

TUBERIZACION "IN VITRO" EN CULTIVOS DE BROTOS Y PLANTULAS DE PAPA CONTAMINADOS CON *RHIZOCTONIA SOLANI*

Por FRANCISCO K. CLAVER¹

SUMMARY

Tests were made to study the tuberization of isolated potato sprouts and seedlings from true seeds. A White medium plus 2,5 mg/1 of calcium pantothenic acid was used.

Treatments included media contaminated with *Rhizoctonia solani* and the addition of filtrates of extract of the fungus cultivated in liquid media. The culture flasks were set at $20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in light and darkness conditions.

Sprouts contaminated with mycelium of *Rhizoctonia solani* tuberized in shorter time than controls. This effect does not occur when the sprouts are cultivated on acellular filtrates of autoclaved extract.

Seedlings contaminated with the mycelium of the fungus grown in light died more prematurely than those in darkness.

INTRODUCCION

Los estudios sobre la fisiología de la tuberización desde sus comienzos fueron vinculados con la presencia de hongos. Bernard (1902) sostenía que estaban asociados con las raíces de las plantas de papa y los relacionó a la tuberización, más tarde Bernard y Magrou (1911) demostraron la existencia de micorrizas en sus raíces. En contraposición, Jumelle (1905) y Castan (1941) concluían que los hongos no tenían relación con la formación de tubérculos.

En investigaciones independientes Cooper, Rieman y Hougas (1951) encontraron una estructura que se asemejaba a un micelio en tubérculos de 30 variedades y 150 plántulas provenientes de cruza-
mientos de *Solanum tuberosum* y otras especies.

Claver, Hildebrandt, Rieman y Cooper (1958), trabajando sobre este mismo tema produjeron tubérculos en cultivos asépticos *in vitro*

¹Ingeniero Agrónomo, Profesor Asociado del Instituto de Fisiología Vegetal. Facultad de Agronomía de La Plata.

de plántulas originadas de semillas, del cultivar Red Beauty y de brotes de Russet Burbank.

Los medios contenían sustancias fungicidas como verde de malaquita y antibióticos como: actidiona, rimocidina, mycoestatina, oligomicina y griseofulvina. Las sustancias fueron ensayadas en concentraciones distintas por un período y luego los cultivos transferidos al medio basal de Hildebrandt, Riker y Duggar (1946) con 2,5 mg por litro de pantotenato de calcio y sin fungicidas.

Se encontraron algunos tubérculos cultivados con verde de malaquita, rimocidina y oligomicina, libres de la estructura fungosa. La aparente estructura micelar se determinaba por preparados de parénquima cortical por medio de teñido con carmín acético.

Por otra parte, se sabe desde hace mucho tiempo que la expresión de la tuberización es inhibida por la luz, Vöchting (1887); pero plantas de papa pueden producir tubérculos aéreos a la luz cuando son parasitadas con *Rhizoctonia solani*.

Probablemente el hongo ocasionaría una traqueomicosis en los tejidos de conducción de sustancia orgánica. Se consideró importante determinar si el efecto estaba relacionado a sustancias activas sintetizadas por el parásito.

Observaciones realizadas en cultivos "in vitro" de brotes y plántulas de papa efectuados para estudiar aspectos de la fisiología de la tuberización, mostraron que cuando los medios se contaminaban con bacterias u hongos, la formación de tubérculos ocurría en menor tiempo.

Las bacterias más comunes fueron *Bacillus cereus* y *Bacillus pumilus* y el hongo *Rhizoctonia solani*. Los resultados de experiencias con contaminaciones artificiales de las bacterias citadas y su influencia en la tuberización ya han sido informados, Claver (1961).

MATERIAL Y METODO

Rhizoctonia solani se aisló de tubérculos de papa afectados con la enfermedad, procedentes de la Estación Experimental de Iraizos. Luego de aislado se cultivó en tubos de ensayo, en medio de agar de papa.

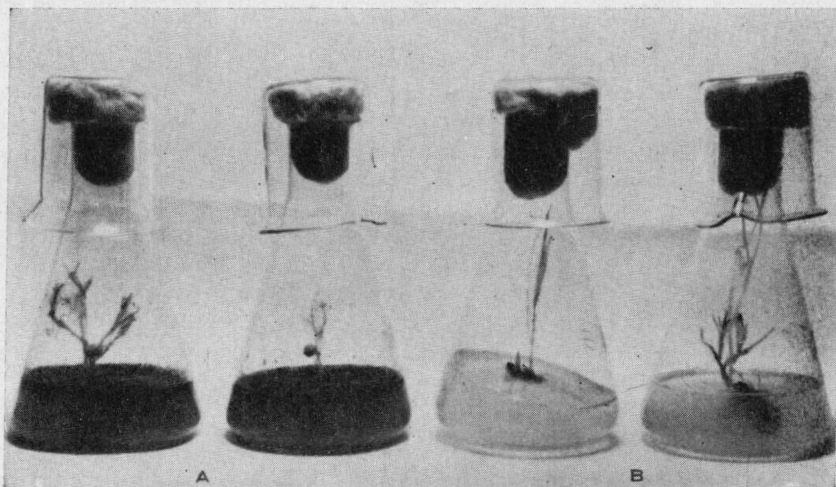
Para los cultivos "in vitro" se usaron brotes y plántulas de papa. Se utilizaron tubérculos de papa del cultivar Katahdin de la misma procedencia, que fueron sumergidos en bicloruro de mercurio al 1 % durante 3 horas. Después de la brotación cuando los brotes tenían alrededor de 1 cm de longitud se esterilizaron con hipoclorito de calcio durante 45 minutos y se lavaron con agua estéril. Los brotes se sembraron en los medios de cultivo. El medio de cultivo utilizado fue el de White más 2,5 mg/l de pantotenato de calcio. Como fuente de hidratos de carbono se usó sacarosa al 2 %; la concentración del agar fue de 0,75 %. Se emplearon recipientes de 200 ml. La cantidad de medio de cultivo agregado a cada frasco fue de 100 ml. Los Erlenmeyer fueron esterilizados en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Los cultivos estériles con brotes de papa en crecimiento se contaminaron con micelio de *Rhizoctonia solani* de los tubos por medio de una lanceta. Se infectaron 15 cultivos, y 15 se dejaron sin contaminación como testigos.

Se colocaron los Erlenmeyer con los cultivos a oscuridad en una estufa y a temperaturas de $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$; se realizaron observaciones periódicas para registrar la formación en los cultivos.

La formación de tubérculos tuvo lugar después de 36 días (promedio de 9 cultivos) de la fecha de contaminación con el micelio de *Rhizoctonia solani*; en cambio en los testigos la tuberización se produjo a los 49 días.

La figura representa los cultivos de las 2 variantes, observándose la formación de tubérculos contaminados con *Rhizoctonia*.



Cultivo "in vitro" de plántulas de papa: A) Infectados con *Rhizoctonia solani*; B) Testigos no infectados.

Para la obtención de plántulas se utilizaron semillas del cultivar Huinkul y fueron desinfectadas sumergiéndolas 2 minutos en alcohol etílico 96° y luego en hipoclorito de calcio al 15% durante 45 minutos. Se lavaron tres veces con agua estéril y se los sembró en frascos Erlenmeyer que contenían el mismo medio usado para los brotes y esterilizados en autoclave en la forma descrita anteriormente. Después de la germinación se trasladaron individualmente a tubos que contenían el mismo medio estéril y en condiciones de ambiente de laboratorio y a luz difusa durante 15 días, desarrollando las plantas en este lapso las primeras hojas de color verde y se inocularon 15 tubos con micelio de *Rhizoctonia solani* en forma idéntica a la realizada con los cultivos que contenían brotes. Quince tubos inoculados fueron dejados en el

laboratorio a luz natural, cerca de una ventana, y otro grupo de igual número a oscuridad en estufa a $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. En cada variable se colocaron quince tubos con plántulas que no habían sido infectadas con el hongo.

Las plántulas contaminadas dejadas a oscuridad, murieron después de 90 días de crecimiento pobre. Tanto las inoculadas como las testigos no formaron tubérculos, en cambio los brotes sí lo hicieron, demostrando que la luz es un factor necesario para la formación de tubérculos en los cultivos originados de semillas verdaderas, Claver (1967).

Los cultivos de la variante luz, presentaron el siguiente comportamiento: los inoculados con el hongo murieron en un lapso de 7 días, no sucediendo esto con los testigos que formaron tubérculos en el 40 % de los cultivos después de 120 días.

Este resultado indicaría que la patogenicidad del hongo ha sido exaltada por la luz; ya que los infectados y en oscuridad se mantuvieron vivos durante un largo período.

Se realizó asimismo un ensayo con brotes en medio de cultivo "in vitro" que en lugar de inocularlos con el micelio del hongo se lo hizo con un extracto de éste. El extracto se obtuvo de un cultivo en medio líquido del hongo durante un período de tiempo en agitación constante. Se separó el micelio y se agregó a los medios de cultivo antes de esterilizarlos en el autoclave. Doce frascos con brotes en medio de White más 2,5 mg de pantotenato de calcio sin el extracto del hongo fueron utilizados como testigo. Los frascos se colocaron a oscuridad en las mismas condiciones de temperatura que los cultivos con micelio.

Contrariamente al ensayo anterior con brotes, no se encontró ninguna diferencia en el período para formar tubérculos.

DISCUSION

Como ya ha sido demostrado, Claver (1967), los brotes tuberizan en menor tiempo que las plántulas, y la tuberización no se produce en plántulas a oscuridad como en los brotes.

Una observación que debe destacarse es el efecto de los tejidos contaminados con *Rhizoctonia* expuestos a la luz y que induce la muerte de las plántulas, efecto que no se produce en oscuridad, esto llevaría a pensar, que la luz tiene ciertos efectos sobre el hongo en la formación de algún metabolito muy tóxico para la planta. Weinhold y Hendrix demostraron que la luz afecta al medio de cultivo y que los hongos desarrollaron micelios más débiles y distintos a los normales. Estas sustancias formadas por efecto de la luz podrían ser muy tóxicas para las plántulas como en nuestro caso. La ausencia de actividad de los extractos sin micelio demostraría que la tuberización se debería a la traqueomicosis, y si existe algún metabolito formado por el hongo que interviniera en el fenómeno de tuberización, sería termolábil, destruido por esterilización en autoclave. Para dilucidar este hecho sería conve-

niente realizar otros ensayos agregando los extractos filtrados en condiciones estériles a los medios.

En relación a la producción de sustancias activas de crecimiento, Aoki, H. y colaboradores aislaron del filtrado de cultivos de *Rhizoctonia solani* ácido fenilacético, conocido regulador de las plantas. Esta sustancia inhibe en ciertas concentraciones el crecimiento de las raíces, pero no causa la necrosis característica de la actividad del hongo.

La posibilidad que esta sustancia tenga influencia en el fenómeno de la tuberización de la planta tendrá que ser demostrado.

Se han publicado trabajos acerca de la acción de herbicidas e inhibidores de crecimiento sobre la formación de tubérculos aéreos. Denisen (1953), observa el fenómeno después de pulverizaciones con hidrazida maleica. Ghosh y Pande (1966) y Mehrotra (1970) en aplicaciones de Dacthal y cloropropionanilida, respectivamente.

Las sustancias químicas mencionadas no están relacionadas entre sí, ni al ácido fenilacético formado por acción del hongo.

Estos hechos revelan que la formación de tubérculos aéreos se induciría por interferencia fisiológica en el traslado de sustancias plásticas, principalmente hidratos de carbono, ya sea por sustancias químicas o por obstrucción anatómica.

LITERATURA CITADA

- AOKI, H.; SASSA, T. and T. TAMURA (1963). Phytotoxic metabolites of *Rhizoctonia solani*. *Nature*, 200 (4906) 575.
- BERNARD, N. 1902. Etudes sur la tuberization. *Rev. Gen. Botan. et Biol. Vegetale*. Ser. 9, 14: 235-252.
- BERNARD, N. ET MAGROU, J. 1911. Sur les mycorrhizes des Pommes de terre sauvages. *Ann. Sci. Nat. Botan. et Biol. Vegetale*. Ser. 9, 14: 252-258.
- CASTAN, R. 1941. Recherches sur les conditions de tuberization des stolons de pomme de terre. *Compt. rend. Soc. Biol.* 135: 578-580.
- CLAVER, F. K. ET AL. 1958. Growth of excised potato tissue and seedling under aseptic conditions. *Phyton* 11 (2): 129-137.
- CLAVER, F. K. 1961. Estudios sobre brotes y "seedling" de papa *in vitro*. *Congreso Americano de Fitotecnia*.
- 1967. Influencia de la longitud del día y temperatura sobre la tuberización de brotes y plántulas de papa *in vitro*. *Rev. de Inv. Agro. INTA Serie 2*. 4: 224-229.
- COOPER, D. C.; RIEMAN, G. H. and HOUHAS, R. W. 1951. Mycorrhiza-like mycelium in potato tubers. U. S. Dept. Agron. Natl. *Potato Breeding Program. 22nd. Ann. Rept.*, 202.
- DENISEN, E. L. 1953. Response of Kennebec potatoes to maleic hydrazide. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 62, 411-421.
- HILDEBRANDT, A. C.; RIKER, A. J. and DUGGAR, B. M. 1946. The influence of the composition of the medium on growth *in vitro* of excised tobacco and sunflower tissue culture. *Am. J. Botany*. 33: 591-597.
- GHOSH, A. K. and PANE, P. N. 1966. Aerial tuber development in potato induced by dimethyl ester of tetrachloroterephthalic acid (Dacthal). *Allahabad Farmer* 40 (4).
- JUMELLE, H. 1905. De l'influence des endophytes sur la tuberisation de Solanum. *Rev. Gen. Botan.* 17: 49-50.

- MEHROTRA, O. N. 1970. Development of serial tubers in potato induced by stam F. 34 (3, 4, dichloropropionilide). *Allahabad Farmer* 44 (3): 113.
- VÖCHTING, H. 1887, visto en Goebel, K. (1900). *Organography of plants* (Especially of the Archegonistae and Spermathyta). Part 1. General Organography, Oxford at the Clarendon Press.
- WEINHOLD, A. R. and HENDRIX, F., 1962. Inhibition of *Rhizoctonia solani* by potato-dextrose agar previously exposed to light. *Phytopathology*, 52
- WELLENSIEK, S. J. 1929. The physiology of tuber formation in *Solanum tuberosum* L. *Med. Landbouwh. Wageningen* 33: 6-42.