

METODO PARA OBTENER MATERIAL DE ALFALFA RESISTENTE A *DITYLENCHUS DIPSACI*

Isabel Philippi y Gastón Pichard

Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile,
Casilla 6177, Santiago, Chile.

Accepted:

19.VII.1990

Accepted:

RESUMEN

Philippi, I., y G. Pichard. 1990. Método para obtener material de alfalfa resistente a *Ditylenchus dipsaci*. *Nematropica* 20:129-135.

Varios procedimientos de selección para obtener cultivares de alfalfa resistentes al nematodo del tallo, *Ditylenchus dipsaci*, se llevaron a cabo bajo condiciones de campo e invernadero. Selecciones de campo dieron origen a la línea mejorada SIN UC F1 la cual mostró un aumento significativo en resistencia en relación a los cultivares parentales. El mismo germoplasma se inoculó con 200 nematodos/planta. En una generación se obtuvo un aumento del 63% en resistencia. Dos ciclos de selección recurrente en el invernadero no produjeron incrementos de rendimientos en evaluaciones de campo.

Palabras claves: alfalfa, *Ditylenchus dipsaci*, *Medicago sativa*, resistencia, selección.

ABSTRACT

Philippi, I., and G. Pichard. 1990. A method for obtaining alfalfa selections resistant to *Ditylenchus dipsaci*. *Nematropica* 20:129-135.

Several selection procedures for obtaining alfalfa cultivars resistant to the stem nematode, *Ditylenchus dipsaci*, were carried out under field and greenhouse conditions. Field selection gave origin to the breeding line SIN UC F1 which showed significant increase in resistance in relation to its parent cultivars. The same germplasm was inoculated with 200 nematodes/plant. In one generation a 63% increase in resistance was obtained. Two cycles of recurrent selection in the greenhouse did not achieve yield increments in field evaluations.

Key words: alfalfa, *Ditylenchus dipsaci*, *Medicago sativa*, resistance, selection.

INTRODUCCION

La alfalfa, *Medicago sativa* L., constituye una alternativa forrajera de gran importancia para los productores pecuarios. Se estima que actualmente en Chile, la superficie destinada a este cultivo es de 95 000 ha, con una longevidad promedio de 2 o 3 años en un buen nivel de producción, y 1 o 2 años adicionales en un estado de degradación muy marcada. La duración de la pradera se ve fuertemente afectada por la muerte de plantas debido a plagas, enfermedades y microorganismos del suelo, entre los cuales están los nematodos fitoparásitos, responsables en gran

medida de la destrucción prematura de las praderas. De éstos, el nematodo del tallo, *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev, es el más agresivo y devastador de la alfalfa (8). Su acción parasitaria produce una gran variedad de efectos en el hospedero, como resultado del daño mecánico y la destrucción de células, ocasionada por la extracción del contenido celular. Al parecer, el nematodo también actúa incrementando la actividad metabólica a nivel celular (2,10).

Siendo la resistencia genética una vía efectiva y la más económica para el control de este nematodo, se realizaron una serie de selecciones en campo, bajo niveles naturales de infestación y en invernadero, sometiendo germoplasma a infestaciones artificiales, con el propósito de generar líneas experimentales resistentes. Estas últimas se basan en la capacidad que tienen las plántulas de alfalfa, para mostrar aún en estados de desarrollo primario, distintos grados de severidad en los síntomas observados a nivel de nudo cotiledonario (3,4,5,6,14). La importancia de esta línea de trabajo radica en la posibilidad de disponer de germoplasma adaptado a las condiciones ambientales y fitosanitarias imperantes en Chile, debido a que con frecuencia se ha importado material genético considerado como resistente en su lugar de origen, pero que en Chile ha resultado ser susceptible (Philippi y Pichard, datos no publicados).

El objetivo del presente trabajo consistió en desarrollar diferentes métodos de selección y someterlos a una evaluación, en función de los incrementos logrados en la resistencia y la productividad de la alfalfa.

MATERIALES Y METODOS

Para las selecciones en campo se definió el área comprendida entre los paralelos 33 y 36 Latitud Sur, cuyas características agroclimáticas y de manejo de la alfalfa son similares y en la cual se encuentra una alta proporción de las siembras de esta especie. En esta área se muestreó 930 ha de empastadas atacadas por *D. dipsaci*, sembradas con los cultivares CUF 101, California 40, 50, 60, y WL 512, 514 y 519. Dentro de sectores fuertemente dañados se detectaron plantas muy vigorosas y con un alto grado de sanidad, las cuales se consideraron supuestamente resistentes y fueron seleccionadas como participantes del pool genético que se pretendía establecer. Dichas plantas se propagaron en forma vegetativa, utilizando ácido indol butírico (AIB) en 1 000 ppm. Después del enraizamiento, se transplantaron a una mezcla de arena y tierra estéril (1:1) manteniéndose en observación por 2-3 meses, al cabo de los cuales se aplicó una fuerte presión de selección a enfermedades foliares y características agronómicas, tales como hábito de crecimiento, relación hoja-tallo, altura de planta, y otros. Especial atención se dio a las manchas foliares producidas por *Stemphylium botryosum*, Wallr., *Pseudopeziza*

medicaginis (Lib.) Sacc. y *Cercospora medicaginis* Ell. y Ev. Así, la población original de 456 plantas se redujo a 100 individuos, los cuales fueron sometidos a un cruzamiento manual en cadena, obteniéndose semilla de la línea experimental SIN UC F1.

Luego se procedió a una selección bajo condiciones de invernadero. Se trabajó con la línea SIN UC F1 y el cultivar Pierce, estableciendo cultivos hidropónicos en arena cuarzo. Cuando las plántulas tenían ambos cotiledones abiertos, fueron inoculadas en siete oportunidades con una suspensión de nematodos, añadiendo un total aproximado de 200 juveniles + adultos por planta. Los cultivos se mantuvieron bajo un régimen lumínico de 16 hr luz, con un rango de temperatura de 14–18 C. La determinación del grado de resistencia se realizó 12–16 semanas después de la inoculación, reconociéndose cuatro categorías en los síntomas, en base a lo sugerido por Elgin et al. (7) y Toynbee-Clarke (11): 1 = ningún síntoma; 2 = mancha necrótica en el hipocotilo sin observar hinchazón; 3 = hinchazón moderada del hipocotilo; y 4 = hinchazón severa del hipocotilo. Las plantas clasificadas dentro de los grupos 1 y 2 fueron consideradas resistentes y las restantes susceptibles. La población de plantas identificadas como resistente en el SIN UC F1 se sometió a un cruzamiento manual en cadena, obteniéndose semilla del SIN UC F2. Posteriormente, las plantas consideradas resistentes en F2 se sometieron a una propagación vegetativa, con el objetivo de conformar un semillero en el campo, el cual originó el SIN UC F3.

Las poblaciones de *D. dipsaci*, necesarias para las inoculaciones, se obtuvieron a partir de tejidos de alfalfa recolectados en campo y de nuestras colecciones establecidas en el invernadero y cámara de crecimiento. Las poblaciones originales para ambas fuentes de inóculo provenían de cinco lugares geográficos diferentes, ubicados entre los paralelos 33 y 35 Latitud Sur. Los distintos orígenes de las poblaciones permitieron realizar una mezcla, en proporciones similares, bajo la hipótesis de tener en cuenta la diversidad condicionante de la variación de la agresividad-virulencia. Con ello, se intentó evitar el problema de ruptura de resistencia por poblaciones diferentes de las utilizadas para su caracterización (1). En la preparación del material de inoculación proveniente del campo, se siguió la metodología sugerida por Toynbee-Clarke (11), mientras que para la obtención de inóculo a partir de cultivos en cámara de crecimiento, se utilizó la de Philippi y Pichard (9).

La evaluación del germoplasma obtenido en las selecciones previas, se efectuó en función del número de plantas resistentes encontradas en una muestra poblacional, y en la productividad expresada en cantidad de materia seca por unidad de superficie. Para la determinación del grado de resistencia, se establecieron ensayos de invernadero en una mezcla de arena y tierra estéril (1:1), con el objetivo de evitar los problemas de balance hídrico y contaminación tan frecuentes en los cultivos

hidropónicos. Todas las plantas fueron inoculadas en siete oportunidades, con un total aproximado de 200 nematodos/planta, y al cabo de 16 semanas, se sometieron a observación con lupa estereoscópica. La proporción de plantas resistentes se calculó teniendo en cuenta las que no presentaban síntomas, referidas éstas a la población inicial 15 días después de la siembra (13).

Para la determinación de productividad del germoplasma (kg de materia seca/ha), se establecieron dos ensayos de campo en un sector infestado de la localidad de Pirque, Región Santiago. En un ensayo, la línea SIN UC F1 se sembró junto a los cultivares Rayén, California 50 y WL 514, de acuerdo a un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Se constituyeron parcelas de 1.0×3.0 m con cinco hileras, a 0.2 m de distancia. En el segundo ensayo, SIN UC F3 se sembró junto a los cultivares anteriormente señalados, de acuerdo a un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Cada parcela abarcó 4.0×2.0 m, con 10 hileras, establecidas a la distancia de 0.2 m. Ambos ensayos se manejaron de igual forma que las praderas de alfalfa de uso comercial, manteniendo la frecuencia de corte de acuerdo a la presencia de rebrote y/o inicio de floración. Los datos obtenidos en productividad fueron sometidos al Análisis de Varianza y la Prueba de Rango Múltiple de Duncan ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSION

SIN UC F1 mostró un mayor grado de resistencia que los cultivares CUF 101, California 50 y WL 519 en la selección de campo (Cuadro 1). Estos cultivares representan los germoplasmas a partir de los cuales se seleccionó el SIN UC F1. La valoración de resistencia indica que bajo condiciones de campo es posible identificar individuos tolerantes y/o resistentes y que dicho carácter es heredable, lo que concuerda con lo encontrado por Elgin (3).

Cuadro 1. Población de plantas resistentes a *Ditylenchus dipsaci* en cuatro materiales de alfalfa, establecidos bajo condiciones de invernadero.

Línea o cultivar	Población* (No. de individuos)	Plantas resistentes (%)	Valorización de resistencia ^y
SIN UC F1 ^z	129	32.6	R
CUF 101	116	14.8	RB
California 50	116	21.1	RM
WL 519	121	23.1	RM

*Valores corresponden al promedio de dos ensayos.

^yClasificación de acuerdo a "The National Certified Alfalfa Variety Review board", en que R = Resistente; RB = Resistencia baja; RM = Resistencia moderada.

^zLínea obtenida en selección de campo.

Cuadro 2. Rendimiento en materia seca de cuatro materiales de alfalfa, en tres ciclos de producción, bajo condiciones de campo naturalmente infestada con *Ditylenchus dipsaci*.

Línea o cultivar	Producción de materia seca (t/ha)				Producción relativa (%)
	Ciclo I	Ciclo II	Ciclo III	Total	
SIN UC F1	24.1 a	25.9 a	16.0 a	66.0 a	107
Rayén	21.7 a	24.0 ab	16.0 a	61.7 ab	100
California 50	23.2 a	20.8 b	13.8 b	57.8 b	94
WL 514	23.1 a	22.7 ab	13.1 b	58.9 ab	95

Valores son promedio de cuatro repeticiones. Valores en una misma columna seguidos por una misma letra no difieren estadísticamente entre sí según la Prueba de Rango Múltiple de Duncan ($P < 0.05$).

Al analizar los antecedentes de productividad (Cuadro 2), no se obtuvieron diferencias entre germoplasmas en la primera temporada de producción pero a partir de la segunda temporada, la línea SIN UC F1 difirió significativamente del cultivar California 50. El incremento registrado en la productividad aparentemente fue originado por la mayor resistencia del SIN frente al ataque de *D. dipsaci* bajo condiciones de campo. Por otra parte, la presión selectiva que los cultivares ejercen sobre las poblaciones de nematodos, se manifestaría en una menor superficie y distribuciones más erráticas para los cultivares resistentes, como queda de manifiesto para SIN UC F1, al observar los valores medios y desviación estándar en el tercer ciclo del Cuadro 3.

La selección recurrente en el invernadero fue un éxito en términos del grado de resistencia, logrando un incremento de 32 a 52% de resistencia en la líneas experimental SIN UC al pasar de F1 a F2, lo cual permite clasificar como altamente resistente al SIN UC F2, basado en los estándares establecidos por "The National Certified Alfalfa Variety Review Board". El cultivar Pierce, incorporado como testigo resistente en esta prueba, obtuvo incrementos similares, de 33 a 52% en la valoración de resistencia de plantas de F1 a F2.

El incremento logrado en el grado de resistencia de SIN UC F2 no se tradujo en una mayor producción de materia seca/ha en SIN UC F3

Cuadro 3. Aumento de superficie en campo infestado por *Ditylenchus dipsaci* en cuatro germoplasmas de alfalfa y tres ciclos productivos.

Línea o cultivar	Superficie atacada (%)		
	Ciclo I	Ciclo II	Ciclo III
SIN UC F1	1 ± 0.8	15 ± 10.0	39 ± 17.1
Rayén	4 ± 1.7	30 ± 16.3	52 ± 10.8
California 50	8 ± 3.1	38 ± 34.0	54 ± 10.6
WL 514	5 ± 1.2	25 ± 19.1	63 ± 5.3

Valor promedio y desviación estándar de cuatro repeticiones.

Cuadro 4. Rendimiento en materia seca, de la línea experimental SIN UC en tercera generación (F3) y tres cultivares de alfalfa, en tres ciclos de producción bajo condiciones de campo.

Línea o cultivar	Producción de materia seca (t/ha)				Producción relativa (%)
	Ciclo I	Ciclo II	Ciclo III	Total	
SIN UC F3	24.5 a	25.6 a	15.4 a	65.5 a	107
Rayén	21.7 b	24.7 a	14.8 ab	61.2 ab	100
California 50	21.9 b	22.6 a	12.6 bc	57.1 b	93
WL 514	22.5 b	24.4 a	11.8 c	58.7 b	96

Valores son promedios de cuatro repeticiones. Valores en una misma columna seguidos por una misma letra no difieren estadísticamente entre sí según la Prueba de Rango Múltiple de Duncan ($P < 0.05$).

al finalizar el tercer ciclo productivo (Cuadro 4). Los valores de producción relativos obtenidos son casi exactos a los registrados para SIN UC F1 (Cuadro 2), manteniendo superioridad los SIN UC F1 y F3. La mayor productividad registrada en SIN UC F1 y SIN UC F3, probablemente es el reflejo de un mayor grado de resistencia a *D. dipsaci*, en relación al grado de resistencia registrado en los demás cultivares. En efecto, en el tejido de alfalfa se obtuvo, en promedio para dos muestreos efectuados a partir del ciclo II, los valores de 35, 15, 75 y 55 nematodos/g de tejido fresco, para los cultivares SIN UC F3, Rayén, California y WL, respectivamente. Estos antecedentes constituyen sólo una base preliminar, que permite plantear la hipótesis (a pesar de no haber sido aún estudiada experimentalmente la relación entre valor productivo y resistencia) de que este nematodo es el factor limitante para los cultivares más sensibles.

De acuerdo al incremento obtenido en la valoración de resistencia para la línea SIN UC F3, se esperaba una producción relativa superior a la registrada para SIN UC F1, lo cual no ocurrió, indicando que los ciclos de selección recurrente efectuados en el invernadero, no fueron beneficiosos desde el punto de vista de la productividad, bajo las condiciones en que se llevaron a cabo los ensayos. Desafortunadamente no se determinaron los niveles poblacionales en el suelo, los cuales hubieran aportado algún antecedente en relación a las causas de ello. Una discusión adicional podría plantearse si, por medio de nuevas experiencias, se demostrara que *D. dipsaci* se elimina como factor limitante de la productividad de la alfalfa, al superar los niveles de 31% en la valorización de la resistencia, lo cual se logró con el SIN UC F1 (Cuadro 1).

Finalmente, creemos que estos resultados pueden representar sólo una aproximación de valor fundamentalmente metodológico, agronómico y descriptivo sobre la naturaleza de la resistencia de la alfalfa a *D. dipsaci* en nuestro país, permitiendo abordar en un futuro, estudios

Cuadro 4. Rendimiento en materia seca, de la línea experimental SIN UC en tercera generación (F3) y tres cultivares de alfalfa, en tres ciclos de producción bajo condiciones de campo.

Línea o cultivar	Producción de materia seca (t/ha)				Producción relativa (%)
	Ciclo I	Ciclo II	Ciclo III	Total	
SIN UC F3	24.5 a	25.6 a	15.4 a	65.5 a	107
Rayén	21.7 b	24.7 a	14.8 ab	61.2 ab	100
California 50	21.9 b	22.6 a	12.6 bc	57.1 b	93
WL 514	22.5 b	24.4 a	11.8 c	58.7 b	96

Valores son promedios de cuatro repeticiones. Valores en una misma columna seguidos por una misma letra no difieren estadísticamente entre sí según la Prueba de Rango Múltiple de Duncan ($P < 0.05$).

al finalizar el tercer ciclo productivo (Cuadro 4). Los valores de producción relativos obtenidos son casi exactos a los registrados para SIN UC F1 (Cuadro 2), manteniendo superioridad los SIN UC F1 y F3. La mayor productividad registrada en SIN UC F1 y SIN UC F3, probablemente es el reflejo de un mayor grado de resistencia a *D. dipsaci*, en relación al grado de resistencia registrado en los demás cultivares. En efecto, en el tejido de alfalfa se obtuvo, en promedio para dos muestreos efectuados a partir del ciclo II, los valores de 35, 15, 75 y 55 nematodos/g de tejido fresco, para los cultivares SIN UC F3, Rayén, California y WL, respectivamente. Estos antecedentes constituyen sólo una base preliminar, que permite plantear la hipótesis (a pesar de no haber sido aún estudiada experimentalmente la relación entre valor productivo y resistencia) de que este nematodo es el factor limitante para los cultivares más sensibles.

De acuerdo al incremento obtenido en la valoración de resistencia para la línea SIN UC F3, se esperaba una producción relativa superior a la registrada para SIN UC F1, lo cual no ocurrió, indicando que los ciclos de selección recurrente efectuados en el invernadero, no fueron beneficiosos desde el punto de vista de la productividad, bajo las condiciones en que se llevaron a cabo los ensayos. Desafortunadamente no se determinaron los niveles poblacionales en el suelo, los cuales hubieran aportado algún antecedente en relación a las causas de ello. Una discusión adicional podría plantearse si, por medio de nuevas experiencias, se demostrara que *D. dipsaci* se elimina como factor limitante de la productividad de la alfalfa, al superar los niveles de 31% en la valorización de la resistencia, lo cual se logró con el SIN UC F1 (Cuadro 1).

Finalmente, creemos que estos resultados pueden representar sólo una aproximación de valor fundamentalmente metodológico, agronómico y descriptivo sobre la naturaleza de la resistencia de la alfalfa a *D. dipsaci* en nuestro país, permitiendo abordar en un futuro, estudios