

Presencia de hongos contaminantes durante el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de mango (*Mangifera indica* L.)

Presence of contaminating fungi in breeding *in vitro* mango nodal segments (*Mangifera indica* L.)

F. Isea¹, M. Escalante², J. Urdaneta¹ y M. Ramírez Villalobos³

¹Universidad Nacional Experimental Sur del Lago (UNESUR). Santa Bárbara de Zulia. Hacienda La Glorietta, vía aeropuerto. Estado Zulia, Venezuela.

²Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Zulia) Estación Local El Guayabo.

³Departamento de Botánica. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Apto. 15205. Maracaibo, ZU4005. Venezuela.

Resumen

Durante el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de mango se presentan comúnmente microorganismos contaminantes, principalmente hongos que ocasionan la muerte del tejido usado como explante. El aislamiento y la identificación de estos microorganismos son necesarios para lograr su control eficiente mediante ciertos procedimientos de desinfección superficial. Se recolectaron brotes terminales de plantas adultas de 4 años de edad, de los cuales se seleccionaron 80 segmentos nodales, que se desinfectaron durante 30 min en 8 g L⁻¹ de Benomil® + 300 mg L⁻¹ de Rifampicina®, 1 min en alcohol etílico al 70% y 15 min en hipoclorito de sodio al 2,625%; y sembrados en tubos de ensayo contentivos del medio de cultivo Murashige y Skoog. Posteriormente, a los 8 días de su incubación se detectó la presencia de hongos contaminando los segmentos nodales y causando la muerte de los mismos. Se procedió al aislamiento e identificación de los hongos y el resultado mostró la presencia de *Alternaria* sp. y *Curvularia* sp. en un 47,06 y 52,94%; respectivamente. La aparición de estos hongos en los explantes desinfectados posiblemente se asocia a que los mismos se ubican dentro de las irregularidades de los tejidos usados para propagación, donde no llega el producto desinfectante, lo que impide su acción fungicida sobre los hongos presentes.

Palabras clave: hongos, *Alternaria* sp., *Curvularia* sp., *Mangifera indica*, *in vitro*.

Recibido el 6-7-2004 ● Aceptado el 15-9-2004

Autores para correspondencia correo electrónico: iseafernando@cantv.net; mescalante@inia.gov.ve; mcramire@cantv.net

Abstract

During the establishment *in vitro* of nodal segments of mango, normally appear pollutant micro-organisms, which are mainly fungi that occasion the death of the tissue used as explants. The isolation and identification of these micro-organisms are necessary to obtain its efficient control through some processes of superficial disinfection. Terminal buds of adult plants of 4 years old were collected, from which 80 nodal segment were selected, which were later disinfected for 30 min in 8 g L⁻¹ of Benomyl® + 300 mg L⁻¹ of Riphampicina®, 1 min in ethylic alcohol at 70% and 15 min in hypochloride of sodium at 2.625%, and afterwards these were put on essay tubes with the Murashige and Skoog culture medium. Subsequently, passed 8 days of its incubation, it was detected the presence of fungi, contaminating the nodal segments and causing the death of these. Later, it was proceeded to isolate and identify fungi, and the result showed the presence of *Alternaria* sp. and *Curvularia* sp. in 47.06 and 52.94% respectively. The appearance of these fungi in the disinfected explants might be due to these are inside the irregularities of the tissues used for propagating, which limits its fungicide action on the present fungi.

Key words: fungi, *Alternaria* sp., *Curvularia* sp., *Mangifera indica*, *in vitro*.

Introducción

El mango (*Mangifera indica*) es uno de los frutales mas difundidos en Venezuela debido a la existencia en casi todo el territorio de condiciones edafoclimáticas que satisfacen sus necesidades fisiológicas (3). Este frutal ha adquirido notable importancia económica ya que existen buenas perspectivas para su producción, así como por la aceptación que ha tenido este rubro en los mercados nacionales e internacionales, lo cual se traduce en un ingreso de divisas al país. Para el año 1993 se estimo una superficie cosechada de 8095 has y una producción de 12718 toneladas (10). En los últimos años ha despertado un marcado interés entre los productores agrícolas de la Planicie de Maracaibo, estimándose para 1999 una superficie sembrada de 600 ha con tendencia a

incrementarse. Según la FAO para el año 2001 a partir de 8.700 Has el país produjo 132.000 TM y un rendimiento de 151.724 Hectogramos por hectárea (7)

Este árbol puede propagarse por semilla y por medios vegetativos como la injertación y las estacas (2), de igual manera por técnicas de cultivo *in vitro* como la organogénesis y la embriogénesis somática (13). Sin embargo, la micropropagación de esta especie ha sido poco estudiada, siendo este método de regeneración muy prometedor dado a que permite la multiplicación masiva de plantas genéticamente idénticas, entre otras ventajas (8). En el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales, se pueden presentar microorganismos hongos y bacterias contaminantes que interfie-

ren con la obtención de explantes asépticos (16).

Se tiene que las especies leñosas, como el mango, son muy difíciles de manipular durante su cultivo *in vitro* (13, 14, 16). Un amplio rango de microorganismos (hongos filamentosos, bacterias, levaduras, virus y viroides) y microartrópodos (ácaros y trips) han sido identificados como contaminantes durante el establecimiento *in vitro* de plantas. Estos microorganismos son introducidos con el explante durante la manipulación en el laboratorio, y pueden expresarse inmediatamente o permanecer latentes por largos periodos de tiempo (9). Leifert y Caselles (9), señalaron que frecuentemente es difícil identificar la fuente de contaminación y que los protocolos han sido desarrollados para reducir la presencia de estos microorganismos contaminantes, que pueden encontrarse en la superficie o en el interior del explante o en ambos sitios; siendo los de la superficie son

más fáciles de eliminar (14, 15, 16).

El éxito de los sistemas de propagación de plantas por biotecnología depende en gran medida del control y la prevención de la contaminación microbiana, la cual ocasiona pérdidas cuantiosas de material vegetal en los procesos productivos y de investigación (1). Existen varias estrategias para controlar y manejar la contaminación, que incluyen: a) La prevención mediante la selección y el tratamiento de la planta madre, la desinfección superficial del explante y la identificación de los microorganismos contaminantes. b) El control de la contaminación a través del uso de sustancias antimicrobianas y el cultivo de meristemas (1, 9, 12, 13, 14, 15).

Este trabajo tuvo como objetivo aislar e identificar los géneros de hongos contaminantes presentes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de mango procedentes de plantas adultas cultivadas en el campo.

Materiales y métodos

Localización de la plantación. La plantación de mango empleada para la obtención del material vegetal está situada en el municipio Mara, estado Zulia, dentro del área denominada la altiplanicie de Maracaibo. Esta zona se caracteriza por presentar un régimen de distribución de lluvias 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). Para un promedio de 500 mm/año. Con res-

pecto a la temperatura promedio y la evapotranspiración potencial se registran valores de 27° C y 2.500 mm anuales, respectivamente. En general, los suelos presentan 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 (FAa). Estos suelos están clasificados como Tipic Haplargids (6).

Recolección de las muestras. El material vegetal fue obtenido de plantas de mango de 4 años de edad,

cultivadas en el Campo Experimental del Centro Frutícola del Estado Zulia-CORPOZULIA ubicado en el municipio Mara del estado Zulia. 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⁻¹ de Ridomil® en un intervalo de 4 días antes de la siembra. 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.

Preparación y siembra de los segmentos nodales. En el laboratorio se eliminaron las hojas a los brotes, dejando parte del pecíolo para evitar dañar las yemas. Los explantes consistieron de segmentos nodales con una yema axilar, correspondientes al tercer y cuarto nudo del brote desde la parte apical (14).

La desinfección superficial consistió en sumergir los explantes por 30 min en 8 g.L⁻¹ de Benomil® + 300 mg.L⁻¹ de Rifampicina®, 1 min en alcohol etílico al 70 % y 15 min en cloro comercial al 50 % (Hipoclorito de sodio 5,25 % i.a.). Seguidamente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril antes de la siembra de los explantes en un tubo de ensayo (150 mm x 25 mm) conteniendo de 10 mL de medio nutritivo de

Murashige y Skoog (11), complementando con 1 mg.L⁻¹ de las vitaminas tiamina, piridoxina y ácido nicotínico, 100 mg.L⁻¹ de mioinositol, 20 g.L⁻¹ de sacarosa y 7 g.L⁻¹ de agar. El pH del medio se ajustó a 5,8 + 0,01 antes de esterilizarlo a 121°C y 1,1 kg.cm⁻² por 20 min. Las condiciones de incubación de los explantes fueron bajo oscuridad a una temperatura de 25 + 1°C.

Aislamiento e identificación de los hongos contaminantes. Luego de la incubación a los ocho días 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 efectuó 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 ser aislados los hongos en el medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar más ácido Láctico al 25% (PDAA) y obtenidos los cultivos puros de los mismos, se procedió a preparar láminas portaobjetos de cada uno de ellos, empleando el colorante azul de algodón. Las características morfológicas de las estructuras reproductivas de cada hongo se observaron con un microscopio óptico marca Olympus-CH y la identificación de los géneros se realizó mediante el uso de una clave ilustrada y consulta de literatura micológica especializada (4).

Resultados y discusión

En el cuadro 1 se describen los géneros de hongos contaminantes presentes durante el cultivo *in vitro* de

segmentos nodales de mango, procedentes de plantas adultas cultivadas en el campo, los cuales correspondie-

Cuadro 1. Hongos aislados, descripción y porcentaje de explantes contaminados durante el cultivo *in vitro* de segmentos nodales de mango.

Hongo	Descripción	Porcentaje de explantes contaminados
<i>Alternaria</i> sp.	El hongo presentó conidioforos oscuros, generalmente simples, cortos o elongados, típicamente con conidios oscuros, con septos longitudinales y transversales; de forma variada, obclavados a elípticos, u ovoides, y frecuentemente formando cadenas largas (acropetalmente); en algunas instancias formados individualmente y presentando un ápice apical simple o ramificado.	47,06
<i>Curvularia</i> sp.	Este hongo se caracterizó por presentar conidioforos marrones, simples, con esporas apicales o en nuevos puntos de crecimiento simpoidales; conidios oscuros, células terminales claras, de 3-5 células, mas o menos fusiformes, típicamente curvadas, con una de sus células centrales mas alargadas.	52,92

ron a: *Alternaria* sp. y *Curvularia* sp. Porcentualmente el género *Curvularia* sp. presentó el mayor valor de explantes contaminados (52,92 %) con respecto a *Alternaria* sp con un 47,06%. Estos resultados difieren de los reportados por Borges *et al.* (5), quienes detectaron más géneros en ápices de mangos cultivados *in vitro* (*Fusarium* sp., *Botryodiplodia* sp., *Alternaria* sp. y *Aspergillus* sp.), y no detectaron el género *Curvularia* sp. Estas diferencias pueden atribuirse al

procedimiento de desinfección, el explante, época del año, entre otras.

Los resultados obtenidos muestran que la desinfección empleada no logró controlar la contaminación fungosa, problema que podría asociarse a que los desinfectantes superficiales utilizaron que no permitieron eliminar los hongos, ubicados tanto en la superficie como en el interior del explante, lo que determina la necesidad de utilizar fungicidas o antibióticos en el medio para contro-

lar los hongos y bacterias, y de otras alternativas que permitan disminuir su frecuencia (14, 15). En relación a esto, Borges *et al.* (5) lograron retardar la presencia de los contaminantes durante el establecimiento *in vitro* de ápices de mango del cv. Haden, colectados durante la época seca, al adicionar al medio de cultivo fungicidas y antibióticos. En este mismo sentido, Alvarado (1), indicó que las condiciones climáticas en zonas tropicales favorecen el desarrollo y la multiplicación de los microorganismos, que tienen un efecto negativo sobre los explantes, dado a que estos compiten entre ellos por los

nutrientes del medio ocasionándole daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o la expulsión al medio de cultivo de metabolitos tóxicos, reduciendo de esta forma los coeficientes de multiplicación y provocando la muerte del explante.

Otra causa que incrementa la presencia de contaminantes corresponde a las irregularidades ubicadas en la superficie del explante que pueden servir de depósito de esporas y polvo, que afectan el éxito de la desinfección superficial ya que productos no logran llegar y desinfectar esas áreas (14, 15).

Conclusiones y recomendaciones

De los hongos contaminantes detectados se lograron identificar dos géneros: *Curvularia* sp. y *Alternaria* sp., de los cuales el primero se presentó en la mayor parte de los explantes afectados.

Se recomienda realizar otras evaluaciones usando explantes provenientes de diferentes épocas del año, y de diferentes variedades de mango, así como estudiar otras alternativas de desinfección del material de propagación.

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento a las instituciones, que gracias a su cofinanciamiento hicieron posible la realización de esta investigación, Fondo Nacional de Investigaciones Científicas, Tecnológicas e Innovación (FONACIT), a través de los Proyectos de Investigación S1-2000000795, S1-2808, F-

2001001117; la Corporación de Desarrollo de la Región Zuliana (CORPOZULIA), a través de su Centro Frutícola del Zulia; El Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ), a través de los Proyectos de Investigación No. CC-0802-01, No. CC-0194-03, No. 1736-98.

Literatura citada

1. Alvarado, Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. p. 81 – 104. En: J. N. Pérez, (ed). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara. Cuba.
2. Avilan, L., F. Leal y D. Bautista. 1992. Manual de fruticultura. Principios y manejo de la producción. Segunda Edición. Tomo II. Editoaial América. Caracas, Venezuela. p.777-1472.
3. Avilan, L., M. Rodríguez y J. Ruiz. 1995. Germinación de algunas variedades de mango con bajo y mediano porte para ser usadas como patrones. *Agronomía Tropical*. 45: 445-456.
4. Barnett, H. L. y B. B. Hunter. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Third Edition. Editorial Burgess Publishing Company. Minneapolis, USA. 241 p.
5. Borges, L., H. Morales, Z. Valero, S. León de S., R. Santos, C. Castro de Rincón y A. Del Villar. 1997. Comparación de métodos de esterilización superficial de yemas apicales de mango (*Mangifera indica* L.) variedad Haden. VII Jornadas Científico Técnicas. Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. p. 102.
6. 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. p 10.
7. Food Administration Organization (F.A.O). 2001. Indicadores de producción agrícola en Venezuela. <http://www.iica.int.ve/BFAO.htm>. Consultas: 24/02/2005
8. Jiménez, E. 1998. Cultivo de ápices y meristemas. p. 45 – 56. En: J. N. Pérez, (ed). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara. Cuba.
9. Leifert, C. y A. Cassells. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:133-138.
10. Ministerio de Agricultura y Cría. 1993. Oficina Sectorial de Planificación Agrícola. Dirección de estadística e Informatica. 5 p.
11. Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue. *Phys. Plant*. 15:473-493.
12. Niedz R. P. y M.G. Bausher, 2002. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse and fields grown trees. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 38:468-471.
13. Pateña, L., L. Carlos y R. Barba. 2002. Somatic embriogénesis and plantlet regeneration in mango (*Mangifera indica* L.). *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 38: 173-177.
14. Ramírez, V. M., R. Santos y F. Isea. 2000. Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava* L. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 17:217-225.
15. 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.
16. Viloria V., Z.J. 1993. Cultivo *in vitro* de nudos de guayabo (*Psidium guajava* L.) Fase I. Trabajo de Ascenso. Maracaibo, estado Zulia. Venezuela. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. 35 p.