

MULTIPLICACION IN VITRO DE *DITYLENCHUS DIPSACI* EN TEJIDOS DE *MEDICAGO SATIVA*

I. Philippi y G. Pichard

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

Aceptado:

4.IV.1988

Accepted:

RESUMEN

Philippi, I., y G. Pichard. 1988. Multiplicación in vitro de *Ditylenchus dipsaci* en tejidos de *Medicago sativa*. Nematropica 18: 25–32.

Se establecieron cultivos de *Ditylenchus dipsaci* en tejidos de alfalfa. El método consiste en alimentar a nematodos en sustratos de alfalfa establecidos en un medio nutritivo con distintas combinaciones de hormonas. Diversos ensayos se realizaron bajo condiciones asépticas en cámara de crecimiento, con el objeto de determinar el nivel hormonal adecuado y las condiciones de luminosidad necesarias para lograr una máxima multiplicación de *D. dipsaci*. Los medios Blaydes y White modificado, con distintas concentraciones hormonales, resultaron ser los más aptos para la multiplicación in vitro de *D. dipsaci*, utilizando como sustrato a callos de alfalfa y tejido diferenciado, respectivamente. En ausencia de hormonas, con el medio White, también se obtuvo una gran proliferación, situación que puede aprovecharse para realizar una selección masiva de genotipos resistentes de alfalfa.

Palabras claves: alfalfa, *Ditylenchus dipsaci*, *Medicago sativa*, reproducción in vitro, resistencia.

ABSTRACT

Philippi, I., and G. Pichard. 1988. In vitro multiplication of *Ditylenchus dipsaci* in tissues of *Medicago sativa*. Nematropica 18: 25–32.

Cultures of *Ditylenchus dipsaci* were reared on alfalfa tissues. The method consists of feeding nematodes on an alfalfa substrate established on nutrient media with combinations of different hormones. Several tests were carried out under aseptic conditions and in growth chambers to determine the adequate hormone levels and illumination necessary for maximum reproduction of *D. dipsaci*. The Blaydes' and modified White's media, using various hormone concentrations, resulted in greater in vitro multiplication of *D. dipsaci* on alfalfa callus and differentiated tissues, respectively. High proliferation was also obtained in the absence of hormones with White's modified media, a situation that can be used for screening resistant alfalfa genotypes.

Key words: alfalfa, *Ditylenchus dipsaci*, *Medicago sativa*, in vitro reproduction, resistance.

INTRODUCCION

El nematodo del tallo *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev es una especie bisexual con juveniles y adultos vermiformes que endoparasitan tallos y bulbos de una amplia gama de hospederos. Esta especie es considerada como uno de los fitoparásitos más devastadores de regiones templadas, siendo la alfalfa (*Medicago sativa* L.), uno de los hospederos en los que se observa gran agresividad.

En el proceso de mejoramiento genético para obtener resistencia a *D. dipsaci*, es necesario poder contar con la disponibilidad permanente de una gran cantidad de nematodos. Afortunadamente, miembros de esta especie proliferan en tejidos de alfalfa en activo crecimiento, por lo cual su multiplicación in vitro sobre ese tipo de tejidos, surge como una alternativa para satisfacer dicha necesidad (2,6,7).

Diversos autores (2,4,6,7) han publicado métodos para cultivar nematodos bajo condiciones asépticas. En general utilizan leche o agua de coco, la cual aporta gran número de componentes activos, entre los que se encuentran diferentes citocinas y fenilalaninas. En la práctica, la leche de coco tiene algunas limitaciones debido principalmente a los cambios cuantitativos y cualitativos observados en el extracto como consecuencia del grado de madurez del fruto de origen. Por ello surge la necesidad de desarrollar técnicas alternativas simples y confiables.

El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar diversos medios de cultivo para el desarrollo de sustratos de alfalfa bajo distintos niveles hormonales e intensidad lumínica, con el propósito de establecer una técnica simple y confiable que permita lograr la multiplicación máxima de *D. dipsaci*.

MATERIALES Y METODOS

Medios de cultivo: Se estudiaron los medios White (W) (2,5,8) modificado, eliminando KNO_3 , CuSO_4 , y MoO_3 , Blydes (B) (1), Schenk y Hildebrandt (SH) (4) y Murashige y Skook (MS). A todos ellos se les añadió hidrolizado de caseína (200 mg/L), sacrosa (2%), y bacto-agar (0.7%, Difco®). Las hormonas 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (NAA), y 6-furfurilaminopurina (K), se agregaron en concentraciones variables. Solamente fueron consideradas las combinaciones hormonales más promisorias tanto para la obtención de callo como para la multiplicación de nematodos, en base a ensayos previos y antecedentes bibliográficos para las dos especies involucradas.

Producción de sustratos: Como fuente de germoplasma para la obtención de sustratos se utilizaron los cultivares Mesa Sirsa, Cuf 101, y California 40, sin pretender realizar comparaciones entre ellos. Se utilizaron cotiledones de 7 días y semilla pregerminada de 3 días, los que fueron establecidos como explantes para la obtención de callo y tejido diferenciado, respectivamente. Ambos explantes se obtuvieron de semilla seleccionada, escarificada en forma química y mecánica, y esterilizada con HgCl_2 (1:1 000). Para el trabajo con callos se utilizó tubos de 10 ml de capacidad, los que recibieron 5 ml de medio de cultivo. Los cultivos con tejido diferenciado se establecieron en frascos de 150 ml de capacidad que contenían 20 ml de medio de cultivo. Cada uno de los tubos y frascos constituyó una repetición para cada tratamiento. Todos los medios fueron esterilizados en autoclave a 120 C por 15 min, previo al establecimiento de los explantes.

Obtención del inóculo: El inóculo se obtuvo de tejido de alfalfa infestado por el nematodo, y la extracción de éstos se realizó con un nebulizador intermitente por 24 hr. Los nematodos colectados fueron filtrados a través de una malla nylon de 36 μm en un embudo Buchner conectado a una bomba de vacío. Luego se centrifugaron con agua destilada a 4 500 rpm durante 10 min. Una segunda centrifugación (4 500 rpm/10 min) se efectuó con sacarosa (45%), obteniendo así una suspensión azucarada de nematodos puros. Esta debió enjuagarse sucesivas veces con agua estéril, después de lo cual, los nematodos obtenidos fueron desinfectados de acuerdo a la metodología sugerida por Faulkner et al. (2) y Guntzel (3).

La población de nematodos se determinó tomando una alicuota de 1 ml que contenía 23 nematodos por ml con cuatro repeticiones por muestra, considerando estados juveniles y adultos.

Multiplicación de nematodos y pruebas de infectividad: Los cultivos fueron inoculados al estado de callo viable (mayor o igual a 0.5 cm de diámetro) y cotiledones abiertos, con 1 y 3 ml de suspensión de *D. dipsaci* esterilizados, respectivamente. La población inicial promedio fue de 32 nematodos por repetición para callos y 82 nematodos por repetición para tejidos diferenciados. La incubación de los cultivos se realizó en cámaras de crecimiento con rangos de temperaturas de 20–25 C durante 35–45 días, en base a lo sugerido por Faulkner et al. (2) y Viglierchio (7). Los callos fueron establecidos bajo luz indirecta, con una intensidad lumínica aproximada de 500 lux y el tejido diferenciado bajo 0, 1 700, y 5 300 lux de acuerdo a los tratamientos. La evaluación de la población final se efectuó en base a la combinación medio de cultivo y sustrato de alfalfa, para lo cual se consideraron las formas adultas y juveniles.

Finalmente, con el objeto de comprobar la capacidad infectiva de los nematodos multiplicados, se estableció un ensayo de invernadero bajo condiciones hidropónicas utilizando arena-cuarzo como sustrato. En el se sembraron cultivares de alfalfa susceptibles al nematodo del tallo, recibiendo al estado de dos cotiledones un promedio de 150 juveniles y adultos, provenientes de las poblaciones de nematodos multiplicados en la cámara de crecimiento. Después de un período de 120 días se realizó la evaluación en base a la capacidad de los nematodos para desarrollar la sintomatología típica a nivel del nudo cotiledonario.

RESULTADOS Y DISCUSION

En todos los tratamientos se obtuvo una alta proporción de callos inducidos; sin embargo, en un porcentaje apreciable esto pudo deberse más bien a una respuesta del tejido frente al corte efectuado, ya que no constituyeron posteriormente callos viables (Cuadro 1). Esta respuesta pudo haber sido también influenciada por el genotipo de la planta y el grado de contaminación, factores que posiblemente contribuyeron en parte a la reducción observada en la proporción de callos viables.

Cuadro 1. Formación de callos en el alfalfa, cultivar California 40, establecido bajo distintos medios de cultivo con niveles variables de auxinas y citocina.²

Medio de cultivo	Niveles hormonales (mg/L)			Total (n)	Inducción de callo en %	Callo via- ble en %	Evaluación global
	2,4-D	NAA	K				
White	0.0	0.0	0.0	44	73	36	deficiente
	0.06	1.0	0.0	90	95	58	regular
	2.0	0.0	0.0	58	90	74	regular
	0.0	4.0	0.0	44	86	48	dificiente
	0.0	4.0	2.0	43	42	23	dificiente
Blaydes	2.0	2.0	2.0	154	70	51	regular
Schenk y Hildebrandt	0.06	1.0	0.0	45	73	53	regular
	0.0	4.0	0.0	44	93	80	bueno
	0.0	4.0	2.0	140	80	48	regular
Murashige y Skook	0.06	1.0	0.0	37	81	68	bueno
	2.0	4.0	0.0	48	100	94	bueno
	0.0	4.0	0.0	37	84	73	bueno
	0.0	4.0	2.0	37	73	60	deficiente

²Explant: cotiledón. Intensidad lumínica = 500 lux

Los medios de cultivo y niveles hormonales mostraron distintas capacidades para producir tejido calloso, obteniéndose en promedio callos viables después de 1 a 3 semanas de establecido el explante. La evaluación global, realizada en base a velocidad de formación, tamaño alcanzado y tipo de callo, permitió considerar los medios SH y MS como los más promisorios (Cuadro 1). Ambos produjeron una mayor proporción de callos grandes y fáciles de manipular. Sin embargo, al analizar el incremento poblacional de los nematodos en los distintos medios (Fig. 1), los medios W y B mostraron la mayor capacidad de multiplicación, particularmente en los tratamientos con 2,4-D. Esta auxina es inductora de la formación de tejido calloso, pero tiene propiedades mutagénicas y cancerígenas, las cuales, al utilizarse en dosis altas, podría alterar en algún modo la patología de los nematodos propagados.

Con el objeto de comparar los resultados obtenidos para los distintos tratamientos, se calculó la tasa diaria de incremento poblacional:

$$T_n = \frac{P_f - P_i}{P_i * T}$$

donde, T_n = Tasa diaria de incremento poblacional por cada nematodo en P_i .

P_i = Población inicial de nematodos por repetición.

P_f = Población final de nematodos por repetición.

T = Tiempo de incubación para cada repetición, en días.

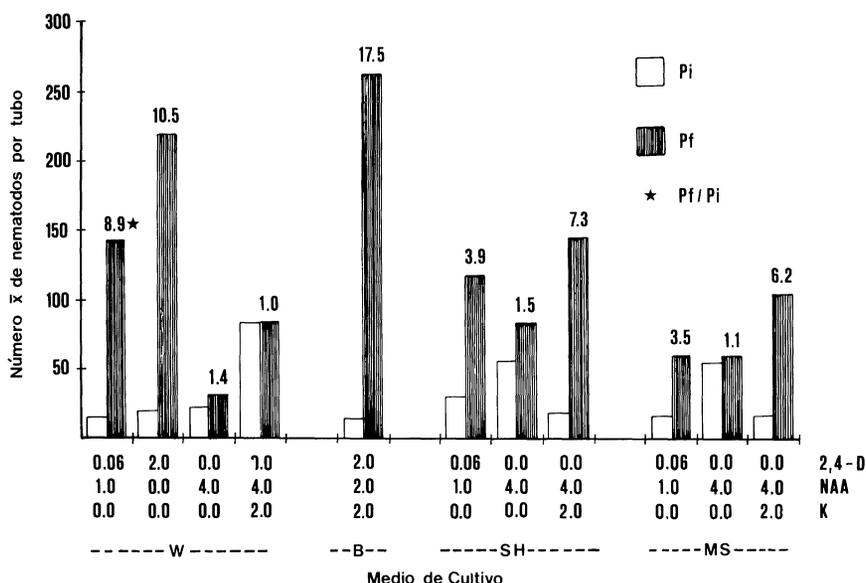


Fig. 1. Efecto del medio de cultivo y nivel hormonal (mg/L) sobre la multiplicación de *Ditylenchus dipsaci* en callos de alfalfa, cultivar California 40, con un período de incubación promedio de 35 días e intensidad lumínica de 500 lux. W = White; B = Blaydes; SH = Schenk y Hildebrandt; y MS = Murashige y Skook medio de cultivo.

En base a esta tasa (Cuadro 2), se recomienda utilizar el medio Blaydes con un alto nivel de 2,4-D (2.0 mg/L) para el trabajo con callos. Sin embargo, al utilizar tejido diferenciado debe reducirse la concentración de 2,4-D, para lo cual se recomienda el medio White con 0.06 mg/L de 2,4-D y 1.0 mg/L de NAA. Dicho medio mostró la mayor capacidad de multiplicación para estos niveles hormonales (Cuadro 2). El uso de tejido diferenciado como sustrato, presenta las ventajas de no necesitar continuos trasplantes con el objeto de mantener los niveles hormonales necesarios para el desarrollo de los callos, y de no requerir de personal particularmente adiestrado para su implementación. Una ventaja adicional es que la estructura de la población de nematodos no se ve modificada, lo que permite obtener resultados más homogéneos entre las distintas repeticiones. En general, se observó para los callos una gran variación entre las repeticiones, lo cual concuerda con lo encontrado por Riedel y Foster (6) y Viglierchio (7). Este último indica que es factible incrementar con los subcultivos la tasa de reproducción y homogeneidad de la población de los nematodos multiplicados, estabilizándose ambas en el quinto subcultivo (Viglierchio, comunicación personal). Para nuestros resultados esto significaría un incremento en las tasas de multiplicación y en los niveles de homogeneidad obtenidos.

Cuadro 2. Multiplicación de *Ditylenchus dipsaci* en callos de alfalfa, cultivar California 40, establecidos bajo distintos medios de cultivo y niveles hormonales *.

Medio de cultivo	Niveles hormonales (mg/L)			Tasa diaria promedio de incremento poblacional (Tn) ^y
	2,4-D	NAA	K	
White	0.06	1.0	0.0	0.28 b ^z
	2.0	0.0	0.0	0.32 b
	0.0	4.0	0.0	0.01 d
	0.0	4.0	2.0	0.00 e
Blaydes	2.0	2.0	2.0	0.53 a
Schenk y Hildebrandt	0.06	1.0	0.0	0.10 c
	0.0	4.0	0.0	0.01 d
	0.0	4.0	2.0	0.17 c
Murashige y Skook	0.06	1.0	0.0	0.11 c
	0.0	4.0	0.0	0.00 e
	0.0	4.0	2.0	0.16 c

*Explante: cotiledón. Período de incubación promedio = 35 días. Intensidad lumínica = 500 lux

^yPromedio de 30 repeticiones.

^zPromedios en una misma columna seguidos por una misma letra son estadísticamente iguales según la Prueba de Rango Múltiple de Duncan (P = 0.05).

Al establecer tejido diferenciado en el medio White (Fig. 2), se obtuvo una gran multiplicación aún en el tratamiento libre de hormonas. Sin embargo, en este tratamiento, se encontró un amplio rango de variación para la población de nematodos presentes en el interior de cada plántula. Dentro del mismo frasco, se observaron plántulas sanas que tenían un rango promedio de 0–100 nematodos/planta y plántulas que presentaban síntomas de infección, las cuales contenían en el interior de sus tejidos, niveles de 50–250 nematodos por plántula. Esta heterogeneidad entre tejidos dentro de un mismo frasco complicaría el manejo de subcultivos, para los cuales se utiliza tejido infestado del cultivo anterior como fuente de inóculo. Este inóculo presentaría niveles poblacionales muy distintos, dependiendo si proviene de una plántula sana o una plántula que muestra síntomas de infección. Por estas razones, el tratamiento sin hormonas no constituye una buena alternativa para establecer una técnica simple que logre la máxima multiplicación de *D. dipsaci* en forma permanente. Sin embargo, esta situación podría constituir una alternativa muy eficiente para establecer selecciones masivas de resistencia bajo condiciones in vitro, seleccionando las plántulas sanas y vigorosas, las cuales podrían ser micropropagadas conjuntamente con determinar los niveles poblacionales de nematodos presentes en el interior de sus tejidos.

Al adicionar hormonas al medio White, trabajando con tejido diferenciado, se observó una situación más homogénea dentro de cada

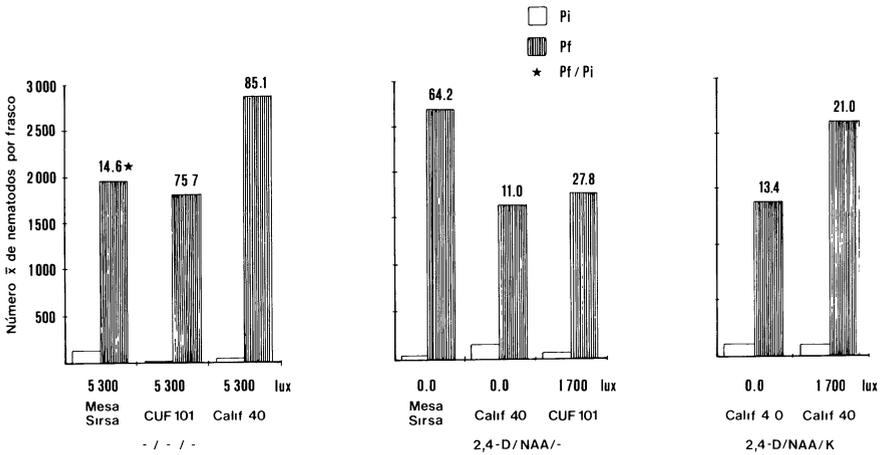


Fig. 2. Efecto de la intensidad lumínica y de diferentes hormonas sobre la propagación de *Ditylenchus dipsaci* en plántulas de alfalfa establecidas en medio de White con un periodo de incubación promedio de 42 días. 2,4-D = 2,4-diclorofenoxiacético; NAA = ácido naftalenacético; y K = 6-furfurilaminopurina.

repetición (Fig. 2). Todas las plántulas fueron infestadas, lográndose un rango promedio de 100–200 nematodos por plántula para los distintos tratamientos. Al analizar los promedios de cada tratamiento, se obtuvo valores de 174 y 131 nematodos por plántula, para los tratamientos sin y con citocina, respectivamente. Por otra parte, la tasa multiplicación promedio (Pf/Pi), mostró una reducción en los valores obtenidos para el tratamiento con citocina, indicando que dicha hormona no produjo el incremento esperado en la multiplicación de los nematodos. La intensidad lumínica a su vez, presentó efectos contrarios a los tratamientos hormonales, obteniéndose una mayor tasa de multiplicación para el tratamiento con citocina cuando fue establecido bajo 1 700 lux. Por el contrario, en ausencia de dicha hormona, se logró una mayor tasa de multiplicación bajo un régimen de oscuridad.

En base a los resultados obtenidos, se propone la utilización del medio Blaydes (2.0 mg/L de 2,4-D) para el trabajo con callos, y el medio White con la adición de auxina (0.06 mg/L 2,4-D, 1.0 mg/L NAA) y establecido en ausencia de luz, para el de tejido diferenciado. Este se comportó como la mejor alternativa, presentando un incremento poblacional promedio de 37.6 nematodos (Pf/Pi) en un período de incubación de 42 días, para los cultivares Mesa Sirsa y California 40. Las diferencias observadas entre los cultivares utilizados, no permitieron realizar comparaciones estadísticas, dado la variación observada entre las distintas repeticiones. Cabe agregar que el medio White sin adición de hormonas es apto para establecer una multiplicación, pero por las razones ya analizadas, se recomienda más bien su utilización dentro de

un programa de selección de genotipos resistentes. Finalmente, la infectividad de los nematodos multiplicados in vitro no fue alterada, ya que desarrollaron la sintomatología visual típica, cuando se inocularon con ellos plántulas susceptibles establecidas en invernadero y cámara de crecimiento.

LITERATURA CITADA

1. BINGHAM, E. T., L. V. HURLEY, D. M. KAATZ, and J. W. SAUNDERS. 1974. Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. *Crop Science* 14:719-724.
2. FAULKNER, L. R., D. B. BOWER, D. W. EVANS, and J. H. ELGIN, Jr. 1974. Mass cultures of *Ditylenchus dipsaci* to yield large quantities of inoculum. *Journal of Nematology* 6:126-129.
3. GUNTZEL, D. 1981. A rapid and efficient method for concentrating nematodes from a suspension. *Nematologica* 27:246-248.
4. KRUSBERG, L. R. 1961. Studies of the culturing and parasitism of plant-parasitic nematodes in particular *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi* on alfalfa tissues. *Nematologica* 6:181-200.
5. MITTEN, D. H., S. J. SATO, and T. A. SKOKUT. 1984. In vitro regenerative potential of alfalfa germplasm sources. *Crop Science* 24:943-945.
6. RIEDEL, R. M., and J. G. FOSTER. 1970. Monoxenic culture of *Ditylenchus dipsaci* and *Pratylenchus penetrans* with Krusberg's and White's media. *Plant Disease Reporter* 54:251-254.
7. VIGLIERCHIO, D. R., I. A. SIDDIQUI, and N. A. CROLL. 1973. Culturing and population studies of *Ditylenchus dipsaci* under monoxenic conditions. *Hilgardia* 42:177-214.
8. WHITE, P. R. 1963. The cultivation of plant and animal cells. Ronald Press: New York.

Recibido para publicar:

20.I.1988

Received for publication:

¹Esta investigación ha sido financiada por el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, Proyecto N° 0236/1986.