i> sp1	2
<i>Penicillium</i> sp2	0.5
<i>Penicillium</i> sp3	2
<i>Penicillium</i> sp4	4
<i>Penicillium</i> sp5	4
<i>Penicillium</i> sp6	2
<i>Penicillium</i> sp7	0.25
<i>Spicaria</i> sp	8
<i>Curvularia</i> sp1	>512
<i>Curvularia</i> sp2	>512
<i>Chaetomium</i> sp	0.5
<i>Cladosporium</i> sp1	>512
<i>Cladosporium</i> sp2	>512
<i>Trichoderma</i> sp	2
<i>Fusarium</i> sp1	1
<i>Fusarium</i> sp2	4
<i>Fusarium</i> sp3	1
<i>Fusarium</i> sp4	0.25
<i>Helminthosporium</i> sp	> 512
<i>Pestalotia</i> sp	< 0.125
<i>Rhizopus</i> sp	>512
<i>Colletotrichum</i> sp1	1
<i>Colletotrichum</i> sp2	16
<i>Oidiodendron</i> sp	>512
<i>Monilia</i> sp	>512

Según Boxus y Terzi (1988), Cassells, (1991) y Osorio *et al.* (1997,1999) los hongos filamentosos constituyen un problema serio en cuanto a las pérdidas que

ocasionan en el cultivo *in vitro* de plantas. Los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Curvularia*, *Fusarium* y *Chaetomium* han sido descritos por

George (1993) y por Leifert *et al.* (1994) como los microorganismos fungosos más comúnmente introducidos al cultivo de tejidos.

El 100% de las cepas de los géneros *Penicillium*, *Chaetomium* y *Fusarium*, presentaron MCI del complejo I, menores e iguales que 4mg.l⁻¹, y en el caso del género *Aspergillus* el 87.5% de las cepas mostraron MCI menores e iguales que 8 mg.l⁻¹.

Autores como García y Rafael (1990) utilizaron concentraciones de 500 mg.l⁻¹ de Benomyl para el control de la contaminación fungosa en la propagación *in vitro* de Café (*Coffea arabica* L.), sin embargo, utilizando el complejo I (Carbendazim- β -ciclodextrina) se logró inhibir el 79% de las cepas de hongos contaminantes ensayadas a concentraciones de 64mg.l⁻¹. Estos resultados pueden contribuir una alternativa valiosa para el control químico de la contaminación fungosa en el cultivo *in vitro* de plantas.

El género *Colletotrichum* ha sido referido como un agente fitopatógeno de los cultivos de la guayaba, café, entre otros, causando enfermedades o formando parte del ecosistema bajo una acción saprofitica (Mayea *et al.*, 1983; Martínez y Zambrano, 1994). El mismo apareció como contaminante en el cultivo *in vitro* siendo probablemente, el material inicial, la fuente de esta contaminación, es por ello que se pudiera recomendar el uso de este producto en el tratamiento de las plantas donadoras antes de ser introducidas en el cultivo *in vitro*.

CONCLUSIONES

El complejo I (Carbendazim - β -ciclodextrina) logró inhibir el crecimiento de un gran número de hongos filamentosos contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas por lo que pudiera valorarse su uso para el control de la contaminación fungosa.

REFERENCIAS

Boxus, Ph y Terzi J (1988) Control of accidental contamination during mass propagation. *Acta Horticulturae* 225:189-193

Cassells, AC (1991) Problem in tissue culture: culture contamination. En: Debergh P y Zimmerman R.H (Eds) *Micropropagation*, pp. 31-45. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Carrazana, D , León A, Herrera L, Alvarado Y y Quiñones R (1997) Efecto de diversos fungicidas comerciales sobre hongos contaminantes en biofábricas. *Centro Agrícola*. 1: 61-66

Enjalric, F, Carron M y Lardet L (1988) Contamination of primary cultures in tropical areas: The case of *Hevea brasiliensis*. *Acta Horticulturae* 255: 57-65

Falkiner F., (1997) Antibiotics in plant tissue culture and micropropagation what are we aiming at?. En: AC Cassells (Ed) *Pathogen and Microbial Contamination Management in micropropagation*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp 155-160

García EG y Rafael, M (1990) Control de la oxidación y contaminación en microesquejes de café (*Coffea arabica* "Catimor") cultivados *in vitro*. *Agronomía Tropical*. 40: (4-6)281-290

George, EF (1993) *Plant propagation by tissue culture*. Chapter 5, Part1. 2nd Ed., pp. 130-143. Exergetics Ltd.

Kannan, V y Srinivasan S (1994) A simple technique for reducing microbial contamination and increasing survival rate of explant in *Eucalyptus*. *J. Ecobiol.* 6(1): 43-46

Leifert, C, Morris CE y Waites WM (1994) Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13: 139-183

Osorio, Ch y Suárez JM (1999) La regeneración aplicada a laboratorios comerciales de cultivo de tejidos. Libro de Reportes cortos del 5to Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. IBP. UCLV. S.C. Cuba. pp 55-58

Mayea, S y Padrón J (1983) Bacterias y hongos fitopatógenos. Ed. Pueblo y Educación. pp 130-134. La Habana

Martínez M y Zambrano C (1994) Identificación y patogenicidad de cepas del género *Colletotrichum* asociados al cultivo del café (*Coffea arabica*) L. en la región centro occidental de Venezuela *Agronomía Trop.* 44 (4): 567-577

Skirvin, S Motoike S, Norton M, Ozgur M, Al-juboory K y McMeans O (1999) Workshop on micropropagation establishment of contaminant-free perennial plants *in vitro*. *In vitro cell. Biol- Plant* 35: 278-280

Ramírez M y Salazar E (1997) Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.) *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 14: 497-506