

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 Camajuaní 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.

Palabras clave: *Coffea arabica*, contaminación microbiana, control, Mínima Concentración Inhibitoria

ABSTRACT

Collectotrichum genus was identified as frequent contaminant in coffee callus formation from foliar explants fragments of plants cultivated in field. The presence of this genus as contaminant in fragments of coffee leaves used for callus formation involved the initial explants as possible contamination source. It was also evaluated the effect of carbendazim for its control beginning from the determination of its Minimal Inhibitory Concentration in PDA culture medium by the dilution in agar method. The isolated CCIBP Co-1 used for the susceptibility determination was controlled at 1.0mg.l⁻¹ carbendazin concentration.

Key Words: *Coffea arabica*, microbial contamination, control, Minimal Inhibitory Concentration

La contaminación microbiana se ha referido como una de las limitantes para el cultivo *in vitro* del café a partir de explantes provenientes de plantas cultivadas en el campo (García y Rafael, 1990; Danby *et al.*, 1994; González y Barrios, 2002; De Rezende *et al.*, 2003).

La presencia de microorganismos durante la fase de establecimiento de especies leñosas es un serio problema que afecta su cultivo *in vitro* (Quintero 1997; Jiménez, 1998). En ello el explante inicial constituye la fuente principal de contaminantes propiciado quizás, por las características anatómicas de estos cultivos tales como: la presencia de cera y estípulas en los tallos que permite la acumulación de agentes contaminantes. Duhem *et al.* (1988) refirieron tres ubicaciones de la contaminación microbiana en plantas de café: en la superficie del tejido, bajo las estípulas y en el sistema vascular.

Para la formación de callos de café se han empleado fragmentos de explantes foliares de plantas cultivadas *in vitro* (Barbón, 1997) o en campo (De Rezende *et al.*, 2003). González y Barrios (2002) encontraron una alta incidencia de contaminantes fungosos en la formación de callos de *Coffea canephora* y *C. robusta*. Entre ellos se

destacaron los géneros *Fusarium*, *Cladosporium* y *Colletotrichum*. Este último se ha identificado como saprófito o parásito en casi todas las regiones del mundo donde se cultiva café, y es el responsable de enfermedades como la Antracnosis de las hojas, muerte regresiva, quemazón de los frutos maduros y la enfermedad de las cerezas verdes del café (Martínez y Zambrano, 1994).

Para la eliminación de contaminantes microbianos durante el cultivo *in vitro* de plantas se han empleado métodos físicos, biológicos y químicos (Leifert y Cassells, 2001). El uso de sustancias antimicrobianas ha resultado adecuado en los casos en que se identifica el microorganismo presente y se evalúa su susceptibilidad a la misma. Por ejemplo, autores como Vieira *et al.* (1988) y Carrazana *et al.* (1997) han obtenidos buenos resultados en el control de los contaminantes fungosos con el empleo de fungicidas en el medio de cultivo previa identificación del microorganismo y la determinación de su susceptibilidad.

Teniendo en cuenta estos criterios este trabajo se propuso como objetivos identificar un contaminante fungoso de alta frecuencia de aparición en la formación de callos de café y evaluar el efecto del carbendazim para su control.

Material vegetal

Fragmentos de hojas de *Coffea arabica* L. cv Caturra rojo, procedentes de plantas adultas cultivadas en campo, establecidos en medio de cultivo Sondhal (Sondhal y Sharp, 1977) para la formación de callos y visiblemente contaminados por un hongo filamentososo de color gris, superficie aterciopelada y reverso negro.

Fungicida

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

El contaminante se aisló por siembra directa en placas de Petri (9.0cm Ø) que contenían 10ml del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) (BioCen) y se incubaron a 28°C en oscuridad durante 14 días.

Para el estudio taxonómico se tuvieron en cuenta sus características culturales (crecimiento, color de la colonia, color del reverso y textura superficial) y morfológicas (características de las hifas, de las estructuras de reproducción, de las esporas, presencia de setas, etc.). Para la identificación se utilizaron los criterios establecidos por Barnett y Hunter (1987).

En medio de cultivo PDA, se observaron colonias grises oscuras, con líquido transpirado de color gris oliváceo, reverso negro y crecimiento lento. En cuanto a la caracterización morfológica se observaron conidios unicelulares, alargados, casi cilíndricos con un ligero estrechamiento en el centro con extremos redondeados, estas características coincidieron con las referidas para el género *Colletotrichum* sp. perteneciente a la clase *Deuteromycetes* u hongos imperfectos, orden *Melanconiales*, familia *Melanconiaceae*.

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. Varios investigadores afirman haber encontrado serios problemas al tratar de cultivar *in vitro* explantes procedentes de plantas leñosas, sobre todo cuando provienen de condiciones adultas y cultivadas directamente en el campo, se atribuye como causa fundamental el alto porcentaje de contaminación bacteriana y fungosa (García y Rafael, 1990; Vilorio, 1993; Borges, 1997). Es por ello que juega un papel importante la selección y crecimiento de la planta madre bajo condiciones higiénicas adecuadas, esto, según Daquinta *et al.* (2000), reduciría notablemente la contaminación, principalmente la fungosa.

El efecto del carbendazim sobre la cepa CCIBP- Co1 de *Colletotrichum* sp. se evaluó a partir de la determinación de su Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) en medio de cultivo PDA por el método de dilución en agar según lo descrito por Cruz *et al.* (2001).

Se ensayaron concentraciones decrecientes de este en diluciones seriadas dobles desde 64.0 a 0.03125 mg.l⁻¹. Se prepararon dos repeticiones de cada concentración. Además, se incluyeron placas de Petri con medio de cultivo PDA libres de fungicida para ser usadas como controles de crecimiento.

Se colocó un disco de micelio (7.0mm Ø) en el centro de cada placa, se invirtieron y se incubaron a 28°C y oscuridad constante. Se midió diariamente el diámetro en milímetros de las colonias hasta los 14 días.

El carbendazim logró controlar la cepa de *Colletotrichum* sp. a una concentración de 1.0 mg.l⁻¹ y se tomó este valor como su MCI. (Figura 1). Este resultado concordó con los presentados por Vieira *et al.* (1988) quienes afirmaron la efectividad del uso de forma rutinaria del carbendazim para el control de la contaminación fungosa en el cultivo *in vitro* de Guaraná (*Paullina cupana* var *Sorbilis* H.B.K.)

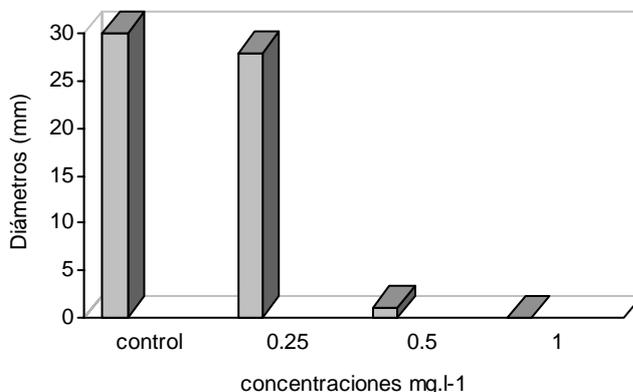


Figura 1. Diámetro de crecimiento de las colonias de la cepa CCIBP- Co1 de *Colletotrichum* sp. a los 14 días de inoculada en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa en presencia de Carbendazim.

García y Rafael (1990) refirieron el uso del Benomyl (500mg.l⁻¹) añadido en el medio de cultivo para obtener microesquejes de café libres de contaminación fungosa. Además otros autores han afirmado obtener buenos resultados con la utilización del Benomyl y el Propiconazol para el control de la contaminación fungosa en la fase de establecimiento de varias especies (Danby *et al.*, 1994; Carrazana *et al.*, 1997).

El carbendazim (bencimidazol 2-il carbamato de metilo) es el componente activo de varios fungicidas sistémicos entre los que se encuentra el Benomyl, su mayor dificultad radica en su escasa solubilidad en agua. Al presentarse el carbendazim acompañado con una β -ciclodextrina este problema queda solucionado por lo que pudiera utilizarse el Complejo Carbendazim- β -ciclodextrina como una alternativa para solucionar el problema de la presencia de contaminantes fungosos en explantes foliares de café procedentes de plantas adultas cultivadas en campo. Además se pudiera recomendar el uso de este producto en el tratamiento de las plantas donadoras antes de ser introducidas en el cultivo *in vitro*.

REFERENCIAS

- Barbón, RR (1997) Empleo de suspensiones celulares embriogénicas para la transformación genética de café (*Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo) por electroporación. Tesis para optar al grado científico de Magister Scientiae en Biotecnología Vegetal. Santa Clara, Cuba pp. 76
- Barnett, HH y Hunter, BB (1987) Illustrated Genera of imperfect fungi. New York MacMillan Publishing Company London Collier MacMillan Publishers
- Borges, L, Morales H, Valero Z, León S, Santos R, Castro C y del Villar A (1997) Comparación de métodos de esterilización superficial de yemas apicales de mango (*Mangifera indica* L) variedad Haden. En resúmenes: VII Jornadas Científicas Técnicas. Maracaibo, Venezuela. pp. 102
- 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
- Cruz, M, Acosta M, Rodríguez E, Leiva M y Alvarado Y (2001) Determinación de la mínima concentración inhibitoria (MCI) de Higromicina B para su utilización como agente de selección en la transformación de *Mycosphaerella fijiensis*. Biotecnología Vegetal. 1 (2): 121-123
- Danby, S, Berger F, Howtt, D y Wilson A (1994) Fungal contaminants in *Primula*, *Coffea*, *Musa* and *Iris* tissue culture. En: Lumdsen, P, Nicholas J y Davies B (Eds) Physiology growth and development of plant in culture. pp 397-403. Dordrecht
- Daquinta, M, Ramos I, Lezcano Y, Rodríguez R y Escalona M (2000) Algunos elementos en la micropopagación de la Teca. Biotecnología Vegetal 1: 39-44
- De Fera, M, Jiménez E, Barbón R, Capote A, Chávez M y Quiala E (2000) Multiplicación de suspensiones celulares embriogénicas de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. Biotecnología Vegetal 1: 13-20
- De Rezende, A, Pasqual M, Pereira A, Costa J, Bortolotti A y Ferreira L (2003) Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. CV. Obatã. Ciênc. agrotec., Lavras. 27 (1): 107-116
- Duhem, K, Le Mercier N y Boxus Ph (1988) Difficulties in the establishment of axenic *in vitro* cultures of field collected Coffee and Cacao germplasm. Acta Hort. 225: 67-77
- García, E 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
- González, M y Barrios L (2002) Estudio de contaminantes fungosos en la micropopagación del cafeto (*Coffea* sp.). Libro de resúmenes. VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Villa Clara, Cuba, pp.119
- Jiménez, E (1998) Cultivo de ápices y meristemas. En: Pérez, JN (Ed) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. pp. 45-56. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara
- Leifert, C y Cassells AC (2001) Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro* Cell Dev. Biol. Plant 37(2): 133-138
- 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
- Quintero, W, Mas G, Santos R León S, Castro C y Bracho B (1997) Efecto de la temperatura y tiempo de inmersión en el control de la contaminación de yemas apicales de Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden, cultivadas *in vitro*. En: Resúmenes VII Jornadas Científicas Técnicas. Maracaibo, Venezuela. pp. 101
- Sondhal, M y Sharp W (1977) High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea Arabica* L. Zpflanzenphysiol. 94: 101-108
- Vieira, S, Pereira T y Luz E (1988) Propagação do Guaraná *in vitro*. I. Seleção de fungicidas. Fitopatología brasileira. 13(3): 183-185
- Villalobos, R, León S y Urdenata A (1999) Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz Rev. Fac. Agron. (Luz) 16: 243-255
- Viloria, V (1993) Cultivo *in vitro* de nudos de guayabo (*Psidium guajava* L.) Fase I. Trabajo de Ascenso. La Universidad de Zulia. Facultad de Agronomía. Venezuela