

CRECIMIENTO DE CULTIVOS DE TEJIDOS DE *Stylosanthes* spp. EN MEDIO CONTENIENDO EXTRACTOS DE *Colletotrichum gloeosporioides*

Gloria P. López E.*

William Roca**

COMPENDIO

En el invernadero, para caracterizar las reacciones a la antracnosis de diferentes accesiones de *Stylosanthes* spp. se usaron cultivos filtrados de *Colletotrichum gloeosporioides*. Se encontró efecto semejante con extractos del hongo en el crecimiento de callos de los genotipos CIAT 2243, CIAT 10136 y CIAT 2312, con dos cepas (Q - 136 de Santander de Quilichao y L-VE seca del Brasil) de *C. gloeosporioides*. Se encontraron cambios en el peso fresco de los callos. Se detectó reacción específica de los tres genotipos al incremento de concentraciones de los extractos fungosos. Hubo diferencia significativa en el efecto de la concentración de los filtrados del hongo 32 días después de cultivadas las tres variedades.

Aunque hacen falta las evaluaciones de estas plantas en campo, estos resultados muestran que existe alta correlación entre la respuesta de las plantas a inoculaciones en invernadero y el crecimiento de callos en medio conteniendo extractos del hongo. Esto sugiere que procesos a nivel celular son responsables del efecto (daño) del agente causante de la antracnosis.

ABSTRACT

Colletotrichum gloeosporioides filtrate cultures were used in characterizing the reactions to antracnosis in different accesions of *Stylosanthes* spp. under greenhouse conditions. Similar effect was found with fungus extract in callus growing of genotypes CIAT 2243, CIAT 10136 and CIAT 2312 with two known strains of *C. gloeosporioides* (Q - 136 from Santander de Quilichao and L-VE withered from Brasil). Changes in callus gross weight were found. Three genotypes specific reaction to the increment of fungi extract concentration were detected. Fungus filtrate concentration effect is different significantly between concentrations 32 days after three varieties were cultivated.

Although field evaluations are left, these results show that a high correlation is there between plant response to inoculations under greenhouse conditions and callus growing on medium containing fungus extract. This suggests that cellular level processes are responsible of antracnosis causal agent harmful effect.

* Estudiante de pre-grado. Universidad Nacional de Colombia - Palmira.

** Centro Internacional de Agricultura Tropical- CIAT. A. A. 6713, Cali, Colombia.

1. INTRODUCCION

La mayoría de las especies del género *Stylosanthes* son importantes en los ecosistemas de sabana, ya que además de suministrar proteínas necesarias para suplir las necesidades del animal, sus características de resistencia a la sequía, amplia aceptabilidad y consumo han permitido mejorar la calidad de la dieta y reducir las pérdidas de peso que son normales durante la época seca (4). El gran potencial de las especies de *Stylosanthes* como forrajeras promisorias en los suelos ácidos e infértiles del trópico es restringido por la antracnosis, enfermedad causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, que induce considerables pérdidas en la producción de forraje y cuyo desarrollo puede ocurrir en amplio rango de condiciones ambientales, siendo difícil su control (5).

La antracnosis es una enfermedad endémica en América Tropical y factor limitante de la producción de forraje en *Stylosanthes* spp., al afectar su persistencia y disminuir la calidad de forraje en las praderas para la producción animal. Aunque la intensidad del daño varía según la susceptibilidad o resistencia de las variedades, en aquellas susceptibles causa severas defoliaciones y la muerte a plantas jóvenes (1).

S. guianensis posee gran potencial orgánico para ser utilizado en cultivo *in vitro* (7). Se ha comunicado la ocurrencia de variación fenotípica en plantas mejoradas de *S. guianensis* (2) y la persistencia de muchos de estos cambios a través de la semilla sexual. Los cambios fenotípicos pueden ser genéticos, citogenéticos y fisiológicos, pueden ocurrir durante períodos prolongados de cultivos *in vitro* (9) y algunos se podrían utilizar para seleccionar material con características agrónomicamente buenas (6).

La generación de plantas a partir de explantes es posible, si se tiene en cuenta la hipótesis de la estabilidad genética de los tejidos; sin embargo, si la regeneración se hace a partir de estados celulares indiferenciados (callos), puede ocurrir variación en las plan-

tas regeneradas. Esta variabilidad no se debe únicamente a eventos genéticos, que involucran cambios en la secuencia de nucleótidos o del número de estructuras de los cromosomas. Puede también ser una respuesta fisiológica a un medio ambiente inadecuado o presentarse por cambios epigenéticos que reflejan niveles alterados de la expresión genética y que son relativamente estables, pues, persisten a través de la mitosis a las células hijas (3). En los últimos años se ha aprovechado la variabilidad causada por el cultivo celular logrando así líneas celulares de alfalfa (*Medicago sativa*) y regenerando plantas resistentes a las toxinas producidas por *F. oxysporium*, sin utilizar ningún tipo de mutágeno (8).

Aunque en las colecciones del género *Stylosanthes* existe variabilidad en la tolerancia a la antracnosis, la utilización de estos materiales estaría limitada por la lentitud del mejoramiento varietal y por la imposibilidad de transferencia de la resistencia entre las especies más importantes (2). Es por tanto necesaria la búsqueda de metodologías nuevas, como el cultivo de tejidos, que faciliten la selección de resistencia a partir de alteraciones de las funciones celulares para incorporarla en los programas de mejoramiento; puesto que si la principal responsable de la enfermedad es la toxina producida por el patógeno, se puede utilizar como método de selección de líneas celulares la respuesta de grupos celulares ante extractos menos puros de la toxina. Por consiguiente, el presente trabajo pretendió contribuir al desarrollo de técnicas para la selección *in vitro* de *Stylosanthes* spp y a estudiar el efecto de diferentes concentraciones del extracto crudo de *Colletotrichum gloeosporioides* en el crecimiento de cultivos celulares de *Stylosanthes* spp.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El trabajo se desarrolló en el Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT. Para obtener los explantes se sembraron semillas esterilizadas de *Stylosanthes guianensis* CIAT 10136, CIAT 2243 y CIAT 2312, en tubos de ensayo que contenían medio nutritivo de Mu-

rashige y Skoog, solidificado con agar al 0.8 o/o. Porciones iguales de hojas se sembraron en cajas de petri que contenían medio inductor de callos (2.0 mg/l de 6 - bencilaminopurina y 2.0 mg/l de ácido naftalenacético). Los extractos crudos centrifugados y filtrados de las cepas Q-136 de Santander de Quilichao, Colombia y L-VE seca del Brasil de *C. gloeosporioides*, se prepararon en elenmeyer con solución Czapek estéril sin agar inoculada con 10^6 esporas del hongo e incubada durante tres semanas a 28°C.

El experimento estuvo constituido por 5 diluciones del extracto (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:32) repetidas 5 veces y un testigo. En cada caja de petri se colocaron 10 callos de aproximadamente un milímetro de diámetro, de igual consistencia y peso fresco inicial promedio de 0.0001 gramo. A los 32 días, se tomó el peso fresco de 5 muestras al azar.

Para la evaluación de las accesiones de *S. guianensis*, en el invernadero se sembraron dos surcos de 10 plantas de cada variedad y se inocularon después de 15 días con los extractos del hongo; en el ensayo se dispuso de un testigo. Las bandejas se embolsaron durante 48 horas y a los 12 días se realizó la evaluación utilizando la siguiente escala: ausencia de la enfermedad (0); pocas manchas y lesiones pequeñas en las hojas (1); manchas y lesiones pequeñas en las hojas, tallos y estípulas (2); manchas y lesiones medianas en las hojas, tallos y estípulas y poca defoliación (3); manchas y lesiones grandes en hojas, tallos y estípulas, acompañadas de mucha defoliación (4) y muerte de la planta (5).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Comportamiento de los ecotipos de *S. guianensis*

Con el extracto de la cepa Q-136, los callos del ecotipo CIAT 2243 crecieron en la dilución 1:2, mientras que con el extracto de la cepa L-VE sólo lo hicieron en la dilución 1:4 y al combinar los extractos la inhibición fue mayor, registrándose sólo crecimiento en

la dilución 1:32 (Fig. 1).

Por lo anterior y el comportamiento de las plántulas en el invernadero (Cuadro 1), este ecotipo se puede considerar como resistente a estas cepas del hongo.

El extracto L-VE y la combinación de los extractos inhibieron el crecimiento de los callos del ecotipo CIAT 2312, el cual se mostró resistente a la cepa Q-136 (Fig. 2). En el invernadero, el ecotipo presentó susceptibilidad a la cepa L-VE y a la combinación Q-136 + L-VE.

S. guianensis CIAT 10136 se desarrolló a partir de la dilución 1:4 cuando estaba en presencia de las cepas L-VE y de la cepa Q-136; al combinar las cepas mostró inhibición total del crecimiento (Fig. 3). En invernadero, el ecotipo no fue susceptible al inóculo de la cepa Q-136, mientras que fue susceptible a la cepa L-VE y a la combinación de las dos cepas.

3.2. Interacción ecotipos vs. cepa de *C. gloeosporioides*.

Los callos de *S. guianensis* CIAT 2243 crecieron aún a diluciones del extracto de la cepa L-VE menores de 1:4, la cual inhibió el desarrollo de *S. guianensis* 2312 en todos los niveles de dilución. *S. guianensis* CIAT 10136 se comportó como medianamente resistente, observándose ligero incremento en el peso fresco de sus callos a diluciones mayores de 1:8 (Figura 4, Cuadros 2 y 3).

Los callos de los ecotipos CIAT 2312 y 2243 se desarrollaron a partir de todas las diluciones, mientras que los del ecotipo CIAT 10136 lo hicieron desde la dilución 1:8 (Fig 5, Cuadros 4 y 5).

El desarrollo de los callos de los tres ecotipos mostró alta inhibición al combinar las cepas Q-136 más L-VE y no se obtuvo ningún crecimiento significativo de éstos (Fig. 6, Cuadros 6 y 7).

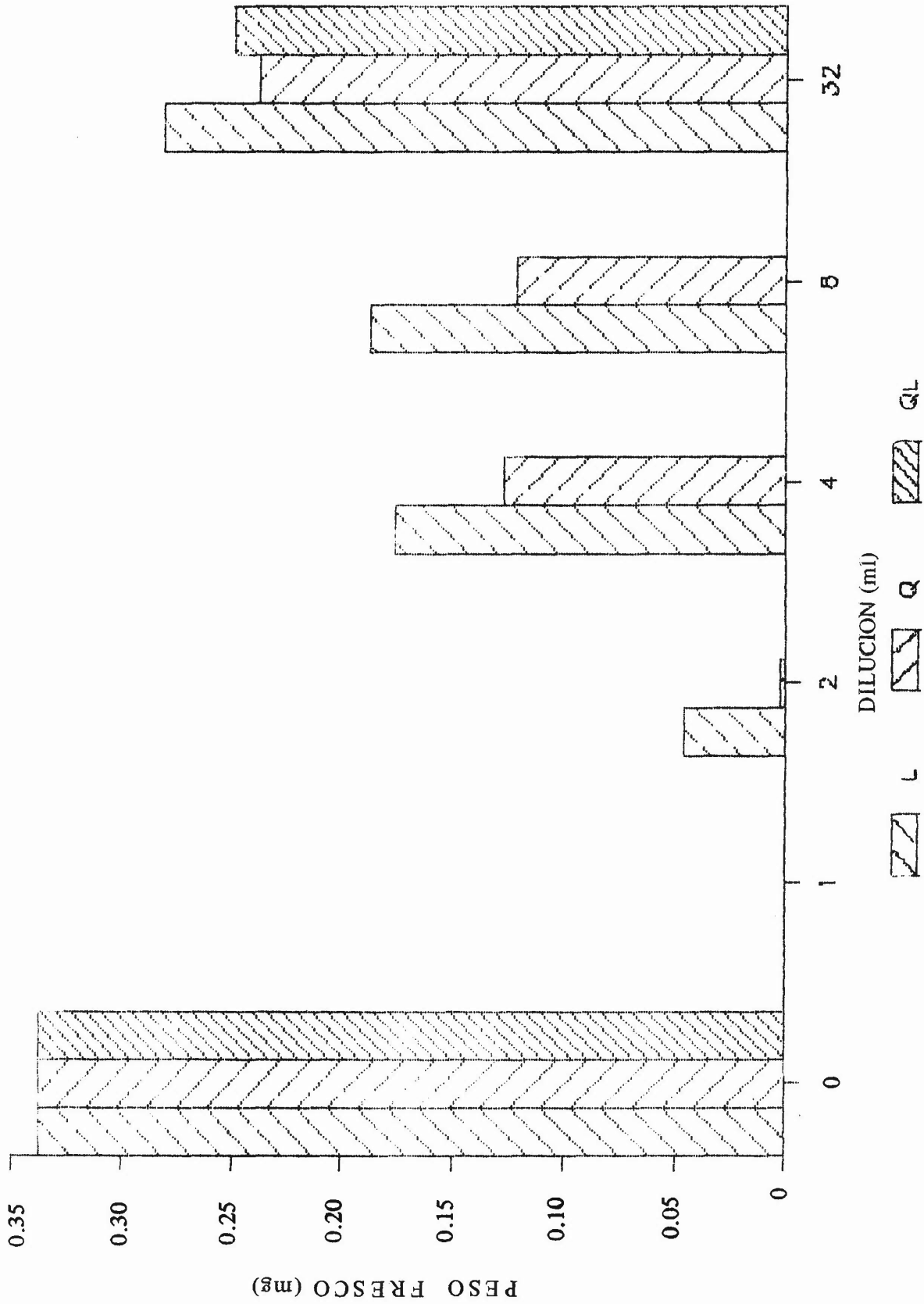


Fig. 1. Interacción de *S. guianensis* CIAT 2243 con extractos de *C. gloeosporioides*

Cuadro 1

Respuesta de plántulas de ecotipos de *Stylosanthes guianensis* a la inoculación con extractos de *C. gloeosporioides*

Ecotipos	Toxina			Control
	Q	L	QL	
2243	0	0	0	0
2312	1	4	4	0
10136	0	1	1	0

Cuadro 2

Análisis de varianza del extracto L- VE frente a las variables variedad, dilución y variedad x dilución

	DF	Tipo I SS	F		DF	Tipo III SS	F		Coeficiente de variación
			Evaluated	PR > F			Evaluated	PR > F	
Variedad	2	0.283	12.74	0.0001	2	0.292	13.14	0.0001	91.958
Dilución	5	2.969	53.39	0.0001	5	2.268	40.79	0.0001	
Variedad x Dilución	10	1.166	10.49	0.0001	10	1.166	10.49	0.0001	

Prueba de DUNCAN para la interacción variedades vs. extracto

Grupo	Media	N	Variedad
A	0.1956	21	Sg 2243
B	0.1234	60	Sg 10136
C	0.0511	35	Sg 2312

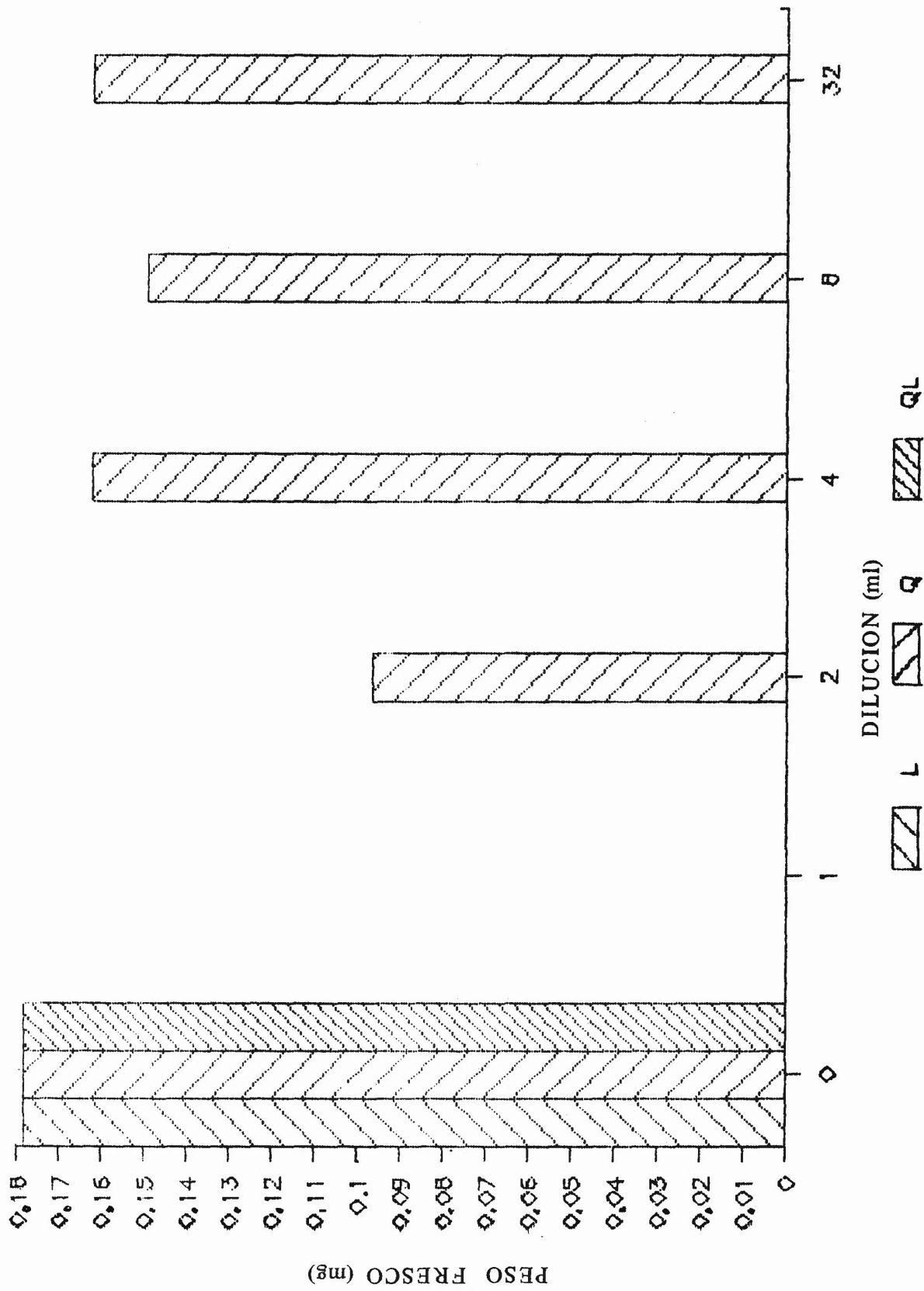


Fig. 2. Interacción de *S. guianensis* CIAT 2312 con extractos de *C. gloeosporioides*

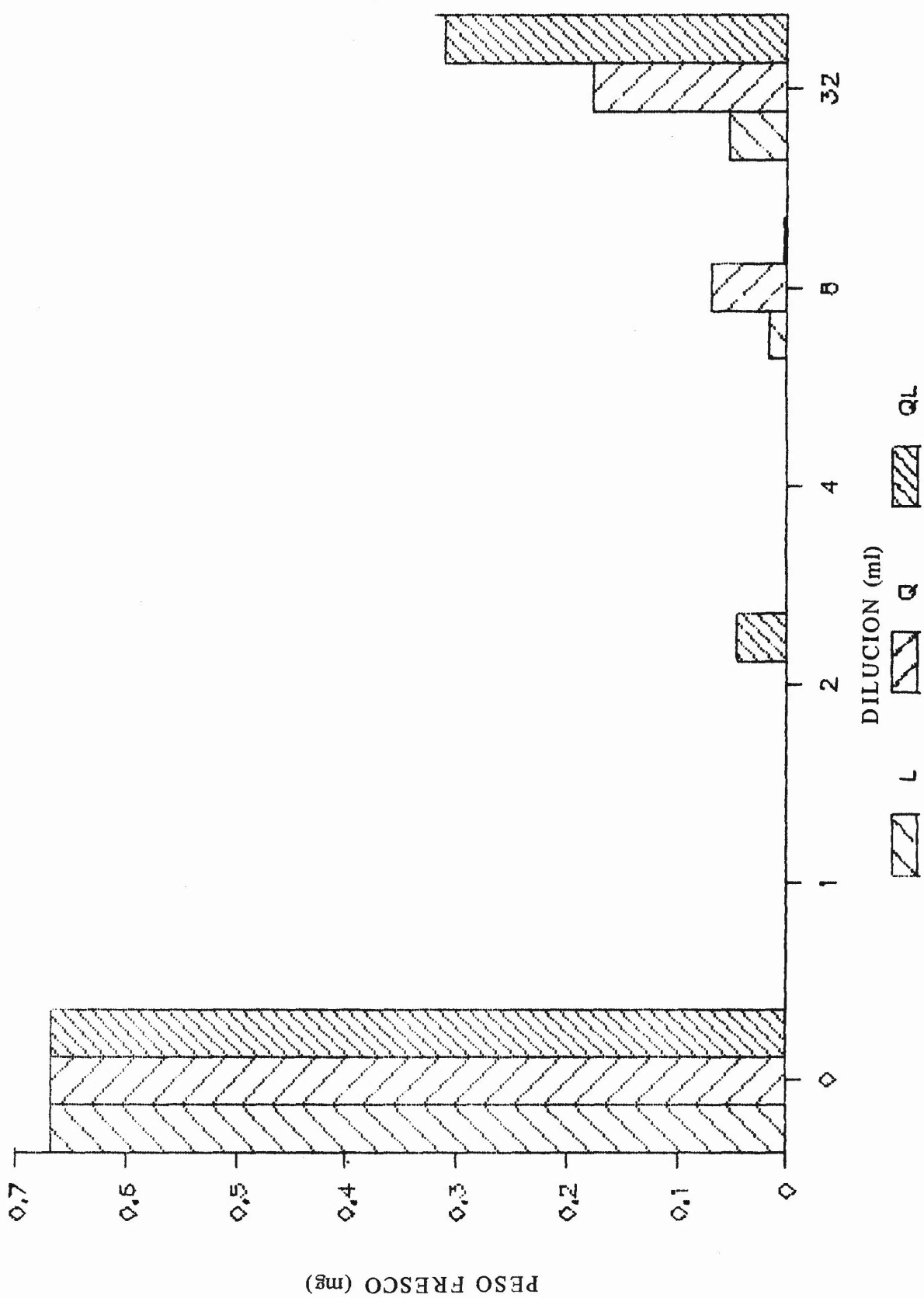


Fig. 3. Interacción de guianensis CIAT 10136 con extractos de *C. gloeosporioides*

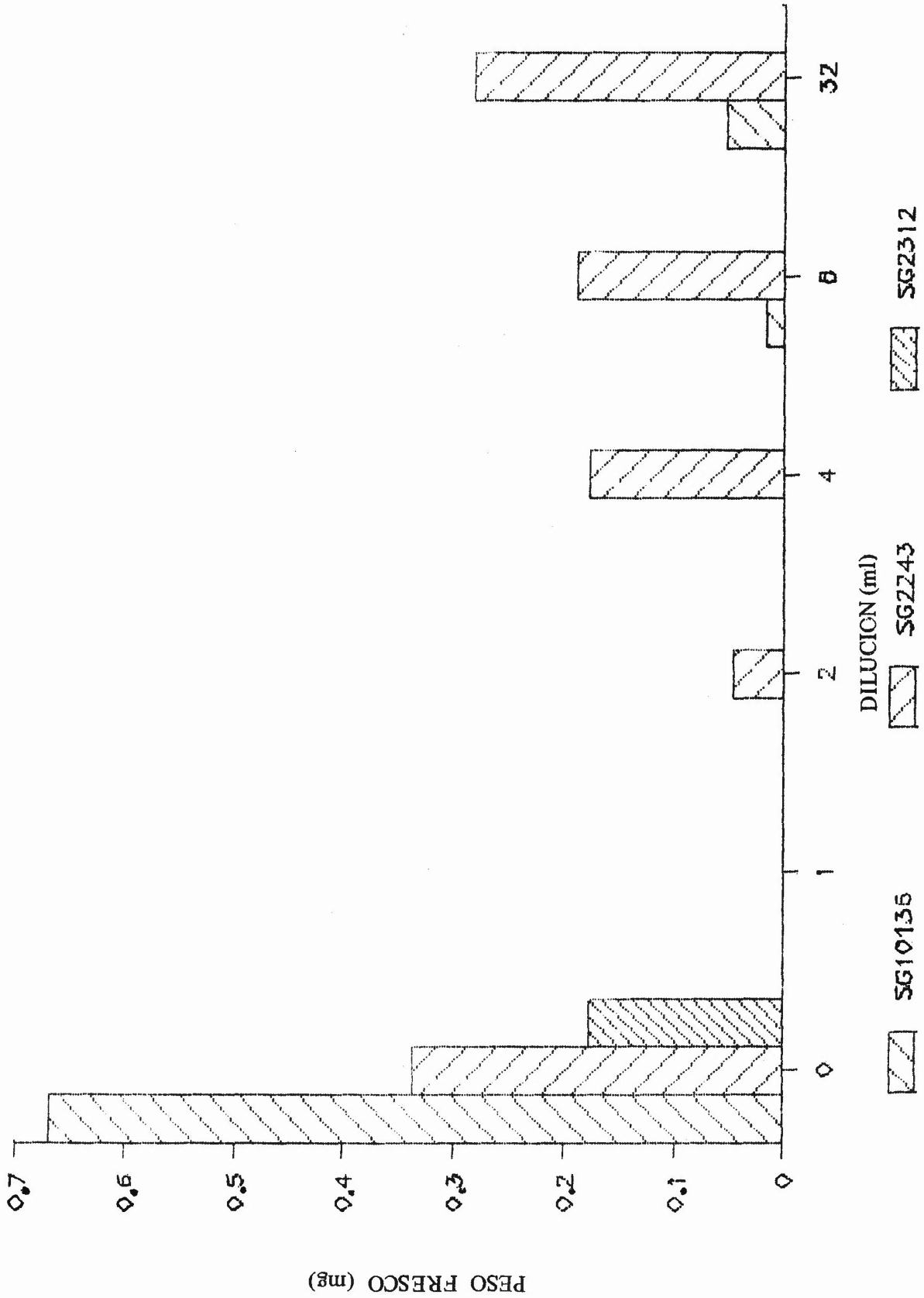


Fig. 4. Respuesta de los ecotipos CIAT 10136, CIAT 2243 y CIAT 2312 frente al extracto L - VE

Cuadro 3

Prueba de DUNCAN para la diferencia entre dilución del extracto L - VE

<u>Grupo</u>	<u>Media</u>	<u>N</u>	<u>Dilución</u>
A	0.4036	26	0
B	0.0764	18	32
CB	0.0404	18	8
CB	0.0304	18	4
CB	0.0082	18	2
C	0.0004	18	1

Cuadro 4

Análisis de varianza del extracto Q frente a las variables variedad, dilución y variedad x dilución

	DF	Tipo I SS	F		DF	Tipo III SS	F		Coeficiente de variación
			Evaluated	PR > F			Evaluated	PR > F	
Variedad	2	0.016	0.41	0.6626	2	0.0164	0.41	0.6673	95.341
Dilución	5	2.594	25.69	0.0001	5	2.0428	20.22	0.0001	
Variedad x Dilución	10	1.324	6.56	0.0001	10	1.3248	6.56	0.0001	

Prueba de DUNCAN para la Interacción variedades vs. extracto

<u>Grupo</u>	<u>Media</u>	<u>N</u>	<u>Variedad</u>
A	0.1666	21	Sg 2243
A	0.1525	60	Sg 10136
A	0.1326	35	Sg 2312

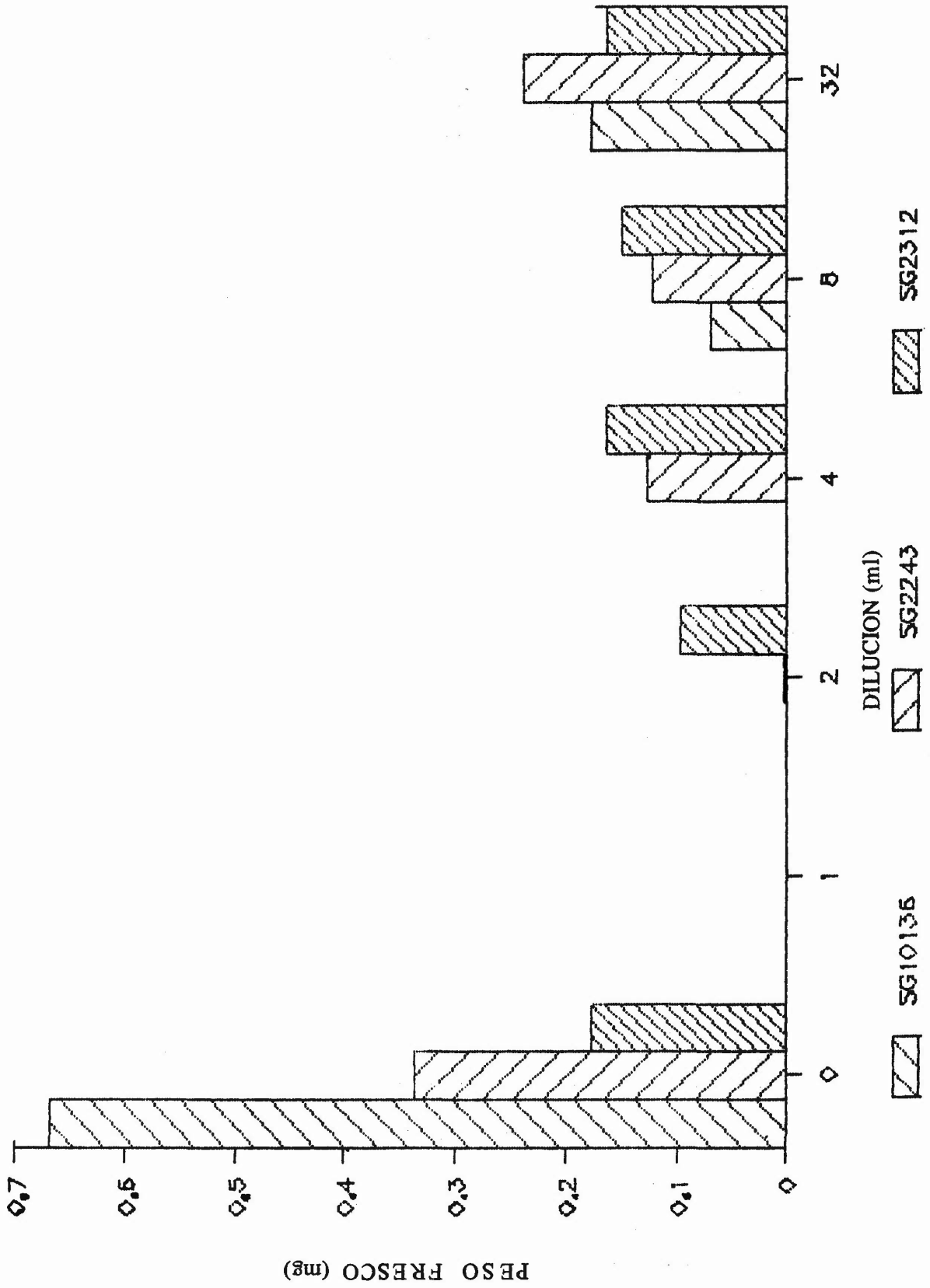


Fig. 5. Respuesta de los ecotipos CIAT 10136, CIAT 2243 y CIAT 2312 frente al extracto Q - 136

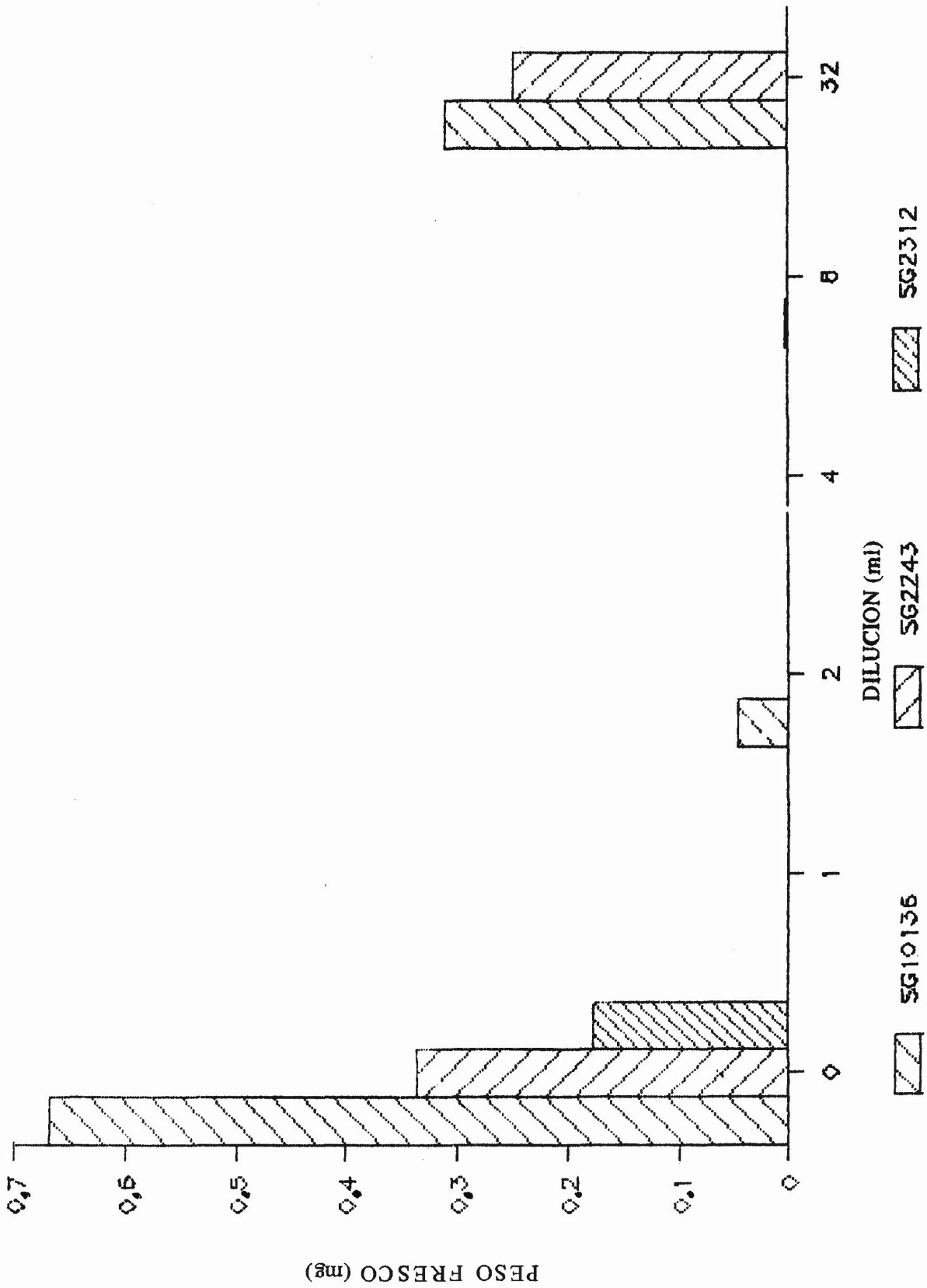


Fig. 6. Respuesta de los ecotipos CIAT 10136, CIAT 2243 y CIAT 2312 frente a la combinación de las cepas

Cuadro 5

Prueba de DUNCAN para la diferencia entre diluciones del extracto Q

<u>Grupo</u>	<u>Media</u>	<u>N</u>	<u>Dilución</u>
A	0.4036	26	0
B	0.1827	18	32
CB	0.1000	18	8
C	0.0664	18	4
C	0.0274	18	2
C	0.0009	18	1

Cuadro 6

Análisis de varianza del extracto L - VE + Q frente a las variables variedad, dilución y variedad x dilución

	<u>DF</u>	<u>Tipo I SS</u>	<u>F</u> <u>Evaluated</u>	<u>PR > F</u>	<u>DF</u>	<u>Tipo III SS</u>	<u>F</u> <u>Evaluated</u>	<u>PR > F</u>	<u>Coefficiente de</u> <u>variación</u>
Variedad	2	0.5389	12.44	0.0001	2	0.3871	8.94	0.0003	99.754
Dilución	5	3.0108	27.80	0.0001	5	2.1091	19.48	0.0001	
Variedad x Dilución	6	0.9088	6.99	0.0001	6	0.2088	6.99	0.0001	

Prueba de DUNCAN para la interacción variedades vs. extracto

<u>Grupo</u>	<u>Media</u>	<u>N</u>	<u>Variedad</u>
A	0.3087	9	Sg 2243
B	0.1722	60	Sg 10136
C	0.0559	32	Sg 2312

Cuadro 7

Prueba de DUNCAN para la diferencia entre diluciones de la combinación L - VE + Q

<u>Grupo</u>	<u>Media</u>	<u>N</u>	<u>Dilución</u>
A	0.4036	26	0
B	0.2152	18	32
C	0.0318	15	2
C	0.0030	13	8
C	0.0047	15	1
C	0.0004	14	4

4. CONCLUSIONES

- 4.1. El método permitió establecer la tolerancia de los ecotipos de *Stylosanthes guianensis* CIAT 2243, CIAT 10136 y CIAT 2312 a las cepas Q-136 y L-VE de *Colletotrichum gloeosporioides*.
- 4.2. Con las diluciones 1:4 y 1:18 se conoció la susceptibilidad o la tolerancia de las variedades.
- 4.3. A concentraciones extremas de los extractos (1:1 y 1:2), hubo crecimiento de un pequeño número de callos, esto adísticamente no significativo, en los tres ecotipos para los extractos y sus combinaciones. Si la tolerancia expresada a nivel celular se manifiesta en plantas regeneradas y se mantiene a través de su progenie, esta metodología permite acortar la duración de los métodos convencionales de mejoramiento y a la vez aumentar su eficiencia.

5. BIBLIOGRAFIA

1. CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). Informe Anual, 1982.
2. CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). Informe Anual, 1986.
3. CHALEFF, R. S. Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. *Science*. Vol. 219, p. 676-682. 11 February 1983.
4. HUTTON, E. M. Tropical Pastures. *Advances in Agronomy* Vol. 22, p. 2-66. 1970.
5. LEITAO, H. F. et al. Consideracoes sobre o genero *Stylosanthes* spp. Secretaria do Agricultura Estado do Sao Paulo. Boletín Técnico. No. 10. 1983. 12 p.
6. McILROY, R. J. Introducción al cultivo de los pastos. México, Limusa, 1973.
7. RICE, T. B. and CARLSON, P. S. Genetic analysis and plant improvement. *Ann. Rev. Plant Physiology*. Vol. 26, p. 279-308. 1975.
8. RURICO, A. Efecto de la inoculación de plantas con *Colletotrichum gloeosporioides* sobre ocho ecotipos de *Stylosanthes capitata*. Cali, CIAT, 1979.
9. SHIPTON, W. A. *Colletotrichum dematium* and *Colletotrichum gloeosporioides* on *Stylosanthes*. *Aust. Plant Pathol. Soc. Newsl.* Vol. 8, p. 45-46. 1979.