



ALTERNATIVES PRODUCTS IN THE *IN VITRO* DISINFESTATION IN ROOTSTOCK EXPLANTS DUKE-7 AND IDENTIFICATION OF ENDOPHYTE MICROORGANISMS †

[PRODUCTOS ALTERNATIVOS EN LA DESINFESTACIÓN *IN VITRO* EN EXPLANTES DE PORTAINJERTO DUKE-7 E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS]

Sandra L. Castro-Garibay¹, Angel Villegas-Monter^{1*},
Gabriel A. Hernández-Nava², Coral Mendoza-Ramos²,
Mercedes Martínez-Villagómez³, Claudia Reyes-Quiroz³
and Sergio Aranda-Ocampo²

¹Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, Posgrado en Fisiología Vegetal, km. 36.5, Texcoco, Estado de México C.P. 56230, Mexico. Emails: sandracastro9024@gmail.com; *villema53@hotmail.com

²Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, Posgrado de Fitosanidad-Fitopatología, km. 36.5, Texcoco, Estado de México C.P. 56230, México. Emails: gahna08@gmail.com; coralmendozaramos@gmail.com; arandasergio63@gmail.com

³Universidad Autónoma Chapingo, Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, km. 38.5 Carretera México-Texcoco C.P. 56230, México. Emails: martinezvillagomezmercedes@gmail.com; claudiareyesqroz@gmail.com

*Corresponding author

SUMMARY

Background. The vegetative material for *in vitro* establishment of avocado explants is from the field, for this reason, the proportion of contamination, oxidation and mortality of explants is elevated, therefore we are looking for alternatives to decreased. **Objective.** To evaluate concentrations of alternative products for disinfection in avocado explants cv Duke 7, and decrease oxidation with the addition of L-cysteine in the *in vitro* establishment. **Methodology.** The products used were: peroxyacetic acid (AP), chlorine dioxide (DC), and quaternary ammonium salts (ACS), in three concentrations. 54 explants were used in each treatment, and placed in culture medium for establishment, evaluating contamination (%) and oxidation (%). Two weeks later, 50% of viable explants from each treatment were immersed in L-cysteine (100 mgL⁻¹) and placed in a culture medium for multiplication, the rest was placed in a multiplication medium containing L-cysteine; only oxidation was evaluated (%). Contaminated explants were isolated, identified, and characterized fungi and bacteria. **Results.** The best results of the disinfection were with ACS with 3.7% contamination, without oxidation. Regarding the use of L-cysteine (100 mgL⁻¹), the lowest percentage of oxidation (47%) was obtained when immersed in a cysteine solution. Three genera of fungi were identified: *Aspergillus* (3), *Penicillium* (1) and *Cladosporium* (1), and *Agrobacterium* as a bacterium. **Implications.** With the proposed methodology, we can continue with the following stages of *in vitro* culture, to establish methodologies for budding, growth, and rooting of avocado clonal rootstocks. **Conclusions.** The use of ACS and cysteine in solution reduces both contamination and oxidation of explants, but it is necessary to modify concentrations and exposure times in the disinfection protocol, in addition to identifying even the genus the microorganisms found.

Keywords: contamination; L-cysteine; oxidation; quaternary ammonium salts.

RESUMEN

Antecedentes. Debido a que para el establecimiento *in vitro* de explantes de aguacate se utiliza material proveniente de campo, los porcentajes de contaminación, oxidación y mortandad son altos, por lo que se han buscado alternativas para disminuirlos. **Objetivo.** Evaluar concentraciones de productos alternativos para la desinfección en explantes de aguacate cv Duke 7, y disminuir la de oxidación con la adición de L-cisteína en el establecimiento *in vitro*.

† Submitted June 6, 2023 – Accepted November 11, 2023. <http://doi.org/10.56369/tsaes.5005>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = Sandra Luz Castro Garibay [0000-0003-1093-5558](https://orcid.org/0000-0003-1093-5558); Angel Villegas Monter [0000-0002-7166-6112](https://orcid.org/0000-0002-7166-6112); Gabriel Alejandro Hernández Nava [0000-0003-1484-3044](https://orcid.org/0000-0003-1484-3044); Coral Ramos Mendoza [0000-0002-9563-9274](https://orcid.org/0000-0002-9563-9274); Mercedes Martínez-Villagómez [0000-0003-1132-2630](https://orcid.org/0000-0003-1132-2630); Claudia Reyes-Quiroz [0000-0002-5094-3037](https://orcid.org/0000-0002-5094-3037); Sergio Aranda-Ocampo [0000-0002-4478-1465](https://orcid.org/0000-0002-4478-1465)

Metodología. Los productos utilizados fueron: Ácido peroxiacético (AP), Dióxido de cloro (DC) y sales cuaternarias de amonio (SCA), en tres concentraciones. Se utilizaron 54 explantes en cada tratamiento, y se colocaron en medio de cultivo para establecimiento, se evaluaron contaminación (%) y oxidación (%). Dos semanas después, 50 % de los explantes viables de cada tratamiento se sumergieron en L-cisteína (100 mg L⁻¹) y se colocaron en medio de cultivo para multiplicación, el resto se colocó en medio de multiplicación que contenía L-cisteína; solo se evaluó oxidación (%). De los explantes contaminados se aislaron, identificaron y caracterizaron hongos y bacterias. **Resultados.** El menor porcentaje de contaminación (3.7 %) se obtuvo con SCA, además de no presentar oxidación. Respecto al uso de L-cisteína (100 mgL⁻¹), el menor porcentaje promedio de oxidación (47 %) se obtuvo cuando se sumergieron en solución de cisteína. Se identificaron tres géneros de hongos: *Aspergillus* (3), *Penicillium* (1) y *Cladosporium* (1) y un género de bacteria: *Agrobacterium*. **Implicaciones.** Con la metodología planteada, se puede continuar con las siguientes etapas de cultivo *in vitro*, para establecer metodologías de brotación, crecimiento y enraizamiento de portainjertos clonales de aguacate. **Conclusiones.** El uso de SCA y cisteína en solución, disminuye tanto la contaminación y oxidación de explantes, pero es necesario modificar concentraciones y tiempos de exposición en el protocolo de desinfección, además de identificar hasta género los microorganismos encontrados.

Palabras clave: contaminación; L- cisteína; oxidación; sales cuaternarias de amonio.

INTRODUCCIÓN

En las plantaciones de aguacate en México se utilizan portainjertos provenientes de semilla de raza mexicana, lo que aumenta la susceptibilidad al oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands., que causa la muerte de raíces, base del tronco y posteriormente todo el árbol (Alberti *et al.*, 2018).

Una alternativa que se ha implementado es el uso de portainjertos clonales de genotipos tolerantes al oomiceto (Alberti *et al.*, 2018). Sin embargo, la dificultad que tienen para propagarse por enraizamiento de estacas y acodo, ha llevado al uso de la técnica de Frolich y Platt (1972), Método Brokaw y Allesbeste (Alberti *et al.*, 2018).

Con base en lo anterior, se ha utilizado el cultivo *in vitro* como alternativa para obtener clones de genotipos de interés (Alberti *et al.*, 2018). Debido a que el material vegetal utilizado es generalmente de árboles establecidos en campo o plantas de invernadero, el porcentaje de contaminación es alto, dificultando la obtención de explantes visualmente asépticos (Ibarra-López *et al.*, 2016). Hay protocolos donde utilizan cloruro de mercurio y/o cloruro de calcio, estos productos dañan el material vegetal y pueden ser cancerígenos para el usuario (El-Fadl *et al.*, 2022). A pesar de existir muchos protocolos de desinfección *in vitro*, los productos utilizados pueden destruir los microorganismos de la superficie de los explantes, pero no microorganismos endófitos, que, aunque no sean patógenos *in vivo*, en condiciones *in vitro* son microorganismos no deseados (El-Banna *et al.*, 2021). Hay evidencias del uso de ácido peroxiacético o paracético, dióxido de cloro e hipoclorito de sodio en el medio de cultivo, disminuyendo la contaminación en los explantes colocados (Cardoso y Petit, 2018; Srichuay *et al.*, 2018).

Otro problema, es la oxidación que causa muerte de los explantes. Para solucionarlo se han utilizado antioxidantes aplicándolos al medio de cultivo o exponiendo el material vegetal por minutos en solución acuosa (Güler *et al.*, 2021). Para poder multiplicar aguacate *in vitro* es importante desarrollar un protocolo eficiente para la desinfección de explantes y evitar oxidación, además que los productos utilizados no sean tóxicos para explantes, usuario y ambiente.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el uso de Ácido peroxiacético, Dióxido de cloro y Sales cuaternarias de amonio para la desinfección y de L-cisteína para evitar oxidación de explantes de portainjertos de aguacate, para el desarrollo de un protocolo eficiente de establecimiento *in vitro* de explantes de aguacate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

En julio de 2022 se recolectaron varetas de aguacate cv Duke 7, las cuales se encuentran dentro del invernadero 9 de la Universidad Autónoma Chapingo (19° 29'25.3" N, 98° 52'24.5" W), visualmente sanas, semileñosas o leñosas, con yema apical y de 5-6 yemas axilares. Se eliminaron las hojas, dejando 0.5 cm de cada peciolo; para transportarlas al laboratorio se colocaron en bolsas ziploc® y posteriormente en una hielera.

En el laboratorio de cultivo *in vitro* del edificio de Genética, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, estado de México, las varetas se lavaron con agua, jabón Roma ® y se frotaron con cepillo de dientes en sentido del crecimiento de las yemas, se enjuagaron y colocaron en agua desionizada.

Tratamientos y siembra *in vitro*

Los productos utilizados fueron: Dióxido de cloro (BIOXPY 10®), ácido peroxiacético (TerraClean®) y sales cuaternarias de amonio (Timsen®), las concentraciones fueron 1, 2 y 4 mL L⁻¹, para Timsen® se utilizaron 1, 2 y 4 g L⁻¹, en total 9 tratamientos con 54 repeticiones (explantes).

Dentro de la campana de flujo laminar se fraccionaron las varetas en secciones de tallo más yema, colocándolas en nueve frascos Gerber® con agua desionizada, para evitar deshidratación; el procedimiento de desinfestación usado fue: etanol al 80 % (v/v), peróxido de hidrógeno comercial 50 % (v/v) por 2 y 5 minutos, respectivamente; los tratamientos con productos alternativos durante 5 minutos y dos lavados con agua desionizada estéril (5 minutos cada uno), al terminar el procedimiento, las fracciones de tallo se mantuvieron en agua desionizada para evitar deshidratación (Figura 1).

Los componentes del medio de cultivo para establecimiento fueron: agar (Sigma®) y azúcar comercial no refinada; con 6 y 20 g L⁻¹ respectivamente, y 4 mM L⁻¹ de NH₄NO₃; estabilizado a pH 5.7 y esterilizado a 20 libras de presión en autoclave, por 15 minutos. Los explantes fueron colocados en tubos de ensayo (25 × 150 mm) con 10 mL del medio de cultivo antes mencionado. Dos semanas después los explantes se colocaron en medio de cultivo (Tabla 1) con y sin L-cisteína (100 mg L⁻¹), también se preparó la misma concentración de L-cisteína en solución acuosa, esterilizándose con las especificaciones antes mencionadas.

Del total de los explantes de cada tratamiento, la mitad de estos se colocaron en medio de cultivo con cisteína y la otra mitad se dejaron en la solución de cisteína durante 5 minutos y posteriormente se pusieron en medio sin antioxidante.

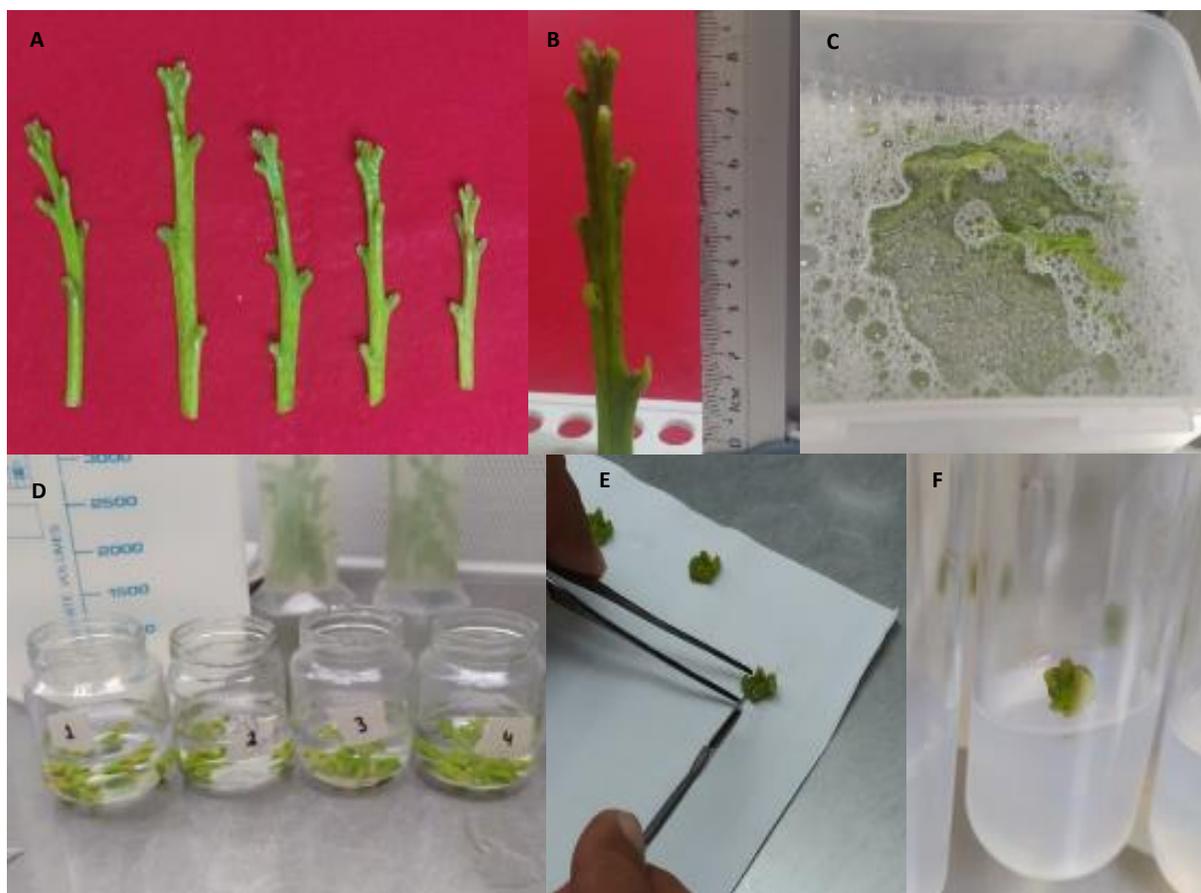


Figura 1. Proceso de desinfestación de explantes de aguacate cv Duke 7 colocados *in vitro*. A y B) varetas semileñosas a leñosas de Duke 7, C) lavado de varetas con agua y jabón Roma®, D-E) disección de explante y F) colocación de explantes en medio de cultivo de establecimiento.

Tabla 1. Medio de cultivo con y sin adición de cisteína para evitar oxidación en explantes de aguacate cv Duke 7

Nutrientes	Concentración
NH ₄ NO ₃	5 mM
KNO ₃	5 mM
Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O	0.2 mM
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.3 mM
KH ₂ PO ₄	0.3 mM
Quelatos*	0.03 mM
Micronutrientes**	0.1 mM
Ácido indolbutírico	0.098 µM
Kinetina	0.92 µM
Sacarosa	20 g
Agar	6 g

*Quelatos: FeSO₄ 7H₂O (695 mg) y Na EDTA (931 mg), preparados en 250 mL de agua. **Micronutrientes: H₃BO₃ (155 mg), MnSO₄ H₂O (422.5 mg), ZnSO₄ 7H₂O (215 mg), Na₂ MoO₄ H₂O (6.25 mg), CuSO₄ 5H₂O (0.625 mg) preparados en 250 mL de agua desionizada.

Aislamiento e identificación de microorganismos

Hongos

El crecimiento de los hongos se observó 4 días después de colocados en medio de cultivo *in vitro*, se dejaron crecer durante dos semanas para determinar si las cepas eran diferentes, identificándose seis. Las muestras se aislaron con un asa bacteriológica, transfiriendo micelo y esporas en cajas Petri con PDA Bioxon®, transcurridos 10 días de crecimiento se purificaron en medio de agua-agar (Agar-agar Merck®, 20 g L⁻¹), y cinco días después se aisló por punta de hifa a otra caja petri con PDA, para que el crecimiento no presentara contaminación. La caracterización se realizó 15 días después de la siembra; para observar estructuras desarrolladas se utilizó una solución de azul de anilina (0.025 g), cristales de fenol (10 g), glicerol (20 mL), ácido láctico (10 mL) y agua desionizada (10 mL); las estructuras se tomaron con cinta adhesiva transparente la cual se colocó en un portaobjeto que contenía tres gotas de la solución de azul de anilina; se observaron en microscopio estereoscópico y compuesto Carl Zeiss®.

Bacterias

La cepa se aisló de explantes de aguacate cv Duke 7 colocadas *in vitro*, dicha bacteria se sembró en medio de cultivo King's B, incubándola en estufa Riossa® modelo E71-D a 28 °C por 48 horas, después se realizaron pruebas fisiológica y bioquímica mediante tinción de Gram, oxidasa, catalasa, reacción de KOH; además la caracterización morfológica se realizó con microscopio estereoscópico Spencer®.

Prueba de hipersensibilidad en tabaco y actividad pectinolítica en papa.

Se realizaron pruebas de hipersensibilidad en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* "xanthi") infiltrando 1 mL de suspensión bacteriana a concentración de 1X10⁸ UFC mL⁻¹ ajustándola mediante la escala de McFarland (McFarland, 1907). Para la prueba de actividad pectinolítica en rodajas de papa, estas se colocaron en cámaras húmedas y se inocularon con suspensión bacteriana antes mencionada, se incubaron a 28 °C durante 48 h (Goszczyńska *et al.*, 2000) y posteriormente se observó el tejido.

Extracción de ADN

La extracción de ADN bacteriano se realizó mediante el método CTAB, se agregaron 600 µL de CTAB 2% (1.4 M NaCl, 0.02 M EDTA, 0.1 M Tris-HCl pH 8, y 2 g de CTAB por 100 mL de buffer) y 3µL de Beta-Mercaptoetanol, se mezcló con agitador vórtex por 10 s, e incubaron a 65° C durante 15 min. Posterior se agregaron 400 µL de cloroformo, se mezcló nuevamente con agitador vórtex por 10 s y se centrifugó a 13 500 rpm por 10 min. En un microtubo nuevo se colectaron 500 µL, agregando 500 µL de isopropanol y 50 µL de acetato de amonio, mezclando por inversiones suaves. Se incubó por 20 min a -20° C. Pasado ese tiempo, se centrifugó a 13 500 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. A la pastilla se agregaron 1000 µL de etanol, centrifugando 13 500 rpm por 10 min y se desechó el etanol. Por último, se procedió a secar la pastilla durante 30 min, para luego suspenderla en 30 µL de agua libre de nucleasas. Se verificó la calidad del ADN extraído en Nanodrop y electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación del gen 16S rRNA se utilizaron los cebadores universales 8 F (3'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-5') y 1492 R (3'GGTTACCTTGTTACGACTT-5') (Galkiewicz y Kellogg, 2008). El volumen de reacción fue de 25 µL, la cual contenía 5 µL de la muestra, 1.5 U de Taq polimerasa, 2.5 µL de Buffer 10X, MgCl₂ 1.8 mM (concentración final), 10 pmol de cada primer (forward - reverse), dNTPs 0.3 mM (concentración final mezcla) y agua grado PCR hasta completar el volumen final. Las condiciones de termociclaje fueron: desnaturalización inicial del ADN a 95 °C por 2 min, seguida de 30 ciclos a 95 °C por 1 min, 55 °C por 30 s, 72 °C por 1 min y extensión final a 72 °C por 10 min. Se visualizó el producto de PCR en gel de agarosa al 1% a 120 V, durante 60 minutos. Los geles fueron visualizados con luz UV en transiluminador General Electric. Posteriormente, el producto fue secuenciado por la empresa Macrogen en Corea.

VARIABLES EVALUADAS

Para el experimento de establecimiento se evaluó porcentaje de contaminación y oxidación durante dos semanas. Y con la adición de cisteína al medio de cultivo solo se determinó el porcentaje de oxidación durante cuatro semanas. La identificación de hongos y bacteria se hizo a nivel de género.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Productos alternativos: contaminación y oxidación de explantes

De los productos utilizados, ácido peroxiacético (AP) y dióxido de cloro (DC) presentaron mayor contaminación promedio con 30.9 y 17.3 % respectivamente, mientras que las sales cuaternarias de amonio (SCA) 3.7 % (Figura 2). Cabe indicar que la mayor disminución se presentó con AP, donde se redujo 60% de T1 a T2, y de 9 % en DC, mientras que, en SCA no hubo cambios. Llama la atención que esta tendencia no se mantuvo para AP y DC, donde los porcentajes incrementaron; mientras que, en SCA la contaminación fue cero.

Kwaśniewska *et al.* (2020) clasifican los productos usados para la desinfección de acuerdo a su manera de actuar, AP y DC pueden catalogarse como oxidantes y las SCA como biocida activo de membrana.

En el establecimiento de explantes de aguacate en cultivo *in vitro* los productos utilizados son hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones o tiempos de

exposición, fungicidas sistémicos (Rabuma *et al.*, 2020) con 10 % de explantes contaminados. Sin embargo, también es común que se utilice cloruro de mercurio (El-Fadl *et al.*, 2022), aun cuando este producto puede ser cancerígeno. La ventaja que tienen los productos en el presente trabajo es que son amigables con el ambiente, y hasta ahora no se tiene evidencia que sean perjudiciales a la salud humana; respecto a las SCA el porcentaje de contaminación es de 5.6 %, siendo opción viable para la desinfestación de explantes.

Los hongos y bacterias fueron los microorganismos que más proliferaron; la contaminación por hongos fue 18.5, 16 y 3.1 % del total de los explantes para AP, DC y SCA, respectivamente; mientras que, para bacterias fue 12.3, 1.2 y 0.6 % en el orden antes mencionado. Teixeira da Silva *et al.* (2016) mencionan que hay varios factores que aumentan la probabilidad de contaminación *in vitro* los cuales son: sitio (campo o invernadero), época de recolecta, tipo y tamaño de explante, además de concentración y tiempo de los desinfectantes utilizados.

Debido al modo de acción de los desinfectantes (Kwaśniewska *et al.*, 2020) de los productos usados, es probable que hongos y bacterias causantes de la contaminación sean microorganismos endófitos. El-Banna *et al.* (2021) mencionan que estos microorganismos viven dentro de las plantas por lo que sobreviven a la desinfección superficial, aunque no necesariamente son patógenos, sí son problema en cultivo *in vitro* ya que la tasa de crecimiento es más rápida que la de los explantes.

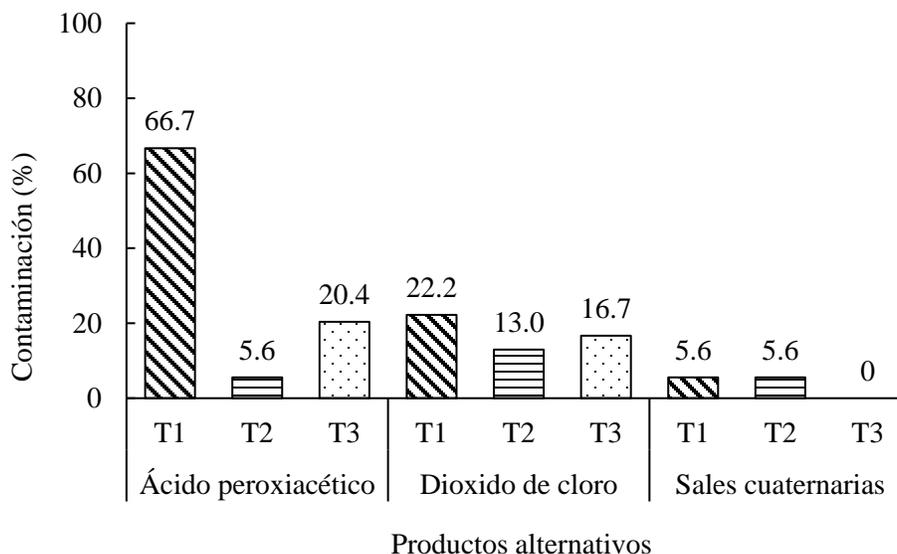


Figura 2. Porcentaje de contaminación de aguacate Duke 7, utilizando productos alternativos para la desinfestación; T1: 1 mL L⁻¹; T2: 2 mL L⁻¹; T3: 4 mL L⁻¹; en el caso de sales cuaternarias de amonio se utilizaron g L⁻¹ (n = 54).

La eficacia de las SCA para eliminar microorganismos superficiales y endófitos en los explantes de aguacate con las características utilizadas, puede deberse a que las SCA penetraron dentro del tejido. Warren (2013) reporta que algunas plantas tienen la capacidad de absorber moléculas intactas de amonio cuaternario, lo que puede estar asociado a la contaminación mínima de los explantes.

Respecto a la oxidación, con AP y DC se obtuvieron en promedio 76.6 y 24 %, pero en esta variable se distingue una relación positiva entre concentración y oxidación de explantes (Figura 3), para AP y DC. Mientras que con SCA no hubo tal efecto.

Probablemente por la naturaleza de AP y DC (Kwaśniewska *et al.*, 2020) el efecto de oxidación fue parcial o total en los explantes. El ácido peroxiacético es utilizado para reducir la carga de esporas en poscosecha de frutas y hortalizas obteniendo resultados con concentraciones desde 0.05 % (Kyanko *et al.*, 2010), tal vez el alto porcentaje de oxidación en los explantes está asociado a las concentraciones altas que se utilizaron (0.1, 0.2 y 0.4 %) en comparación a lo reportado en la literatura. Es probable que la ausencia de oxidación causada por las SCA es también efecto del modo de acción del desinfectante ya que estas a diferencia de AP y DC, no forman compuestos reactivos de oxígeno, por lo que se evita la oxidación de tejidos.

Uso de L-cisteína como antioxidante

Además de la contaminación durante el establecimiento de explantes de aguacate, otro problema es la oxidación. De los tratamientos utilizados con la aplicación de cisteína, se determinó que el mayor porcentaje de explantes oxidados (89 %) se obtuvieron cuando el antioxidante se mezcló y esterilizó con los componentes del medio. En contraste, hubo más explantes viables en promedio (52 %) cuando la cisteína no se adicionó al medio de cultivo (Figura 4).

Vásquez-Hernández *et al.* (2021) obtuvieron 43 % de explantes viables de *Pimienta dioica* utilizando concentraciones de 50 – 200 mg L⁻¹ de cisteína agregada en medio de cultivo MS. Al esterilizar el medio de cultivo los componentes de este se degradan, existiendo cambios en su composición química (García-González *et al.*, 2010), probablemente el efecto de la cisteína en los explantes de aguacate fue debido a estas reacciones en el medio de cultivo. Para aguacate además del uso de cisteína, también se ha experimentado con antioxidantes como: ácido ascórbico, ácido cítrico, carbón activado y polivinilpirrolidona (PVP), obteniendo hasta 83 % de explantes viables (Güler *et al.*, 2021).

La oxidación en los explantes se debe a varios factores, desde las condiciones de cultivo, edad del explantes por la concentración de compuestos fenólicos presentes, hasta el proceso de desinfección y cortes realizados a los explantes (Nieto *et al.*, 2018).

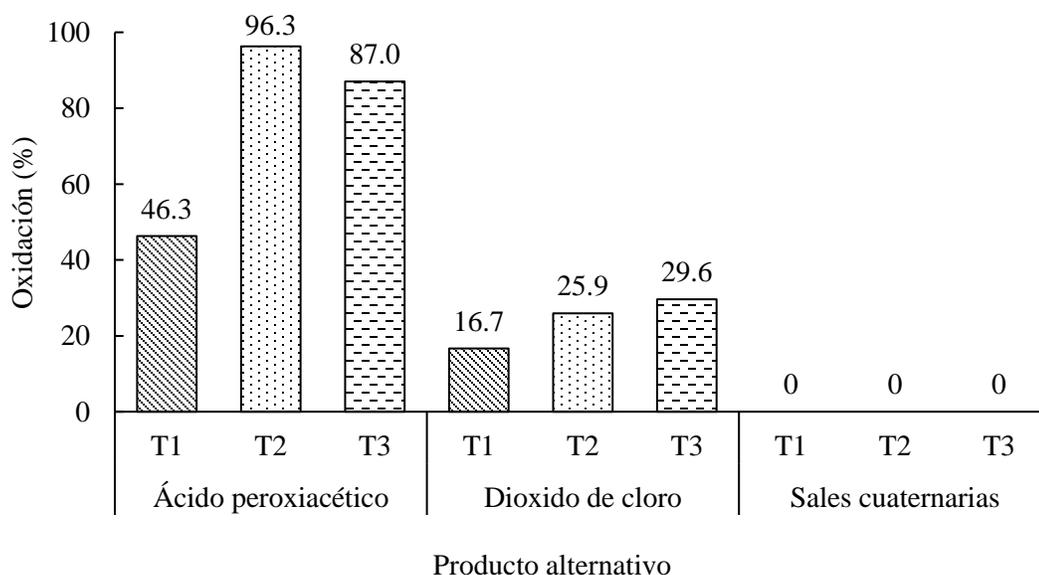


Figura 3. Porcentaje de oxidación de explantes de aguacate Duke 7, en medio con ácido peroxiacético, y dióxido de cloro (T1: 1 mL L⁻¹; T2: 2 mL L⁻¹; T3: 4 mL L⁻¹) y sales cuaternarias de amonio donde se utilizaron g L⁻¹ (n = 54).

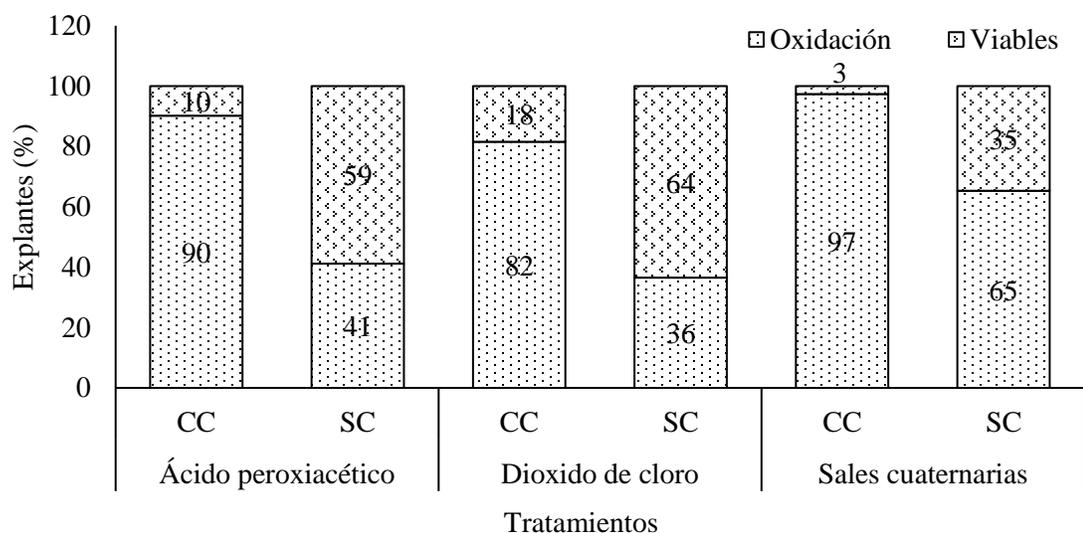


Figura 4. Porcentaje de oxidación de explantes de aguacate Duke 7, en medio de cultivo con y sin cisteína (100 mg L⁻¹). CC: medio de cultivo con cisteína; SC: medio de cultivo sin cisteína; n= 51 para ácido peroxiacético; n= 74 para dióxido de cloro; n= 75 para sales cuaternarias, por tratamiento.

Cruz-Gutiérrez *et al.* (2020) mencionan que la cisteína actúa en la remoción de las quinonas (fenoles que causan oxidación y muerte de explantes) durante el cultivo *in vitro*. Aunque los resultados presentados son alentadores, es preferible hacer modificaciones ya sea en la concentración o tiempo de exposición para aumentar la cantidad de explantes viables de aguacate.

Identificación de microorganismos

Hongos

Con la caracterización morfológica se identificaron seis cepas de hongos: *Aspergillus* spp. (3), *Cladosporium* sp. (1) y *Penicillium* sp. (2) (Figura 5). Sólo una cepa se identificó a nivel de especie por las estructuras características del mismo, *Aspergillus niger* para la cepa A11 (Figura 5).

Aspergillus sp y *Penicillium* sp. son cepas comúnmente encontrado en varios cultivos en tejido, rizosfera y suelo (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013), mientras que *Cladosporium* sp, es un hongo cosmopolita encontrado en suelo y agua, que afecta principalmente a cereales, cucurbitáceas y tomates (Ogórek *et al.*, 2012).

Cabe resaltar que el crecimiento que presentaron los hongos al inició fue en el medio de cultivo y posteriormente invadieron todo el explante, lo que hace suponer que son microorganismos endófitos de la planta de donde se obtuvieron los explantes. Hyde y Soyong (2008) mencionan que los microorganismos

endófitos viven inter e intracelulares de los tejidos vegetales de manera asintomática, teniendo interacciones de diversos tipos con la planta.

Shetty *et al.* (2016) aislaron e identificaron molecularmente 17 especies de hongos endófitos de aguacate de plantaciones manejadas orgánica y convencionalmente, encontrando la cepa *Cladosporium*, al igual que en este trabajo.

Cuando se colectaron los explantes no había síntomas ni signos de algún patógeno, por lo que es probable que los hongos aislados no causen daño a la planta, sino que exista algún tipo de simbiosis. Hakizimana *et al.* (2011) mencionan que los hongos endófitos pueden utilizarse como biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* Rands. Si se quiere probar aspectos de biocontrol, es necesario hacer otras pruebas, para poder concluir al respecto.

Bacterias

Caracterización morfológica e identificación molecular

La caracterización morfológica en la cepa bacteriana fue: lisa, blanca, convexa y mucosida; mientras que, de acuerdo con la identificación molecular la amplificación del gen 16S rRNA (primer 8 F y 1492 R) mostró un fragmento de 1170 pares de bases (Figura 6C). La secuencia obtenida se comparó con la base de datos del NCBI, con la herramienta Blast, con la cual se determinó similitud del 100% con *Agrobacterium* (Figura 6).

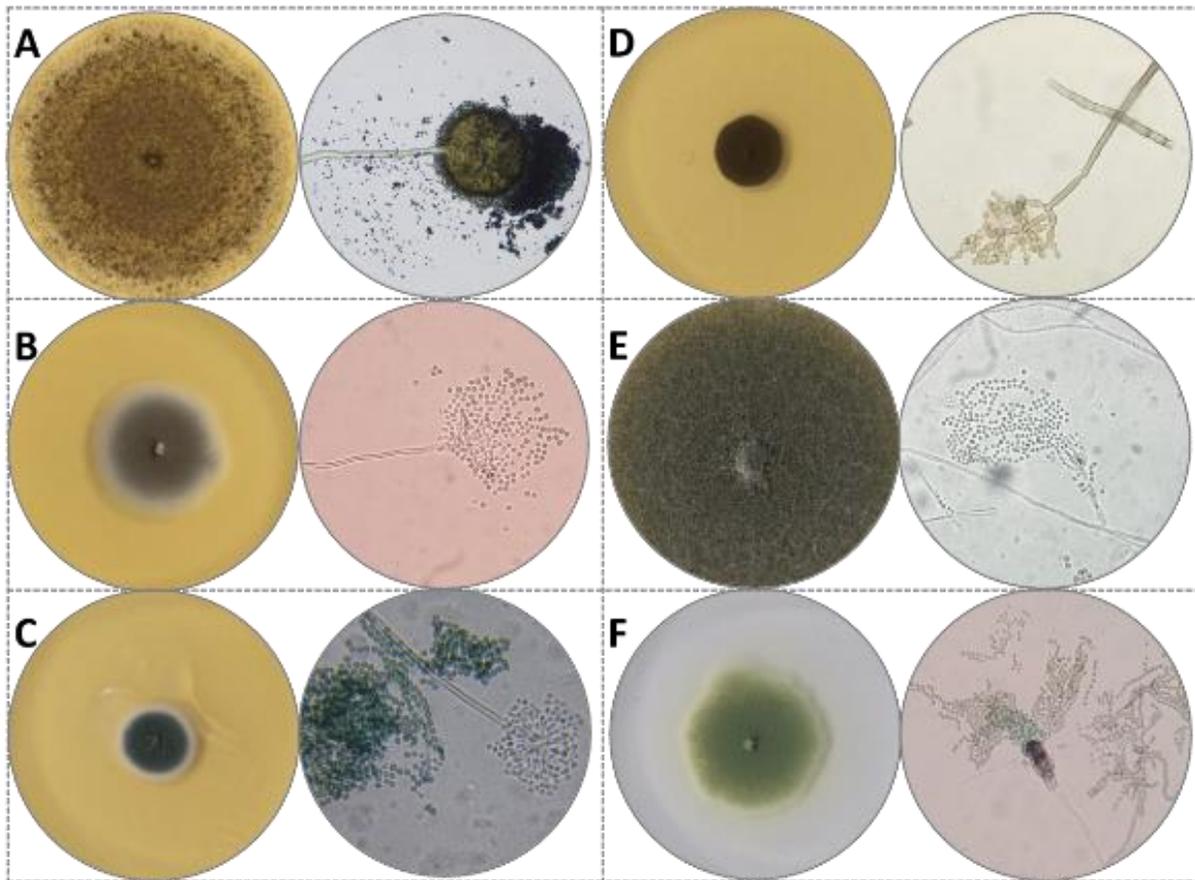


Figura 5. Caracterización morfológica de 6 cepas de hongos causantes de contaminación *in vitro* en explantes de Duke 7. En la izquierda de cada imagen se muestra el crecimiento micelial por punta de hifa en medio de cultivo PDA y a la derecha la estructura representativa. A) cepa AI1, *Aspergillus niger*; B) y C) AI2 – AI3, *Aspergillus* sp.; D) AI4, *Cladosporium* sp.; E) y F) AI5 y AI6, *Penicillium* sp.

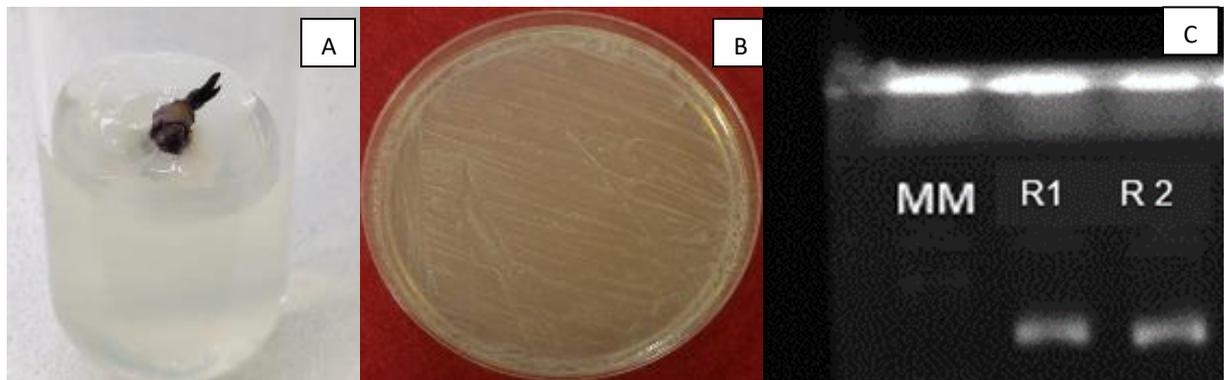


Figura 6. Morfología e identificación molecular de cepa bacteriana, colonia de *Agrobacterium* sp en medio King's B. A) Explante de aguacate contaminado *in vitro*; B) cepa bacteriana en crecimiento; C) Amplificación de primer 8 F y 1492 R (R1: repetición 1, R2: repetición 2)

Caracterización fisiológica y bioquímica

Agrobacterium sp. aislada de explantes de aguacate *in vitro* dio negativo a reacción de hipersensibilidad en

tabaco lo que manifiesta la ausencia del sistema de secreción tipo III el cual está regulado por los genes hypersensitive response and pathogenicity (**hrp**) lo que nos dice que la reacción de hipersensibilidad es una

respuesta incompatible (no enfermedad) a causa de los genes de resistencia de la planta. Así mismo, dio negativo a pudrición de papa lo que sugiere que no emplea el sistema de secreción tipo I y II. La cepa de *Agrobacterium* sp. evaluada mostró ser aeróbica, con capacidad de reducir nitratos lo que indica que presenta la enzima nitrato reductasa por lo tanto es capaz de reducir nitratos a nitritos (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación fisiológica y bioquímica de *Agrobacterium* sp

Característica	<i>Agrobacterium</i> sp.
Hipersensibilidad en tabaco	-
Pudrición de papa	-
Tinción de Gram	-
Reacción KOH	+
Crecimiento anaeróbico	-
Oxidasa	-
Catalasa	+
Fluorescencia en medio B de King	-
Colonia mucoides	+
Hidrolisis de gelatina	+
Dihidrolasa de Arginina	-
Hidrólisis de almidón	-
Levana	-
Reducción de nitratos	+
Indol	-

El género *Agrobacterium* generalmente se asocia con bacterias patógenas, sin embargo, hay cepas que no lo son (Holmes y Roberts, 1981). Probablemente la cepa de *Agrobacterium* identificada en el presente trabajo se trate de alguna especie no patógena, ya que, en las pruebas de hipersensibilidad de tabaco y pudrición de papa, la respuesta fue negativa, además en la planta de donde se obtuvieron los explantes no presenta las agallas típicas que causa esta bacteria; sin embargo, para aseverar o rechazar tal premisa, es necesario hacer más pruebas.

Una particularidad de *Agrobacterium* son las agallas o tumores que forma en el cuello de la raíz o arriba de esta zona, ya que es un microorganismo que generalmente penetra por la raíz (Nester, 2015). Una peculiaridad de la cepa identificada es que se encontraba en la copa del árbol (explante), en *Ficus benjamina* se encontró una especie nueva de la bacteria en cuestión *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., aislada de las ramas de *Ficus* (Bouzar y Jones, 2001), sin embargo, esta cepa es patógena; caso contrario para la cepa aislada en el presente trabajo (de acuerdo con las pruebas realizadas).

Si bien las agrobacterias son comunes en la microbiota del suelo, tanto en forma saprobia como patógena, se conoce poco sobre la estructura de estas poblaciones bacterianas, principalmente a la dificultad de detectar su presencia en el suelo, la rizosfera y el material vegetal asintomático (Peluso *et al.*, 2003).

Korsten *et al.* (1995) aislaron *Agrobacterium radiobacter* de hojas de árboles de aguacate cv Fuerte, dicha especie es catalogada como no patógena (Alippi *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

El uso de sales cuaternarias de amonio para la desinfestación *in vitro* de aguacate, es la opción más viable. Es preferible utilizar solución de cisteína líquida, para disminuir la oxidación de explantes de aguacate. Es necesario realizar ajustes en las concentraciones o tiempos de exposición, para eficientizar el protocolo aquí mencionado para tratar de eliminar los hongos y bacterias identificadas. Es necesario hacer identificación a nivel de especies de hongos y bacterias, con el propósito de poder dar mejor manejo de las plantas previo al establecimiento *in vitro*.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional Mexiquense de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico de la Cátedra COMECYT 2022, para realizar el presente trabajo.

Funding. The research costs were financed by the authors.

Declaration of conflict of interest. The authors declare that they have no conflict of interest in carrying out this research.

Compliance with ethical standards. Informed consent was obtained from all persons involved in the research.

Data availability. Data is available from the author for correspondence (Angel Villegas Monter: vilema53@hotmail.com).

Author contribution statement (CRediT). S.L.

Castro-Garibay: Data curation, writing – original draft. **A. Villegas-Monter:** Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing. **G.A. Hernández-Nava:** Investigation, Methodology. **C. Mendoza-Ramos:** Investigation, Methodology. **M. Martínez-Villagómez:** Investigation, Resources. **C. Reyes-Quiroz:** Investigation, Resources. **S. Aranda-Ocampo:** Resources.

REFERENCIAS

- Alberti, M. F., Brogio, M.B, da Silva, S.R., Avilés, T.C. and Fassio, C., 2018. Avances en la propagación del aguacate. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40(6), pp. 1-18. <https://doi.org/10.1590/0100-29452018782>
- Alippi, A.M., López, A.C. and Balatti, P.A., 2011. Métodos para la detección de *Agrobacterium* a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua. *Revista Argentina de Microbiología*, 43(4), pp. 278-286. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412011000400008
- Bouzar, H and Jones, J.B. 2001. *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumors of *Ficus benjamina*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), pp. 1023-1026. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-1023>
- Cardoso, J.C. and Petit I.A.C., 2018. Easy and efficient chemical sterilization of culture medium for *in vitro* growth of gerbera using chlorine dioxide (ClO₂). *Ornamental Horticulture*, 24(3), pp. 218 – 224. <https://doi.org/10.14295/oh.v24i3.1222>
- Cruz-Gutiérrez, E.J., Hernández-Fuentes, L.M. and Gómez-Reyes, L.A., 2020. Uso de L-Cisteína para el control de oxidación *in vitro* de *Annona muricata* L. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, 6(3), pp. 1-6. <https://www.remai.ipn.mx/index.php/REMAI/article/view/75>
- El-Banna, A.N., El-Manhrouk, M.E., Dewir, Y.H., Fair, M.A. Abou E, M.D. and Schumacher, H.M., 2021. Endophytic bacteria in banana *in vitro* cultures: molecular identification, antibiotic, susceptibility, and plant survival. *Horticulturae*, 7(12), pp. 1-13. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7120526>
- El-Fadl, A., Reda, E., Ahmad, M.E. and Abd Alhady, M.R.A., 2022. *In vitro* propagation of avocado (*Persea americana* Mill.). *Egyptian Journal Desert Research*, 72(1), pp. 73-87. https://ejdr.journals.ekb.eg/article_255678.html
- Frolich, E.F. and Platt, R.G., 1972. Use of the etiolation technique in rooting avocado cuttings. California. Avocado Society Year Book. 55:97-109.
- Galkiewicz, J.P. and Kellogg, C.A, 2008. Cross-Kingdom amplification using Bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. *Applied Environmental Microbiology*, 74(24), pp. 7828-7831. <https://doi.org/10.1128/AEM.01303-08>
- García-González, R., Quiroz, K., Carrasco, B. and Caligari, P., 2010. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia e Investigación Agraria*, 37(3), pp.5-30. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202010000300001>
- Goszczyńska, T., Serfontein, J.J. and Serfontein, S., 2000. Introduction to Practical Phytobacteriology. Bacterial disease unit. ARC-Plant Protection Research Institute Pretoria, South Africa.
- Güler, G., Gübbük, H. and Arslan, M.A., 2021. The effect of antioxidants on micropropagation of avocado by nodal segments. *Horticultural Studies*, 38(1), pp. 50 – 55. <https://doi.org/10.16882/hortis.900936>
- Hakizimana, J.D., Gryzenhout, M., Coutinho, T.A. and van den Berg, N., 2011. Endophytic diversity in *Persea americana* (avocado) trees and their ability to display biocontrol activity against *Phytophthora cinnamomi*. in *Proceedings VII World Avocado Congress*, September 5-9, Cairns, Australia.
- Holmes, B. and Roberts, P., 1981. The classification, identification and nomenclature of Agrobacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 50(3), pp. 443 – 467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1981.tb04248.x>
- Hyde, K.D. and Soyong, K., 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33, pp. 163 –173. <https://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/33-9.pdf>
- Ibarra-López, A., Ojeda-Zacarias, M.C., García-Zambrano, E.A. and Gutiérrez-Diez, A., 2016. Inducción *in vitro* de dos cultivares de aguacate raza Mexicana *Persea americana* var. *dyrmifolia* Schldtl. & Cham. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(2), pp. 337 – 347.

- https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016000200337
- Korsten, L., De Jager, E.S. and De Villiers, E.E., 1995. Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biocontrol of avocado postharvest diseases. *The American Phytopathological Society*, 79 (11), pp. 1149-1153. <https://doi.org/10.1094/PD-79-1149>
- Kwaśniewska, D., Chen, Y.L. and Wiczorek, D., 2020. Biological activity of quaternary ammonium salts and their derivatives. *Pathogens*, 9(6), pp. 1-12. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060459>
- Kyanko, M.V., Russo, M.L., Fernández, M. and Pose, G., 2010. Efectividad de ácido peracético sobre la reducción de la carga de esporas de mohos causantes de pudrición poscosecha de frutas y hortalizas. *Información tecnológica*, 21(4), pp. 125-130. <https://doi.org/10.1612/inf.tecnol.4299it.09>
- McFarland, J., 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 49, pp. 1176-1178. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001f>
- Nester, E.W., 2015. *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. *Frontiers in Plant Science*, 5, pp. 1-16. <http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00730>
- Nieto R, M.I., García T, J.F., Caltzontzin R, V., Chávez J, R. and Estrada S, M.L., 2018. Efecto de las condiciones de cultivo en la producción de fenoles, flavonoides totales y su capacidad antioxidante en el árnica (*Heterotheca inuloides*). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 21, pp. 4296 – 4305. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i21.1530>
- Ogórek, R., Lejman, A., Pusz, W., Miłuch, A. and Miodyńska, P., 2012. Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. *Mikologia lekarska*, 19(2), pp. 80-85. https://www.researchgate.net/publication/233818972_Characteristics_and_taxonomy_of_Cladosporium_fungi
- Peluso, R., Raio, A., Morra, F. and Zoina, A., 2003. Physiological, biochemical and molecular analyses of an Italian collection of *Agrobacterium tumefaciens* strains. *European Journal of Plant Pathology*, 109, pp. 291-300. <http://doi.org/10.1023/A:1023556108085>
- Rabuma, T., Kassaye, E.; Asfere, Y. and Abera, G., 2020. Optimization of efficient protocol for *in vitro* mass propagation of selected accessions of avocado (*Persea Americana* Mill) by auxiliary and apical buds culture. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 21(71&72), pp. 75-87. <https://www.ikppress.org/index.php/PCBMB/article/view/5767>
- Sánchez-Fernández, R.E., Sánchez-Ortiz, B.L., Sandoval-Espinosa, Y.K.M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M.C. and Macías-Rubalcava, M.L., (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), pp. 132-146. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2013000200006
- Shetty, K.G., Rivadeneira, D.V., Jayachandran, K. and Walker, D.M., 2016. Isolation and molecular characterization of the fungal endophytic microbiome from conventionally and organically grown avocado trees in South Florida. *Mycological Progress*, 15(6), pp. 1-10. <http://doi.org/10.1007/s11557-016-1219-3>
- Srichuay, W., Promchan, T. and Te-chato, S., 2018. Effect of Chlorine Dioxide (ClO₂) on culture medium sterilization on micropropagation of persian violet (*Exacum affine* Balf.f. ex Regel). *International Journal of Agricultural Technology*, 14(2), pp. 259-270. <https://www.thaiscience.info/Journals/Article/IJAT/10989145.pdf>
- Teixeira da Silva, J.A., Winarto, B., Dobránszki, J., Cardoso, J.C. and Zeng, S., 2016. Tissue disinfection for preparation of *Dendrobium in vitro* culture. *Folia Horticulture*, 28(1), pp. 57-75. <http://doi.org/10.1515/fhort-2016-0008>
- Vásquez-Hernández, S., Cruz-Cruz, C.A., Santiago-Santiago, M. and Bello-Bello, J.J., 2021. Evaluation of different antioxidants during *in vitro* establishment of allspice (*Pimenta*

dioica L. Merrill): a recalcitrant species. *Agro Productividad*, 7, pp. 1-9.
<http://doi.org/10.32854/agrop.v14i11.2167>

Warren, C.R., 2013. Quaternary ammonium compounds can be abundant in some soils and are taken up as intact molecules by plants. *New Phytologist*, 198, pp. 476-485.
<http://doi.org/10.1111/nph.12171>