

Micobiota de plantas donadoras y hongos filamentosos contaminantes del establecimiento *in vitro* de cinco especies forestales

M. Acosta-Suárez, Y. Alvarado-Capó, M. Cruz-Martín, M. Leiva-Mora, C. Sánchez-García, Berkis Roque, E. Quiala, Maité Chávez, F. Jiménez-Terry, Mariana la O, R. Barbón, R. Collado, Mayelín Rodríguez, M. De Feria, Ivan Borroto, Martha Pérez *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

A pesar de que se han desarrollado protocolos para propagar un gran número de especies forestales por cultivo *in vitro*, la contaminación fúngica de los explantes constituye uno de los problemas fundamentales que limita su aplicación. Los objetivos de este trabajo fueron identificar la micobiota de plantas donadoras y los hongos filamentosos contaminantes del establecimiento *in vitro* de explantes de cinco especies forestales (caoba, teca, majagua, pino y cedro). De plantas donadoras se tomaron explantes que se colocaron en cámara húmeda. Se realizaron preparaciones directas al microscopio óptico del crecimiento fúngico, se aislaron e identificaron los géneros presentes. Además, se aislaron e identificaron los hongos filamentosos contaminantes de la fase de establecimiento. Se identificaron 11 géneros fúngicos presentes en las plantas donadoras y 20 como contaminantes del establecimiento *in vitro*. *Botryodiplodia*, *Cephalosporium*, *Diplodia*, *Dreschlera*, *Geotrichum*, *Gloeosporium Helminthosporium*, *Memnoniella*, *Oidiodendron* y *Rhinoclediella* aparecieron solamente durante la fase de establecimiento, mientras que *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Colletotricum*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium* y *Pestalotia* se detectaron en plantas donadoras y durante la fase de establecimiento, lo que indicó que el explante inicial fue la posible fuente de contaminación. Los géneros más frecuentes fueron *Botryodiplodia* en teca, *Nigrospora* en majagua y *Alternaria* en pino, cedro y caoba. A partir de estos resultados se elaboró 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: caoba, cedro, contaminación microbiana, majagua, micropropagación, pino, teca

ABSTRACT

Although protocols to propagate large numbers of woody species by *in vitro* culture have been developed, microbial contamination of explants is a fundamental problem which limits its application. The objectives of this study were: to identify the donor plant mycobiota and to identify filamentous fungi contaminants at the establishment phase of mahogany, teak, majagua, pine and cedar. Explants of donor plants were placed in moist chamber and were prepared to direct optical microscope of fungal growth. Cultural characteristics and morphological were taken into account to identify filamentous fungi contaminants in the establishment phase. Frequency of all genera identified was determined. Eleven genera of filamentous fungi in donor plants and twenty genera in the establishment of forest species were identified. The genera *Botryodiplodia*, *Cephalosporium*, *Diplodia*, *Dreschlera*, *Geotrichum*, *Gloeosporium Helminthosporium*, *Memnoniella*, *Oidiodendron* and *Rhinoclediella* appeared only during establishment phase. Others such as *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Colletotricum*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium* and *Pestalotia* were detected in donor plants and during establishment phase. This indicates that the possible source of contamination was the initial explant. The most frequent genera were *Botryodiplodia* in teak, *Nigrospora* in majagua and *Alternaria* in pine, cedar and mahogany. A phytosanitary plan of defence for donor plants was developed. The plan included systemic and contact fungicides whose spectrum of activity covered the identified genera of fungi.

Keywords: cedar, mahogany, majagua, micropropagation, microbial contamination, pine, teak

INTRODUCCIÓN

El rescate de especies forestales de interés comercial es una de las líneas prioritarias de la biotecnología como herramienta básica para apoyar al mejoramiento de árboles élitos. De esta forma se contribuye a elevar las tasas de multiplicación y permite participar en los programas de reforestación

de áreas con grandes problemas de deforestación. Todo ello conduce a su integración al desarrollo del país y a mantener el equilibrio del ecosistema natural.

Las especies forestales tienen muchos problemas de propagación por la variabilidad genética de las plantas producidas a partir de semillas (Daquinta *et al.*, 2000). La micropropagación vía organogénesis

directa mediante el desarrollo y enraizamiento de brotes axilares ha ido reemplazando los sistemas de propagación tradicional (Nadgauda *et al.*, 1997; Monteuis *et al.*, 1998; Daquinta *et al.*, 2001).

Uno de los principales problemas para la micropropagación de estas especies, lo constituye la contaminación fúngica durante la fase de establecimiento *in vitro*. En las especies forestales esto se ve incrementado por las características anatómicas de los explantes que dificultan a menudo su desinfección (Sharry, 2001). El uso de fungicidas en el tratamiento de plantas donadoras durante la fase preparativa de la micropropagación es muy importante para prevenir o eliminar los hongos filamentosos saprofitos o parásitos causantes de contaminaciones durante la fase de establecimiento (Agramonte *et al.*, 2001). Conocer la micobiota epifítica de plantas donadoras y los hongos filamentosos contaminantes del establecimiento *in vitro*, permite crear un esquema de tratamientos a las plantas donadoras dirigidos a prevenir, disminuir o eliminar la contaminación fúngica. Por ello los objetivos de este trabajo fueron identificar la micobiota de plantas donadoras y los hongos filamentosos contaminantes del establecimiento *in vitro* de explantes de cinco especies forestales (caoba, teca, majagua, pino y cedro).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon plantas de caoba (*Swietenia mahagonii* L Jacq.), teca (*Tectona grandis* L.) majagua (*Talipariti elatum* (Sw)), pino (*Pinus caribaea* var. *caribaea* (L) Morelet) y cedro (*Cedrela odorata* L.) que estuvieron sembradas en bolsas de polietileno ubicadas en el banco de donantes del Instituto de Biotecnología de las Plantas.

Identificación de la micobiota de plantas donadoras

De las ramas laterales de las plantas donadoras se cortaron segmentos nodales de aproximadamente 1 a 3 cm de longitud con una yema axilar bien diferenciada (explantes).

Inmediatamente después de cortados los explantes fueron introducidos en recipiente de 500ml de capacidad con 25 ml de agua desionizada estéril (25 explantes por recipiente) y se colocaron en zaranda orbital a 140 rpm por 15 minutos para su lavado superficial. Posteriormente los explantes se colocaron en cámara húmeda para el crecimiento de los hongos filamentosos que conformaban la micobiota de las plantas donadoras. Las placas se incubaron a 28°C y oscuridad constante hasta 14 días.

Los hongos filamentosos que crecieron fueron aislados. Para ello el micelio fue transferido con aguja de siembra a placas de Petri de 32 mm de diámetro con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (BioCen). Las placas se incubaron a 28°C y oscuridad constante durante 7 días. Para la identificación se describieron las características culturales y morfológicas de los hongos filamentosos y se realizaron preparaciones directas que se obtuvieron con el microscopio clínico (OLYMPUS) con 400x de aumento. Las características observadas se compararon con las descripciones contenidas en el Atlas de hongos del suelo y de semilla (Watanabe, 2002).

Identificación de hongos filamentosos contaminantes en fase de establecimiento *in vitro*

Los explantes fueron establecidos *in vitro* según protocolos descritos por Daquinta *et al.* (2000); Collado *et al.* (2004); Jiménez-Terry *et al.* (2007) y De Fera *et al.* (2008) Todos los explantes donde se detectó visualmente crecimiento de hongos filamentosos se retiraron de las cámaras de crecimiento para su posterior identificación.

Se procesaron un total de 171 explantes, de ellos 40 de caoba, 49 de teca, 27 de majagua, 32 de pino y 23 de cedro. Para el aislamiento e identificación se siguió un protocolo similar al descrito anteriormente. Además, se determinó la frecuencia de aparición de los géneros identificados.

A partir de los resultados se confeccionó un plan de defensa fitosanitario que incluyó la aplicación de fungicidas sistémico y de contacto que permitió el control de los géneros identificados en las plantas donadoras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de la micobiota de plantas donadoras

Se identificaron 11 géneros de hongos filamentosos en plantas donadoras de las cinco especies forestales. Estos hongos han sido descritos como saprofitos o patógenos de plantas. Están clasificados taxonómicamente dentro de la clase *Hyphomycetes* los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium* y *Trichoderma* y en la clase *Coleomycetes* los géneros *Colletotrichum* y *Pestalotia* (Watanabe, 2002; Vilaró *et al.*, 2006). Los géneros *Fusarium* y *Alternaria* fueron los de mayor incidencia en todas las especies forestales. La mayor diversidad de hongos filamentosos como parte de su micobiota se apreció en pino, seguido de caoba y teca (Tabla 1, Figura 1).

Tabla 1. Hongos filamentosos que fueron identificados como parte de la micobiota de plantas donadoras de cinco especies forestales.

Especie	Micobiota
Caoba (<i>Swietenia mahagonii</i> L Jacq.)	<i>Alternaria</i> , <i>Cercospora</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pestalotia</i> , <i>Aspergillus</i> .
Teca (<i>Tectona grandis</i> L.)	<i>Alternaria</i> , <i>Cercospora</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i>
Majagua (<i>Talipariti elatum</i> (Sw))	<i>Alternaria</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Pestalotia</i> , <i>Colletotrichum</i>
Pino (<i>Pinus caribaea</i> var. <i>caribaea</i> (L) Morelet.)	<i>Alternaria</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Nigrospora</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Trichoderma</i>
Cedro (<i>Cedrela odorata</i> L.)	<i>Cladosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Colletotrichum</i>

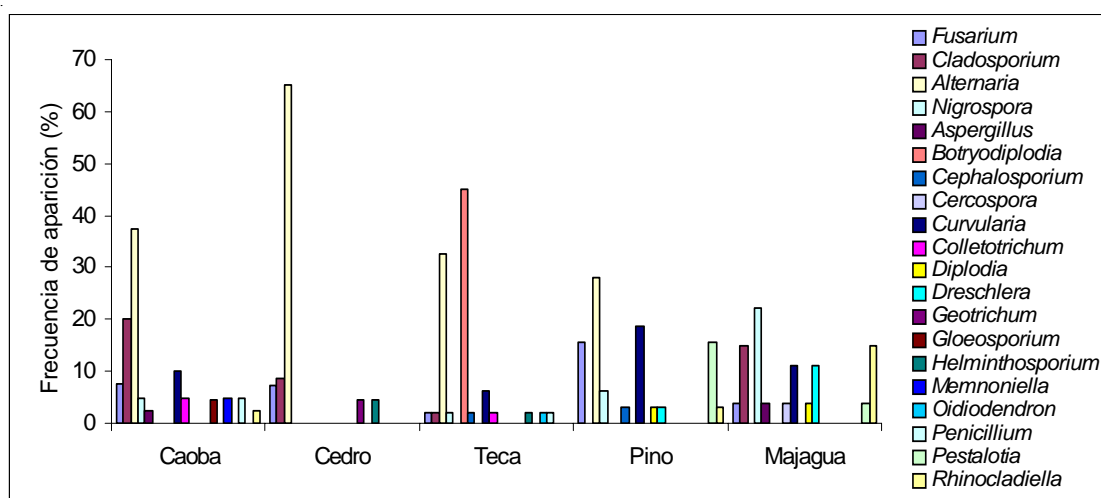


Figura 1. Frecuencia de aparición de hongos filamentosos que aparecieron en fase de establecimiento *in vitro* de cinco especies forestales.

Se conoce que la micobiota de las especies forestales es diversa. Estudios de la micobiota de otros árboles han revelado la existencia de algunos de los géneros fúngicos encontrados en este trabajo. Por ejemplo, Acosta-Suárez *et al.* (2005) identificaron nueve géneros de hongos filamentosos en la micobiota del eucalipto (*Eucalyptus grandis*) ellos fueron: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Gloeosporium*, *Memnoniella*, *Nigrospora*, *Penicillium* y *Rhizopus*. En el cacao (*Theobroma cacao*), Urdaneta y Delgado (2007) encontraron las especies *Curvularia lunata*, *Nigrospora sphaerica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora* spp., *Penicillium* sp y *Gliocladium* sp.

Identificación de hongos filamentosos contaminantes en fase de establecimiento *in vitro*

Se identificaron 20 géneros de hongos filamentosos contaminantes del establecimiento *in vitro* de las cinco especies forestales. Los géneros

Botryodiplodia, *Cephalosporium*, *Diplodia*, *Dreschlera*, *Geotrichum*, *Gloeosporium*, *Helminthosporium*, *Memnoniella*, *Oidiodendron* y *Rhinoclediella* aparecieron solamente durante la fase de establecimiento, mientras que *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium* y *Pestalotia* se detectaron en los explantes de plantas donadoras y durante la fase de establecimiento indicando que el explante inicial fue la posible fuente de contaminación. Están clasificados taxonómicamente dentro de la clase *Hyphomycetes* los géneros *Dreschlera*, *Geotrichum*, *Helminthosporium*, *Memnoniella*, *Oidiodendron* y *Rhinoclediella* y los géneros *Botryodiplodia*, *Diplodia* y *Gloeosporium*, dentro de los *Coleomycetes* (Watanabe, 2002; Vilaró *et al.*, 2006). El género *Fusarium* fue el de mayor incidencia en todas las especies evaluadas, seguido de *Cladosporium*, *Curvularia* y *Nigrospora*. Los géneros más frecuentes fueron *Botryodiplodia* en teca, *Nigrospora* en majagua y *Alternaria* en pino, cedro y caoba (Figuras 1 y 2).

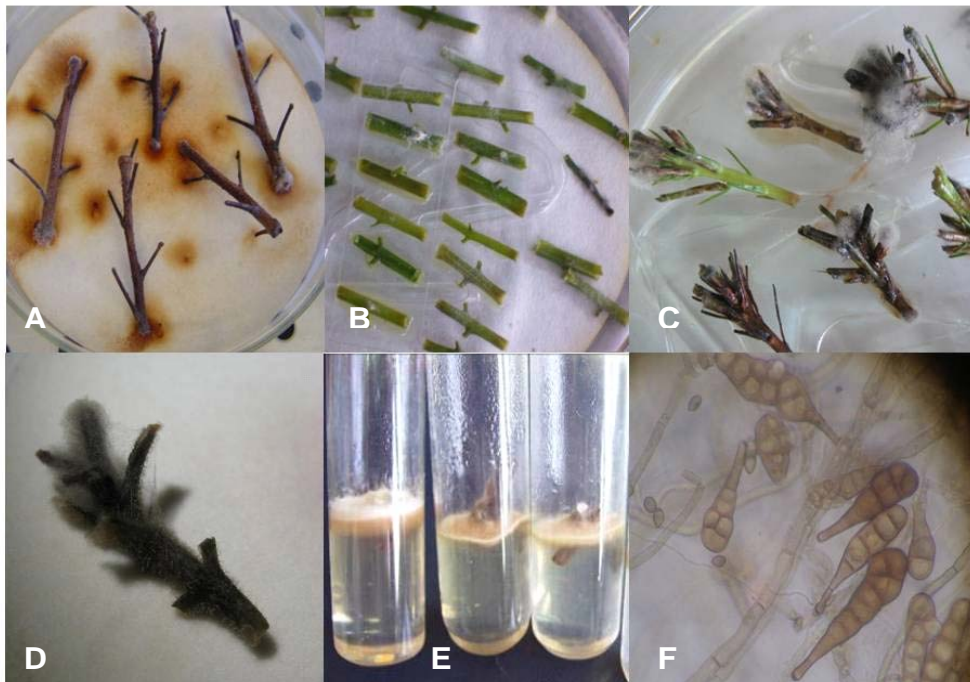


Figura 2. Crecimiento de hongos filamentosos en explantes de plantas donadoras colocados en cámara húmeda. A. Explantes de caoba, B. Explantes de cedro, C. Explantes de pino, D. Explante de teca. E. Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de teca. F. *Alternaria* spp.

El medio de cultivo de tejidos vegetales es una excelente fuente de nutrientes para el crecimiento de microorganismos, cuya presencia trae como resultado, generalmente, un incremento en la mortalidad de los tejidos, reducción del coeficiente de multiplicación y del enraizamiento de la planta *in vitro* (Kane, 2003).

Estos resultados concuerdan con los encontrados en el establecimiento *in vitro* de otros árboles leñosos, ejemplo los géneros: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* y *Helminthosporium* aparecieron como contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayaba (Ramírez *et al.*, 2000; Acosta-Suárez *et al.*, 2002); mientras que *Cladosporium* ha sido identificado en el establecimiento de la conífera *Cryptomeria japonica* (Gómez y Valverde, 2003).

En la formación de callos a partir de explantes foliares de *Coffea* sp. González y Barrios (2003) identificaron a *Fusarium* y *Cladosporium* como los hongos filamentosos de mayor frecuencia de aparición.

Por su parte, Martínez *et al.* (2005) micropropagaron dos especies de eucalipto *Eucalyptus urophylla* y *E. grandis* y obtuvieron un 3% y un 8% de contaminación por hongos contaminantes respectivamente. Acosta-Suárez *et al.* (2005) identificaron los géneros *Alternaria* y *Curvularia* en el establecimiento de *E. grandis*.

A pesar del gran número de especies propagadas por cultivo *in vitro*, la contaminación interna de los explantes, constituye uno de los problemas fundamentales en su multiplicación (Sharry, 2001).

Varios investigadores afirman que desde la fase 0 o preparatoria de la micropropagación hay que tomar las medidas necesarias para prevenir o eliminar la contaminación en el establecimiento *in vitro*. Así, Pacheco (1995) refirió que la revigorización es una vía factible que permite la manipulación del potencial en las especies leñosas en función de preparar las plantas donadoras para el establecimiento *in vitro* y disminuir la contaminación por microorganismos de los explantes iniciales.

La metodología de micropropagación del *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) desarrollada por Agramonte *et al.* (2001) señala la importancia del establecimiento de un banco de plantas donantes bajo condiciones controladas y la aplicación de mezclas de fungicidas comerciales con el objetivo de atenuar el efecto de los microorganismos contaminantes durante la fase de establecimiento.

En este sentido Jiménez-Terry *et al.* (2007) demostraron que la aplicación de varios fungicidas (Benomil, Mancozeb y Silvacur Combi) a los brotes de estaquillas de *Cedrela odorata* L. en casa de cultivo durante la revigorización de este material vegetal, ejerció un papel determinante en la disminución de la contaminación *in vitro* de los explantes.

De acuerdo con resultados se confeccionó un plan de defensa fitosanitario que comprendió la aplicación de fungicidas preventivos y curativos de acción sistémica (Silvacur combi CE30 (22.5+7.5) (Tebuconazol + Triadimenol) a la concentración de 2.0 ml.l⁻¹.) y fungicidas preventivos de contacto (Mancozeb PH80 (Ingrediente activo: etilenbisditiocarbamato de Mn y Zn) a la concentración de 5 g.l⁻¹) a plantas donadoras cuyo espectro de acción cubría los géneros de hongos identificados.

CONCLUSIONES

La micobiota de plantas donadoras de especies forestales fue diversa y estuvo integrada por géneros de hongos filamentosos que generalmente aparecieron durante la fase de establecimiento *in vitro* indicando que el explante inicial es la posible fuente de contaminación. El pino fue la especie con mayor diversidad de hongos filamentosos como parte de su micobiota. El género *Fusarium* apareció como contaminante en todos los forestales durante fase de establecimiento, mientras que los más frecuentes fueron *Botryodiplodia* en teca, *Nigrospora* en majagua y *Alternaria* en pino, cedro y caoba.

REFERENCIAS

- Acosta-Suárez, M, Alvarado-Capó Y, Cruz-Martín M, Leiva-Mora M, Delgado L (2005) Micobiota epífita y contaminantes fungos del establecimiento *in vitro* de *Eucalyptus grandis*. Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 75: 60-63
- Acosta-Suárez, M, Caballero I, Alvarado-Capó Y, Leiva-Mora M (2002) Micobiota epifítica y contaminantes fungos 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, Gutiérrez O (2001) Micropropagación del *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) a partir segmentos nodales. Biotecnología vegetal 1 (2): 109-114
- Collado, R, Barbón-Rodríguez R, Agramonte-Peñalver D, Jiménez-Terry F, Pérez M, Gutiérrez O, Ramírez D (2004) Establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de *Swietenia macrophylla* King Biotecnología vegetal 4 (3): 143-146
- Daquinta, M, Ramos L, Capote I, Lezcano Y, Rodríguez R, Escalona M (2000) Algunos elementos en la micropropagación de la Teca. Biotecnología vegetal 1: 39-44
- Daquinta, M, Ramos L, Capote I, Lezcano Y, Rodríguez R, Escalona M (2001) Micropropagación de la Teca (*Tectona grandis* L). Revista Forestal Centroamericana 25: 25-28
- De Fera, M, Chávez M, Barbón-Rodríguez R, La O M, Pérez M, Jiménez-Terry F, Quiala E, Agramonte D (2008) Establecimiento *in vitro* de brotes apicales de *Pinus caribaea* var. *Caribaea*. Biotecnología vegetal 8 (1): 15-20
- Gómez, A, Valverde L (2003) Establecimiento *in vitro* de *Cryptomeria japonica* (Taxodiaceae) BiolTrop (51): 3-4
- González, ME, Barrios, LM (2003) Estudio sobre contaminantes fungos en la formación de callos a partir de explantes foliares de *Coffea* sp. Biotecnología vegetal 3 (2): 97-100
- Jiménez-Terry, F, Barbón R, La O M, Pérez M, Collado R, Acosta-Suárez M, Alvarado-Capó Y, Agramonte-Peñalver D (2007) Efecto de la revigorización en el establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de *Cedrela odorata* L. Biotecnología vegetal 7(1): 45 – 51
- Kane, M (2003) Bacterial And Fungal Indexing of Tissue Cultures. [En línea] en: <http://www.hos.ufl.edu/mooreweb/TissueCulture/class1/Bacterial%20and%20fungal%indexing%20of%20cultures.doc>, [Consulta 2 abril 2007]
- Martínez, R, Azpíroz H, Rodríguez JL, Cetina VM, Gutierrez MA, Sahagún J (2005) Micropropagación clonal *in vitro* de *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus urophylla*. Ra Ximhai 1 (001): 111-130
- Monteuuis, O, Bon MC, Goh DKS (1998) Teak propagation by *in vitro* culture. Bois et forests des tropiques 256 (2): 1-11
- Nadgaunda, RS, Kendurkar SV, Kulkarni VM, Jana MM, Mascarenehas AF (1997) Advances in micropropagation of teak. IVFRO. Symposium-97, pp 34-37
- Pacheco, J (1995) Revigorización de material adulto de *Pinus nigra* Arn: Criterios morfológicos y moleculares. 185 p Tesis de Doctorado en Biología. Universidad de Oviedo, Oviedo, España
- Ramírez, M, Santos R, Isea F (2000) Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava* L. Fac. Agron. (LUZ) 17: 217-225
- Sharry, S (2001). Problemas asociados al cultivo de tejidos de especies leñosas. [en línea] en: http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/simposios/s_09.htm [Consulta: 3 Noviembre 2007]
- Urdaneta, L, Delgado A (2007) Identificación de la micobiota del filoplano del cacao (*Theobroma cacao* L.) en el municipio Carraciolo Parra Olmedo, estado Mérida, Venezuela. Fac. Agron (LUZ) 24: 30-45
- 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