

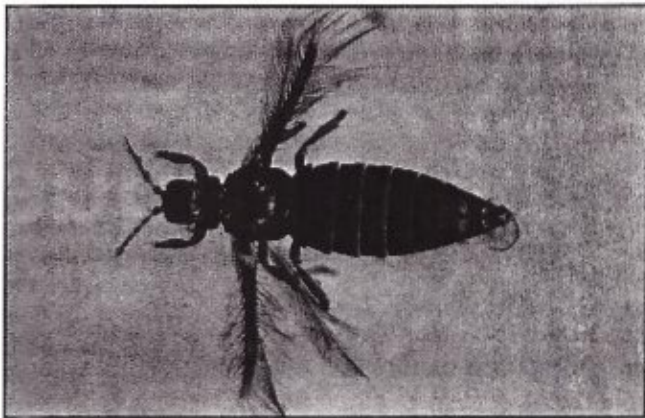


# CUADERNOS DE FITOPATOLOGIA

REVISTA DE FITOPATOLOGIA Y ENTOMOLOGIA

S 14325

Embrapa



AÑO XIV - Núm. 55 - 4º Trimestre 1997

# INFLUENCIA DE FILTRADOS CONCENTRADOS DE *Fusarium subglutinans* SOBRE SEGMENTOS DE HOJAS DE LA PIÑA (*Ananas comosus* (L.) Merr)

Orlando Borrás\*, Aristóteles Pires de Matos\*\*, Renato Santos Cabral\*\*, Raúl Tapia\*, Ramón Santos, María Cristina Pérez; Mayda Arzola\*\*

## RESUMEN

Segmentos de hojas de variedades susceptibles y resistentes fueron empleadas para determinar el efecto fitotóxico de filtrados de cultivos concentrados de *Fusarium subglutinans*; también se determinó la posibilidad de utilizar dichos filtrados como agentes de selección de resistencia sobre híbridos de Cayena lisa x Perolera. En todos los ensayos realizados el efecto fitotóxico fue mayor en las variedades susceptibles que en las resistentes, observándose zonas necrosadas alrededor del punto de inoculación. Como criterio de selección se apreció que el filtrado crudo concentrado proveniente del cultivo de una raza cubana pudo seleccionar individuos resistentes con un comportamiento similar al realizado con el microorganismo más virulento.

## INTRODUCCION

La fusariosis de la piña constituye la principal enfermedad del cultivo en las principales regiones productoras del mundo, especialmente Brasil, con grandes pérdidas en el material de propagación y cosecha, siendo *Fusarium subglutinans* su agente causal (Matos y col., 1991).

En Cuba a pesar de no contar con las razas más virulentas se desarrolla un sistema de mejoramiento genético de la piña el cual incluye la obtención de plantas resistentes a las enfermedades, especialmente la Fusariosis, por ser esta un peligro potencial para el cultivo. La prin-

cipal protección contra esta enfermedad es la obtención de variedades resistentes, para lo cual es necesario contar con un buen esquema de selección por técnicas biotecnológicas. Es importante señalar que para el éxito del mismo se debe tener en cuenta un buen agente de selección (filtrado tóxico, toxina, marcadores bioquímicos o moleculares), niveles de selección (plantas, vitroplantas, callos, suspensiones celulares, protoplastos) y variantes genéticas (hibridación, variación somaclonal e inducción de mutaciones), que permita en un tiempo breve conocer si una planta es resistente o susceptible, aspectos que no cumplen los sistemas de selección tradicional, los cuales son lentos, poco precisos, difíciles de controlar las condiciones ambientales y variables (Jones, 1990).

Los hongos del género *Fusarium* tienen la propiedad de producir filtrados de cultivos de gran cantidad de metabolitos secundarios, biológicamente activos, mostrando fitotoxicidad en bioensayos sobre plantas, pero su papel en la patogénesis no está aún completamente claro (Scheffer, 1983). Para determinar si una toxina tiene papel en la patogénesis es necesario comprobar si tiene actividad fitotóxica manifestada a través de algún bioensayo, así como de reproducir todos o algunos de los síntomas de la enfermedad entre otros aspectos (Fornet, 1991).

Por todo lo anteriormente mencionado el objetivo de esta investigación consistió en

examinar y comparar el efecto fitotóxico de filtrados crudos concentrados de *Fusarium subglutinans* sobre hojas de variedades de plantas de piña con diferentes grados de resistencia al patógeno, además de su posible papel en la selección de plantas resistentes a la enfermedad en los esquemas de mejoramiento genético del cultivo.

## MATERIALES Y METODOS

**Material Vegetal:** Las hojas utilizadas en los experimentos fueron de las variedades Cayena lisa (susceptible del patógeno), Primavera (resistente al patógeno), Perolera (resistente del patógeno) e híbridos de Cayena lisa x Perolera las cuales procedían de plantas adultas de aproximadamente 22 meses de edad.

**Microorganismo fúngal:** La cepa de *Fusarium subglutinans* utilizada en los experimentos para obtener filtrados tóxicos se aisló a partir de tejidos necrosados de hojas de plantas adultas (raza no virulenta según reporte de Pérez y col. en 1994). La obtención e identificación del hongo se realizó a través de la metodología citada por Booth (1971) y conservadas en agar papa glucosado al 2% (PDA) a 26°C durante una semana, la otra cepa (más virulenta) empleada fue donada por el CNPMF-EMBRAPA-Brasil.

Preparación del filtrado de cultivo del hongo: Se tomaron tres discos de 10 mm de diámetro de cultivos monospóricos de

\* Centro de Bioplantitas. ISACA. Ctra. de Morón, km. 9. Ciego de Avila. CP-69450. Cuba

\*\* Centro Nacional de Pesquisas de Mandioca y Fruticultura (CNPMF)-EMBRAPA. Rua Embrapa, s/n CP 007, Cruz das Almas, Bahia, Brasil

*Fusarium subglutinans* cultivados sobre agar de papa glucosado al 2% (PDA) durante una semana y se sembraron en frascos Roux de 1000 mL que contenían 300 mL de Caldo Czapek, incubándose durante un periodo de 24 días a una temperatura de 26°C, luego se procedió al filtrado y esterilización del medio mediante gasa, papel de filtro y filtros milipores de 0.22 micras. A alícuotas del filtrado se le realizó un barrido del espectro-UV de 200-300 nm con el fin de determinar la presencia de metabolitos en el medio, luego se concentró por rotoevaporación a baja presión y temperatura de 40-45°C y se diluyó en agua destilada estéril (p/v).

**Bioensayo:** El bioensayo empleado se basa en el punteado de fragmentos de hojas de aproximadamente 8 cm de longitud de la parte basal y superior de las hojas con una aguja estéril, agregando después en el daño producido 5 µl del filtrado crudo concentrado. Los fragmentos de hojas se colocaron en cámaras húmedas y condiciones semejantes a las necesitadas por el hongo para reproducir la enfermedad. Se realizaron siete evaluaciones a intervalos de 5 horas, siendo a las 35 horas el momento de mejor expresión fitotóxica (necrosis en forma de elipse). La expresión sintomatológica de necrosis formada alrededor del punto de aplicación fue medida a través del tamaño de la misma con la siguiente fórmula:

$$A = \frac{\pi a \cdot b}{4}$$

A- Área de la elipse en mm<sup>2</sup>

a- radio de la parte más ancha (mm)

b- radio de la parte menos ancha (mm)

π- 3.14

**Selección de resistencia:** Fragmentos de hojas de híbridos de Cayena lisa x Perolera fueron inoculados con filtrado concentrado según la técnica y condiciones descritas anteriormente, utilizando como controles las variedades Cayena lisa, Perolera y Primavera. Paralelo a esto, con los mismos híbridos y testigos, se montó la técnica de inoculaciones con filtrado concentrado del microorganismo más patógeno (raza brasileña), las evaluaciones consistieron en evaluar el com-

portamiento de uno u otro sistema de selección en cuanto a resultados.

**Análisis estadístico:** Se realizaron 30 repeticiones por tratamiento y se procesaron las mediciones del área mediante pruebas no paramétricas aplicando el test de Mann-Whitney-Wilcoxon a través del paquete estadístico SPSS (Statistical Package for Social Science).

## RESULTADOS Y DISCUSION

El filtrado crudo concentrado de *Fusarium subglutinans* mostró un efecto fitotóxico sobre ambas variedades (Tabla 1), aunque mucho más marcado en la variedad susceptible, evidenciado por el tamaño de la lesión y el tratamiento estadístico de los resultados. Por otro lado, los segmentos provenientes de la parte basal de la hoja son los más susceptibles a este efecto, resultado que pudiera estar relacionado a una mayor cantidad de compuestos fenólicos en la parte más clorofilada de la hoja (parte superior) y que tengan una función detoxificadora.

Hay que plantar que a pesar del efecto fitotóxico del filtrado crudo concentrado sobre las dos variedades (resistente y susceptible), existió un efecto selector de dicho filtrado, así como su posible utilización en la identificación de plantas resistentes y susceptibles. Resultados similares fueron obtenidos por Kaur y col (1987) cuando utilizaron filtrados fitotóxicos de *Fusarium oxysporum* var. *ciceri* los cuales inducían lesiones en plantas de garbanzo susceptible al patógeno, siendo estas lesiones de menor grado en plantas resistentes y no hospederas.

Sacristan (1982), planteó que la selección de resistencia usando filtrados del patógeno puede dar como resultado la obtención de plantas resistentes, aunque no se conozcan que toxinas están presentes en los mismos y el papel que juegan en la patogénesis. Como se observa el filtrado crudo concentrado de *Fusarium subglutinans* (raza cubana) empleado en este trabajo pudo seleccionar individuos de acuerdo al grado de resistencia dentro de una población híbrida (Tabla 2), donde el 64% de las plantas mostró resistencia, con una gran similitud al seleccionar con el filtrado del microorganismo más patógeno (Tabla 3).

Binarová y col (1990) emplearon filtrado de cultivo para la selección de resistencia a *Fusarium* sp. en plantas y suspensiones celulares de *Medicago sativa*, obteniendo líneas de plantas que más tarde incrementaron la resistencia a la infección *in vivo* con el hongo en cuestión, siendo este un sistema alternativo de selección en el menor tiempo posible aplicable en los programas de mejoramiento genético del cultivo.

Como se aprecia en los experimentos existió una correlación directa entre el grado de virulencia del patógeno (raza brasileña) y el grado de fitotoxicidad del filtrado concentrado de la raza cubana, ya que a pesar de no ser esta la raza más virulenta sus filtrados si son fitotóxicos sobre el material vegetal susceptible. Para corroborar lo anterior Kaur y col (1987) encontró que el aislado 162 de *Fusarium oxysporum* exhibía una baja virulencia pero una alta toxicidad de sus filtrados frente al material vegetal susceptible.

**Tabla 1. Efecto del filtrado concentrado de *Fusarium subglutinans* sobre diferentes variedades de piña**

Variedad	Área de la lesión en la parte basal de la hoja (mm <sup>2</sup> )	Área de la lesión en la parte superior de la hoja (mm <sup>2</sup> )
Cayena lisa (S)	14.7 a	9.6 a
Perolera (R)	7.8 b	3.6 b
Primavera (R)	7.5 b	3.9 b

R: resistente S: susceptible. (p < 0.05; es 0.0236)

**Tabla 2. Selección de plantas resistentes en el cruzamiento entre las variedades Cayena lisa x Perolera empleando como agente de selección filtrado concentrado de microorganismo no virulento.**

Plantas bioensayadas	Tamaño promedio de la lesión entre la parte basal y superior de la hoja (mm <sup>2</sup> )	Reacción
Híbrido 1	8.1	T
Híbrido 2	9.9	T
Híbrido 3	6.6	R
Híbrido 4	8.6	T
Híbrido 5	6.8	R
Híbrido 6	3.9	R
Híbrido 7	9.9	T
Híbrido 8	7.6	T
Híbrido 9	6.8	R
Híbrido 10	5.5	R
Híbrido 11	6.8	R
Híbrido 12	4.7	R
Híbrido 13	8.6	T
Híbrido 14	8	T
Híbrido 15	6.8	R
Híbrido 16	6.8	R
Híbrido 17	4.3	R
Híbrido 18	4.3	R
Híbrido 19	4.8	R
Híbrido 20	7.3	R
Híbrido 21	8.1	T
Híbrido 22	2.9	R
Híbrido 23	2.9	R
Híbrido 24	5.8	R
Híbrido 25	10.7	S
Testigo (Cayena lisa)	12.1	S
Testigo (Perolera)	5.7	R
Testigo (Primavera)	5.7	R

Escala de evaluación según tamaño de la lesión: Resistente (R) 7.4 mm<sup>2</sup> <; Tolerante (T) 7.4 mm<sup>2</sup> - 10.5 mm<sup>2</sup>; Susceptible (S) 10.5 mm<sup>2</sup>>

**Tabla 3. Comparación entre los dos sistemas de selección de resistencia a la enfermedad empleados en la obtención de plantas resistentes en el cruzamiento Cayena lisa x Perolera**

Sistemas de	Selección empleando filtrados de cultivos del microorganismo menos virulento (raza cubana)		Selección empleando filtrados del microorganismo más virulento (raza brasileña)	
	Número de plantas	Porcentaje	Número de plantas	Porcentaje
Resistentes	16	64%	15	60%
Tolerantes	8	32%	10	40%
Susceptible	1	4%	0	0%

Nedelnik (1988) obtuvo un fenómeno similar en bioensayos sobre plantas, donde la más baja virulencia no siempre fue acompañada por niveles más bajos de fitotoxicidad de sus filtrados.

### CONCLUSIONES

- El filtrado concentrado de *Fusarium subglutinans* tuvo un efecto fitotóxico mucho más marcado en la variedad susceptible que en las resistentes.

- El filtrado concentrado de *Fusarium subglutinans* raza cubana sirvió para seleccionar plantas resistentes.

- No existió correlación entre el grado de virulencia del hongo (raza cubana) y el grado de fitotoxicidad de sus filtrados.

### REFERENCIAS

- Binarová, P.; F. Novotny and B. Dedbalková. Selection and characterization of alfalfa cell lines resistant to lysine plus thionine and/or thionine. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 185: 1-2 (in press). 1990.
- Booth, E. The genus *Fusarium*. *Key to Commonwealth Mycol Inst.* p. 237. 1971.
- Farnet, E. Metodología general para el estudio de las toxinas producidas por los hongos fitopatógenos. *Academia de Ciencias de Cuba.* 1991.
- Jones, M.J.K. Plant cell line selection: Procedures and applications. 116-117. 1990.
- Kaur, G.; U.S. Singh and G.K. Garg. Mode of action of toxin isolated from *Fusarium oxysporum* var. *subglutinans*. *Fruits* 46 (6). 647-652. 1991.
- Nedelnik, J. Pathogenicity and culture filtrate phytotoxicity in species of genus *Fusarium*. *Plant Prot.* 1 (2): 65-66. 1988.
- Pérez, M.; O. Borrás; A.P. Matos; M. Arzola y Y. Rodríguez. Reporte de *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* sobre piña en Cuba. *Centro Agrícola* [2]: 88-89. 1994.
- Sacristan, M.D. Resistance responses to *Phoma lingam* of plants regenerated from selected cell and embryogenic cultures of haploid *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* 61: 193-200. 1982.
- Scheffer, R.P. Toxins as chemical determinants of plant disease. In: Daly & Deverall BJ (Eds) p. 1-40 New York, Academic Press. 1983.