

Micobiota epífita y contaminantes fungosos del establecimiento in vitro de *Eucalyptus grandis*

Mayra Acosta¹
Yelenys Alvarado¹
Mileidy Cruz¹
Michel Leiva¹
Luis Delgado¹

RESUMEN. Se evaluó cualitativamente la micobiota epífita presente en plantas de *Eucalyptus grandis* de las cuales se tomarían explantes iniciales para la micropropagación de esta especie forestal. Para ello se utilizaron los métodos de cámara húmeda y observación de preparaciones directas al microscopio óptico. A partir de la determinación de los principales géneros fungosos, se realizaron dos aspersiones semanales a las plantas con los fungicidas mancozeb, oxiclóruo de cobre y benomil. Además, se aislaron e identificaron los hongos filamentosos que aparecieron como contaminantes en la fase de establecimiento in vitro de estos explantes. Se demostró que la micobiota epífita en plantas de eucalipto evaluadas estaba conformada por los hongos *Alternaria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Gloeosporium*, *Memmoniella*, *Nigrospora*, *Penicillium* y *Rhizopus*. Los fungicidas utilizados lograron eliminar los géneros *Cladosporium*, *Fusarium*, *Memmoniella*, *Nigrospora*, *Penicillium* y *Rhizopus*. Sin embargo, durante la fase de establecimiento in vitro se aisló *Alternaria*, *Curvularia*, *Gloeosporium*, *Aspergillus* y *Cephalosporium* como contaminantes. La coincidencia de géneros de hongos filamentosos presentes en la micobiota epífita de las plantas donadoras y como contaminantes en la fase de establecimiento implicó al explante inicial como la principal fuente de introducción de contaminantes.

Palabras clave: contaminación microbiana, fungicidas, hongos filamentosos, cosechas forestales.

ABSTRACT. Epiphyte and contaminant fungi present in the in vitro establishment of *Eucalyptus grandis*. Epiphyte fungus and contaminant populations were studied on *Eucalyptus grandis* plants. Both moist chamber and microscopic observations were used for identification of fungus genera. The effect of fungicide sprays twice a week on the epiphyte fungal population was evaluated after three weeks. Fungi population on *E. grandis* plants was formed by the genera *Alternaria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Gloeosporium*, *Memmoniella*, *Nigrospora*, *Penicillium* and *Rhizopus*. Genera like *Cladosporium*, *Fusarium*, *Memmoniella*, *Nigrospora*, *Penicillium* and *Rhizopus* were controlled using fungicide sprays. However, during the establishment stage, fungi such as *Alternaria*, *Curvularia*, *Gloeosporium*, *Aspergillus* and *Cephalosporium* were isolated. The coincidence of filamentous fungi genera on donor plants and contaminant filamentous fungi on in vitro plant establishment showed that the initial explants were the main source of contaminants.

Key words: microbial contamination, fungicides, filamentous fungi, forest crops.

Introducción

La micropropagación de especies leñosas forestales a partir de individuos élites seleccionados en los programas de mejora genética convencional se considera como la vía más efectiva para establecer poblaciones morfológica y genéticamente estables (Agramonte et al. 2001). Sin embargo, uno de los principales proble-

mas de esta tecnología es la contaminación microbiana durante la fase de establecimiento, porque las características anatómicas propias de estos cultivos dificultan la desinfección de los explantes (Jiménez 1998). Los microorganismos pueden provenir de la superficie o del interior de los tejidos de la planta donadora

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camaguaní, km 51/2. Santa Clara Villa Clara, Cuba. mayra01a@yahoo.es ; yalvarado@ibp.uclv.edu.cu

(Cassells 1991, Leifert et al. 1994, Alvarado 1998). A partir del diagnóstico de los principales microorganismos patógenos o contaminantes se pueden eliminar o colocar en tratamiento las plantas contaminadas (Jiménez 1998). Uno de los procedimientos para disminuir los riesgos de la contaminación en el establecimiento de los explantes es la aplicación de fungicidas, combinados o por separado, durante todo el ciclo de crecimiento de las plantas donadoras (Alvarado 1998, Jiménez 1998).

Los principales microorganismos contaminantes del cultivo in vitro son los hongos filamentosos, las levaduras y las bacterias, los cuales habitan comúnmente plantas in vivo, pero tienen efectos devastadores in vitro (George 1993, Leifert et al. 1994, Leifert y Cassells 2001). Conocer la micobiota epifítica de las plantas donadoras de eucalipto *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) permite crear un plan de tratamiento de estas y del explante inicial, dirigidos a prevenir o eliminar la contaminación fungosa durante su micropropagación. Los objetivos de este trabajo fueron:

- Identificar la micobiota epifítica de las plantas donadoras de *E. grandis*.
- Evaluar la acción de fungicidas sobre la micobiota epifítica de esas plantas.
- Aislar e identificar los hongos filamentosos contaminantes de la fase de establecimiento in vitro de *E. grandis*.

Materiales y métodos

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Cuba, durante el 2002.

Los explantes utilizados provenían de plantas donadoras sembradas en áreas del IBP con un marco de plantación de 1 x 1 m. Dichas plantas conformaban el banco de donantes de explantes que recibió las atenciones agronómicas requeridas, como la revigoriación a través de podas intensas cada 60 días, previo a la toma de los explantes, y fertilización con nitrógeno (N) 110 g L⁻¹, fósforo (P₂O₅) 80 g L⁻¹ y potasio (K₂O) 60 g L⁻¹.

Para la identificación de la micobiota epifítica en plantas donadoras, se colocaron segmentos nodales de los rebrotes tiernos, con una longitud de 5-7 cm y con dos o tres yemas axilares, 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. Pasado este tiempo, se realizaron preparaciones microscópicas del crecimiento fungoso con lactofenol y se observaron al microscopio óptico con 400 aumentos. De acuerdo con las características morfológicas de las estructuras de reproducción observadas y con el auxilio del *Illustrated genera of imperfect fungi* (Barnett y Hunter 1987), se identificaron los géneros de hongos filamentosos presentes.

Conociendo la micobiota epifítica presente en las plantas donadoras, estas fueron sometidas a dos aspersiones semanales de fungicidas comerciales, alternando las siguientes mezclas:

- Fungicida preventivo de contacto mancozeb pH 80 (10 g L⁻¹) y fungicida preventivo curativo de acción sistémica benomil pH 50 (2 g L⁻¹).
- Fungicida preventivo de contacto oxiclورو de cobre pH (10 g L⁻¹) y fungicida preventivo curativo de acción sistémica benomil pH 50 (2 g L⁻¹).

Se realizaron seis aplicaciones de fungicidas. Después de la última aplicación se recolectaron nuevos explantes (segmentos nodales), que se colocaron 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. Pasado este tiempo, se realizaron preparaciones microscópicas del crecimiento fungoso con lactofenol y se observaron al microscopio óptico con 400 aumentos.

Los explantes fueron establecidos in vitro según el protocolo descrito por Agramonte et al. (2001). La contaminación fungosa se evaluó diariamente por observación visual de los recipientes de cultivo (tubos de ensayo de 14,5 x 25 mm). El aislamiento de los contaminantes fungosos se realizó por siembra directa de fragmentos de micelio en placas de Petri que contenían medio de cultivo agar papa dextrosa a razón de 39 g L⁻¹ y pH 5,6 ± 0,2. Las placas se incubaron a 28 °C y oscuridad constante durante 14 días. Para la caracterización se tuvieron en cuenta las características morfológicas de las colonias en medio de cultivo sólido. Además, se realizaron preparaciones directas de fragmentos de colonias que se observaron al microscopio óptico con 400 aumentos. En ellas se registraron las características de las hifas, de las estructuras de reproducción y las esporas. Para la identificación se tuvieron en cuenta los criterios contenidos en el *Illustrated genera of imperfect fungi* (Barnett y Hunter 1987).

Resultados

Se determinó que la micobiota epífita de las plantas donadoras de eucalipto estuvo integrada por géneros de hongos filamentosos que han sido descritos como saprofitos o patógenos de plantas. Se identificaron nueve géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Gloeosporium*, *Memnoniella*, *Nigrospora*, *Penicillium* y *Rhizopus*. Todos los géneros se ubican en la clase Deuteromycetes (Barnett y Hunter 1987), excepto *Rhizopus*, que pertenece a la clase Zygomycetes.

Se demostró la acción benéfica de los fungicidas, que eliminaron más del 50% de los hongos filamentosos que conformaban la micobiota de las plantas donadoras. Solo los géneros *Alternaria*, *Curvularia* y *Gloeosporium* lograron sobrevivir a la acción de los fungicidas. Durante la fase de establecimiento *in vitro*, se aislaron e identificaron los géneros de hongos filamentosos *Alternaria*, *Curvularia*, *Gloeosporium*, *Aspergillus* y *Cephalosporium*.

Discusión

Los resultados de este trabajo concuerdan con los obtenidos por numerosos investigadores. Montilla et al. (1999) evidenciaron la gran diversidad de microorganismos que conviven en forma epífita en las hojas de *E. grandis*; identificaron 11 géneros de hongos, siendo los más frecuentes *Aspergillus* sp. y *Rhizopus* sp., y resaltaron por su importancia fitopatológica a *Alternaria* sp., *Botryodiplodia* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp. y *Trichoderma* sp.

En el cultivo del café, Arizaleta y Pineda (1999) encontraron que los hongos *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Mucor*, *Pythium*, *Phomopsis*, *Rhizopus*, *Colletotrichum*, *Pestalotia* y *Nigrospora* formaban parte de la microflora epifítica de ese cultivo.

La mayor fuente de contaminación primaria en los cultivos *in vitro* proviene de la planta madre (Cassells 1991); por esta razón, se recomienda diagnosticar y tratar las plantas donantes, donde es mucho más fácil detectar los contaminantes en el tejido maduro, ya que existen altas poblaciones de los mismos (Jiménez 1998). La aplicación de fungicidas es una de las opciones empleadas para disminuir o eliminar la acción de los microorganismos fungosos en las plantas donadoras de explantes durante la fase cero o preparativa de la micropropagación de plantas (Alvarado 1998). Cruz et al. (2002) demostraron que el complejo carbendazim- β -ciclodextrina, en concentraciones

que variaron desde 0,125 hasta 512 mg L⁻¹, inhibió el crecimiento micelial de los contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Spicaria*, *Fusarium*, *Pestalotia* y *Colletotrichum*. Segmentos nodales sumergidos durante 30 min en 2 g L⁻¹ de benomil permitieron el establecimiento *in vitro* de *P. guajava* y *Psidium friedrichsthalianum*, obteniéndose el menor porcentaje de explantes contaminados a los 7 días de la siembra (Ramírez 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 y Salazar 1997). Leifert et al. (1994) y Alvarado (1998) refieren a los géneros *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia* y *Fusarium* como los microorganismos fungosos más comúnmente introducidos al cultivo de tejidos. Ramírez et al. (1999) detectaron la presencia de hongos contaminantes en ápices de plantas adultas de *Annona muricata*. Los hongos detectados correspondieron a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryodiplodia*, *Curvularia* y *Helmithosporium*. Acosta et al. (2002) identificaron los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Aspergillus* durante el establecimiento *in vitro* de la guayaba.

Con los resultados obtenidos se comprobó la diversidad de la micobiota epífita en las plantas donadoras de eucalipto y la necesidad de las aplicaciones de fungicidas durante la fase preparativa de la micropropagación. La coincidencia de géneros de hongos filamentosos presentes en la micobiota epífita de las plantas donadoras y como contaminantes en la fase de establecimiento implicó al explante inicial como la principal fuente de introducción de contaminantes.

Literatura citada

- Acosta, M; Alvarado, Y; Caballero, I. 2002. Micobiota epifítica y contaminantes fungosos del establecimiento *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L.). *Biotecnología Vegetal* 2(2):67-71.
- Agramonte, D; Delgado, L; Trocones, A; Pérez, M; Ramírez, D; Gutierrez, O. 2001. Micropropagación del *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) a partir de segmentos nodales. *Biotecnología Vegetal* 1(2):109-114.
- Alvarado, Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. In Pérez P, JN. ed. *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Santa Clara, CU, Instituto de Biotecnología de las Plantas. p. 81-104.

- Arizaleta, M; Pineda, J. 1999. Microflora epifítica en el cultivo del cafeto (en línea). *In* Congreso de Fitopatología. Barquisimeto, VE, Universidad del Zulia. Disponible en <http://www.redpav-fpolar.info.ve/fitopato/index.html>.
- Barnett, HL; Hunter, BB. 1987. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4 ed. Nueva York, US, MacMillan Publishig Company. p. 118.
- Cassells, AC. 1991. Problem in tissue culture: culture contamination. *In* Micropropagation, Dordrecht, DE, Kluwer Academic Publishers. p. 31-45.
- Cruz, M; Acosta, M; Leiva, M; Alvarado, Y; Lezcano, M. 2002. Evaluación del efecto del complejo carbendazim- β -ciclodextrina para el control de hongos filamentosos contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas. *Biología Vegetal* 2 (2):73-76.
- George, EF. 1993. *Plant propagation by tissue culture*. 2 ed. p. 130-143.
- Jiménez, E. 1998. Cultivo de ápices y meristemas. *In* Pérez P, JN. ed. *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Santa Clara, CU, Instituto de Biotecnología de las Plantas. p. 45-56.
- Leifert, C; Morris, CE; 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.
- _____; Cassells, AC. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* 37(2):133-138.
- Montilla, J; Pineda, J; Rodríguez, D. 1999. Microflora de la filosfera de árboles de *Eucalyptus camaldulensis* (en línea). *Fitopatología Venezolana*. *In* Congreso Venezolano de Fitopatología. Barquisimeto, VE, Universidad del Zulia. Disponible en <http://www.redpav-fpolar.info.ve/fitopato/index.html>
- Ramírez, M; Salazar, E. 1997. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía (Venezuela)* 14:497-506.
- _____; Isea, F; Santos, R; León de Sierralta, S; Urdaneta, A. 1999. Hongos contaminantes en el cultivo *in vitro* de ápices de plantas adultas de *Annona muricata* tratados con Hipoclorito de Sodio, en el estado Zulia, Venezuela. *In* Congreso Venezolano de Fitopatología. Barquisimeto, VE, Universidad del Zulia. Disponible en <http://www.redpav-fpolar.info.ve/fitopato/index.html>
- _____; León de Sierralta, S; Urdaneta, A. 1999. Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz. *Revista de la Facultad de Agronomía (Venezuela)* 16:243-255.