

Estudio sobre contaminantes fúngicos en la formación de callos a partir de explantes foliares de *Coffea* sp.

María Esther González^{1*} y Luis Manuel Barrios² *Autor para correspondencia.

¹ Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Carretera San José-Tapaste Km 3^{1/2}. San José de las Lajas. La Habana. e-mail: esther@inca.edu.cu.

² Centro Nacional de Sanidad Vegetal.

RESUMEN

El café es un cultivo de importancia económica para varios países en vías de desarrollo y la aplicación de la biotecnología ofrece ventajas en su propagación. No obstante, la contaminación microbiana continúa siendo uno de los problemas que afecta el cultivo *in vitro*. Este trabajo tuvo como objetivos identificar hongos contaminantes durante la fase de callogénesis de *Coffea arabica* y *Coffea canephora*, así como evaluar el efecto del RIZOBAC en el control de los mismos. Se realizaron muestreos a callos obtenidos de explantes foliares, desechados por contaminación microbiana y se aislaron e identificaron contaminantes fúngicos, considerando características culturales y morfológicas. Se realizó un experimento de antagonismo *in vitro* inoculándose 100 µl de RIZOBAC en placas de Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa sobre las que se colocaron suspensiones de esporas de las cepas aisladas. La incubación se realizó a 28 °C durante siete días. Se midió el diámetro de las colonias del hongo y se determinó el porcentaje de inhibición. Los porcentajes de contaminación fúngica oscilaron entre 51.2 y 73.7 %. Los hongos filamentosos de mayor frecuencia de aparición fueron *Fusarium* y *Cladosporium*. Se demostró el efecto antagónico del RIZOBAC, obteniéndose entre 71.5 y 43.3 % de inhibición, respectivamente, constituyendo una alternativa viable el empleo de este producto a fin de disminuir los índices de contaminación fúngica en el cultivo *in vitro* del café.

Palabras clave: café, contaminación microbiana, hongos, RIZOBAC

ABSTRACT

The coffee is a crop of economic importance for several developing countries and the application of the biotechnology offers advantages in its propagation. Nevertheless, the microbial contamination continues being one of the problems that affects the *in vitro* culture. This paper had as objectives to identify fungal contaminants during the phase of callogenesis of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*, as well as to evaluate the effect of the RIZOBAC in the control of the same ones. Samplings to obtained callus of leaf explants were carried out, discarded by microbial contamination and they were isolated and identified fungal contaminants, considering cultural and morphological characteristic. The antagonistic effect of RIZOBAC against the strains of fungal contaminants was determined, being inoculated 100 µl of RIZOBAC in badges with medium Potato Dextrose Agar on those that suspensions of spores of the isolated strains were placed. The incubation was carried out at 28 °C for 7 days. The diameter of the colonies of the fungi was measured and the inhibition percentage was determined. The percentages of fungus contamination in the explants oscillated between 51.2 and 73.7 %. The filamentous fungi of more appearance frequency were *Fusarium* and *Cladosporium*. The antagonistic effect of the RIZOBAC was demonstrated, obtaining between 71.5 and 43.3 % inhibition of the fungi growth, respectively, constituting a viable alternative the use of this product in order to diminish the indexes of fungus contamination in the *in vitro* culture.

Key words: coffee, microbial contamination, fungi, RIZOBAC

INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea* sp.) es un cultivo de gran importancia económica para varios países en vías de desarrollo (Raghuramulu y Timmaraju, 1998; Filomena, 1999) y la aplicación de las novedosas técnicas biotecnológicas ofrece ventajas en su propagación (Zamarripa, 1991; Anthony *et al.*, 1997). No obstante, la contaminación microbiana ocasionada por hongos y bacterias continúa siendo uno de los principales problemas que afecta las técnicas del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Surga, 1994; Leifert y Cassells, 2001). Ello provocó pérdidas considerables en

materiales vegetales procedentes de especies de interés, cultivados en condiciones naturales y sometidos a los procesos de multiplicación con el empleo de estos métodos.

El presente trabajo tuvo como objetivos: determinar el porcentaje de contaminación fúngica e identificar los hongos filamentosos contaminantes durante la fase de callogénesis de las variedades Caturra y Robusta de *C. arabica* y *C. canephora*, respectivamente, así como evaluar el efecto de un biopreparado con acción fungicida en el control de los mismos.

MATERIALES Y METODOS

Se realizaron siembras a partir de explantes foliares de las variedades de café Caturra y Robusta, empleando 15 ml del medio de cultivo de formación de callos según González, (2003), en estado semisólido y contenido en tubos de ensayo de 15 cm de largo por 2.5 cm de ancho, con tapones de goma. La esterilización fue realizada en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Se inocularon 70 explantes por variedad, las siembras se incubaron en la oscuridad a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura.

Para determinar el porcentaje de contaminación microbiana durante la fase de calogénesis se realizaron muestreos a los 45 días de cultivo.

El aislamiento de los contaminantes fúngicos en las variedades en estudio se realizó a partir de callos desechados por contaminación microbiana, utilizando el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) (Biocen), con un total de 15 repeticiones por cada variante (contaminante x variedad). Para la identificación de los géneros fúngicos se tuvieron en cuenta sus características culturales y morfológicas.

Se realizó un experimento de antagonismo *in vitro* para evaluar el efecto del RIZOBAC, nuevo biopreparado de origen bacteriano con acción fungicida, sobre las cepas de hongos filamentosos contaminantes de *Fusarium* y *Cladosporium*, para lo cual se inocularon 100 µl del

producto en el centro de placas de Petri que contenían medio de cultivo PDA y se diseminó con espátula de Drigalski. Se realizaron suspensiones de esporas de las cepas de hongos aisladas según Bashan (1996), utilizando una concentración de 10^6 esporas y se colocaron en pocillos de 8 mm de diámetro ubicados en las placas de PDA, previamente tratadas con RIZOBAC. La incubación se realizó a 28 °C durante siete días y finalmente se midieron las zonas de inhibición de crecimiento del hongo.

En todos los casos se utilizó un diseño Completamente Aleatorizado y los datos se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple a través del programa STATGRAPHICS (1996) En los casos donde existieron diferencias significativas se utilizó la prueba de Rangos múltiples de Duncan para la comparación de las medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se reflejan los porcentajes de contaminación en los explantes, los que oscilaron entre 51.2 y 73.7%, existiendo diferencias significativas para las variedades de café en estudio, comportamiento que se atribuye a las propias características genéticas de las variedades, que les confieren propiedades de presentar menor o mayor grado de vulnerabilidad ante las afectaciones provocadas por los contaminantes fúngicos.

Tabla 1. Comportamiento de la contaminación microbiana en la calogénesis de dos variedades de café.

VARIABLES	VARIEDAD	
	Robusta	Caturra
Explantes sembrados	70	70
Explantes contaminados	36	52
% Contaminación	51.2 b	73.7 a
ES x (±)	0.032***	

Medias con letras comunes no difieren estadísticamente, según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan para $p < 0.05$.

En las muestras analizadas se identificaron un total de siete géneros de hongos filamentosos (Tabla 2). Los de mayor frecuencia de aparición resultaron ser *Fusarium* y *Cladosporium*. Diversos autores han destacado la presencia de algunos de estos hongos en explantes procedentes de plantas leñosas sobre todo de condición adulta y cultivadas directamente en el campo (Carvalho, 1988). En tal sentido, se obtuvo hasta 73% de la muerte vegetal debido al crecimiento profuso de estos microorganismos alrededor de los explantes, lo que puede atribuirse a que las necesidades nutritivas de los microorganismos son similares a las de las células de los tejidos vegetales cultivados *in vitro*, lo cual crea una competencia, siendo las últimas

normalmente menos eficientes en el aprovechamiento de los nutrientes (Boccon-Gibod, 1982). Además, los hongos filamentosos contaminantes a través de la colonización de los tejidos vegetales provocan la asfixia de los mismos y entre otros efectos perjudiciales durante la aplicación de estas técnicas, liberan sustancias tóxicas al medio de cultivo que dañan el desarrollo del material vegetal cultivado.

Estos resultados están en correspondencia con lo informado para el cultivo de la frutabomba (*Carica papaya*) por Litz y Conover (1981) y en la propagación del chayote (*Sechium edule* (Jacq) Sw), al estudiar los efectos de la contaminación microbiana en el establecimiento *in vitro* de los explantes.

Tabla 2. Frecuencia de aparición (%) de contaminantes fúngicos en la calogénesis de dos variedades de café .

No.	VARIEDAD			
	Robusta	(%)	Caturra	(%)
1	<i>Fusarium</i>	45	<i>Fusarium</i>	42
2	<i>Cladosporium</i>	24	<i>Cladosporium</i>	26
3	<i>Colletotrichum</i>	10	<i>Aspergillus</i>	12
4	<i>Alternaria</i>	9	<i>Pestalotia</i>	7
5	<i>Pestalotia</i>	5	<i>Curvularia</i>	6
6	<i>Curvularia</i>	4	<i>Colletotrichum</i>	4
7	<i>Aspergillus</i>	3	<i>Alternaria</i>	3

Por otro lado, se demostró el efecto antagónico del RIZOBAC ante los géneros de mayor predominio en el presente estudio (*Fusarium* y *Cladosporium*), permitiendo alcanzar porcentajes de inhibición del crecimiento del hongo que difirieron estadísticamente entre las variedades para el género *Fusarium*, no observándose este

comportamiento para *Cladosporium*. Los valores estuvieron comprendidos entre 71.5 y 45.1%, respectivamente, para la variedad Robusta y valores entre el 59.3 y 43.3%, respectivamente, en la variedad Caturra (Tabla 3). De forma general, se observó un mayor efecto inhibitorio del bioproducto sobre las cepas de *Fusarium*.

Tabla 3. Efecto del RIZOBAC en el control de géneros fúngicos de alta frecuencia de aparición en la calogénesis de dos variedades de café.

VARIEDAD	% de inhibición del crec. fúngico	
	<i>Fusarium</i>	<i>Cladosporium</i>
Robusta	71.5 a	45.1 c
Caturra	59.3 b	43.3 c
ES x (±)	0.171***	

Medias con letras comunes no difieren estadísticamente, según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan para p<0.05

Esta pudiera constituir una vía alternativa para disminuir los altos porcentajes de contaminación fúngica que afectan el desarrollo exitoso de algunos protocolos de multiplicación para el café, en particular y para otras especies vegetales en general, propensas a este tipo de afectación durante su cultivo *in vitro*, efecto que se atribuye a la composición química del producto evaluado, pudiendo citarse entre sus componentes sideróforos y compuestos antifúngicos (Hernández, 2002). El RIZOBAC pudiera ser incorporado al medio de cultivo o utilizarse en el tratamiento previo de los explantes, a fin de disminuir los altos índices de contaminación fúngica. Algunos autores han alcanzado resultados favorables al emplear este bioproducto en el control de diferentes géneros fúngicos. En tal sentido Miranda *et al.* (2000) informaron el control de afecciones provocadas por *Phytophthora infestans* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*), y Toledo *et al.* (2002) demostraron el efecto antagónico sobre cepas de *Fusarium* sp. al aplicarlo en el cultivo del gladiolo (*Gladiolus* sp.), aspectos que contribuyen a explicar los resultados alcanzados en el presente estudio y corroboran la factibilidad de emplear el RIZOBAC en

el control de la contaminación durante la aplicación de las técnicas biotecnológicas en cultivos de importancia económica.

REFERENCIAS

- Anthony, F, Bertrand B, Lashermes P, Charrier A (1997) La Biologie Moléculaire en appui a l' amélioration génétique du caféier Arabica. Plantations, Recherche, Development 4 (6): 369
- Bashan, Y, Holguín G y Ferrera-Cerrato R (1996) Interacciones plantas y microorganismos benéficos. I *Azospirillum* TERRA, 14(2):159-195
- Boccon-Gibod, G (1982) Les besoins nutritifs tissus cultivés en conditions aseptiques. In la culture *in vitro* et ses applications horticoles p. 41-72. Techniques & Documentation Lavoisier, Paris.
- Carvalho, D (1988) Micropropagacao de *Eucalyptus grandis* Hill ex maiden a través dea cultura *in vitro* de segmentos nodais. Tesis de Maestría,. Escolar Superior de Agricultura de Lavras. Brasil. 62 p.
- Filomena, MC (1999) Advances in coffee biotechnology. AgBiotechNet (1), ABN 006
- González, ME (2003) Estudio del proceso de calogénesis en genotipos promisorios de café (*Coffea canephora* P). Revista Colombiana de Biotecnología 5 (1): 16- 22

- Hernández, A (2002) Obtención de un biopreparado a partir de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz (*Zea mays* L.). La Habana. CU. (Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas). INCA. La Habana. 104p.
- Leifert, C y Cassells AC (2001) Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro* Cell Dev. Biol. Plant 37(2): 133-138
- Litz, RE y Conover RA (1981) Effect of sex type, season and other factors on *in vitro* establishment and culture of *Carica papaya* L. explants. J. Amer. Soc. Sci. 106: 792-794
- Miranda, S, Hernández A y Marqués R (2000) Estudio del efecto antagónico de productos bacterianos ante *Phytophthora infestans*. Resumen Ampliado AGROCIEN 2000. 4p.
- Raghuwamulu, Y y Thimmaraju KR (1998) Observation précoces de la compatibilité du greffage entre cultivars commerciaux de cafeiers Arabica et porte-greffes appropriés. Plantation, Recherche, Development 5 (1): 41-44
- Surga, J y Guevara Y (1994) Prueba de desinfección para controlar la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de ápices caulinares de banano (*Musa* AAA). Fitopatología Venezuela 7 (1): 14-17
- Somarribas, G, Sandoval J y Muller L (1991) Propagación vegetativa del chayote (*Sechium edule* (Jacq) Sw). Fase de establecimiento. Turrialba 41: 538-544
- Toledo, Y, Hernández A, Álvarez M, Martín G y Márquez R (2002) Determinación del efecto antagónico de un biopreparado a partir de una cepa de *Burkholderia cepacia* ante *Fusarium* sp en el cultivo del gladiolo (*Gladiolus* sp). Cultivos Tropicales 23(4): 11-15
- Zamarripa, CA, Ducos JP, Tessereau H, Bollon H y Petiard V (1991) Production d'embryons somatiques de cafeier en milieu liquide: Effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. Café, Cacao, Thé 35 (4): 21-26