

Identificación de agentes causales de la contaminación microbiana durante la micropropagación de *Musa* spp.

Díaz Lezcano, M. I.^{1*}; Pereira Báez, K. D.²; Benítez Vera, S. G.²; Brites Moreira, J. R.²; Alegre, C. E.²; Duarte Ovejero, N. N.²; Mongelós Franco, J. Y.²; Mussi Cataldi, C. E.²; y Batte Martínez, H. D.²

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay

²Facultad de Ciencias Agrarias, Maestría en Fitosanidad, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay

*E-mail del autor: maura.diaz@agr.una.py

Identificación de agentes causales de la contaminación microbiana durante la micropropagación de *Musa* spp. La investigación se realizó en el Laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, con la finalidad de identificar los agentes causales de la contaminación microbiana durante la micropropagación del banano (*Musa* spp.). Se utilizaron 80 hijuelos de 30 - 40 cm de los cuales se extrajeron los ápices meristemáticos que fueron sembrados en medios MS (Murashige y Skoog, 1962) con el agregado de 1 g.L⁻¹ de carbón activado como antioxidante. El tratamiento de desinfección consistió en la inmersión en una solución de NaClO (10 %) durante cinco minutos. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con ochenta repeticiones, constituyendo cada ápice una unidad experimental. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de sobrevivencia, porcentaje de contaminación de explantes y agente causal. Para la identificación de los microorganismos fúngicos se utilizó el microscopio óptico, por su parte, las bacterias fueron repicadas en placas de Petri conteniendo el medio de rutina 523 de Kado y Heskett (1970), siendo incubadas a 25-30 °C en posición invertida durante tres días. Posteriormente, se realizó la técnica de tinción de Gram. Los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y las bacterias Gram negativas son los causantes de la contaminación, en la fase de establecimiento *in vitro*, de ápices meristemáticos de banana.

Palabras clave: bacterias, contaminación, cultivo *in vitro*, hongos, micropropagación

Identification of causal agents of microbial contamination during the micropropagation of *Musa* spp. The research was carried out in the Biology Laboratory of the Facultad de Ciencias Agrarias of the Universidad Nacional de Asunción, to identify the causal agents of microbial contamination during the micropropagation of banana (*Musa* spp.). Eighty shoots of 30-40 cm were used, from which the meristems were extracted and grown in MS culture media (Murashige and Skoog, 1962) with the addition of 1 g.L⁻¹ of activated carbon as antioxidant. The disinfection treatment consisted of immersion in a NaClO solution (10%) for five minutes. The experimental design used was completely randomized with eighty repetitions, each apex constituting an experimental unit. The variables evaluated were: percentage of survival, percentage of contamination of explants, and causal agent. For the identification of the fungal microorganisms the optical microscope was used. The bacteria were passaged into Petri dishes containing the routine medium 523 by Kado and Heskett (1970), and incubated at 25-30 °C in an inverted position during three days. Subsequently, the Gram staining technique was performed. The genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and Gram negative bacteria were found to be the cause of contamination, in the *in vitro* establishment phase, of meristematic banana apices.

Keywords: bacteria, contamination, *in vitro* culture, fungi, micropropagation

INTRODUCCIÓN

La banana (*Musa spp.*) es la fruta más comercializada en todo el mundo en términos cuantitativos, además de las manzanas y los cítricos (FAO, 2016). En el periodo 2014-2016 la producción anual de banana a nivel mundial fue de 113 millones de toneladas (FAO, 2019), siendo los principales países productores China e India que conjuntamente representaron poco más de un tercio de la producción total en el periodo 2010-2016. Un segundo grupo de países productores, con participación en torno al 6% cada uno, son Filipinas, Ecuador, Brasil, Indonesia y Tanzania (Enciso, 2019).

Paraguay ha pasado de ser importador de banana a exportador, cambio que se dio a principios del presente siglo (Enciso, 2019). En este sentido, según el MAG (2015) en la zafra 2016-2017 la producción fue de 72,3 t, en una superficie de 7,3 ha teniendo un rendimiento de 9,2 t/ha. Entre los principales departamentos productores se encuentran Caaguazú, San Pedro, Caazapá y Cordillera.

La búsqueda de variedades resistentes a plagas y enfermedades ha sido una de las principales acometidas en la historia de los programas de mejoramiento del banano (FAO, 2004). Debido al escaso número de variedades locales y su reproducción asexual, el banano tiene una reducida reserva genética que lo hace vulnerable a plagas y enfermedades. Los cultivares son susceptibles a enfermedades como la Sigatoka negra (*Mycospharella fijiensis*), (*Ralstonia solanacearum*), y el Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum f. sp. cubense*) que ocasiona pérdidas en la producción de

frutas y afecta la disponibilidad de material vegetal de propagación sano en campo (Ancasi *et al.*, 2016).

El banano tradicionalmente se propaga en forma vegetativa por cormos, que son separados para sembrarlos y uno de los principales problemas que presenta propagarlos con este método es que la tasa de multiplicación es muy baja, pero aún más grave es el aumento de la población de insectos y otras plagas en la plantación. Por esta razón la propagación *in vitro* es una de las alternativas para la obtención de plantas sanas libres de patógenos, a diferencia del método tradicional que pueden traer problemas fitosanitarios (Sandoval *et al.*, 1991).

La propagación *in vitro* de *Musa spp.* generalmente se la realiza por meristemos apicales extraídos de los cormos, debido a que estos meristemos tienen un crecimiento longitudinal y también por su totipotencia. Los meristemos se establecen en un medio de cultivo adecuado donde puede crecer una nueva planta (Ortega *et al.*, 2010).

Por ello, resulta necesaria la investigación sobre los aspectos relacionados a los patógenos que afectan al establecimiento *in vitro* del banano con la finalidad de controlar la contaminación microbiana en el protocolo de micropropagación. El objetivo del trabajo fue la identificación de agentes causales de la contaminación microbiana durante en la micropropagación del banano (*Musa spp.*).

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología de la Facultad

de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción en San Lorenzo, Paraguay; durante los meses de abril y mayo del 2018.

El medio cultivo utilizado fue el de Murashige y Skoog (MS) suplementado con 15 g.L⁻¹ de sacarosa y gelificado con 4 g.L⁻¹ de ágar, además del agregado de 1 g.L⁻¹ de carbón activado, 50 mg.L⁻¹ de mioinositol y 10 ml.g⁻¹ de glicina, el pH del medio fue ajustado a 5,8 y posteriormente de autoclavado a 121 °C, 1 atm de presión durante 20 minutos. El mismo fue propuesto por Díaz Lezcano *et al.* (2016) para la micropropagación de *Musa* spp. variedad Nanicao.

Los materiales vegetales fueron adquiridos del campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, ubicado en latitud y longitud 25° 21' 54.80" S y 57° 30' 8.77" O.

Se utilizaron 80 ápices provenientes de hijuelos de 30 - 40 cm de altura. Inmediatamente, se procedió a la remoción de las hojas del pseudotallo y los tejidos blancos de la base del cormo. Con ayuda del estereoscopio, los semicormos fueron sometidos a reducciones hasta obtener un cono aproximadamente de 1 cm, formado por el meristema central y un mínimo del tejido de rizoma para facilitar la manipulación.

En la cámara de flujo laminar los explantes fueron sometidos al protocolo de desinfección, propuesto por Mongelós Franco *et al.* (2020) que consistió en sumergir los explantes por 30 segundos en alcohol etílico al 70 %, posteriormente a hipoclorito de sodio al 10 % durante 5 minutos y finalmente sometidos a triple enjuague con agua destilada estéril.

Estos explantes fueron sembrados en tubos de vidrio (75 x 10 mm) en volúmenes de 2,5 ml de medio de cultivo y mantenidos en la sala de crecimiento a 25 °C, 70 % de humedad relativa, en condiciones de fotoperiodo 16:8 horas luz/oscuridad.

Los explantes se observaron a los 15 días posteriores a su inoculación en el medio de cultivo. Las variables medidas fueron porcentaje de sobrevivencia, contaminación y agente causal.

Porcentaje de sobrevivencia: se realizó mediante la observación del desarrollo de brotes, siendo considerados como tales si presentan un tamaño aproximado de 2 mm con una coloración blanca verdusca.

Porcentaje de contaminación y agente causal: se basó en la identificación visual del crecimiento micelial de los hongos o la apariencia lechosa de color blanquecino o amarillo, característico de las bacterias, pudiéndose manifestar ambos patógenos: dentro del medio de cultivo, alrededor del explante en contacto con el medio de cultivo o saliendo del meristemo del explante.

Para la identificación del patógeno con crecimiento micelial, se prepararon láminas de vidrio con micelio para ser observado bajo microscopio óptico.

Para identificar la colonia bacteriana, con ayuda de un ansa de laboratorio, previamente flameado, se retiró una gota de la colonia bacteriana y fue depositada en el borde de la placa de Petri esterilizada conteniendo el medio de rutina 523 de Kado y Heskett (1970) para realizar estrías equidistantes a 0,5 cm. Posteriormente, las placas fueron etiquetadas e incubadas en posición invertida a 25-

30 °C durante tres días. Finalmente, se realizó la técnica de tinción de Gram, observándose bajo microscopio óptico la coloración rojiza de las células bacterianas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A los 15 días de evaluación se registró 20,8% de sobrevivencia y 25,7% de contaminación microbiana atribuible a hongos y bacterias.

En ese contexto, uno de los problemas en la sobrevivencia fue relacionado con los efectos de toxicidad causados por la alta concentración del hipoclorito de sodio, seguido por la contaminación microbiana. En ese sentido, según Montano *et al.* (2004), la concentración de hipoclorito de sodio ideal, para desinfectar sumergiendo los explantes de banana durante 10 minutos es del 3 %.

Por su parte, Ramírez *et al.* (2014) registraron que con aplicación 2 % de hipoclorito de sodio, durante 15 minutos, se produce la mejor desinfección de los explantes de *Guadua angustifolia*, además de la mayor sobrevivencia. Diversos autores (Ancasi *et al.* (2014); Marulanda *et al.* (2005); Monzón (2005), etc.) mencionan que, en general, la concentración del hipoclorito de sodio a ser utilizada debe ser del 1 al 3 % para activar la diferenciación celular de los explantes y lograr una buena desinfección.

De lo antes mencionado, las concentraciones superiores al 3 % ocasionan daños fitotóxicos a los tejidos del explante, lo que se traduce en explantes muertos (Marulanda *et al.*, 2005). De acuerdo con varios autores (Abdelnour *et al.*, 2011; Borges *et al.*, 2004; Borges

et al., 2009; Del Ángel *et al.*, 2014), el hipoclorito de sodio es un producto recomendado normalmente para la desinfección *in vitro* de explantes, pero para algunas especies este compuesto puede ser tóxico.

Además, Del Ángel *et al.* (2014) han reportado que semillas esterilizadas con dicho compuesto, pueden retener suficientes cantidades del agente reactivo como para interferir con la germinación y que, aun lavando el tejido varias veces con agua no se elimina por completo, de esta manera, el cloro residual es absorbido por el tejido.

En ese contexto, el cloro residual afecta la permeabilidad celular de las células vegetales, impidiendo el adecuado desarrollo celular de las células meristemáticas y por lo tanto no genera la brotación del explante (Borges *et al.*, 2004).

Por otro lado, una de las dificultades para el establecimiento de cultivos *in vitro*, es la presencia de microorganismos contaminantes tanto endógenos como exógenos que afectan la viabilidad y el desarrollo de los explantes una vez que se han establecido *in vitro*, por lo tanto se requiere establecer protocolos que conlleven a minimizar o eliminar dichos microorganismos sin afectar la viabilidad de los explantes (Roca y Mroginski, 1991).

A este respecto, Pereira *et al.* (2003) mencionan que la contaminación fúngica en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales procede principalmente del ambiente, mientras que las bacterias generalmente acompañan al explante y son un indicador de una desinfección deficiente. Así mismo, estos autores afirman que la contaminación bacteriana es

más perjudicial, ya que no se detecta de forma temprana y los agentes contaminantes pueden ser transferidos durante los sub cultivos.

En este ensayo se identificó la presencia de los géneros *Aspergillus*, *Pe-*

nicillium y *Fusarium* como contaminantes en la etapa de establecimiento *in vitro* de explantes de banano (Figura 1).

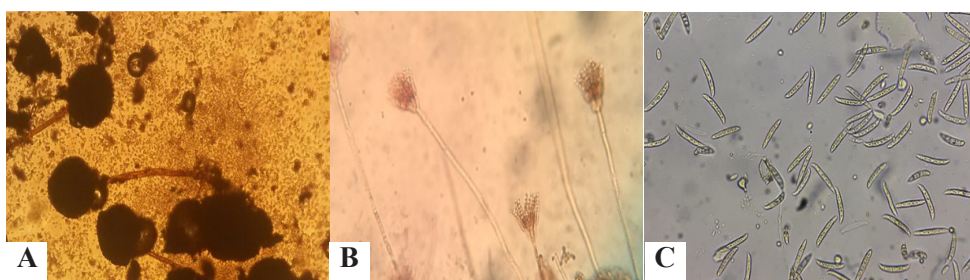


Figura 1. Contaminación fúngica durante el establecimiento *in vitro* de *Musa* spp. A) Conidióforo y conidios de *Aspergillus* spp. B) Conidióforo y conidios de *Penicillium* spp. C) Macro y micro conidios de *Fusarium* spp. FCA-UNA. San Lorenzo, Paraguay. 2018

Alvarado (1998) y Hernan (1987) sostienen que como contaminantes *in vitro* de plantas se han aislado microorganismos fungosos de los géneros *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia* y *Fusarium*.

García *et al.* (2015) registraron los porcentajes más altos de contaminación, al utilizar hipoclorito de sodio al 5 %, principalmente por la aparición de hongos. Asimismo, resultados similares fueron obtenidos por Arbeláez *et al.* (2016), quienes evaluaron diferentes protocolos de desinfección para el establecimiento *in vitro* de meristema apical de *Musa* spp., y constataron que la probabilidad de contaminación por hongos y bacterias es 8,65 veces mayor cuando se utiliza hipoclorito de sodio al 5 %, en contraste con la utilización de hipoclorito de sodio al 10 %.

En ese sentido, Sánchez *et al.* (2009)

mencionan que las soluciones de hipoclorito de sodio que contienen 5 % disponible de cloro, se descomponen rápidamente a 24 °C, por lo cual se pudieron presentar altos niveles de contaminación fúngica.

En el presente experimento se observaron finas películas de crecimiento bacteriano a partir del explante formando camino y rodeando el borde del frasco, con coloración blanquecina, haciéndose visible por la base del mismo (Figura 2).

Se comprobó que el crecimiento bacteriano pertenece a una bacteria Gram negativa, atendiendo que son las más abundantes en las plantas y en otros ambientes. En ese marco, Leifert *et al.* (1994) mencionan que las bacterias colonizan los espacios intercelulares y así escapan de la desinfección y manifiestan crecimiento en el medio de cultivo, en situaciones de estrés para el explante.

Díaz Lezcano, M.I. et al. Contaminación microbiana en la micropropagación de *Musa* spp.

En ese marco, la contaminación microbiana y la oxidación del tejido donador han sido los problemas más severos

que se han enfrentado en la micropropagación de plantas (Castro *et al.*, 1993).

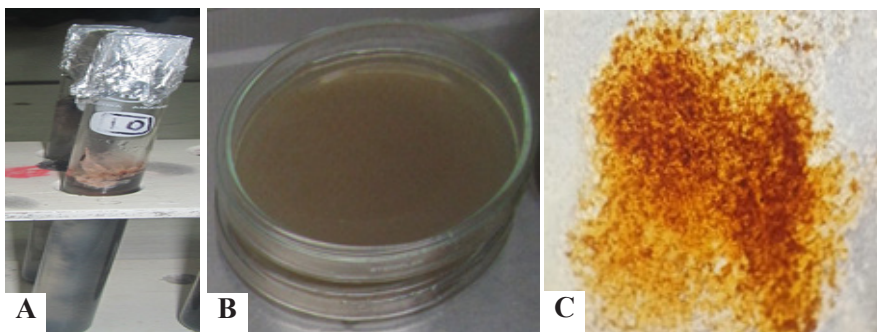


Figura 2. A) Crecimiento de bacterias en medio de cultivo *in vitro*; B) Aislado bacteriano, C) Tinción de Gram. FCA-UNA. San Lorenzo, Paraguay, 2018

CONCLUSIONES

Los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y las bacterias Gram negativas son las causantes de la contaminación microbiana en la micropropagación de ápices meristemáticos de banano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelnour, A.; Aguilar, M; Valverde, L. 2011. Micropropagación de Pílón (*Hieronyma alchorneoides*). *Agronomía Costarricense* 35(2): 9-19.

Alvarado, Y. (1998). Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: J. N. Pérez, (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. Cuba. 81–104 p.

Ancasi, R; Montero, J; Ferreira, N; Muñoz, I. (2014). Determinación un mejor medio de cultivo en la fase de establecimiento para la propagación *in vitro* de plátano (*Musa paradisica*

ca L.) (en línea). Consultado 14 may. 2018. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v7n2/v7n2_a08.pdf

Arbeláez A, LM; Montoya L, J; Saavedra R, SA. 2016. Evaluación de protocolos para el establecimiento y desinfección *in vitro* de meristemos de plátano *Musa* spp. *Vitae*. 23(1): 391-395.

Borges, M; Ros, C; Castellanos, C; Velásquez, R. (2004). Efecto de diferente métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. *Biotecnología vegetal* 4(4): 237-242.

Borges, M; Estrada, E; Pérez, I; Menezes, S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Centro de estudios de biotecnología vegetal. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma, Bayamo* (85): 100-111.

Castro, D; Jiménez, C; Ríos, D; Restrepo, A; 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*). CONARE Del Ángel, O ; Gilber, A; Gómez, M; García, H. (2014). Desinfección y regeneración eficiente de chayote *in vitro* (*Sechium edule* Jacq.Sw.) (en línea). Consultado 23 may. 2018. Disponible en: http://www.ecorfan.org/handbooks/Ciencia%20Agropecuarias%20T-II/Articulo_3.pdf
- Díaz Lezcano, M. I., Flor Benítez, B. A., Enciso Garay, C. R., y González Segnana, L. R. (2016). El carbón activado y las condiciones de oscuridad en la micropropagación de banana variedad Nanicão. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 140–146. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.55618>
- Enciso, V. (2019). Producción y comercialización de banana. San Lorenzo, Paraguay. Disponible en http://www.agr.una.py/ecorural/ecorural_otras_publicaciones.php
- FAO. (2004). La economía mundial del banano 1985-2002. Disponible en <https://www.fao.org/3/y5102s/y5102s00.htm>
- FAO. (2016). Situación del mercado del banano 2015-2016. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-i7410s.pdf>
- FAO. (2019). FAOSTAT. [Base de datos]. Disponible en [http://www.fao.org/faostat/es/Ministerio de Agricultura y Ganadería. \(2018\) Síntesis estadísticas producción agropecuaria](http://www.fao.org/faostat/es/Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2018) Síntesis estadísticas producción agropecuaria)
- año agrícola 2000/2018. Disponible en http://www.mag.gov.py/Censo/SINTESIS%20Estadisticas%202017_2018%20_pdf%20OV.pdf
- García Lozano, D., Ocampo Guerrero, M., Mesa López, N. (2015). Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 17, no. 2 (julio 1, 2015): 76-84. Accedido mayo 5, 2021. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/articulo/view/54277>.
- Herman, E. B. (1987). Toward control of micropropagation contamination. *Agricell Report*. vol. 9, p.33-35.
- Kado, C; Heskett, M. (1970). Selective media for Isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopath* 60:969-976.
- Leifert C; Morris, C; Waites, W. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plant: reason for contamination *in vitro*. *Plant Sciences* 13: 139 -181.
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería, PY). (2015). Potencial agroindustrial de los rubros mango, mbrurukujá, banana y piña (en línea). MAG/DGP. 28 p. Consultado 29 abr. 2018. Disponible en: <http://www.mag.gov.py/dgp/UEA%20DGP%20MAG/POTENCIAL%20AGROINDUSTRIAL%20DEL%20MANGO,%20MBURUKUA,%20BANANA%20Y%20PINHA%200515.pdf>
- Marulanda, M; Gutiérrez, L; Uribe, M; Márquez, M. (2005). Micropropagación de *Guadua angustifolia* (en

Díaz Lezcano, M.I. et al. Contaminación microbiana en la micropropagación de *Musa* spp.

- línea). *Biotecnología vegetal* (6)2. Consultado 15 may. 2018. Disponible en: http://revista.ibp.co.cu/component/docman/doc_download/192
- Mongelós Franco, Y., Mussi Cataldi, C. E., Duarte Ovejero, N. N., & Díaz Lezcano, M. I. (2020). Protocolo de desinfección para establecimiento *in vitro* de meristema apical de banano *Musa* spp. *CEDAMAZ*, 10(2), 47–50. Recuperado a partir de <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/815>
- Montano, N; Reynaldo, D; López, J; Torres, M; Otero, E; Gutiérrez, V; Martínez, M. (2004). Nueva metodología para la implantación *in vitro* del plátano y el banano en biofábricas. *Plants Physiol* 2:2-8.
- Monzón, JD. (2005). Propagación *in vitro* de pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder) por medio de la multiplicación de ápices de brote. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Murashige, T; Skoog, FA. (1962). Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473–497.
- Ortega, N; Korvena, S; Ruiz, O; Santos, E; Peralta, E. (2010). Obtención de multimeristemas y callos de diferentes variedades de Banano y Platano *Musa acuminata* a partir de Meristemas apicales y Scalps. *Revista Tecnológica ESPOL*.23(1):1-4.
- Pereira, JES; Mattos, ML; Fortes, GR. (2003). Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 38(7): 827-834.
- Ramírez, L; Granados, J; Carreño, N. (2014). Evaluación del efecto de tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio sobre segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth para el establecimiento del cultivo *in vitro* (en línea). Consultado 21 may. 2018. Disponible en: <http://oaji.net/articles/2017/5565-1508729847.pdf>
- Roca, W; Mroginski, A. (1991). Capítulo 22: Micropropagación de Plátanos y Bananos. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT Centro Internacional de Agricultura Tropical. CR.
- Sánchez, F; Taketoshi, A; Arroniz, S; Gómez, A; Gómez, L. (2009). Comparación de la acción bactericida de hipoclorito de sodio y Microcyn 60 (en línea). Consultado 23 may. 2018. Disponible en: <http://www.mediagraphic.com/pdfs/odon/uo-2009/uo091b.pdf>
- Sandoval J, Brenes G, Pérez Sánchez L. (1991). Micropropagación de Plátano y Banano (*Musa* AAB, AAA) en el CATIE. Serie técnica, Informe técnico CATIE N° 186. Turrialba (Costa Rica). p. 2.