

Bacterias contaminantes en la fase de establecimiento *in vitro* del guayabo

Nayanci Portal González^{*1}, Israel Carabaloso², Yelenys Alvarado Capó² y Michel Leiva Mora². *Autor para correspondencia.

¹Facultad de Agronomía. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón km 9. Ciego de Ávila. Cuba. e-mail: psa_nayanci@agronomia.unica.cu

²Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

RESUMEN

El guayabo (*Psidium guajava* L.) ha demostrado ser una especie recalcitrante a técnicas de micropropagación vía organogénesis, debido a problemas de contaminación microbiana y ennegrecimiento de los tejidos. El presente trabajo persiguió como objetivos: evaluar la incidencia y el efecto de la contaminación bacteriana en el establecimiento *in vitro* del Guayabo así como aislar e identificar los principales contaminantes. Se trabajó con un total de 34 segmentos nodales de guayabo que no lograron establecerse *in vitro*. De ellos, 28 presentaban contaminación microbiana visible sobre el medio de cultivo, alrededor de la base de los explantes y en ocasiones colonizando los mismos. Se describieron los caracteres culturales de los microorganismos contaminantes en el medio de cultivo para el establecimiento *in vitro*, se aislaron y purificaron. Para la identificación se realizaron pruebas tintoriales, fisiológicas y bioquímicas tradicionales. Los resultados obtenidos indicaron que la contaminación microbiana y la fenolización limitaron el establecimiento *in vitro* del Guayabo. Se determinó que el 76.47% de las muestras analizadas presentaban contaminación bacteriana, el 5.88% por levaduras y el 17.64% no presentaban contaminantes detectables. Los contaminantes más frecuentes pertenecieron a las familias *Pseudomonadaceae* y *Enterobacteriaceae*. Se observó el efecto nocivo de los contaminantes sobre los explantes de guayabo detectándose necrosis total de los mismos.

Palabras clave: contaminación bacteriana, *Enterobacteriaceae*, propagación *in vitro*, *Pseudomonadaceae*, *Psidium guajava*

ABSTRACT

The guava tree (*Psidium guajava* L.) is an specie which has demonstrated to be recalcitrant to micropropagation techniques by organogenesis due to microbial contamination and tissue blackening problems. The current work followed as objective: to evaluate the incidence and effect of the bacterial contamination of the guava *in vitro* establishment as well as to isolate and identify the main contaminants. The work was carried out with 34 nodal segments of guava tree which did not succeed the *in vitro* establishment. Twenty-eight out of them presented microbial contamination visible on the culture medium, around the base of the explants and sometimes colonizing the same ones. The cultural characters of the contaminants microorganisms in the culture medium for the *in vitro* establishment were described, isolated and purified. Traditional staining, physiological and biochemical tests were realized for the identification. The obtained results indicated that the microbial contamination and the fenolization limited the *in vitro* establishment of guava. It was determined that the 76.47% of the samples analyzed presented bacterial contamination, the 5.88% by yeasts and the 17.47% did not presented detectable contaminants. The most frequent contaminants belonged to the *Pseudomonadaceae* and *Enterobacteriaceae* families. The injurious effect of the contaminants on the explants of guava were observed and a total necrosis of the same ones was detected.

Key words: bacterial contamination, *Enterobacteriaceae*, *in vitro* propagation, *Pseudomonadaceae*, *Psidium guajava*

INTRODUCCION

El guayabo (*Psidium guajava* L.) es uno de los 50 árboles frutales más conocidos y cultivados del trópico y el subtropico (Vilchez, 2001). Este frutal se encuentra en más de 15 países en todo el mundo y Cuba se ha mencionado entre los más productores (Tong y Khay, 1990).

La especie representa uno de los frutales de mayores perspectivas de explotación debido a las

características nutricionales y organogénicas de su fruto, la posibilidad de su uso en el campo industrial y la medicina verde, su adaptabilidad a diferentes condiciones edafoclimáticas y la gran aceptación y demanda en los mercados internacionales (Vilchez, 2001). Por este motivo, en los países productores, se han implementado programas de mejoramiento genético y nuevas formas de propagación, como la micropropagación con miras a multiplicar plantas con características agronómicas deseadas. (de Sierralta *et al.*, 1997;

Ramírez y Salazar, 1998a; Ramírez y Salazar, 1999). Sin embargo, el guayabo ha demostrado ser una especie recalcitrante a técnicas de micropropagación vía organogénesis, debido básicamente a problemas de contaminación microbiana y ennegrecimiento de los tejidos en el establecimiento de explantes *in vitro* (de Sierralta *et al.*, 1997; Ramírez y Salazar, 1998a; Ramírez y Salazar, 1998b). Conocer los microorganismos contaminantes y su efecto sobre los explantes pudiera ayudar a encontrar soluciones a este problema. Por esas razones este trabajo persiguió como objetivos: evaluar la incidencia y el efecto de la contaminación bacteriana en el establecimiento *in vitro* de Guayabo así como aislar e identificar los principales contaminantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medio de cultivo

Agar Nutriente (AN) (Biocen)

Material Vegetal

Segmentos nodales de Guayaba Enana Roja cubana var. EEA 18-40 (*Psidium guajava* L.), con una longitud de 1.5 a 2.0 cm, establecidos según la metodología propuesta por Carabaloso (2001).

Se trabajó con un total de 34 explantes de guayabo que no lograron establecerse *in vitro*. De ellos 28 presentaban contaminación bacteriana o levaduriforme visible sobre el medio de cultivo, alrededor de la base de los explantes y en ocasiones colonizando los mismos.

Se evaluó la incidencia de los contaminantes bacterianos por observación visual y se determinó el grupo microbiano presente en preparaciones directas con agua destilada estéril al microscopio óptico (Olympus). Las mismas fueron observadas con un aumento de 400x.

Aislamiento

Se describieron los caracteres culturales de los microorganismos contaminantes en el medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* y se agruparon según éstos. Se aislaron directamente con asa de platino a placas de Petri con medio de cultivo AN, se incubaron a 30°C durante 24- 48h. Se obtuvieron cultivos puros por agotamiento de las colonias aisladas y posteriormente se conservaron a 4 °C en tubos de ensayo con el mismo medio de cultivo.

Identificación

Se realizó atendiendo a los criterios culturales, morfológicos, tintoriales y fisiológico- bioquímicos

para la identificación de bacterias acorde a los esquemas propuestos por el Manual de Bergey (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) (Krieg y Holt, 1986). Las pruebas que se realizaron fueron: tinción de gram, Hugh y Leifson, Oxidasa, Catalasa, Motilidad, producción de ácido de la glucosa y producción de gas de la glucosa.

Finalmente se determinó la frecuencia de aparición de cada una de las familias identificadas en las muestras analizadas y se describió el efecto de los contaminantes sobre los explantes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De todas las muestras analizadas se determinó que el 76.47% mostraban contaminación bacteriana, el 5.88% por levaduras y el 17.64% no presentaban contaminantes detectables, y sí un oscurecimiento o ennegrecimiento del medio de cultivo (fenolización), cuestión ésta que afectó a todas las muestras. Estos resultados revelaron que tanto la contaminación microbiana como la fenolización pueden constituir causas que limitan el establecimiento *in vitro* del Guayabo. Estos resultados coincidieron con los que refirieron Vitoria (1993) y Ramírez y Salazar (1997) quienes plantearon que el establecimiento *in vitro* del guayabo se ha caracterizado por un bajo porcentaje de explantes asépticos y un alto porcentaje de explantes oscurecidos.

Las bacterias contaminantes crecieron en el medio de cultivo para el establecimiento del guayabo de diferentes colores (gris, blanquecinas y amarillo pálido), cubrían la totalidad del medio de cultivo, en ocasiones colonizaban los explantes y en otras solo bordeaban la base de los mismos. Presentaban una consistencia acuosa o cremosa. Con respecto a las propiedades ópticas se observó crecimiento brillante, además, en algunos casos se evidenció la producción de gas. En todas las muestras se observó crecimiento bacteriano en el interior medio de cultivo y alrededor de los explantes en forma de lóbulos y halos.

Para las levaduras el crecimiento fue abundante en la superficie del medio de cultivo, de color blanco, opaco y consistencia cremosa. En el interior del medio de cultivo también se observó abundante crecimiento en forma de lóbulos. Las especies de levaduras presentes no fueron identificadas.

Del total de muestras contaminadas por bacterias (26), 10 se identificaron como pertenecientes a las familia *Enterobacteriaceae*, 10 a *Pseudomonadaceae* y seis no pudieron ser ubicados a nivel de familia (bacilos gram positivos en parejas y solos). Los resultados de las pruebas realizadas se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de las pruebas realizadas a contaminantes bacterianos del establecimiento *in vitro* de Guayabo (*Psidium guajava* L.) para su identificación hasta familia.

Características	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
No de muestras	10	10
Morfología	Bacilos cortos	Bacilos cortos
Tinción de gram	gram -	gram -
Hugh y Leifson (O/F):		
Oxidativo	-	+
Fermentativo	+	-
Alcalino	-	-
Oxidasa	-	+
Catalasas	+	+
Molilidad	+	+
Producción de ácido de la glucosa	+	+
Producción de Gas de la Glucosa	-	-

Se comprobó que los contaminantes más frecuentes pertenecieron a las familias *Pseudomonadaceae* y *Enterobacteriaceae* (Tabla 2). Esto coincidió con el criterio de que en las primeras fases de la micropropagación las bacterias que se detectan son gram negativas, pertenecientes a estas familias y se explica porque son las más abundantes en la superficie aérea de las plantas (Leifert *et al.*, 1994), también en otros ambientes, así como se han aislado como

saprófitos del agua, suelo, etc. Tampoco se puede descartar la posibilidad que se encuentren de los espacios intercelulares y así escapan de la desinfección y manifiestan crecimiento en el medio de cultivo en condiciones de estrés para el material vegetal (Leifert *et al.*, 1994). Estos resultados implicaron al explante inicial (segmentos nodales de plantas adultas cultivadas en campo) como la principal fuente de contaminación microbiana en el establecimiento del guayabo.

Tabla 2. Frecuencia de aparición de bacterias contaminantes del establecimiento *in vitro* del guayabo.

FAMILIAS	NO DE MUESTRAS	FRECUENCIA DE APARICION (%)
<i>Enterobacteriaceae</i>	10	38.46
<i>Pseudomonadaceae</i>	10	38.46
Bacilos gram positivos en parejas y solos	6	23.07
Total	26	100

Ramírez y Salazar (1997) evaluaron el Hipoclorito de Sodio y el Hipoclorito de Calcio en el establecimiento aséptico de segmentos nodales de guayabo cultivados *in vitro*. Obtuvieron en todos los tratamientos empleados alta contaminación bacteriana. La misma correspondió a *Erwinia herbicola*, una bacteria gram positiva no identificada y una levadura.

La contaminación microbiana y la oxidación del tejido donador han sido los problemas más severos que se han enfrentado en la micropropagación de plantas leñosas (Castro *et al.*, 1993) y el guayabo no escapa a esta. Vilorio (1993) evaluó varios métodos utilizados para el establecimiento aséptico de plantas leñosas *in vitro* sin ningún éxito en el guayabo y concluyó que la diversidad de la microbiota presente en el material vegetal seleccionado, así como el grado de contaminación que caracteriza a las plantas cultivadas

en el campo, dificultó la esterilización exitosa de los explantes y su establecimiento *in vitro*. La presencia de microorganismos contaminantes y el oscurecimiento son los principales problemas durante la propagación *in vitro* de segmentos nodales de guayabo, sobre todo si estos provienen de plantas cultivadas en campo (Parra *et al.*, 1991; Vilorio, 1993).

Además, se evidenció visualmente el efecto nocivo de los contaminantes sobre los explantes de guayabo. Se detectó necrosis total de los mismos y esto coincidió con lo planteado por Boxus y Terzi (1987) y Alvarado *et al.* (1999) quienes valoraron el efecto de los microorganismos contaminantes sobre las plantas *in vitro* de considerables.

Poseer información sobre los principales microorganismos contaminantes del guayabo

constituye una valiosa herramienta de trabajo ya que posibilitará que se incrementen los porcentajes de plantas establecidas a partir de diseñar medidas que mejoren la calidad fitosanitaria del material vegetal inicial.

REFERENCIAS

- Alvarado, Y, García L, Martínez Y, Ramírez D, Pichardo T, Portal N (1999) Estudio de la influencia de la contaminación bacteriana en la micropropagación de caña de azúcar var C 87-51. En: Libro de reportes cortos. Quinto Coloquio Internacional de Sanidad Vegetal, pp. 241-243. IBP, junio 16-19. Santa Clara
- Boxus, PH y Terzi JM (1987) Big losses due to bacterial contamination can be avoided in mass propagation scheme. *Acta Horticulturae* 22: 91- 93
- Caraballosa, IG (2001) Propagación *in vitro* por organogénesis de la guayaba (*Psidium guajava* L.) var. Enana Roja cubana EEA 18- 40. Tesis presentada en opción al título académico de Máster en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV
- Castro, D, Jiménez CM, Rios D, Restrepo A y Giraldo C (1993) Utilización de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* para la propagación y conservación de germoplasma de cuatro especies vegetales en vías de extinción en el oriente antioqueño: Comino (*Aniba perutilis*), Abarco (*Cariniana pyriforme*) y Guayacán (*Tabebuia serratifoliar*). Documento divulgativo #8, CONARE 44p.
- Krieg, N R y Holt J G Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Edition. Vol. II. Williams and Wilkins. Baltimore
- Leifert C, Morris CE y Waites WM (1994) Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plant: reason for contamination *in vitro*. *Critical Review in Plant Sciences* 13: 139 -181
- León de Sierralta, S, Arenas L y Voloria Z (1997) Efecto de la exposición solar de plantas donantes en la iniciación del cultivo *in vitro* del guayabo (*Psidium guajava* L) *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 14: 47- 53
- Ramírez, M y Salazar E (1997) Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 14: 497-506
- Ramírez, M y Salazar E (1998a) Método de desinfección y efecto de citoquininas en el cultivo *in vitro* de segmentos de hojas de *Psidium guajava* L. *Rev. Fac. Agron (LUZ)* 15: 162- 173
- Ramírez, M y Salazar E (1998b) Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros del guayabo (*Psidium guajava* L) *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 15: 211- 225
- Ramírez, M, León de Sierralta S y Urdaneta A (1999) Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichstalianum* Berg (Nierdz), *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 16: 243- 255
- Tong, K y Khay K (1990) Guava in Malaysia. Production, pest and disease. First edition. Tropical Press SDN. BHD. Malaysia
- Vilchez, J A (2001) Embriogénesis somática y regeneración de plantas en el guayabo (*Psidium guajava* L) cv. Enana Roja Cubana EEA 18-40. Tesis presentada en opción al título académico de Máster en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV
- Vitoria, Z (1993) Cultivo *in vitro* de nudos de guayabo (*Psidium guajava* L) fase I. Trabajo de ascenso. La Universidad de Zulia. Facultad de Agronomía, Maracaibo, Venezuela. 35p.