

## Cocultivo *in vitro* de callos de *Nothofagus nervosa* con el hongo xilófago *Postia pelliculosa*

*In vitro* co-culture of *Nothofagus nervosa* calli with the wood-rotting fungi *Postia pelliculosa*

Hernán Alberto Mattes Fernández

Universidad Nacional del Comahue, Asentamiento Universitario de San Martín de Los Andes,  
Pasaje de la Paz 235 - Q8370AQA San Martín de Los Andes, Argentina. Tel./fax: 54-2972-42 7618,  
ausma@smandes.com.ar

### SUMMARY

An *in vitro* co-culture test between raulí (*Nothofagus nervosa*) calli of different genotypes and *Postia pelliculosa*, a frequent wood-destroying fungus in *Nothofagus*, is presented. Calli were regenerated from leaves and stem sections of *in vitro* plants. Calli induction and multiplication were performed with the Broadleaved Tree Medium (BTM) supplemented with different concentrations of plant regulators (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 6-benzyl aminopurine) vitamins (thiamine) and amino acids (glycine, glutamine, lysine). Cocultures were carried out in the BTM without glutamine, lysine and plant regulators. Twelve replicates of each fungal strain and clone combination were used. Although calli were successfully multiplied in the BTM with 6-benzyl Aminopurine (0.5 mg L<sup>-1</sup>) and naphthalene acetic acid (0.02 mg L<sup>-1</sup>), they showed a recalcitrant behavior. After 35 days of co-culture initiation, fungal mycelium invaded calli in 91.3% of cultures; calli showed conspicuous changes in coloration and friability.

*Key words:* subantarctic forests, Nothofagaceae, wood rotting, *in vitro* resistance test.

### RESUMEN

Se describe el cocultivo *in vitro* de callos de varios genotipos de *Nothofagus nervosa* (raulí), con una cepa del hongo xilófago *Postia pelliculosa*. Los callos se obtuvieron de hojas y tallos provenientes de cultivos *in vitro*. Para la inducción de la callogénesis, se utilizó el medio de cultivo Broadleaved Tree Medium (BTM) suplementado con 2,4-diclorofenoxyacético a varias concentraciones (0,5-1-2 mg L<sup>-1</sup>), 0,25 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencil aminopurina (BA), 10 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 50 mg L<sup>-1</sup> de lisina, 50 mg L<sup>-1</sup> de glicina y 500 mg L<sup>-1</sup> de glutamina. La multiplicación de los callos se realizó en el mismo medio sin los suplementos citados o con el agregado de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BA + 0,02 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalén acético (ANA). Los cocultivos callo/hongo se efectuaron en un BTM sin glutamina ni lisina, y sin el agregado de reguladores de crecimiento. Se realizaron 12 repeticiones por cada combinación de clon-hongo. Si bien los callos obtenidos en la primera etapa se multiplicaron satisfactoriamente con BA y ANA, mostraron en general un comportamiento reticente en cultivo. Luego de 35 días, el micelio invadió el 91,3% de los cocultivos con distinta intensidad, y la superficie de los callos presentó un notable cambio en el color y un gran aumento de su friabilidad.

*Palabras clave:* bosques subantárticos, Nothofagaceae, pudrición de madera, prueba de resistencia *in vitro*.

### INTRODUCCIÓN

Entre los factores adversos que actúan sobre los árboles y sus productos, los hongos xilófagos que causan pudriciones constituyen uno de los grupos de agentes patógenos que producen las mayores pérdidas de madera aserrable a nivel mundial (Manion 1991). En Argentina, en los lengales (*Nothofagus pumilio* (Poep.) Endl.) de la provincia de Chubut, se estimó una pérdida económica de aproximadamente 450 millones de dólares a causa de los hongos xilófagos y se demostró que solamente un

26% de la madera proveniente de lengas seleccionadas se encontraba en buen estado sanitario (Rajchenberg y Cwielong 1995). Otras investigaciones en Chile han demostrado la severidad de las pudriciones en lenga (Donoso y Caldentey 1995). En los últimos años se ha prestado mayor atención al uso de métodos de protección biológica contra estas enfermedades, como el uso de microorganismos antagonistas y la selección de árboles tolerantes y resistentes.

El método tradicional para obtener individuos resistentes a hongos y otros microorganismos consiste en la

inoculación artificial *in vivo* del patógeno y la posterior observación de la respuesta de los individuos. Una alternativa a este procedimiento, que permite acortar el tiempo del programa de selección, es el cocultivo *in vitro* del hongo con tejidos o células del árbol hospedante. Esta técnica presenta ventajas para estudiar las enfermedades a nivel celular, como la posibilidad de controlar las condiciones ambientales y la composición nutritiva del medio de cultivo (Duval *et al.* 1999). La aplicación del cocultivo *in vitro* con el objetivo de seleccionar individuos resistentes a hongos y otros microorganismos patógenos ha dado buenos resultados en varias especies forestales (Diner y Karnowsky 1987, Diner 1991, Kechel *et al.* 1988, Klopfenstein 1993, Ragazzi *et al.* 1995). Cocultivos de callos de varias especies forestales con hongos lignívoros mostraron que los callos estimulaban el crecimiento de las especies fúngicas que normalmente atacan a la albura (*Heterobasidium annosum* (Fr.) Bref., *Stereum rugosum* (Pers. ex Fr.), *Piptoporus betulinus* (Bull) Karsten), y eran invadidos por el micelio, mientras que provocaban la inhibición del crecimiento en las especies que invaden el duramen (*Laetiporus sulphureus* (Fr.) Murr, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Fr., *Phaeolus schweinitzii* (Fr. Pat.) (Hrib y Rypacek 1981). En *Nothofagus spp.* ha sido lograda con éxito en varias especies la propagación *in vitro* y, en algunos casos, a partir de árboles maduros (Jordan Zimmerman y Veloso Soto 1992, Martínez Pastur y Arena 1995, 1996, 1997, Martínez Pastur *et al.* 1997), lo que posibilitaría la aplicación de pruebas *in vitro* de resistencia a diversos factores ambientales.

En el presente trabajo se planteó como objetivo ajustar una técnica que permita el cocultivo *in vitro* de callos de varios genotipos de *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil., "raulí", con una cepa del hongo xilófago *Postia pelliculosa* (Berk.) Rajchenb., con la finalidad de realizar posteriormente pruebas *in vitro* de resistencia.

## MÉTODOS

**Obtención de callos.** Como material vegetal fueron seccionadas hojas transversalmente a la mitad y porciones de tallo con dos yemas, provenientes de cultivos *in vitro* en etapa de multiplicación. Los cultivos fueron establecidos a partir de plántulas obtenidas por germinación *in vitro*. Las semillas utilizadas se recolectaron en el Parque Nacional Lanín (Neuquén, Argentina), Área Tromen, Rodal N° 27, en el año 1997. Para establecer los cultivos libres de contaminaciones, antes de la germinación *in vitro*, las semillas fueron sometidas a un tratamiento de desinfección con una solución de peróxido de hidrógeno al 20% durante 60 minutos seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Con el objetivo de promover la callogénesis en los explantos, como medio de cultivo se usó Broadleaved Tree Medium (BTM) (Chalupa 1983)

suplementado con 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en varias concentraciones (0,5-1-2 mg L<sup>-1</sup>), 0,25 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencil aminopurina (BA), 10 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 50 mg L<sup>-1</sup> de lisina, 50 mg L<sup>-1</sup> de glicina y 500 mg L<sup>-1</sup> de glutamina. Tomando como base las recomendaciones de Hrib *et al.* (1993), una vez generados los callos, los mismos se transfirieron a un BTM con los mismos suplementos a excepción del 2,4-D o con la adición de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencil aminopurina + 0,02 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalén acético. Los callos se cultivaron en oscuridad y a 24-25 °C. Los subcultivos se efectuaron cada 14 ó 21 días. Se efectuaron cortes histológicos longitudinales de los callos con el objetivo de montarlos y observar su micromorfología. Los cortes del material fresco se realizaron a mano alzada, fueron vaciados con hipoclorito de sodio, lavados y deshidratados, coloreados con safranina-fast green y montados en bálsamo de Canadá.

**Cocultivo *in vitro*.** Las confrontaciones o cocultivos callo/hongo xilófago se efectuaron en BTM sin glutamina y sin lisina, con las vitaminas tiamina, piridoxina y ácido nicotínico a las concentraciones especificadas para el medio y sin el agregado de reguladores de crecimiento. Para el ensayo se utilizó una cepa de *Postia pelliculosa* (Berk.) Rajchenb., aislada de una troza de raulí en el año 1996 y mantenida en frío (4-6 °C) como cultivo puro. Para la realización de la prueba, en placas Petri estándar se colocaron en forma equidistante y a la altura del radio mayor, una rodela de 0,9 cm de diámetro con medio de cultivo y micelio de la cepa fúngica y una porción de callo de tamaño similar. Los cocultivos se incubaron en oscuridad a 24-25 °C. Se realizaron un total de 12 repeticiones por cada combinación de clon-cepa. A los 35 días de cultivo se dio por finalizado el ensayo evaluándose el desarrollo de la colonia fúngica sobre el callo, las características morfológicas macro y microscópicas del callo y las características morfológicas macro y microscópicas del callo invadido por el micelio fúngico.

## RESULTADOS

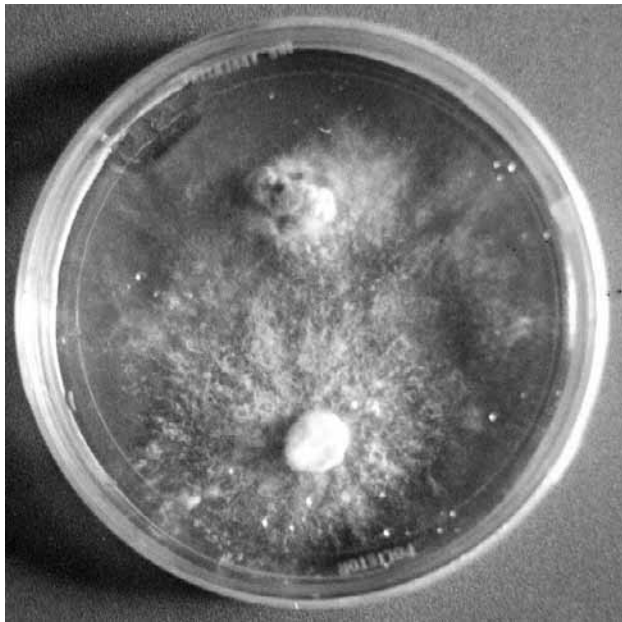
**Obtención de callos.** A partir de los explantos cultivados, todas las concentraciones de 2,4-D ensayadas promovieron la formación de callos cualitativamente similares. La combinación de BAP y ANA en el medio de cultivo fue efectiva para multiplicar los callos obtenidos en la primera etapa. La consistencia de los mismos fue medianamente friable, y el color varió entre blanco amarillento y castaño muy claro con una transparencia media. Al microscopio, en los cortes longitudinales los callos se presentaron como una masa irregular de células parenquimáticas más o menos isodiamétricas, poliédricas, sin espacios intercelulares, en las que se encontraron sectores constituidos por elementos traqueales cortos dispuestos en forma irregular. Las paredes de estos elementos

presentan espesamientos secundarios, lignificados, de tipo helicado y reticulado, característicos del xilema primario temprano o protoxilema. En general, los callos de raulí (*N. nervosa*) obtenidos mostraron un comportamiento reticente en cultivo, produciéndose frecuentes pérdidas a causa de la ocurrencia de necrosis de grupos aislados de células o del callo en su totalidad. Como consecuencia de estos inconvenientes, para la realización de la prueba *in vitro* de resistencia se contó finalmente con un total de cuatro genotipos, con un número de repeticiones que varió entre 7 y 12 por genotipo.

*Cocultivo in vitro.* Aproximadamente a los 30 días de iniciados los cocultivos, el micelio fúngico entró en contacto con el límite externo del callo. A los 35 días, en el 91,3% del total de los cocultivos estudiados (n = 46), el micelio invadió con distinta intensidad la superficie de los callos (figura 1) y en los mismos se observó un notable cambio en el color, de blanco amarillento normal a castaño claro u oscuro, y un gran aumento de su friabilidad.

## DISCUSIÓN

El comportamiento *in vitro* de *Postia pelliculosa* ha sido constatado en otros hongos lignívoros confrontados con callos de varias especies forestales (Hrib y Rypacek 1981). En dicho trabajo, se observó la invasión fúngica del callo en las siguientes confrontaciones: *Picea abies* (L.) Karst./ *Heterobasidium annosum* (Fr.) Bref.-*Fagus*



**Figura 1.** Cocultivo *Nothofagus nervosa*/*Postia pelliculosa* a 35 días del inicio del ensayo.

Joint culture of *Nothofagus nervosa*/*Postia pelliculosa* after 35 days from assay beginning.

*sylvatica* L. (“haya europea”) / *Stereum rugosum* (Pers. ex Fr.)-*Betula verrucosa* Ehrh. / *Piptoporus betulinus* (Bull.) Karsten. En el ambiente natural, estas especies xilófagas tienen la capacidad de atacar la albura y a menudo el cambium del hospedante. En *H. annosum* se ha estudiado con gran profundidad el proceso de infección (Nsolomo y Woodward 1997). Se comprobó, por ejemplo, que las hifas del hongo invaden las células parenquimáticas de la corteza y la epidermis de embriones de especies de *Pinus* resistentes y susceptibles, y que las células invadidas y las adyacentes responden en todos los casos con un engrosamiento de la pared celular. A su vez, se observó en las especies resistentes la lignificación y suberización de las paredes de las células corticales.

## AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar su agradecimiento a la Lic. María Inés Zingoni por su colaboración en la realización e interpretación de los cortes histológicos y al alumno Fernando Guillaumet (Carrera Técnico Universitario Forestal) por su trabajo en la obtención de callos *in vitro* de raulí. Además desea agradecer especialmente a los doctores Mario Rajchenberg, Sandra Sharry y Alejandro Escandón por la revisión del manuscrito.

## REFERENCIAS

- Chalupa V. 1983. Micropropagation of Conifer and Broadleaved Forest Trees. *Communicationes Instituti Forestalis. Cechosloveniae.* 13: 7-39.
- Diner A, D Karnowsky. 1987. Tissue culture application to forest pathology and pest control. In Bonga J y D Durzan eds. *Cell and Tissue Culture in Forestry* Mart. Nijhoff Publ., Boston. p. 351-373.
- Diner A. 1991. *In vitro* disease resistance for expression of somaclonal variation in *Larix*. In M.R. Ahuja (ed.) *Woody Plant Biotechnology*. Plenum Press, New York. p. 63-65.
- Donoso S, J Caldentey. 1995. Rendimiento de lenga (*Nothofagus pumilio*) en el aserrado y su relación con las características silvícolas de los árboles. *Actas IV Jornadas Forestales Patagónicas.* p. 439-453.
- Duval C, L Stier Caldas, R De Oliveira Resende. 1999. Aplicações da cultura de tecidos na fitopatologia. In: Torres, A. (ed.) *Cultura da tecidos em transformação genética de plantas*. CBAB-Embrapa. p. 45-68.
- Hrib J, V Rypacek. 1981. A simple callus test to determine the aggressiveness of wood-destroying fungi. *Eur. J. For. Path.* 11: 270-274.
- Hrib J, B Vookova, P Flak. 1993. Effect of auxin, cytoquinin, and glutamine on mycelial growth of *Phaeolus schweinitzii*. *Eur. J. For. Path.* 23: 269-275.
- Jordan Zimmerman M, J Veloso Soto. 1992. Micropropagación de Raulí (*Nothofagus alpina*). Segundo Taller Silvícola. Santiago, Chile, p. 57-64.

- Kechel HG. 1988. Frühdiagnose von Resistenz-eigenschaften mit Hilfe der Gewebekultur. *Allgemeine Forst Zeitschrift*. 49: 1353-1362.
- Klopfenstein ND. 1993. Transformation of *Populus* hybrids to study and improve pest resistance. *Biotechnology of Trees*. V Intern. Workshop of the IUFRO. p. 23.
- Manion PD. 1991. Tree disease concepts. 2<sup>nd</sup> Ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs (NJ). 402 p.
- Martínez Pastur G, M Arena. 1995. In vitro propagation of *Nothofagus obliqua* (Fagaceae). *Aust. J. Bot.* 43: 601-607.
- Martínez Pastur G, M Arena. 1996. In vitro propagation of *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. *Phyton* 58 (1/2): 1-7.
- Martínez Pastur G, M Arena. 1997. Micropropagación de *Nothofagus pumilio* (Poep. et Endl.) Krasser. *Bosque* 18 (2): 43-50.
- Martínez Pastur G, M Arena, O Caso. 1997. In vitro propagation of *Nothofagus antarctica* from Sphaeroblasts and Samplings. *Biocell*. 21(3): 231-236.
- Nsolomo V, S Woodward. 1997. Histological and biochemical detection of defence responses in pine embryos challenged *in vitro* with *Heterobasidium annosum*. *Eur. J. For. Path.*: 187-198.
- Ragazzi A, S Moricca, I Delavalle. 1995. Growth of axenic cultures of *Cronartium flaccidum* on callus tissue from *Pinus nigra* var. *laricio* and *Pinus sylvestris*. *Eur. J. For. Path.* 2: 31-37.
- Rajchenberg M, P Cwielong. 1995. Wood-rotting fungi on *Nothofagus pumilio* in Patagonia, Argentina. *Eur. J. For. Path.* 25: 47-60.

Recibido: 24.11.05  
Aceptado: 05.01.07