



Comunicación corta

HONGOS CONTAMINANTES EN EL ESTABLECIMIENTO *In Vitro* DE ÁPICES DE PAPA

Short communication

Contaminant fungi in *in vitro* establishment of potato apexes

**Sandra Pérez Álvarez¹✉, Norma E. Leyva López¹,
Marco A. Magallanes Tapia¹, Angela P. Arce Leal¹
y Amaury Méndez Guerrero²**

ABSTRACT. Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important food sources worldwide and it is affected for some pathogen either in the field or in the storage conditions. Some of the pathogens that attack this crop may remain in the tuber and they can be taken to the field at the time of planting so it is very important to obtain high quality potato seed for which *in vitro* culture is a useful technology. The aim of this work was the identification of fungal contaminants at the *in vitro* establishment phase of apices of two potato variety (Fianna and Atlantic). Minutubers were stored in the dark at 18 °C for 20 days to obtain apices that were collected, disinfected and placed in Murashige and Skoog medium supplemented with saccharose and agar. After seven days of apices establishment, 100 % of the samples showed contamination and damage inside, which were identified in an optical microscopy as *Fusarium* and *Penicillium* genera, both tuber pathogen. This research demonstrates once again the importance to have healthy and high quality material for *in vitro* culture and the absence of sanitary in the material sold to the farmers to obtain pre-basic seed or G1.

RESUMEN. La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una de las principales fuentes de alimentación a nivel mundial y es afectada por múltiples patógenos, ya sea en el campo o durante su conservación. Algunos de los patógenos que atacan a este cultivo pueden permanecer en el tubérculo y ser llevados al campo en el momento de la plantación, por lo que cada vez es más importante la obtención de semilla de papa de alta calidad fitosanitaria, donde el cultivo *in vitro* es una tecnología de gran utilidad. El objetivo del presente trabajo fue identificar contaminantes fúngicos en la fase de establecimiento *in vitro* de ápices de dos variedades de papa (Fianna y Atlantic). Los minutubérculos fueron almacenados en la oscuridad a una temperatura de 18 °C durante 20 días para la obtención de los ápices, los cuales se colectaron, desinfectaron y colocaron en un medio basal Murashige y Skoog suplementado con sacarosa y agar. A los siete días de establecerse los ápices, el 100 % de las muestras mostró contaminación y daños en el interior, identificándose en un microscopio óptico, los géneros fúngicos *Fusarium* y *Penicillium* como patógenos del tubérculo. Esta investigación apunta una vez más a la importancia de generar material sano de alta calidad para el cultivo *in vitro* y la falta de sanidad en el material que se les vende a los productores para obtener la semilla pre-básica o G1.

Key words: culture, Fusarium, Penicillium

Palabras clave: cultivo, Fusarium, Penicillium

¹ Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR (Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional), Unidad Sinaloa, Departamento de Biotecnología Agrícola, Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, San Joaquín, Guasave, Sinaloa, México, C.P. 81101

² Productora Agrícola "El Encanto", Guillermo Nelson y Cuauhtémoc, Sin número altos, Dpto. 3, Colonia Centro, Guasave, Sinaloa, México, C.P. 81000

✉ perezalvarezsandra2015@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La papa (*S. tuberosum*) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial. En México los estados de Sinaloa y Sonora son los principales productores de esta solanácea, llegando a establecerse tan solo en Sinaloa 14,000 ha anualmente, lo que representa el 22 % de la superficie nacional^A. El uso de material de alta calidad como partida (semilla original), es un requisito imprescindible para obtener semillas saludables y con buenos rendimientos; sin embargo, la adquisición de estas es una problemática para muchos productores de medianos y escasos recursos, fundamentalmente por los altos costos.

Uno de los principales sistemas utilizados para obtener semilla original es la multiplicación *in vitro* o micropropagación para la posterior obtención de minitubérculos libres de patógenos (1–3). Los medios de cultivo utilizados en este sistema proveen una mezcla rica en nutrientes que puede permitir también el rápido desarrollo de hongos y bacterias. Una vez que estos contaminantes se establecen en el medio de cultivo crecen rápidamente agotando los nutrientes del medio y produciendo toxinas dañinas para el explante (4).

Por lo anterior y teniendo en cuenta que los minitubérculos de papas pueden contener patógenos endógenos (transmitidos de generación en generación) y que este es uno de los primeros estudios en las variedades de papa que abordan la contaminación endógena del material vegetal, el objetivo de este trabajo fue identificar la presencia de contaminantes fúngicos en la fase de establecimiento *in vitro* de ápices de papa en las variedades Fianna y Atlantic.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL E IMPLANTACIÓN DE LOS ÁPICES

Los minitubérculos de papa de las variedades Fianna y Atlantic, provenientes del estado de México, se colocaron en una incubadora a 18 °C durante 20 días para obtener los ápices. Posteriormente se desinfectaron cuidadosamente con agua corriente y detergente, seguido de tres enjuagues con agua destilada durante cinco minutos, luego fueron lavados durante 15 minutos con 20 mL de agua destilada (seis gotas de Tween 20) y se enjuagaron nuevamente con agua destilada hasta eliminar los restos de Tween. Enseguida se sumergieron en

etanol al 70 % durante cinco minutos y se lavaron con agua destilada estéril. En condiciones de flujo laminar, se realizaron cortes de los ápices y se colocaron en hipoclorito de sodio al 2 % durante 15 minutos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces y se dejaron secar durante 15 min antes de colocarlos de manera individual en tubos de ensayo conteniendo el medio basal Murashige y Skoog (5) con vitaminas, suplementado con 20 g L⁻¹ de sacarosa y 4 g L⁻¹ de gel solidificante (pH 5,8 ± 0,02). Las condiciones de incubación fueron con un fotoperíodo de ocho horas luz a temperatura de 25 ± 1 °C (6).

IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS CONTAMINANTES A TRAVÉS DEL MICROSCOPIO ÓPTICO

Los hongos desarrollados en los ápices cultivados *in vitro*, se aislaron para su identificación cultural y morfológica en el medio de cultivo papa-dextrosa-agar y una vez cultivados, se procedió a su observación microscópica en láminas portaobjetos.

Las características morfológicas de las estructuras reproductivas de los hongos se visualizaron con un microscopio óptico marca Leica DM500, con el objetivo 40 x y con una cámara Leica ICC50 HD montada en el mismo se tomaron las imágenes correspondientes. La identificación de los géneros se llevó a cabo mediante el uso de claves y consulta de literatura micológica especializada (7). Por otro lado, la evaluación del porcentaje de explantes para cada hongo se efectuó mediante una relación porcentual partiendo de la muestra de 20 explantes por cada variedad.

El aislamiento e identificación de los hongos contaminantes se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de Fitopatógenos del Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR (Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional), Unidad Sinaloa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo un 100 % de contaminación por hongos en los ápices de papa cultivados *in vitro*, siete días después de la implantación en el medio MS (Figura 1A), por lo que se decidió realizar cortes de los minitubérculos con un bisturí de disección, encontrándose síntomas de pudrición seca en el interior de los mismos para ambas variedades (Figura 1B y C).

La identificación cultural y morfológica de los hongos aislados al microscopio óptico, resultaron en la presencia de los géneros *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp. (Figura 2).

^ASifuentes, I. E. y Macías, C. J. *Requerimiento nutrimentales de las principales variedades de papa en Sinaloa*. Ed. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), 2014, Campo Experimental Valle del Fuerte, 40 p



Figura 1. Contaminación por hongos de los ápices (A); minitubérculos de papa Variedad Atlantic (B) y Variedad Fianna (C)

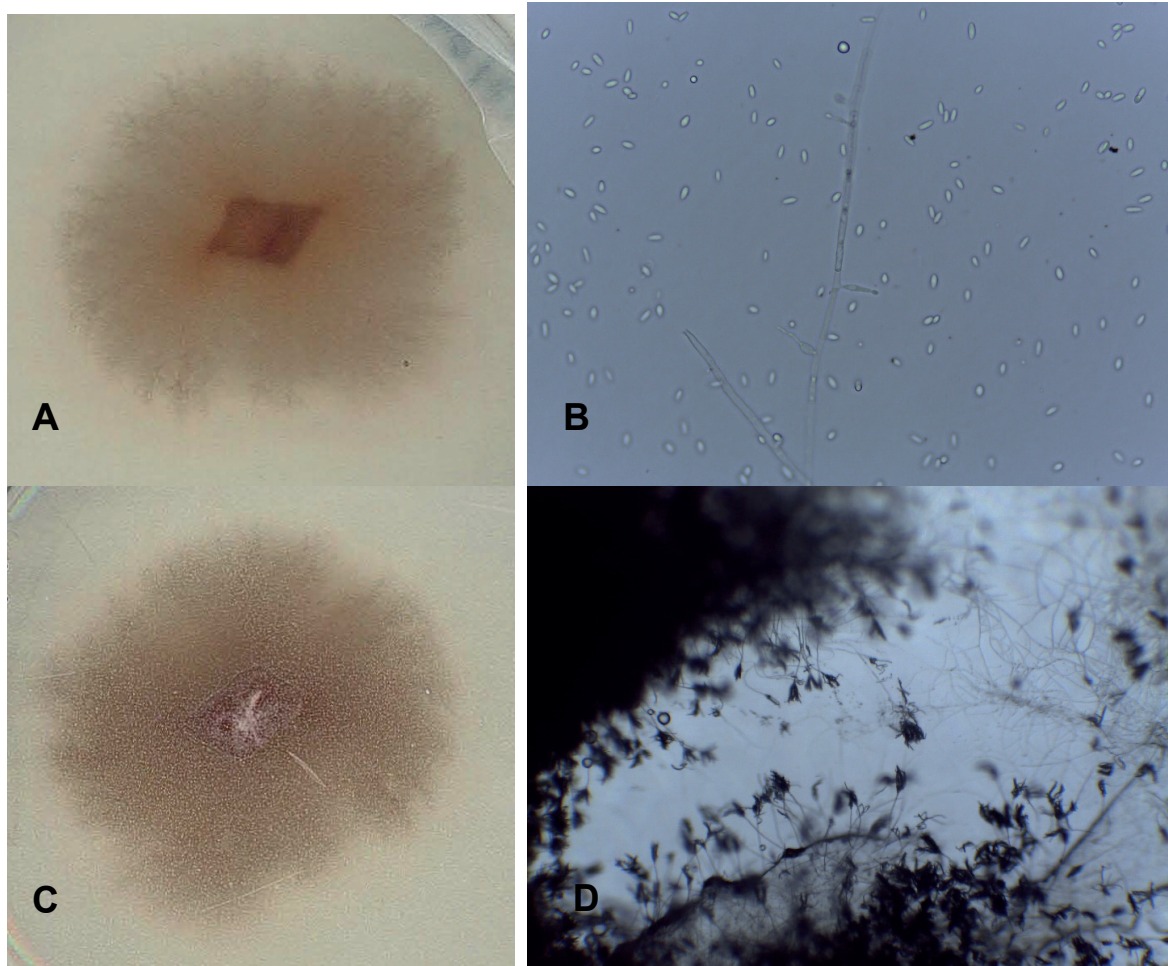


Figura 2. Características morfológicas de los aislados que corresponden con micelio algodonoso de coloración rosada (A) y microconidios de $7,238 \times 2,96 \mu\text{m}$ (B) de *Fusarium* sp.; micelio ligeramente algodonoso de tonalidad verde-azul (C) y conidióforo ramificado y desarrollo de conidios esféricos en cadenas de $2,56 \mu\text{m}$ de diámetro (D) de *Penicillium* sp.

Se ha informado que existen más de 8,000 especies de hongos que producen enfermedades en las plantas (8), los cuales se relacionan con los tejidos externos e internos de las mismas (9). En papa, los géneros *Fusarium* y *Penicillium* han sido informados causando enfermedad (10). La infección por *Fusarium* sp. se va expandiendo lentamente y las partes lesionadas se hunden y arrugan, tomando formas de anillos concéntricos, a medida que el tejido se va secando. De las lesiones emerge el micelio del hongo (11). Por otro lado, *Penicillium*, considerado un hongo de postcosecha, produce micotoxinas que dañan los frutos, flores y semillas de las plantas. Este hongo penetra a través de las lenticelas o por aberturas de la corteza, que en un principio la herida presenta un aspecto blanco y de consistencia acuosa y con el tiempo se hunde sobre sí misma (8).

Un amplio rango de microorganismos (hongos filamentosos, levaduras, bacterias, virus y viroides) se han identificado como contaminantes en el cultivo de tejidos vegetales. Los contaminantes pueden introducirse con el explante, durante la manipulación en el laboratorio (12) o por bacterias endofíticas (13).

Estos patógenos endófitos y epifíticos pueden interferir con el desarrollo del cultivo de tejidos y competir por los nutrientes, por lo que las contaminaciones microbianas en la base del explante o alrededor de él, constituyen una gran problemática en el cultivo *in vitro* (14), por lo que no se descarta que la infección por los hongos aislados en este estudio provengan del interior de los minitubérculos de papa. Por otro lado, se ha informado que estos dos géneros fúngicos se detectan frecuentemente en el cultivo de tejidos vegetales (15).

La mayoría de los problemas de contaminación en la papa, no solamente *in vitro*, sino también en campo, es debido a la propagación vegetativa de las plantas donde los patógenos y enfermedades se transmiten de generación en generación (16), resaltando aún más la importancia de obtener tubérculo-semilla con alta calidad fitosanitaria.

CONCLUSIONES

Fusarium y *Penicillium* son los hongos contaminantes identificados en el cultivo *in vitro* de ápices de papa en este estudio, provocando la contaminación total de los explantes, por lo que es de suma importancia la sanidad del material vegetal con que se inicia el cultivo de tejidos para el éxito de este sistema.

BIBLIOGRAFÍA

- Sharma, A. K. y Pandey, K. K. "Potato mini-tuber production through direct transplanting of *in vitro* plantlets in green or screen houses – a review". *Potato Journal*, vol. 40, no. 2, 2013, ISSN 0973-5909, [Consultado: 15 de junio de 2016], Disponible en: <<http://epubs.icar.org.in/ejournal/index.php/PotatoJ/article/view/35831>>.
- Sharma, A. K.; Venkatasalam, E. P. y Kumar, V. "Potato mini-tuber production during main and off crop seasons in high hills of North-Western Himalaya". *Potato Journal*, vol. 40, no. 1, 2013, pp. 29-37, ISSN 0973-5909.
- Mateus, R. J. F.; de Haan, S. y Rodríguez, D. A. "Genotype by Environment Effects on Potato Mini-Tuber Seed Production in an Aeroponics System". *Agronomy*, vol. 4, no. 4, 21 de noviembre de 2014, pp. 514-528, ISSN 2073-4395, DOI 10.3390/agronomy4040514.
- Guri, A. Z. y Patel, K. N. *Composiciones y métodos para prevenir la contaminación microbiana de medios de cultivo de tejidos vegetales*. no. CL. 7: C12N 5/02, Inst. Oficina Española de Patentes y Marcas, 16 de julio de 2006, España.
- Murashige, T. y Skoog, F. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". *Physiologia Plantarum*, vol. 15, no. 3, 1 de julio de 1962, pp. 473-497, ISSN 1399-3054, DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Rumzum, B. F. "In Vitro Meristem Culture and Regeneration of Three Potato Varieties of Bangladesh". *Research in Biotechnology*, vol. 4, no. 3, 24 de junio de 2013, ISSN 2229-791X, [Consultado: 15 de junio de 2016], Disponible en: <<http://researchinbiotechnology.com/article/view/123>>.
- Barnett, H. L. y Hunter, B. B. *Illustrated genera of imperfect fungi* [en línea]. 3.^a ed., Ed. Mycological Society of America, 1972, Minneapolis, USA, 241 p., DOI 10.2307/3757954, [Consultado: 15 de junio de 2016], Disponible en: <<http://www.jstor.org/stable/3757954>>.
- Agrios, G. N. *Plant pathology*. 5.^a ed., no. solc. SB731 .A35 2005, Ed. Elsevier Academic Press, 2005, Amsterdam, Boston, 922 p., ISBN 978-0-12-044565-3.
- Altan, F.; Bürün, B. y Sahin, N. "Fungal contaminants observed during micropropagation of *Lilium candidum* L. and the effect of chemotherapeutic substances applied after sterilization". *African Journal of Biotechnology*, vol. 9, no. 7, 2010, pp. 991-995, ISSN 1684-5315, DOI 10.4314/ajb.v9i7.
- Fiers, M.; Chatot, C.; Edel, H. V.; Le Hingrat, Y.; Konate, A. Y.; Gautheron, N.; Guillery, E.; Alabouvette, C. y Steinberg, C. "Diversity of microorganisms associated with atypical superficial blemishes of potato tubers and pathogenicity assessment". *European Journal of Plant Pathology*, vol. 128, no. 3, noviembre de 2010, pp. 353-371, ISSN 0929-1873, 1573-8469, DOI 10.1007/s10658-010-9657-2.
- Castro, I. y Contreras, A. *Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de la papa*. Ed. Imprenta Austral, 2011, Valdivia, Chile, 72 p., ISBN 978-956-345-156-6.

12. Leifert, C. y Cassells, A. C. "Microbial hazards in plant tissue and cell cultures". *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 37, no. 2, marzo de 2001, pp. 133-138, ISSN 1054-5476, 1475-2689, DOI 10.1007/s11627-001-0025-y.
13. Chandra, J. R. y Chandra, S. K. "Endogenous microbial contamination during *In vitro* culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam): identification and prevention". *Journal of Agricultural Technology*, vol. 7, no. 6, 2011, pp. 1725–1731, ISSN 1686-9141.
14. Naser, H. M.; Ahmed, E. M. M.; El-Hoseiny, H.; Abdelaziz, O. S. y Ibrahim, E. S. N. "Effect of nanoparticles on biological contamination of *in vitro* cultures and organogenic regeneration of banana". *Australian Journal of Crop Science*, vol. 8, no. 4, 2014, p. 612, ISSN 1835-2693, 1835-2707.
15. Msogoya, T.; Kanyagha, H.; Mutigitu, J.; Kulebelwa, M. y Mamiro, D. P. "Identification and management of microbial contaminants of banana *in vitro* cultures". *Journal of Applied Biosciences*, vol. 55, 2012, pp. 3987–3994, ISSN 1997-5902.
16. Alptekin, Y. "Integrated pest management of potatoes". *Agricultural Sciences*, vol. 2, no. 3, 2011, pp. 297-300, ISSN 2156-8553, 2156-8561, DOI 10.4236/as.2011.23039.

Recibido: 28 de abril de 2015

Aceptado: 3 de febrero de 2016