

Influencia de metabolitos fitotóxicos de *Alternaria porri* (Ellis) Ciferri sobre plantas y callos de *Allium sativum* L. con vista al fitomejoramiento

Yiliam González Moya^{1*}, Ramón Santos Bermúdez², Bárbara Campanioni González², Lidcay Herrera Isla³, Ricardo Hernández Pérez¹ y Xiomara Rojas Moya¹. *Autor para correspondencia.

¹ Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales. Apdo 6, Santo Domingo, CP 53 000, Villa Clara, Cuba. e-mail: inivit@enet.cu

² Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón km 9 Ciego de Ávila, Cuba. e-mail: rsantos@bioplanta.cu

³ Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Cuba. e-mail: lidcayhi@agronet.uclv.edu.cu

RESUMEN

Con el objetivo de obtener metabolitos fitotóxicos de *Alternaria porri* (Ellis) Ciferri y conocer su influencia sobre plantas y callos de ajo con vistas al mejoramiento genético de la resistencia a la alternariosis, se llevó a cabo el presente trabajo. Para la obtención de los filtrados de cultivos se utilizó el medio de cultivo Fries a los 30 días de inoculado el hongo, el cual se cultivó estáticamente a 28±1 °C y oscuridad constante. Los ensayos biológicos, utilizando varias concentraciones del filtrado de cultivo, se realizaron sobre plantas de diferentes edades del clon de ajo 'Criollo' mediante el método de punción y sobre callos del clon 'Chileno'. El mayor efecto fitotóxico se observó en plantas de 110 días de edad cuando fueron inoculadas con el filtrado concentrado al 70% de su volumen inicial. Los callos tuvieron pérdida de peso y cambio en la coloración cuando el filtrado se concentró por encima del 40%.

Palabras clave: *Allium sativum*, mejoramiento genético, selección *in vitro*

ABSTRACT

In order to obtain phytotoxic metabolites from *Alternaria porri* and to know their influences on garlic plants and calli in plant breeding for resistance to alternariosis, a research was carried out. Filtrates were obtained in Fries medium 30 days after fungus incubation which was statically cultivated at 28±1 °C and constant darkness. Biological assays using several filtrate concentrations were developed in garlic plants of different ages (clone 'Criollo') through puncture method and also in garlic calli (clone 'Chileno'). The highest phytotoxic effect was observed in 110 days old plants when they were inoculated with filtrates concentrated at 70% initial volume. Calli showed weight losses and changed their coloration when filtrate was concentrated above 40%.

Key Words: *Allium sativum*, *In vitro* selection, Plant breeding

INTRODUCCIÓN

La mancha púrpura causada por *Alternaria porri* (Ellis) Ciferri es considerada la enfermedad de mayor importancia en el ajo, la cual ha sido referida como el principal problema en la mayoría de los países donde se cultiva esta liliácea y tradicionalmente su control se ha venido realizando utilizando fungicidas, los cuales ejercen una acción letal sobre el inóculo sin importar la raza del hongo presente (Rodríguez *et.al.*, 2001).

Se han realizado investigaciones en la selección *in vitro* de diferentes cultivos resistentes a enfermedades ya que los métodos de evaluación de la resistencia de las mismas en condiciones de campo resultan lentos y engorrosos en los esquemas de mejoramiento (Fornet, 1991). Los métodos de selección precoz se han convertido en un complemento muy valioso en cualquier

programa de mejoramiento genético para la obtención de individuos resistentes a las enfermedades (Santos, 2000). El empleo de filtrados y toxinas de hongos e incluso cultivos duales para este proceso son prometedores (Gómez, 1998). Por tanto los objetivos del trabajo fueron: determinar la actividad biológica de los metabolitos fitotóxicos aislados de *Alternaria porri* en plantas y callos de ajo y estudiar la efectividad del uso de los metabolitos fitotóxicos de *Alternaria porri* para la selección de la resistencia a la mancha púrpura en ajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se utilizaron los clones de ajo 'Chileno' y 'Criollo', los cuales se seleccionaron teniendo en cuenta el

criterio de campesinos de la zona en cuanto a susceptibilidad a la enfermedad mancha púrpura.

Obtención del filtrado fitotóxico

Para la obtención de los filtrados se emplearon Erlenmeyers de una capacidad de 500 ml que contenían 200 ml del medio de cultivo Fries modificado (Luke y Wheeler, 1955). El pH del mismo fue ajustado a 5.6 previo a la esterilización que se realizó a 121 °C por 15 minutos. Posteriormente, se inocularon con tres discos de micelio de 5 mm de diámetro, procedente de los márgenes de un cultivo de *A. porri* de 8 días de edad de crecido sobre medio de cultivo Agar Papa Dextrosa. Los frascos fueron incubados por un período de 30 días a una temperatura de 28±1 °C en condiciones de cultivo estático y oscuridad constante. Pasado el tiempo de incubación, se procedió a realizar la filtración del cultivo a través de papel de filtro Whatman # 4. Cada uno de los filtrados se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos en centrífuga refrigerada con el objetivo de eliminar los restos de micelio que pudieran existir y se concentró al 80% en rotoevaporador a 40 °C. Los filtrados fueron recogidos asépticamente en frascos de 250 ml y fueron conservados a una temperatura de -20 °C hasta su posterior utilización.

Efecto de diferentes concentraciones del filtrado de cultivo de *Alternaria porri* sobre plantas adultas del clon 'Criollo'

El método utilizado para la aplicación de los filtrados fue el de punción (Borrás, 1999). Se probaron diluciones del filtrado de cultivo de 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% de su volumen inicial y el control fue el filtrado concentrado al 80% y el agua destilada estéril. Se estudió el efecto del filtrado crudo cosechado y diluido sobre plantas adultas del clon 'Criollo' de aproximadamente 65 días de edad. Fueron utilizadas 20 réplicas por cada tratamiento. Las evaluaciones se realizaron a las 72 horas de aplicado el filtrado de cultivo del hongo y se determinó el grado de fitotoxicidad a través del área elíptica de la lesión alrededor del punto de inoculación, aplicando la fórmula:

$A = \pi \cdot a \cdot b$, donde:

A- área de la elipse (mm²); a-radio mayor (mm);

b-radio menor (mm); π - 3.14

Efecto del filtrado de cultivo de *Alternaria porri* sobre plantas adultas de diferentes edades del clon 'Criollo'

El efecto fitotóxico de filtrados de cultivo de *Alternaria porri* concentrados al 70% de su volumen total fue determinado sobre hojas intermedias de plantas adultas de diferentes edades (65; 80 y 110 días) del clon 'Criollo'. Se emplearon 20 repeticiones por cada tratamiento y la evaluación se realizó a las 72 horas

de exposición de los filtrados, a través de la medición del área de la lesión necrótica.

Efecto del filtrado crudo de *Alternaria porri* sobre callos de ajo del clon 'Chileno'

Se estudió el efecto del filtrado del hongo sobre callos del clon de ajo 'Chileno', que se formaron a partir de hojas de vitroplantas en medio de cultivo de multiplicación de callos (Hernández *et al.*, 1995). Los mismos se subcultivaron cinco veces con una frecuencia de 21 días y al cabo del quinto subcultivo se le añadieron al medio de cultivo diferentes concentraciones del filtrado; tomándose como tratamiento diluciones de 80%, 60%, 40% y 20% del volumen inicial. El control fue el medio de cultivo sin el filtrado del hongo. En cada tratamiento se emplearon 20 callos que se colocaron en placas de Petri, a razón de cuatro en cada una y a 21± 1 °C con fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad. La evaluación se realizó a los 30 días de realizar el experimento y consistió en determinar el peso fresco de los callos antes y después de aplicar los tratamientos, así como observar otro cambio en la morfología de los mismos.

Análisis estadísticos utilizados

Los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza unifactorial. La comparación múltiple de medias se realizó según Duncan (Sigarroa, 1985). El paquete estadístico utilizado fue el STAT-GRAPHICS versión 4.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de diferentes concentraciones del filtrado de cultivo de *Alternaria porri* sobre plantas adultas del clon 'Criollo'





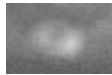





A medida que aumentó la concentración del filtrado, el efecto fitotóxico, sobre las hojas de plantas adultas de ajo, fue mayor. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se aplicó el filtrado al 70% de su volumen inicial (26.84 mm²), los cuales fueron significativos con respecto a los demás tratamientos (Tabla 1), por este motivo se recomienda la utilización de esta concentración en los trabajos de selección de la resistencia bajo las condiciones descritas.

Hernández *et al.* (1991) obtuvieron que a medida que aumentaba la concentración del filtrado de *Alternaria solani* que aplicaban en plántulas de papa, la frecuencia de aparición de los síntomas era mayor. Resultados similares fueron hallados por Okole y Schulz (1997); Borrás *et al.* (1998, 1999) y Campanioni (2001) para otros cultivos. Es importante señalar que para el establecimiento de sistemas de selección de la resistencia, la

determinación de una concentración correcta del agente selectivo para la expresión de la actividad fitotóxica entre variedades es necesaria, lo cual

incrementa las posibilidades de obtener líneas estables de plantas con resistencia a las enfermedades (Binarová *et al.*, 1990; Fornet, 1991).

Tabla 1. Efecto de diferentes concentraciones del filtrado de cultivo de *Alternaria porri* sobre plantas adultas del clon 'Criollo'.

Concentración (%)	Área de la necrosis (mm ²)	Mancha necrótica
Agua destilada estéril	0 f	
0	0 f	
10	2.51 e	
20	1.72 e	
30	5.49 d	
40	5.96 d	
50	8.00 c	
60	8.94 c	
70	26.84 a	
80	16.64 b	
ES ± 0.51		CV=12.14%

Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según prueba de rangos múltiples de Duncan

Efecto del cultivo filtrado de *Alternaria porri* sobre plantas adultas de diferentes edades del clon 'Criollo'

En la Tabla 2 se exponen los resultados del efecto fitotóxico de filtrados concentrados de *Alternaria porri* sobre hojas, de diferentes edades, del clon 'Criollo'. En este caso, a medida que aumenta la edad del cultivo, mayor es el área de la lesión. La mayor área de necrosis se obtuvo en plantas de 110 días de edad (79.8 mm²). Todo parece indicar que la diferencia en el diámetro de la necrosis en los diferentes tratamientos fue influenciada por el tamaño y vigor de la hoja. Las plantas de 65 días de crecidas poseían hojas delgadas que limitaban la extensión del daño.

Estudio del efecto del filtrado crudo de *Alternaria porri* sobre callos de ajo 'Chileno'

La acción del filtrado de cultivo se observó en la pérdida de peso de los callos (Tabla 3). Existió una marcada relación entre la concentración de los metabolitos y el peso de los callos, manifestándose una disminución del peso de los mismos con el incremento de la concentración del filtrado.



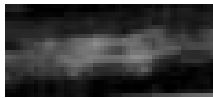
Veitía y Dita (1995) obtuvieron resultados similares al estudiar el efecto de filtrados de cultivo de *Alternaria alternata* sobre callos de papa. Hernández *et al.* (1991) hallaron que la regeneración de callos, de este mismo cultivo, disminuía con el aumento de la concentración de filtrados de *Alternaria solani* (Ellis y Martín).

Otra evidencia del efecto de los metabolitos sobre el tejido, fue el oscurecimiento de los callos a medida que la concentración del filtrado

de cultivo era mayor (Figura 1). Existió un cambio evidente a partir del 40 % de concentrado el filtrado,

aunque, en el tiempo evaluado, no hubo necrosis total del tejido.

Tabla 2. Efecto de filtrados fitotóxicos producidos por *Alternaria porri* sobre plantas de ajo de diferentes edades.

Edad de la planta (Días)	Área de la necrosis (mm ²)	Mancha necrótica
65	15.17 c	
80	47.62 b	
110	79.8 a	

CV=3.19%

ES ± 0.77

Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$. Según prueba de rangos múltiples de Duncan.

Tabla 3. Efecto del filtrado de cultivo de *Alternaria porri* sobre el peso fresco de los callos de ajo 'Chileno'.

Concentración del Filtrado (%)	Peso Fresco de los callos (g)
0	0.069 a
20	0.043 b
40	0.037 c
60	0.011 d
80	0.014 d

ES ± 0.0007

CV=5.27%

Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$. Según prueba de rangos múltiples de Duncan.

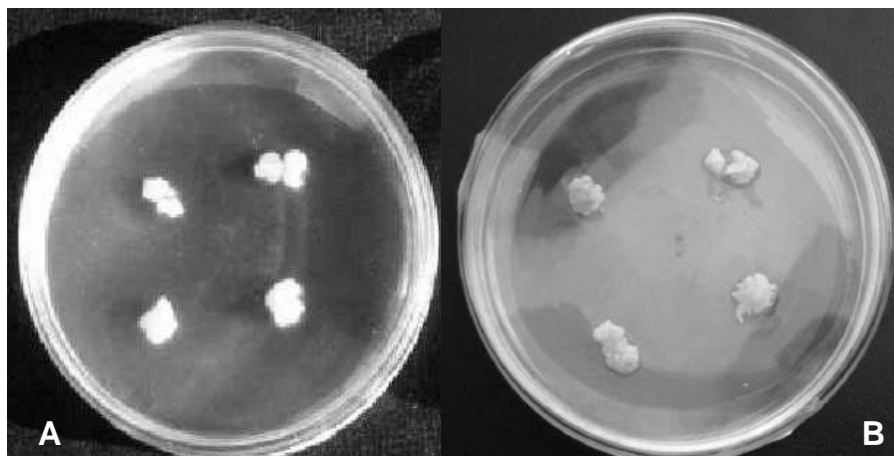


Figura 1. Efecto del filtrado de cultivo de *Alternaria porri* sobre la coloración de los callos de ajo 'Chileno': A-callos en medio de cultivo sin filtrado; B- callos en el medio de cultivo con filtrado (80%).

Urrea (1998) obtuvo que en todos los tratamientos efectuados con filtrado de *Phytophthora infestans* (Mont.), los callos de la variedad de papa susceptible se oscurecieron y murieron.

CONCLUSIONES

El filtrado de cultivo de *Alternaria porri* a través del uso de la técnica de punción, produjo el mayor efecto fitotóxico cuando se empleó en plantas adultas (110

días) a una concentración del 70% de su volumen inicial, la cual se recomienda para su uso en los programas de selección temprana a la mancha púrpura.

Se determinó el efecto fitotóxico de diferentes concentraciones del filtrado de cultivo de *Alternaria porri* sobre callos de ajo. Se apreciaron reducciones del crecimiento y del peso de los mismos a medida que aumentó la concentración del filtrado. Además

hubo un cambio evidente en la coloración cuando se aplicó el filtrado concentrado a partir del 40% de su volumen inicial.

REFERENCIAS

- Binarová, P, Nedelnik J, Fellner M, Nedbalkova B (1990) Selection for resistance to filtrates of *Fusarium* spp. in embryogenic cell suspension culture of *Medicago sativa* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 22: 191 – 196
- Borrás, O (1999) Empleo de fitotoxinas para la selección rápida de la resistencia a la fusariosis en el cultivo de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill). Tesis de Doctorado. Universidad de Ciego de Ávila
- Borrás, O, Pires de Matos A, Santos R, Tapia R, Arzola M, Pérez MC (1998) Phytotoxic effect of culture filtrate from *Fusarium subglutinans* the causal agent of fusariose of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr. *Euphytica* 104: 73-77
- Campanioni, B (2001) Metodología para la selección acelerada de la resistencia al Mal de Panamá en el cultivo del banano. Tesis de Maestría. Universidad de Ciego de Ávila-Centro de Bioplantas
- Fornet, E (1991) Metodología general para el estudio de las toxinas producidas por los hongos fitopatógenos. Informe Científico a la Academia de Ciencias
- Gómez, R (1998) Selección *in vitro* a enfermedades. En: J.N. Pérez Propagación y mejora genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas pp: 327-350 Santa Clara
- Hernández, MM, Kowalski B, Lorenzo P Ortiz U (1991) Efectividad del empleo de *Alternaria solani* Ellis y Martín (Jones y Grout) en la selección *in vitro* de formas resistentes en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Cultivos Tropicales* 12(2): 48-50
- Hernández, R, Fontanella J, Noa JC, Manso R, Pichardo T, Cárdenas H, Igarza Y (1995) Electroterapia, nuevo método para el saneamiento a virus en *Allium sativum* L.. Ponencia X Forum de Ciencia y Técnica. IBP
- Luke, HH y Wheeler HE (1955) Toxin Production by *Helminthosporium victoriae*. *Phytopathology* 45: 453-458
- Okole, BN, Schulz FA (1997) Selection of *Mycosphaerella fijiensis*-resistant cell lines from micro-cross sections of banana and plantain. *Plant Cell Reports* 16: 339-343
- Rodríguez, F, Porra A, Almandoz J (2001) Evaluación de diferentes funguicidas en el control de *Alternaria porri* Ell (Cif) en ajo (*Allium sativum* L.). 41 Reunión Anual de la Sociedad Fitopatológica Americana-División Caribe. Varadero. Libro de Resúmenes
- Santos R (2000) Aislamiento y purificación de metabolitos microbianos involucrados en la interacción piña-*Fusarium subglutinans* y su contribución al mejoramiento genético. Tesis de Doctorado. Universidad de Ciego de Ávila
- Sigarroa, A (1985) *Biometría y Diseño Experimental*. Ed. Pueblo y Educación, La Habana, Cuba
- Urrea, A (1998) Estudio de parámetros para la selección *in vitro* en la mejora de la resistencia a *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en papa (*Solanum tuberosum* var. Diacol capiro). Tesis de Maestría. Universidad Central de Las Villas
- Veitía, N, Dita MA (1995) Estudio de los metabolitos producidos por *Alternaria alternata* (Fr) Keissler sobre vitroplantas y callos de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis de Grado. UCLV