

Micobiota de plantas donadoras y contaminantes fúngicos del establecimiento *in vitro* de especies de bambúes

Mayra Acosta-Suárez*, Yelenys Alvarado-Capó, Mileidy Cruz-Martín, Berkis Roque, Cynthia Sánchez-García, Michel Leiva-Mora, Marisol Freire-Seijo, Yudith García-Ramírez, Zaida Pérez, Teresa Salabarría, Marisol Tejada, Milagros González, Ortelio Hurtado. *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. e.mail: mayra@ibp.co.cu

RESUMEN

La presencia de contaminantes fúngicos es uno de los aspectos que puede limitar el establecimiento *in vitro* de explantes de bambúes. La identificación de los microorganismos presentes en las plantas donadoras permite diseñar estrategias de control adecuadas. Este trabajo tuvo como objetivos: determinar la micobiota de plantas donadoras de especies de bambúes e identificar los hongos filamentosos contaminantes de la fase de establecimiento para su control. Para la determinación e identificación de los hongos filamentosos se utilizó el método de la cámara húmeda y se realizaron preparaciones directas al microscopio óptico del crecimiento fúngico. Se comprobó que las plantas donadoras de bambúes poseían una micobiota integrada por: *Alternaria*, *Botryotrichum*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* y *Nigrospora*. Los géneros *Asteromella*, *Bipolaris* y *Humicola* se identificaron en fase de establecimiento, mientras que *Alternaria*, *Botryotrichum*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* y *Nigrospora* aparecieron en plantas donadoras y en el establecimiento. En las especies *Dendrocalamus asper*, *Dendrocalamus strictus*, *Guadua angustifolia* y *Gigantochloa atter* el género *Nigrospora* fue el de mayor frecuencia de aparición, mientras que en *Bambusa vulgaris* fue *Fusarium*. Se confeccionó un plan de defensa fitosanitario para plantas donadoras que incluyó fungicidas sistémicos y de contacto cuyo espectro de acción cubría los géneros de hongos identificados.

Palabras clave: forestales, hongos filamentosos, micropropagación

ABSTRACT

The presence of fungal contaminants may limit the establishment of bamboo explants. Knowing the contaminant microorganisms present in donor plants allow to trace more appropriate control strategies. This work was aimed to identify the mycobiota of donor plants of bamboo species and to identify the filamentous fungi in the establishment stage to control them. The method of the humid camera was used to determine and to identify the filamentous fungus. Then, direct preparations to the optic microscope of growth fungus were carried out. It was observed that the donor plants of bamboos had a mycobiota composed of diverse generous of filamentous fungi: *Alternaria*, *Botryotrichum*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* y *Nigrospora*. The genera *Asteromella*, *Bipolaris* and *Humicola* were identified in the establishment stage, while *Alternaria*, *Botryotrichum*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* and *Nigrospora* appeared in donor plants and in the establishment. In species *Dendrocalamus asper*, *Dendrocalamus strictus*, *Guadua angustifolia* and *Gigantochloa atter* genera *Nigrospora* showed the highest frequency of appearance, while in *Bambusa vulgaris* the filamentous fungus with highest frequency was *Fusarium*. A phytosanitary defense plan for donor plants was developed. It included systemic and contact fungicides which spectrum of activity covered the identified fungi genera.

Key words: forestal, filamentous fungi, micropropagation

INTRODUCCIÓN

Las especies de Bambúes son muy importantes por sus numerosos usos en la construcción, la industria farmacéutica, en la producción de muebles, industria del papel, artesanías y otros (Montiel, 2006). Las vías de propagación para estas especies, resultan limitadas, debido a que la regeneración natural ocurre estacionalmente por medio de semillas y por rizomas, por eso, se hace necesaria la regeneración y multiplicación de plantas *in vitro* como una alternativa a la propagación vegetativa (Daquinta, 2004). La presencia de microorganismos contaminantes

fúngicos es uno de los aspectos que puede limitar el establecimiento de explantes de bambúes (Das y Pal, 2005). Conocer la micobiota de plantas donadoras y los hongos filamentosos contaminantes del establecimiento de plantas, permite trazar un esquema de tratamientos con fungicidas a plantas donadoras dirigidos a prevenir o eliminar la contaminación *in vitro* (Acosta-Suárez *et al.*, 2005). Por lo anteriormente expuesto es que se realiza este trabajo que tuvo como objetivos determinar la micobiota de plantas donadoras de especies de bambúes e identificar los hongos filamentosos contaminantes de la fase de establecimiento para su control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Explantos: Segmentos nodales de aproximadamente 1 a 3 cm de largo con una yema axilar bien diferenciada (Figura 1) de *Dendrocalamus asper* (Schultes) Backer, *Dendrocalamus strictus* (Roxburgh) Nees, *Guadua angustifolia* Kunth, *Gigantochloa atter* (Hasskari) Kurz y *Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendland. Estas plantas estuvieron cultivadas en una casa de cultivo en bolsas de nylon con tierra como sustrato.

Los explantes (25 por especie) fueron cortados e introducidos en recipientes biotecnológicos de 500 ml de capacidad con 25 ml de agua desionizada estéril. Estos se colocaron en zaranda a 140 rpm por 15 minutos. Se enjuagaron, se desinfectaron y establecieron *in vitro* según el protocolo descrito por Fajardo (2006).

Determinación de la micobiota de plantas donadoras

Para determinar los géneros de hongos filamentosos presentes en los explantes tomados de las plantas donadoras, previo a la desinfección, se tomaron 20 explantes por especie de bambú y se colocaron en cámara húmeda (placas de Petri de 14.7cm de diámetro que contenían papel de filtro previamente humedecido con agua desionizada estéril, (Figura 1), se utilizaron cinco placas como réplica, cuatro explantes por placa). Las placas se incubaron a 28°C y oscuridad constante durante 14 días. Posteriormente, se realizaron preparaciones directas de los hongos filamentosos crecidos sobre los explantes y se observaron al microscopio óptico OLYMPUS con

400x de aumento. Para la identificación se utilizó el Atlas de hongos del suelo y de semillas, Watanabe (2002).

Identificación de los hongos filamentosos contaminantes de la fase de establecimiento

La presencia de contaminantes fúngicos contaminantes de la fase de establecimiento se evaluó diariamente por observación visual de los recipientes de cultivo (tubos de ensayo con 10ml de medio de cultivo para el establecimiento *in vitro*). Los explantes contaminados por hongos filamentosos se retiraron de las cámaras de crecimiento para la identificación.

Los hongos filamentosos fueron aislados con aguja de siembra a placas de Petri (Ø54.0mm) con medio de cultivo Agar Extracto de Levadura. Las placas se incubaron a 28°C durante 14 días. Para la identificación se tuvieron en cuenta sus características culturales y morfológicas y para completar los análisis se utilizó el Atlas de hongos del suelo y de semillas, Watanabe (2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la micobiota de plantas donadoras de especies de bambúes

Las plantas donadoras de especies de bambúes, tuvieron una micobiota integrada por seis géneros de hongos filamentosos los cuales fueron *Alternaria*, *Botryotrichum*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* y *Nigrospora* (Tabla 1). Estos hongos han sido descritos como saprofitos o patógenos de plantas y clasificados taxonómicamente dentro de la clase *Hyphomycetes* (Vilaró *et al.*, 2006).



Figura 1. Explantes utilizados para el establecimiento *in vitro* de diferentes especies de bambú. A. Yemas seleccionadas. B. Explantes en cámara húmeda. C. Hongos filamentosos de la micobiota sobre explantes colocados en cámara húmeda, después de 14 días de incubación.

Tabla 1. Hongos filamentosos que conformaron la micobiota de plantas donadoras de especies de bambúes.

Especies de bambúes	Micobiota
<i>Dendrocalamus asper</i> (Schultes) Backer	<i>Fusarium, Nigrospora</i>
<i>Dendrocalamus strictus</i> (Roxburgh) Nees	<i>Nigrospora</i>
<i>Guadua angustifolia</i> Kunth	<i>Fusarium, Nigrospora</i>
<i>Gigantochloa atter</i> (Hasskarl) Kurz	<i>Alternaria, Nigrospora</i>
<i>Bambusa vulgaris</i> Schrader ex Wendland	<i>Botryotrichum, Cladosporium, Curvularia, Fusarium, Nigrospora</i>

Doungporn *et al.* (2007) aislaron 257 hongos filamentosos endofíticos procedentes de tejidos de bambúes y caracterizaron 71 de ellos por métodos moleculares. Los análisis filogenéticos mostraron que los hongos filamentosos pertenecían a los *Sordariomycetes* y *Dothideomycetes*. Los *Xylariales* fueron el grupo dominante. Estos descubrimientos revelaron que los bambúes contienen un alto reservorio de microorganismos que deberían ser investigados.

Identificación de los hongos filamentosos contaminantes de la fase de establecimiento

Se observó la presencia de contaminantes fúngicos en la fase de establecimiento (Figura 2) y se identificaron nueve géneros de hongos filamentosos.

Los géneros *Asteromella*, *Bipolaris* y *Humicola* se identificaron en fase de establecimiento, mientras que *Alternaria*, *Botryotrichum*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* y *Nigrospora* aparecieron tanto en plantas donadoras como en el establecimiento. Esto demuestra que el explante inicial fue una de las fuentes de contaminación.

En las especies *Dendrocalamus asper*, *Dendrocalamus strictus*, *Guadua angustifolia* y *Gigantochloa atter* el género *Nigrospora* fue el de mayor frecuencia de aparición, mientras que en *Bambusa vulgaris* fue *Fusarium* (Tabla 2).

Das y Pal (2005) plantearon que el principal problema encontrado durante el establecimiento de *Bambusa balcooa* Roxb. fue la presencia de contaminantes fúngicos visibles. Igualmente, Ramanayake *et al.* (2006) solo obtuvieron un 15% de explantes libres de contaminación cuando utilizaron como explantes yemas axilares de *Bambusa vulgaris* 'Striata' procedentes de plantas de campo y de vivero.

A partir de estos resultados se elaboró un plan de defensa fitosanitario para las plantas donadoras que incluyó fungicidas sistémicos y de contacto cuyo espectro de acción cubría los géneros de hongos identificados.

Fungicidas preventivos y curativos de acción sistémica

Benomyl PH50 (Ingrediente activo: Carbendazin) a la concentración de 5g.l⁻¹ y Silvacur combi CE30 (22.5+7.5) (Tebuconazol + Triadimenol) a la concentración de 2.0ml.l⁻¹.

Fungicidas preventivos de contacto

Mancozeb PH80 (Ingrediente activo: etilenbisditiocarbamato de Mn y Zn) a la concentración de 5g.l⁻¹ y Oxicloruro de Cobre a la concentración de 2.0ml.l⁻¹

Se recomendó la aplicación de los fungicidas dos veces por semana durante 15 días antes de ser establecidas *in vitro*. Los fungicidas sistémicos deben ser mezclados con los de contacto para evitar fungoresistencia.

La aplicación de este procedimiento ha permitido controlar la presencia de hongos filamentosos y disminuir la contaminación fúngica en el establecimiento *in vitro* por debajo del 10%.

Las metodologías de propagación *in vitro* para especies leñosas desarrolladas por Agramonte *et al.* (2001), señalan la importancia del establecimiento de un banco de plantas donantes bajo condiciones de invernadero y la aplicación de mezclas de fungicidas comerciales con el objetivo de atenuar el efecto de los microorganismos contaminantes durante la fase de establecimiento. De igual manera, Mroginski *et al.* (2004) sugieren realizar una adecuada preparación de las plantas donadoras de explantes, cultivándolas preferentemente en invernaderos y tratadas con productos químicos que eliminen patógenos y eventuales microorganismos endofíticos.

Fajardo (2006) y Jiménez *et al.* (2006) demostraron que yemas axilares de *Guadua angustifolia* Kunth colectadas de plantas adultas mostraban altos porcentajes de contaminación microbiana, por ello mantuvieron las plantas en condiciones semicontroladas en casa de cultivo con aplicación de fungicidas sistémicos y de contactos y obtuvieron buenos resultados.

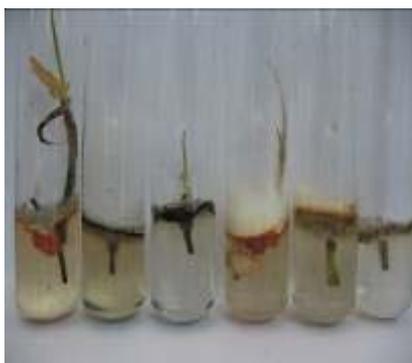


Figura 2. Explantes contaminados por hongos filamentosos durante la fase de establecimiento.

Tabla 2. Frecuencia de aparición de hongos filamentosos que aparecieron en fase de establecimiento de especies de bambúes.

Especies de Bambúes	Contaminantes fúngicos del establecimiento	Frecuencia de aparición (%)
<i>Dendrocalamus asper</i> (Schultes) Backer	<i>Nigrospora</i>	50.0
	<i>Humicola</i>	33.3
	<i>Cladosporium</i>	16.6
<i>Dendrocalamus strictus</i> (Roxburgh) Nees	<i>Nigrospora</i>	50.0
	<i>Curvularia</i>	33.3
	<i>Cladosporium</i>	16.6
<i>Guadua angustifolia</i> Kunth	<i>Nigrospora</i>	66.6
	<i>Cladosporium</i>	33.3
<i>Gigantochloa atter</i> (Hasskari) Kurz	<i>Nigrospora</i>	64.3
	<i>Fusarium</i>	28.6
	<i>Bipolaris</i>	7.1
<i>Bambusa vulgaris</i> Schrader ex Wendland	<i>Fusarium</i>	70.3
	<i>Cladosporium</i>	2.7
	<i>Botryotrichum</i>	13.5
	<i>Nigrospora</i>	5.7
	<i>Bipolaris</i>	2.7
	<i>Asteromella</i>	2.7
	<i>Penicillium</i>	2.7

CONCLUSIONES

Se comprobó que las plantas donadoras de especies de bambúes poseían una micobiota diversa integrada por géneros de hongos filamentosos que han sido descritos como saprofitos o patógenos de plantas algunos de los cuales se identificaron como contaminantes de la fase de establecimiento. Esto demostró que el explante inicial fue una de las fuentes de contaminación. Mediante el conocimiento de la micobiota y los contaminantes fúngicos del establecimiento de especies de bambúes se puede confeccionar un plan de defensa fitosanitario a plantas donadoras encaminado a disminuir o

erradicar gran parte de los hongos filamentosos contaminantes del establecimiento.

REFERENCIAS

- Acosta-Suárez, M, Alvarado Y, Cruz M, Leiva M y Delgado L (2005) Micobiota epífita y contaminantes fúngicos del establecimiento *in vitro* de *Eucalyptus grandis* Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 75: 60-63
- Agramonte, D, Delgado L, Trocones A, Pérez M, Ramírez D, Gutiérrez O (2001) Micropropagación del *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) a partir segmentos nodales. Biotecnología vegetal 1(2): 109-114
- Mroginski, L, Sansberro P y Flaschland E (2004) Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Parte V Métodos de

- propagación y conservación de germoplasma. En: Echenique, V, Rubinsten C y Mroginski L (Eds) Biotecnología y Mejoramiento Vegetal, pp. 35-42, editorial INTA Buenos Aires
- Fajardo, L (2006) Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Guadua angustifolia* Kunth. Tesis presentada para la obtención del grado científico de Master en Ciencias. IBP. UCLV. Santa Clara, Cuba
- Daquinta, M (2004) Manejo Biotecnológico de especies forestales y bambusas en Cuba. [en línea] En: <<http://www.matemáticas.udea.edu.co/~actubiol/> Vol27-82 Resumen. htm>[Consulta: 10 diciembre 2005]
- Das, M y Pal A (2005) *In vitro* regeneration of *Bambusa balcooa* Roxb. Factors affecting changes of morphogenetic competence in axillary buds. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 81(1): 109-112
- Montiel, M (2006) Ultraestructura de bambúes del género *Dendrocalamus* (Poaceae: Bambusoideae) cultivados en Costa Rica IV: *Dendrocalamus asper*, clones Taiwán y Tailandia. Biología Tropical 54 (2):65-75
- Jiménez, V, Castilla J, Tavares E, Guevara E, Montiel M (2006) *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. Plant Cell Tissue Organ Cult. 86:389-395
- Ramanayake, S, Meemaduma y V, Weerawardene T (2006) *In vitro* shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* 'Striata') Scientia Horticulturae 1(10): 109–113
- Doungporn, M, Hiroko K, Tatsuji S (2007) Molecular diversity of bamboo-associated fungi isolated from Japan FEMS Microbiology Letters 266 (1): 10–19
- Vilaró, M, Mena J, Minter, DW (2006) *Hongos de Cuba*. [en línea] en: <http://www.cybertruffle.org.uk/cubafung> [Consulta: 26 Febrero 2007]
- Watanabe, T (2002) Pictorial Atlas of soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species. Second Edition. CrC Press. Boca Ratón Fla