

## Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava* L.<sup>1</sup>

Contaminating fungi in the *in vitro* establishment of nodal segments of *Psidium guajava* L.

M. del C. Ramírez Villalobos<sup>2</sup>, R. A. Santos P.<sup>3</sup> y F. R. Isea L.<sup>3</sup>

### Resumen

En el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales del guayabo (*Psidium guajava* L.) la presencia de microorganismos contaminantes, tal como hongos y bacterias, causa su muerte, siendo necesario su identificación para estudiar el control usando procedimientos eficientes de desinfección superficial en su eliminación. De brotes terminales de plantas adultas de cuatro años de edad se tomaron 80 segmentos nodales desinfectándolos por 30 min en 8 g L<sup>-1</sup> de benomil + 300 mg L<sup>-1</sup> de rifampicina, por 1 min en alcohol etílico al 70 % y 15 min en hipoclorito de sodio 2,625 %, sembrándolos en el medio de Murashige y Skoog. Después de 5 días se detectó la presencia de hongos contaminando los segmentos nodales y causando posteriormente su muerte. La identificación de los hongos detectados mostró que ellos pertenecen a los géneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Helminthosporium* y *Rhizopus*. Asimismo, se observó la presencia de bacterias después de 10 días, aparentemente inocuas, las cuales no se identificaron. Estos hongos contaminantes posiblemente están localizados dentro de las irregularidades de la superficie de los segmentos nodales del guayabo, lo que quizás impide la acción de los desinfectantes superficiales usados.

**Palabras clave:** Identificación, microorganismos, *in vitro*, *Psidium guajava*.

### Abstract

In the *in vitro* establishment of nodal segments of guava (*Psidium guajava* L.) the presence of contaminating microorganisms, like fungi and bacteria, causes its death being necessary its identification to study the control by using efficient procedures of superficial disinfection in its elimination. From apical shoots of four years old

---

Recibido el 9-9-1998 • Aceptado el 15-6-2000

1 Trabajo cofinanciado por CONDES-LUZ (N° 01736-98), CONICIT (S1-2378 y 2808), Centro Frutícola del Zulia-CORPOZULIA

2 La Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía, Dpto. Botánica. Apto. 15205. Maracaibo, ZU 4005. Venezuela. E-mail: mcramire@starmedia.com Fax: 58 61 596183.

3 La Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas, Unidad Técnica Fitosanitaria. Apto. 15205. Maracaibo, ZU 4005.

plants were taken 80 segments desinfecting them by 30 min in 8 g L<sup>-1</sup> of benomyl + 300 mg L<sup>-1</sup> of rifampycine, by 1 min in ethyl alcohol at 70 %, and by 15 min in sodium hypochloride at 2,625 %, sowing them in the Murashige and Skoog medium. After five days it was detected the presence of fungi contaminating the nodal segments that caused lately its death. The identification of the detected fungi showed that belong to the genera: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Helminthosporium* y *Rhizopus*. Also, it was observed the presence of bacteria after ten days, apparently harmless, which were no identified. These contaminating fungi might possible be localized within irregularities of the guava nodal segments surface which might prevent the action of the superficial disinfectants used.

**Key words:** Identification, microorganisms, *in vitro*, *Psidium guajava*.

## Introducción

El guayabo (*Psidium guajava* L.) es una especie frutícola nativa de América Tropical y una de las especies cultivadas más importantes de la familia Mirtaceae (6). En Venezuela, el estado Zulia aporta el 90 % de la producción nacional de guayaba, en una superficie sembrada de 5.000 hectáreas (5) cuyos rendimientos oscilan entre 25.000 y 30.000 kg/ha (21). Los huertos comerciales se han establecido a través de plantas obtenidas por medio de semilla, lo que ha generado variación en las características de los frutos (14, 21), debido al tipo de reproducción y al porcentaje de polinización cruzada que registra la especie (20).

Se han evaluado varias técnicas de propagación asexual con algunos resultados satisfactorios (3, 4, 18, 22), sin embargo, el cultivo *in vitro* se presenta como una alternativa en la propagación asexual y recuperación de germoplasma de plantas de guayabo con características agronómicas deseadas, así como también, que en un futuro no lejano forme parte integral de los métodos convencionales de

propagación asexual (16). Al respecto, varios trabajos demuestran la posibilidad de propagar *in vitro* plantas de guayabo a partir de segmentos nodales (1, 2, 11, 13, 17).

En el establecimiento *in vitro* del guayabo, la presencia de microorganismos contaminantes, hongos y bacterias, es uno de los principales problemas que limitan la posibilidad de obtener explantes asépticos (23). Los explantes pueden llevar contaminantes en su superficie o en su interior, o en ambas partes. Aquellos que lleva el explante sobre su superficie se pueden eliminar mediante la desinfección superficial, pero los que se encuentran dentro del tejido son difíciles de eliminar, lo que impide cumplir con uno de los requisitos básicos para el éxito de la técnica de cultivo *in vitro* de cualquier especie, el cual es el mantener los cultivos libres de microorganismos contaminantes (19). El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar a los hongos contaminantes detectados durante el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales del guayabo.

## Materiales y métodos

**Localización de la plantación.** La plantación de guayabo utilizada para la obtención de material vegetal está situada en el municipio Mara, estado Zulia, dentro del área denominada la Altiplanicie de Maracaibo. La zona presenta un régimen de distribución de lluvias (500 mm) irregular, observándose dos picos de máxima precipitación en los meses de mayo y octubre, con dos mínimos en diciembre-enero y julio-agosto (distribución bimodal). En cuanto a la temperatura promedio y evapotranspiración potencial se registran valores de 27°C y 2.500 mm anuales, respectivamente. Los suelos, en general, presentan características de baja fertilidad natural y pH alrededor de 5,5; con una capa superficial de arenosa a franco arenosa de 0-90 cm de profundidad que descansa generalmente sobre un horizonte argílico de textura más fina (FAa). Estos suelos se clasifican como Typic Haplargids (9).

**Recolección de muestras.** El material vegetal fue obtenido de plantas de guayabo (*Psidium guajava* L.) de cuatro años de edad, cultivadas en el Campo Experimental del Centro Frutícola del estado Zulia (Cenfruzu)-Corpozulia. En la planta madre, los brotes fueron cubiertos por 15 días con bolsas de papel y plásticas transparentes, con algunas perforaciones, y recibieron dos aplicaciones de 4 g L<sup>-1</sup> de ridomil en un intervalo de 4 días antes de la siembra. En el campo se recolectaron brotes terminales de 15 cm de longitud con más de 5 nudos, los cuales permanecieron en condiciones de cámara húmeda hasta su traslado

al Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Investigaciones Agronómicas de La Universidad del Zulia. Días antes de la recolección del material hubo presencia de lluvias.

**Obtención y siembra de segmentos nodales.** En el laboratorio se procedió a eliminarles las hojas a los brotes, dejando parte del pecíolo para evitar dañar las yemas. Los explantes consistieron de segmentos nodales con dos yemas axilares, correspondientes al tercer y cuarto nudo del brote desde la parte apical (23).

La desinfección superficial consistió en sumergir los explantes por 30 min en 8 g L<sup>-1</sup> de benomil + 300 mg L<sup>-1</sup> de rifampicina, 1 min en alcohol etílico al 70 % y 15 min en cloro comercial al 50 % (hipoclorito de sodio 5,25% i. a.). Inmediatamente, se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada antes de la siembra de un explante por cada tubo de ensayo (150 mm x 25 mm) con 10 mL de medio nutritivo de Murashige y Skoog (15), complementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de las siguientes vitaminas: tiamina, piridoxina y ácido nicotínico, 100 mg L<sup>-1</sup> de mioinositol, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 7 g L<sup>-1</sup> de agar. El pH del medio se ajustó a 5,8 ± 0,02 antes de esterilizarlo a 121 °C y 1,1 kg cm<sup>-2</sup> por 20 min. Las condiciones de incubación de los explantes fueron bajo oscuridad a una temperatura de 25 ± 1 °C.

**Aislamiento e identificación de hongos contaminantes.** A los 5 días después de la siembra de los segmentos nodales *in vitro* se detectó el crecimiento de hongos en los explantes.

El aislamiento e identificación de los hongos contaminantes detectados se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Unidad Técnica Fitosanitaria del Instituto de Investigaciones Agronómicas de la Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia. Luego de aislados en el medio de cultivo de papa-dextrosa-agar más ácido láctico al 25% y obtenidos los cultivos puros correspondientes se procedió a preparar montajes de cada uno de ellos en láminas portaobjetos tiñéndolos con

azul de algodón. Las características morfológicas de las estructuras reproductivas de cada hongo se realizó con un microscopio óptico marca Olympus-CH y la identificación de los géneros se hizo mediante el uso de claves y consulta de literatura micológica especializada (7).

La evaluación del porcentaje de explantes para cada hongo se efectuó mediante una relación porcentual partiendo de la muestra de 80 explantes, los cuales todos estaban contaminados por hongos.

## Resultados y discusión

En el cuadro 1 se aprecia que los hongos contaminantes correspondieron a los géneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Helminthosporium* y *Rhizopus* (figura 1). La descripción de los hongos se señala en el cuadro 2.

Los hongos *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp. y *Curvularia* sp. en conjunto generaron un 87,50 % de explantes contaminados y los hongos *Drechslera* sp., *Fusarium* sp., *Helminthosporium* sp. y *Rhizopus* sp. un 12,50 %.

*Cladosporium* sp. presentó el mayor porcentaje 36,25 %, seguido por *Alternaria* sp. con un 23,75%, considerándose los hongos más predominantes.

Estos resultados son análogos a los encontrados por Yanez *et al.* (24), quienes detectaron los hongos *Alternaria* sp. y *Rhizopus* sp. durante el cultivo *in vitro* de apéndices caulinares de guayabo. Trabajos realizados en cultivo *in vitro* de yemas de árboles adultos de

naranja (*Citrus sinensis*) registraron los hongos *Aspergillus* sp. y *Cladosporium* sp. como los predominantes (10). Borges *et al.* (8) detectaron los hongos *Fusarium* sp. *Botryodiplodia* sp. *Alternaria* sp. y *Aspergillus* sp. durante el cultivo de ápices de mango. Sin embargo, contrastan con los observados por Viloria (23), quien indicó al hongo *Fusarium* sp. como el microorganismo que predominó en los segmentos nodales de guayabo cultivados *in vitro* y en menor cuantía a otros tales como: *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. *Curvularia* sp., *Syncephalastrum* sp. Estas diferencias pueden estar afectadas por el momento o época de recolección del material vegetal y a la técnica de desinfección superficial utilizada.

Lo anterior se fundamenta en el hecho que durante la época lluviosa se ha registrado en otros cultivos que los porcentajes de contaminación son altos (12), lo cual coincide con lo indicado por Amin y Jaiswal (1), quienes señalaron que la época del año tiene influencia sobre la

**Cuadro 1. Porcentaje de explantes contaminados para los hongos detectados e identificados durante el cultivo *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.).**

Hongo	Número de explantes contaminados	Porcentaje de explantes contaminados
<i>Cladosporium</i> sp.	29	36,25
<i>Alternaria</i> sp.	19	23,75
<i>Aspergillus</i> sp.	14	17,50
<i>Curvularia</i> sp.	8	10,00
<i>Drechslera</i> sp.	3	3,75
<i>Fusarium</i> sp.	3	3,75
<i>Helminthosporium</i> sp.	2	2,50
<i>Rhizopus</i> sp.	2	2,50

contaminación de los explantes, ya que durante los meses de abril-mayo encontraron menor contaminación.

En relación a la desinfección superficial utilizada también podrían haber diferencias con respecto a los contaminantes presentes, ya que no todos los desinfectantes superficiales permiten remover en igual forma las bacterias y hongos exógenos en el explante. Los contaminantes pueden estar en la superficie o en el interior, o en ambas partes. Los internos son más difíciles de eliminar que los externos, requiriéndose la inclusión de fungistáticos o antibióticos en el medio y

de otras técnicas que permitan disminuir su presencia (19). Al respecto, Borges *et al.* (8) encontraron que en la época seca lograron retardar la presencia de los contaminantes durante el establecimiento *in vitro* de ápices de mango del cv. Haden, al agregar fungicidas y antibióticos en el medio de cultivo.

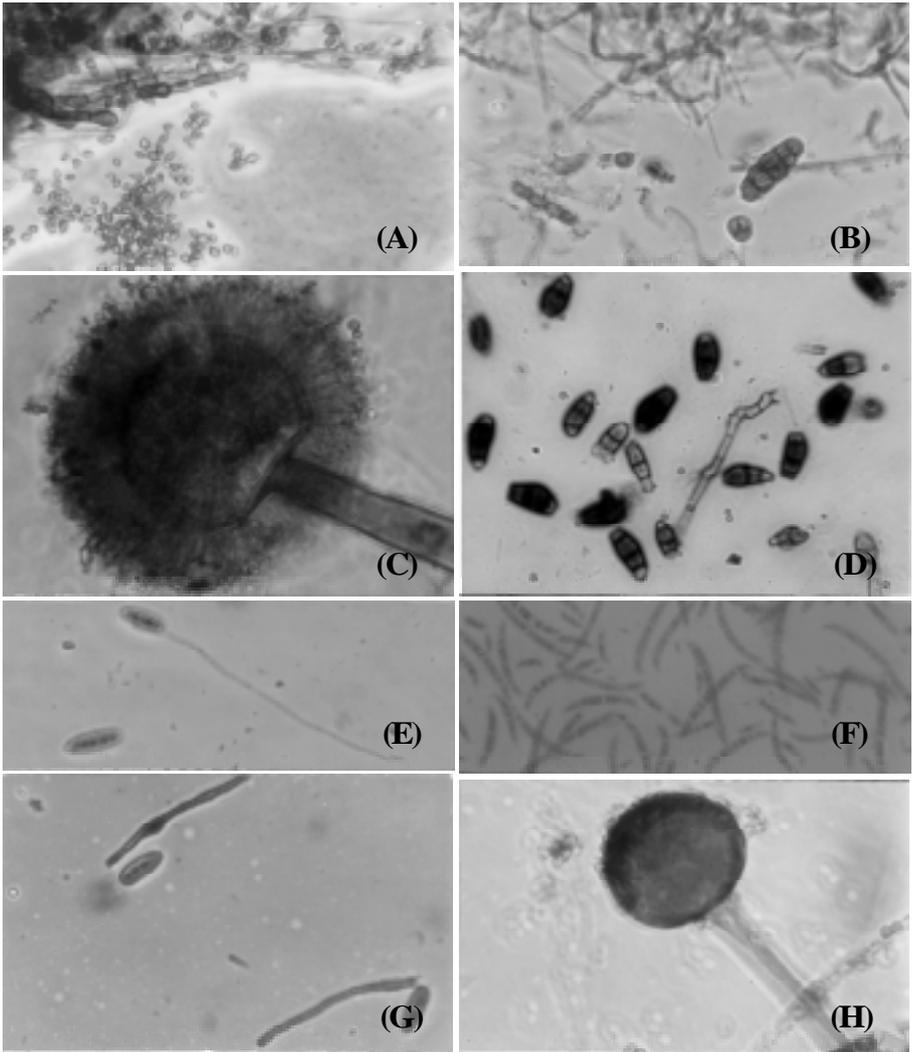
Las irregularidades presentes en la superficie del explante pueden servir de depósito de los contaminantes como el polvo, bacterias, esporas de hongos y otros, los cuales afectarían el éxito de la desinfección superficial si los productos no logran llegar y desinfectar esas áreas microscópicas (19).

## Conclusiones y recomendaciones

Se detectaron e identificaron los hongos: *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Fusarium* sp., *Helminthosporium* sp. y *Rhizopus* sp. *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp. y *Curvularia* sp. fueron los

hongos predominantes.

Detectar e identificar los microorganismos contaminantes en diferentes épocas del año (seca y lluviosa), así como también, utilizar diferentes técnicas de desinfección superficial.



**Figura 1. Hongos detectados durante el cultivo *in vitro* de segmentos nodales del guayabo. A) *Cladosporium* sp. B) *Alternaria* sp. C) *Aspergillus* sp. D) *Curvularia* sp. E) *Drechslera* sp. F) *Fusarium* sp. G) *Helminthosporium* sp. H) *Rhizopus* sp.**

## Cuadro 2. Descripción de los hongos detectados e identificados durante el cultivo *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.).

Hongo	Descripción del hongo
<i>Cladosporium</i> sp.	Conidioforos largos, oscuros, erectos, ramificados en el ápice, simples o agrupados; conidios (blastoporas) oscuras, de 1-2 células, variables en forma y tamaño, ovoides a cilíndricas e irregulares, algunas típicamente en forma de limón.
<i>Alternaria</i> sp.	Conidioforos oscuros, generalmente simples, cortos o elongados, típicamente con conidios (poroesporas) oscuras, típicamente con septos longitudinales o transversales; de forma variada, obclavados a elípticos, u ovoides, frecuentemente formados acropetalmente en cadenas largas; en algunas instancias formados individualmente y presentando un apéndice apical simple o ramificado.
<i>Aspergillus</i> sp.	Conidioforos erectos, simples, terminando en un ensanchamiento, globoso o clavado, presentando fialides en el ápice o en toda la superficie; conidios (fialoesporas) unicelulares, globosa, a menudo de variados colores en masa, en cadenas secas basipetalas.
<i>Curvularia</i> sp.	Conidioforos marrones, simples, con esporas apicales o en nuevos puntos de crecimiento simpodiales; conidios (poroesporas) oscuras, células terminales claras, de 3-5 células, mas o menos fusiformes, típicamente curvadas, con una de las células centrales más alargada.
<i>Drechsleria</i> sp.	Conidioforos marrones, generalmente simples, produciendo conidios individuales en el ápice a través de pequeños poros, continuando con un crecimiento simpodial desde un punto debajo del ápice y formando un conidio en el nuevo ápice; conidios (poroesporas) oscuras, de varias células (fragmoesporas), cilíndricas, germinando de cualquier célula o de todas las células.
<i>Fusarium</i> sp.	Micelio extensivo y algodonoso en medios de cultivo, a menudo con una coloración rosada, púrpura o amarilla, en el medio o en el micelio; conidioforos variables, simples y suaves, o rígidos, cortos, ramificados irregularmente o presentando un conjunto de fialides simples o agrupados en un esporodio; conidios (fialoesporas) hialinos, variables, principalmente de dos tipos, a menudo formadas en pequeñas cabezuelas húmedas. Macroconidios con varias células ligeramente curvadas o dobladas en los extremos, típicamente en forma de canoa; microconidios unicelulares ovoides u oblongos, individuales o en cadenas; algunos conidios intermedios, de 2-3 células, oblongos o ligeramente curvados.
<i>Helminthosporium</i> sp.	Micelio oscuro, estroma a menudo presente; conidioforos simples o en grupos, altos, erectos, marrones; conidios (poroesporas) creciendo lateralmente a través de poros debajo de los septos mientras que el ápice continúa desarrollándose, a veces en conjuntos o individuales, subhialinos a marrón, obclavado, fragmoesporas, seudoseptadas, con una cicatriz basal prominente.
<i>Rhizopus</i> sp.	Micelio cenocítico aéreo originando ramas (estolones) en los puntos de contacto con el sustrato, en donde a la vez se forman pequeñas ramificaciones llamadas rizoides. Los esporangióforos se originan de los estolones en el lado opuesto al punto de origen de los rizoides, generalmente son simples y fasciculados. Esporangios terminales, globosos, multiesporulados con columela prominente hemisférica. Esporangiosporas globosas u ovales, lisas o con ornamentaciones (estricciones longitudinales).

## Agradecimiento

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) por la beca otorgada para cursar estudios de Maestría en Fruticultura en la Facultad de Agronomía de La

Universidad del Zulia.

Al Ing. Agr. Aly Urdaneta por su colaboración durante el desarrollo del trabajo.

## Literatura citada

1. Amin, M. N. y V. S. Jaiswal. 1987. Rapid clonal propagation of guava through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of mature trees. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 9: 235-243.
2. Amin, M. N. y V. S. Jaiswal. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of guava cultivar. *Scientia Hort.* 36: 89-95.
3. Antoni, M. G. y F. Leal. 1977. Propagación de estacas de guayaba (*Psidium guajava* L.). Memorias: IX Jornadas Agronómicas. Sociedad Venezolana de Ingenieros Agrónomos. Maracay, Venezuela. p. 31.
4. Araujo, F., J. Martínez, J. Omaña y H. Pirela. 1991. Injertación de cuña terminal en guayabo (*Psidium guajava* L.) bajo condiciones de campo y vivero en el municipio Mara. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 8 (4): 239 (Resumen).
5. Araujo, F., S. Quintero, J. Salas y J. Villalobos. 1992. Crecimiento y acumulación de nutrientes del fruto del guayabo en el municipio Mara. Estimación de las necesidades de fertilización por restitución. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 9 (2): 142 (Resumen).
6. Avilán, L., F. Leal y D. Bautista. 1992. Manual de Fruticultura. Principios y manejo de la producción. Segunda Edición. Tomo II. Editorial América C. A. Caracas, Venezuela. p. 777-1472.
7. Barnett, H. L. y B. B. Hunter. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Third Edition. Editorial Burgess Publishing Company. Minneapolis, USA. 241 p.
8. Borges, L., H. Morales, Z. Valero, S. León de S., R. Santos, C. Castro de R. y A. Del Villar. 1997. Comparación de métodos de esterilización superficial de yemas apicales de mango (*Mangifera indica* L.) variedad Haden. Resúmenes: VII Jornadas Científico Técnicas. Facultad de Agronomía. La Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. p. 102.
9. Comisión del Plan Nacional de Aprovechamiento de los Recursos Hidráulicos (COPLANARH). 1975. Atlas Inventario Nacional de Tierras. Región Lago de Maracaibo. Atlas. Tecnicolor S.A. Caracas, Venezuela.
10. Giladi, I., A. Altman y R. Goren. 1979. A method for aseptic culture of bud explants from citrus trees. *Scientia Hort.* 10: 357-362.
11. Jaiswal, V. S. y M. N. Amin. 1987. *In vitro* propagation of guava from shoot cultures of mature trees. *J. Plant Physiol.* 130: 7-12.
12. León de S., S. 1988. Una metodología para el cultivo *in vitro* de explantas de yuca. Trabajo de Ascenso. Maracaibo, Venezuela. La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. 81 p.
13. Loh, C. S. y A. N. Rao. 1989. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation *in vitro*. *Scientia Hort.* 39 (1): 31-39.
14. Marín, M., A. De Vargas, L. Sosa y C. Castro de R. 1993. Variación de las características químicas de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) en una plantación comercial del municipio Mara, estado Zulia. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 10 (3): 297-310.

15. Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Phys. Plant.* 15: 473-493.
16. Pardos, J. A. y M. Toribio. 1984. El cultivo *in vitro* aplicado a la mejora forestal. Comunicaciones I.N.I.A. Serie Recursos Naturales. N° 28. 55 p.
17. Pirela, M. y N. Mogollón. 1996. *In vitro* clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Mara-7 from stem shoots. Memorias XIV Congresso Brasileiro de Fruticultura. 42<sup>a</sup> Reunión Interamericana de Horticultura Tropical. Simpósio Internacional de Mirtáceas. Curitiba, Brasil. p. 539.
18. Ramírez, M., A. Urdaneta, C. Rivas, A. Parra y R. Villalobos. 1996. Genotypes and stocks of *Psidium guajava* and *P. friedrichsthalianum* behavior and the interaction in the top budding scioning method in guava. Memorias XIV Congresso Brasileiro de Fruticultura. 42<sup>a</sup> Reunión Interamericana de Horticultura Tropical. Simpósio Internacional de Mirtáceas. Curitiba, Brasil. p. 547.
19. Roca, W. M. y L. Mroginski. A. 1991. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. p. 2-17. En: Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. W. M. Roca y L. A. Mroginski (eds.). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. Publicación N° 151.
20. Soubihs, J. y J. Gurdel. 1962. Taxa de panmixia na goiabeira. *Bragantia* (Brazil) 21: 15-20.
21. Tong, F., D. Medina y D. Esparza. 1991. Variabilidad en poblaciones de guayaba (*Psidium guajava* L.) del municipio Mara del estado Zulia. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 8 (1): 15-27.
22. Vilchez, J., N. Albany, J. Badae, Z. Viloría y C. Castro de R. 1997. Propagación asexual de *Psidium guajava* L. mediante la técnica del acodo aéreo. Memorias VI Congreso Nacional de Fruticultura. Barquisimeto, Venezuela. p. 3.
23. Viloría V., Z. J. 1993. Cultivo *in vitro* de nudos de guayabo (*Psidium guajava* L.). Fase I. Trabajo de Ascenso. Maracaibo, Venezuela. Facultad de Agronomía. La Universidad del Zulia. 35 p.
24. Yanez, A., Z. Viloría, S. León de S. y R. Santos. 1991. Control de oxidación y microorganismos contaminantes en la propagación *in vitro* de apéndices caulinares de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 8 (4): 240 (Resumen).