

Detección de contaminantes bacterianos y fúngicos endógenos en el establecimiento de *Musa* spp.

Daymí Carrazana García*¹, Lidcay Herrera Isla¹, Niurka Mollinedo Diego¹, Norma Suárez Canino¹, Idania Arboláez Moré², Hermelinda Castellanos Morales², Teresita Martínez García³. *Autor para correspondencia.

¹Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuani km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: daymic@qf.uclv.edu.cu

²Biofábrica de Villa Clara, Carretera a Malezas km 1½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

³Hospital Provincial Universitario Clínico Quirúrgico Arnaldo Milián Castro, Carretera a la Pollera y Circunvalación, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

RESUMEN

Se probó un método de fijación en formol al 10%, inclusión en parafina y realización de cortes histológicos teñidos diferencialmente de microcormo y raíz de plantas *in vitro* de *Musa* spp. para la detección de bacterias y hongos endógenos realizando inoculaciones de *Erwinia chrysantemi* E 84 y *Fusarium oxysporum* var *cubense*15 en cultivares susceptibles. El mejor resultado se obtuvo con la tinción de Safranina – Verde brillante para las bacterias y el procedimiento de Schiff – Acido peryódico para los hongos. Se establecieron 35 ápices caulinares de *Musa* spp. cv FHIA – 18 colocándose una porción de tejido vegetal adyacente al explante en medios de cultivo microbiológicos. Una muestra similar se fijó en formol al 10%. A partir de los tubos de ensayo contaminados se aislaron cultivos puros de los microorganismos presentes y se utilizó el procedimiento de corte histológico y tinción diferencial para la determinación de endogenidad. Se encontró un bacilo Gram positivo no formador de endospora y un coco Gram positivo agrupado en forma de sarcina, ambos endógenos. Un hongo de la clase *Deuteromycetes* resultó ser un contaminante endógeno y *Fusarium* sp. un contaminante probablemente introducido durante la preparación del explante.

Palabras clave: bacterias, hongos, microorganismos endógenos, micropropagación

ABSTRACT

A method consisted in fixation of microcorm and root of *Musa* spp. in formaldehyde 10%, inclusion in paraffin and histological cuts, stained differentially to detect endogenous bacterial and fungal contaminants by inoculations of *Erwinia chrysantemi* E 84 and *Fusarium oxysporum* var *cubense*15 in susceptible cultivars. The best results were obtained with the stain of Saphranine – Brilliant green for bacteria and the Schiff – Peryodic acid for fungi. 35 meristems tips of FHIA-18 were established, being placed a portion of adjacent vegetal tissue to the explant in microbiological media. A similar probe was fixed in formaldehyde 10%. Several isolation were realized in order to obtain pure culture of the microorganisms detected. Histological and differential staining were used to determine the endogenous origin. A non esporogenous Gram positive rod and Gram positive coccus grouped like sarcine type were found. One fungus of class *Deuteromycetes* resulted a endogenous contaminant and *Fusarium* sp. introduced probability during the preparation process of the explant.

Key words: bacteria, fungus, microorganisms endogenous, micropropagation

INTRODUCCIÓN

La existencia de poblaciones de bacterias endógenas en los explantes constituye el factor responsable de las mayores pérdidas por contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. Las mismas pueden aparecer en cualquier etapa del proceso y su detección es difícil, pues la mayoría crecen muy poco en los medios de cultivo para plantas, manteniéndose latentes hasta que los mecanismos de resistencia de las plantas *in vitro* se debiliten o surjan cambios en el medio ambiente del frasco de cultivo que favorezcan su crecimiento visible. Los contaminantes fúngicos crecen favorablemente en los medios de

cultivo para plantas pero existen pocas referencias de hongos endógenos (Leifert *et al.*, 1994).

La escasa información sobre los contaminantes bacterianos y fúngicos presentes en el cultivo de tejidos vegetales de *Musa* spp. y la posibilidad de su asociación a este género vegetal estableciendo su carácter endógeno mediante la demostración de su presencia en el explante, fundamentan la realización de la investigación desarrollada. La misma tuvo como objetivos establecer un procedimiento histológico para la detección microscópica de bacterias y hongos endógenos y aislar contaminantes bacterianos y fúngicos en el establecimiento de *Musa* spp. especificando su carácter endógeno o ambiental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento histológico para la detección microscópica de bacterias y hongos endógenos

Se inocularon 10 plantas *in vitro* de *Musa* spp. cv Grande naine procedentes del Banco de Germoplasma del Instituto de Biotecnología de Las Plantas (IBP) mediante la inyección en el microcormo de 0.5 ml de una suspensión de 4.8×10^7 células de *Erwinia chrysantemi* E 84 procedente de la colección del Centro Nacional de Salud Agropecuaria (CENSA), sumergiéndose las mismas además de forma individual en 50 ml de la misma suspensión durante 30 minutos después de podarse las raíces. Se siguió igual procedimiento con dos plantas *in vitro* como control, utilizando agua destilada estéril. Las plantas fueron sembradas en sustrato estéril, suministrado por el IBP, constituido por un 80% de materia orgánica formada por cachaza y un 20% de zeolita cargada con nitrógeno, fósforo, potasio y microelementos. A partir de la aparición de amarillamiento de las hojas se tomó una planta cada 24 horas, se extrajo el microcormo y se seccionaron las raíces, fijándolos en formol al 10 % para su posterior inclusión en parafina mediante el empleo de un histoquinet (Warning). Se realizaron cortes histológicos de 5 a 10 mm empleando un micrótopo (MC2). Se probaron tres tinciones diferenciales: Método de Jensen (Pecocck, 1990), Solución verde claro y Safranina – Verde brillante (González, 1990) para demostrar la presencia de bacterias en el interior del tejido vegetal.

Se inocularon 10 plantas *in vitro* de *Musa* spp. cv Gros Michel procedentes del Banco de Germoplasma del IBP a las que se podaron las raíces previamente, mediante su inmersión en 50 ml de una suspensión de 3×10^4 esporas de *Fusarium oxysporum* var *cubense* 15 procedente del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT) y se siguió el procedimiento antes descrito. Se probó el método de tinción diferencial de Schiff – Acido peryódico según Drings Hotchkiss (Pecocck, 1990).

Los cortes histológicos teñidos fueron observados en microscopio óptico de campo claro (Olympus – Vanox) con aumento de 2000 x para la detección de bacterias y 400 x para la de hongos.

Aislamiento de contaminantes endógenos bacterianos y fúngicos en el establecimiento de *Musa* spp.

Se establecieron 35 ápices caulinares de *Musa* spp. cv FHIA – 18 según el procedimiento indicado en el Instructivo Técnico del Plátano (Cuba, 1990). Durante la preparación de los explantes e inmediatamente antes de su colocación en el medio de cultivo para el establecimiento, se tomaron dos porciones de tejido vegetal adyacentes al explante por debajo y encima del mismo, colocándose uno de ellos en un frasco

con formol al 10 % y el otro en un tubo de ensayo de 15 x 2 cm que contenía un medio de cultivo microbiológico, el cual fue incubado en las mismas condiciones que el de establecimiento. Se emplearon cuatro medios de cultivo microbiológicos: Agar Triptona Soya (ATS) (BioCen), NB (fosfato de amonio: 1200 mg.l⁻¹, hidrógeno fosfato de potasio: 1200 mg.l⁻¹, sulfato de magnesio: 480 mg.l⁻¹, cloruro de sodio: 1200 mg.l⁻¹, extracto de levadura: 2400 mg.l⁻¹, glucosa: 24 000 mg.l⁻¹, pH 7.0), Agar Levadura Peptona (PYA) (peptona: 5000 mg.l⁻¹, extracto de levadura: 3000 mg.l⁻¹, cloruro de calcio: 1300 mg.l⁻¹, agar: 6000 mg.l⁻¹, pH 6.8), MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con tiamina 1 mg.l⁻¹, piridoxina 1 mg.l⁻¹, ácido nicotínico 1 mg.l⁻¹, mioinositol 100 mg.l⁻¹, sacarosa 30 000 mg.l⁻¹, bencilaminopurina 3 mg.l⁻¹ y extracto de levadura 250 mg.l⁻¹ y Agar Sabouraud (AS)(BioCen). En aquellos tubos donde se presentó contaminación microbiana visible se tomó una porción del medio de cultivo y se procedió a la obtención de cultivos puros por el método de diseminación en placas de Petri conteniendo ATS o AS según el caso, las cuales fueron incubadas a 30°C durante siete días. A las cepas fúngicas se les realizaron preparaciones húmedas de gota aplastada montadas con lactofenol azul para la observación de hifas y conidios, procediendo a su identificación preliminar según su morfología y características siguiendo criterios taxonómicos descritos por Nelson *et al.* (1981) y Barnett y Hunter (1986). A las cepas bacterianas se le realizaron extensiones fijadas y teñidas mediante tinción simple y de Gram, para la observación de forma, agrupación y respuesta al Gram.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Procedimiento histológico para la detección microscópica de bacterias y hongos endógenos

Los mejores resultados obtenidos para la realización de cortes histológicos y tinción diferencial para la detección de contaminantes bacterianos endógenos correspondieron a la tinción diferencial Safranina – Verde brillante, la cual permite la observación, con excelente resolución, de las colonias bacterianas de color rojo y el tejido vegetal de color verde. Con el método de Schiff – Acido peryódico se obtuvieron buenos resultados en la detección de hongos filamentosos endógenos. Mediante esta se pueden observar las hifas de color rojo y el tejido vegetal de color verde.

En la literatura consultada se refieren varios procedimientos para la demostración de endogenicidad microbiana en tejidos vegetales, desde los que emplean microscopía electrónica de barrido (Gunson y Spencer-Phillips, 1994), con los que se obtienen excelentes resultados, hasta aquellos donde se aplican varios métodos de tinción diferencial a cortes de tejidos fijados e incluidos en parafina. Entre

las tinciones empleadas para la detección de bacterias se pueden citar la de azul de toluidina, observándose las preparaciones en microscopio de fluorescencia (Surga y Guevara, 1994), que posee el inconveniente de que requiere un período de 15 días para su ejecución y la de naranja de acridina, empleando microscopía de fluorescencia (Monier, 1998). Para la observación de hifas y esporas fúngicas se ha empleado la tinción con azul de anilina, empleando microscopía de fluorescencia (Williamson *et al.*, 1998). Los métodos que emplean microscopía de fluorescencia tienen el inconveniente de que las preparaciones deben ser observadas inmediatamente (como máximo en el término de 48 horas) y no pueden conservarse.

Las tinciones seleccionadas en esta investigación resultan relativamente sencillas y rápidas de realizar y las preparaciones montadas en bálsamo de Canadá pueden conservarse por largo tiempo.

En todas las preparaciones observadas no se conservó la integridad del tejido vegetal en los bordes de los cortes histológicos por lo que se recomienda realizar cortes entre 10 y 15 mm.

Detección de contaminantes endógenos bacterianos y fúngicos en el establecimiento de *Musa* spp.

De los 35 tubos con medio de cultivo MS para establecimiento se contabilizaron 10 con turbidez muy ligera en el transcurso del experimento. De estos, cuatro presentaron inhibición de la brotación que seguida de necrosis parcial y finalmente total del explante. Solamente en uno de ellos se comprobó la presencia de contaminantes microbianos luego del aislamiento en medios microbiológicos, tratándose en este caso de una bacteria Gram positiva en forma de bacilo, no formadora de endospora. En el corte histológico del tejido adyacente al explante se observaron colonias bacterianas agrupadas junto a las paredes celulares, lo cual indicó que se trataba de un contaminante bacteriano endógeno. Además del mismo tubo se aisló un hongo filamentoso, identificado como *Fusarium* sp.. En el corte histológico teñido no se observaron estructuras de este hongo, por lo que se infiere que es un contaminante introducido durante la preparación del explante, aunque no se excluye la posibilidad de que las hifas del hongo se hayan ubicado longitudinalmente en los haces vasculares, por lo que resulta conveniente en la futura aplicación de este método realizar cortes longitudinales a los tejidos vegetales fijados e incluidos en parafina. *Fusarium* spp. constituyó el 23% de los hongos filamentosos aislados a partir de tejidos vegetales que se mantuvieron libres de contaminantes microbianos durante más de 12 meses y el 18% de los contaminantes fúngicos aislados del aire de los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales (Danby

et al., 1994). Herrera *et al.* (2001) aislaron contaminantes de este género a partir de la fase de multiplicación de *Dioscorea alata*, *Manihot esculenta* y *Xanthosoma sagittaeifolium*.

En los tres tubos restantes no se obtuvo crecimiento en los medios de cultivo microbiológicos para el aislamiento, aunque pudieron estar presentes contaminantes microbianos con requerimientos nutricionales específicos no existentes en los medios de cultivo microbiológicos empleados.

En un tubo de ensayo con AS se detectó a las 96 horas de iniciado el experimento una colonia redondeada cuyo centro se localizaba en el borde del tejido vegetal. Luego del aislamiento se identificó un hongo perteneciente a la clase *Deuteromycetes*. En el corte histológico teñido se observaron hifas en el tejido vegetal, indicando su carácter endógeno.

En otro tubo de ensayo con ATS se detectó opacidad a los 12 días de iniciado el experimento, aislándose un coco Gram positivo agrupado en forma de sarcina. En el corte histológico teñido se observó un ácaro y colonias agrupadas a su alrededor, sin poder precisarse si este actuó o no como vector de los microorganismos endógenos.

CONCLUSIONES

Los procedimientos de fijación del tejido vegetal en formol al 10%, inclusión en parafina y realización de cortes histológicos teñidos con los métodos diferenciales de Safranina – Verde brillante y Schiff – Acido peryódico son apropiados para la detección de contaminantes bacterianos y fúngicos endógenos en el cultivo de tejidos vegetales de *Musa* spp. Se encontró un bacilo Gram positivo no formador de endospora y un coco Gram positivo agrupado en forma de sarcina, ambos endógenos. *Fusarium* sp. y un hongo de la clase *Deuteromycetes* fueron contaminantes en la micropropagación de *Musa* spp. probablemente ambiental y endógeno respectivamente.

REFERENCIAS

- Barnett, HL y Hunter BB (1986) Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th Edition. Mac Millan Publishing Company. New Cork
- Cuba, Ministerio de la Agricultura. Instructivo Técnico del cultivo del Plátano (1990) Ciudad de La Habana: CIDA
- Danby, S, Berger F, Howitt DJ, Wilson AR, Dawson S y Leifert C (1994) Fungal contaminants of *Primula*, *Coffea*, *Musa* and *Iris* tissue cultures En: Lumsden, PJ, Nicholas JR y Davies WJ (Eds) Physiology, Growth and Development of Plants in Culture, pp 347-403. Kluwer Academic Publishers, Dordrech
- González Ada, Grillo H, Mas Olga y del Valle N (1990) Nudosidades de los Cítricos en Jagüey Grande, aspectos histológicos y fisiológicos. Centro Agrícola 24: 80-87

Gunson HE y Spencer-Phillips PTN (1994) Latent bacterial endophytes as contaminants of micropropagated plants. En: Lumsden, PJ, Nicholas JR y Davies WJ (Eds) *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*, pp 379-396. Kluwer Academic Publishers, Dordrech

Herrera, L, Folgueras Mariluz, Carrazana Daymí, Suárez Norma, Pérez Delia (2001) Los hongos contaminantes en la micropropagación de raíces y tubérculos tropicales en Cuba. *Centro Agrícola* 3: 46-51

Leifert, C, Morris CE, y Waites B (1994) Ecology of Microbial Saprophytes and Pathogens in tissue Culture and Field – Growth Plants: Reasons for Contamination Problems *in vitro*. *Critical Review in Plant Sciences* 13 : 139 – 183

Monier, C, Bossis E, Chabanet C y Samson R (1998) Different bacteria can enhance the micropropagation response of *Cotonaster lacteus* (Rosaceae). *Journal of Applied Microbiology* 85: 1047-1055

Murashige, T y Skoog T (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology* 5: 173-197

Nelson, PE, Toussoun TA y Cook RJ (1981) *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. Pensilvania State University Press

Pecocck, A (1990) *Elementary Microtechnique*. Ed Arnold. London

Surga, JG y Guevara Y (1994) Pruebas de desinfección para controlar la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de apices caulinares de Banano (*Musa AAA*). *Fitopatología Venezolana* 7: 14 – 17

Williamson, B, Cooke DEL, Duncan JM, Leifert C, Breese WA y Shattock RC (1998) Fungal infections of micropropagated plants at weaning: *Rubus* and *Rosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52: 89-96