

EVALUACIÓN DE PLÁNTULAS DE CARDAMOMO (*Elettaria cardamomum* (L.) Maton) POR SU RESISTENCIA *in vitro* AL FILTRADO DE CULTIVO DE *Fusarium oxysporum* Link

SEEDLINGS OF CARDAMOM (*Elettaria cardamomum* (L.) Maton) EVALUATION BY RESISTANCE *in vitro* AT CULTURE FILTRATES OF *Fusarium oxysporum* Link

Dorcas ZÚÑIGA S.^{1*}, Rodrigo HOYOS S.², Lucía AFANADOR K.²

Recibido: Abril 01 de 2009 Aceptado: Junio 02 de 2010

RESUMEN

El *Fusarium oxysporum* Link es el causante de la pudrición basal en el cardamomo. En el presente trabajo se evalúa el efecto fitotóxico del filtrado crudo del hongo, para seleccionar variantes somaclonales de cardamomo resistentes al mismo en pruebas de patogenicidad en invernadero. Mediante los resultados de mortalidad se seleccionaron el clon 5 y el aislado 4 como los de mayor interacción de susceptibilidad – virulencia. De plántulas madres mantenidas en medio de crecimiento acelerado, se inocularon mensualmente 25 plántulas con diferentes concentraciones del filtrado, causando mortalidad en las primeras semanas. A partir de la semana 6, sólo un 32% resistieron el incremento de concentración. Para el décimo ciclo de inoculación, el 100% de plántulas permanecían en el filtrado crudo sin diluir, demostrando que a más tiempo en medio de crecimiento acelerado y mayor presión de selección, incrementando la concentración del filtrado, mayor probabilidad habrá de obtener variantes somaclonales con resistencia *in vitro* a *Fusarium oxysporum*.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum*, cardamomo, fitotoxinas, variación somaclonal, presión de selección.

ABSTRACT

Fusarium oxysporum Link is the cause of basal rotting in cardamom. The present article evaluates the phytotoxic effect of the fungus crude filtrate, for selecting somaclonal variations of cardamom that showed resistance in greenhouse pathogenicity tests. According to mortality test results clone 5 and the isolated 4 were pointed with the most susceptibility-virulence interaction. From accelerated growth media seedlings there were selected 25 and inoculated with different concentrations of filtrate, causing mortality on the initial weeks. By the sixth week only a 32% resisted the concentration increment. By the tenth cycle of inoculation 100% of seedlings remained in the crude filtrate without dilutions. The more time the seedlings remain in accelerated growth media and the more selection pressure increasing filtrate concentration show increased probability of getting somaclonal variants with *in vitro* resistance of *Fusarium oxysporum*.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, cardamom, phytotoxin, somaclonal variation, selection pressure.

1 Facultad de Ciencias de la Salud. Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia. A.A. 5177. Medellín, Colombia.

2 Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. A.A. 1779. Medellín, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: dorcas.zuniga@unalmed.edu.co

INTRODUCCIÓN

El cardamomo es una hierba perenne perteneciente a la familia de las Zingiberaceae, y de la cual sólo se usan las semillas. Es oriunda de las selvas tropicales de la India meridional, Sri Lanka, Malasia y Sumatra. Actualmente se cultiva también en Nepal, Tailandia y América Central, y es Guatemala el mayor productor mundial (1). Entre sus componentes activos se encuentra un 4% de aceites volátiles, incluidos el terpineol, el cineol, el limoneno, el sabineno y el pineno, almidón y ácidos grasos (1). Gracias a estos componentes, el cardamomo es carminativo, estimulante, antiespasmódico, y aromático, y ha adquirido gran importancia en las industrias alimentaria y farmacológica (1).

Una de las mayores limitantes del cultivo del cardamomo (*Elettaria cardamomum*) es la pudrición de la raíz, que se destaca entre las enfermedades más importantes causadas por el hongo *Fusarium sp* (2), especie *F. oxysporum*, considerado a nivel mundial como el agente causal de la enfermedad (3). Se sabe que las pérdidas en la producción por causa de esta enfermedad superan en ocasiones el 40%, lo cual constituye un gran problema para la rentabilidad del cultivo.

Su control se basa en el uso de fungicidas, que hacen poco atractivo el producto ahora que se impone el consumo de alimentos saludables, es decir de “nula trazabilidad con agroquímicos”.

A pesar de estas medidas la producción sigue afectada. El control de fitopatógenos implica el uso de agropesticidas, que incrementa notablemente los costos de producción, además de contribuir al deterioro del medio ambiente. Es necesario encontrar otras alternativas de manejo de esta enfermedad. Dentro de los diferentes métodos estudiados en otros cultivos, se ha considerado la selección de variedades para plantar en el huerto, las cuales, además de adaptarse a la región, deben demostrar su alta productividad, calidad excelente y resistencia al ataque del hongo, de modo tal que demanden sólo moderadamente el uso de agroquímicos.

Sin embargo, aún no se generan protocolos para el cardamomo que permitan adelantar programas de este tipo, y conduzcan a la obtención de un variante somaclonal. Constituye todo un reto la labor de aplicar una metodología biotecnológica y verificar la interacción hospedante – patógeno, y la selección de aquellas poblaciones de plántulas tolerantes o resistentes al factor de presión (fitotoxinas), con el fin

de regenerarlas, esperando que su comportamiento *in vitro* sea el mismo que el de las plantas adultas en campo, y convertirlo en una alternativa rápida y confiable que pueda ser adoptada en un programa de mejoramiento genético de dicha planta.

El empleo de fitotoxinas extraídas de varios fitopatógenos de importancia comercial, conducentes a la obtención de material resistente a enfermedades a través de procesos de selección *in vitro*, es una técnica ampliamente utilizada desde hace varias décadas, con resultados exitosos en varias especies vegetales (4-6).

Algunas investigaciones confirman la inhibición del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* cuando el micelio del hongo se inocula en macerado de tejido embriogénico de plantas previamente seleccionadas por su resistencia a toxinas de tipo pectinasas (7) o metabolitos secundarios (8) presentes en filtrados crudos del mismo hongo. Se confirma así la existencia de compuestos antifúngicos generados por el vegetal y directamente implicados en los mecanismos de defensa de tejidos seleccionados.

Rappaport y Pullman, 1983 (9), Orton *et al.*, 1984 (10), Paugliuso *et al.*, 1988 (11), han hecho estudios tendientes a determinar la reacción de materiales, en los cuales se informa haber obtenido resistencia al ataque de *Fusarium sp* (12), utilizando técnicas de suspensiones celulares en especies como apio o alfalfa. También hay informes de resistencia en cultivos de tomate, con hongos como *Colletotrichum gloeosporioides* (6), y en apio con *Septoria apiicola* (13).

Los resultados de dichos trabajos indican que, en estas condiciones, los cultivos mencionados se destacan por su baja susceptibilidad a la enfermedad. Lo anterior demuestra que la selección *in vitro* puede generar variantes somaclonales genéticas o epigenéticas con algún grado de resistencia a la enfermedad causada por el patógeno *in vivo*. Estudios de laboratorio y campo con diferentes especies confirman la existencia de variantes somaclonales resultantes de procesos de selección, cuya progenie conserva las características de resistencia adquiridas en la fase de cultivo de tejido (5, 14).

Con miras a contribuir desde otra perspectiva a encontrar materiales resistentes a la marchitez causada por *F. oxysporum*, este trabajo tuvo como objetivo principal evaluar el método de selección *in vitro* usando tejidos somáticos diferenciados de cardamomo contra el filtrado crudo de *F. oxysporum* para obtener, al menos, un clon con resistencia inducida *in vitro* a sus metabolitos tóxicos, y

consolidó la metodología del crecimiento acelerado para generar variantes somaclonales de cardamomo que permitan la selección *in vitro* contra toxinas de hongos fitopatógenos y, por ende, la obtención de materiales resistentes a estos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material fúngico

Los aislados de *F. oxysporum* se obtuvieron de cormos de cardamomo con síntomas típicos de marchitamiento o pudrición radical, donados por la empresa Cultivares S.A. De ocho aislamientos axénicos del hongo se obtuvieron cultivos monospóricos, que al cabo de doce días de crecimiento fueron utilizados para pruebas de patogenicidad en invernadero.

Pruebas de patogenicidad en invernadero. Se trabajó con plántulas de entre ocho y doce meses de establecimiento *in vitro* y ocho semanas de endurecimiento, correspondientes a los clones 5 y 9 donados por Cultivares S. A. al Laboratorio de Micropropa-

gación de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín que, después del establecimiento *in vitro*, los suministraron para la investigación.

Todos los aislados monospóricos del hongo fueron evaluados en cada clon de cardamomo, para estimar la interacción virulencia susceptibilidad; cada bioensayo tuvo cuatro réplicas y su respectivo testigo. La inoculación de las plántulas se hizo escindiendo los ápices radicales y sumergiéndolos en una suspensión de esporas de 1×10^6 durante una hora, al cabo de la cual las plántulas se sembraron individualmente en materas con suelo esterilizado.

Pasados ocho días de la siembra, las plántulas se fertilizaron con N.P.K., para garantizar que los síntomas expresados se debieran a efectos patogénicos y no a carencias nutricionales. Tres meses después se cosecharon, disectaron y evaluaron según cinco variables respuesta. La figura 1 muestra: clorosis foliar, longitud de la raíz, longitud del vástago, número de hojas y necrosis de haces vasculares. Fueron seleccionados el clon 5 como el más susceptible, y el aislado 4 del hongo como el de mayor virulencia. En las figuras 1a y 1b aparecen las variables respuestas mencionadas.

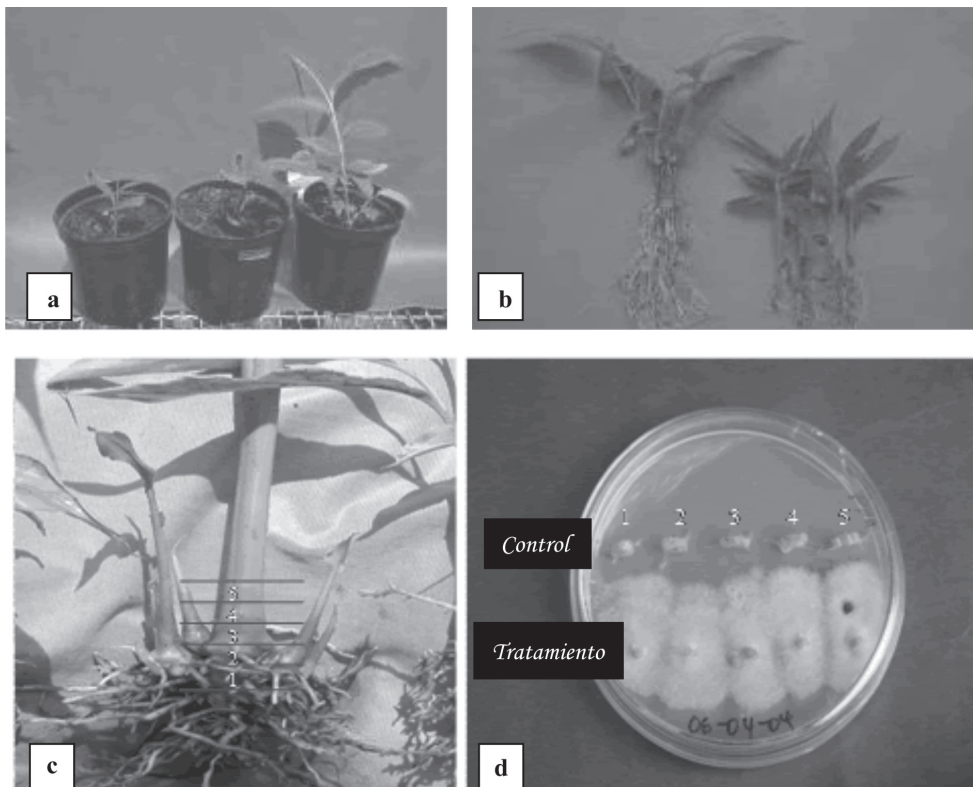


Figura 1. (a). Efecto fitotóxico de *Fusarium* en plántulas de cardamomo en relación con el testigo. (b). Diferencia de crecimiento entre las plántulas con inoculación de *Fusarium oxysporum*, L. (derecha), y sin ella (izquierda). (c). Segmentos disectados para evidenciar el avance del hongo por los haces en plántulas infectadas. (d). Reaislamiento del hongo a partir de segmentos afectados (abajo) para la obtención de monospóricos, y comparación con el testigo (arriba).

La presencia y el avance de la infección en el sistema vascular de las plantas tratadas se evaluó mediante siembra y crecimiento *in vitro* de la porción terminal del tallo, practicando cinco cortes transversales, de 3 mm aproximadamente, desde el cuello de la raíz hacia arriba, colocando en medio PDA las secciones en respectivo orden ascendente, incubando a temperatura ambiente y luz tenue por 72 horas, después de las cuales se evidenció, por germinación de micelio, el nivel vascular de avance del hongo, procediéndose a reaislarlo monospóricamente como se evidencia en las figuras 1c y 1d.

Selección y regeneración *in vitro* de variantes somaclonales

Para obtener y regenerar variantes somaclonales de cardamomo con resistencia inducida *in vitro* a la pudrición basal causada por *Fusarium*, se evaluaron los efectos de dos factores: concentración de la citocinina 6-bencilaminopurina (BAP), y concentración de filtrado fitotóxico, estableciendo un diseño bifactorial con cuatro niveles de concentración de BAP de 3, 4, 7 y 10 mg·L⁻¹ en medio de cultivo básico (15), y cuatro niveles de dilución del filtrado crudo con acción fitotóxica.

El diseño bifactorial no contempla niveles de concentración sino niveles de dilución por haber trabajado filtrados crudos no cuantificados o caracterizados. Para establecer la dilución del filtrado fitotóxico como agente de selección en el medio de cultivo, se procedió según la metodología empleada por Pagliuso *et al.*, 1988 (11), cosechando el filtrado después de tres semanas de germinación de las esporas y crecimiento micelial, filtrando en papel Whatman #1 con posterior filtración en Millipore 0,2 µm.

Los niveles evaluados de dilución del agente selectivo (filtrado fitotóxico) correspondieron a las diluciones 1:0, 1:2, 1:4, 1:8 en donde crecieron las plántulas de cardamomo; el nivel 1:0 correspondió al filtrado crudo puro, es decir, sin diluir. El solvente utilizado para las diluciones fue medio de cultivo básico BAP 3 mg·L⁻¹

Ciclos de inoculación del filtrado y estrategias de selección

Un grupo de 1.000 plántulas madres desarrolladas y conservadas *in vitro* en el laboratorio de Micropropagación de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, se mantuvo durante ocho meses en medio de crecimiento acelerado 3 mg/L de BAP, e igual número de plántulas, en medio de crecimiento básico, con concentraciones normales de BAP de 0,7mg/L, con el fin de intervenir en la división celular de cardamomo, generar posibles variantes somaclonales y poder evaluar la respuesta organogénica de los explantes, sometidos o no a la acción del filtrado fitotóxico.

Se utilizó medio de cultivo básico M&S (14), suplementado con 0,5 mg/L de piridoxina, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 2,0 mg/L de glicina, 1,0mg/L de ácido indolacético, 20 g/L de sacarosa, pH de 5,6 ± 1,0. Las plántulas se sembraron en diferentes tratamientos, con y sin filtrado, y se mantuvieron a 12 horas fotoperíodo y 25 ± 2°C. Los brotes eran subcultivados cada 20 a 30 días en medio fresco.

En cada ciclo de inoculación se evaluaron 25 plántulas de cada grupo madre y se inocularon con el filtrado crudo del hongo durante tres semanas, para obtener un filtrado crudo de 21 días de crecimiento. La variable respuesta corroborada fue la presencia de necrosis como característica primaria de la enfermedad. En los medios con filtrado los brotes sin necrosis se mantenían en la misma dilución por un mes, al cabo del cual se incrementaba la dilución del filtrado fitotóxico.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa estadístico MSTAT-2.13 (Programme Statistical University of Michigan). Para su transformación se utilizó X+0,5 y la comparación de las medias transformadas se realizó mediante la prueba de Duncan.

La figura 2 resume la metodología empleada para generar variantes somaclonales en plántulas de cardamomo con resistencia o tolerancia inducida *in vitro* a los metabolitos fitotóxicos de *Fusarium oxysporum* Link como estrategia de selección.

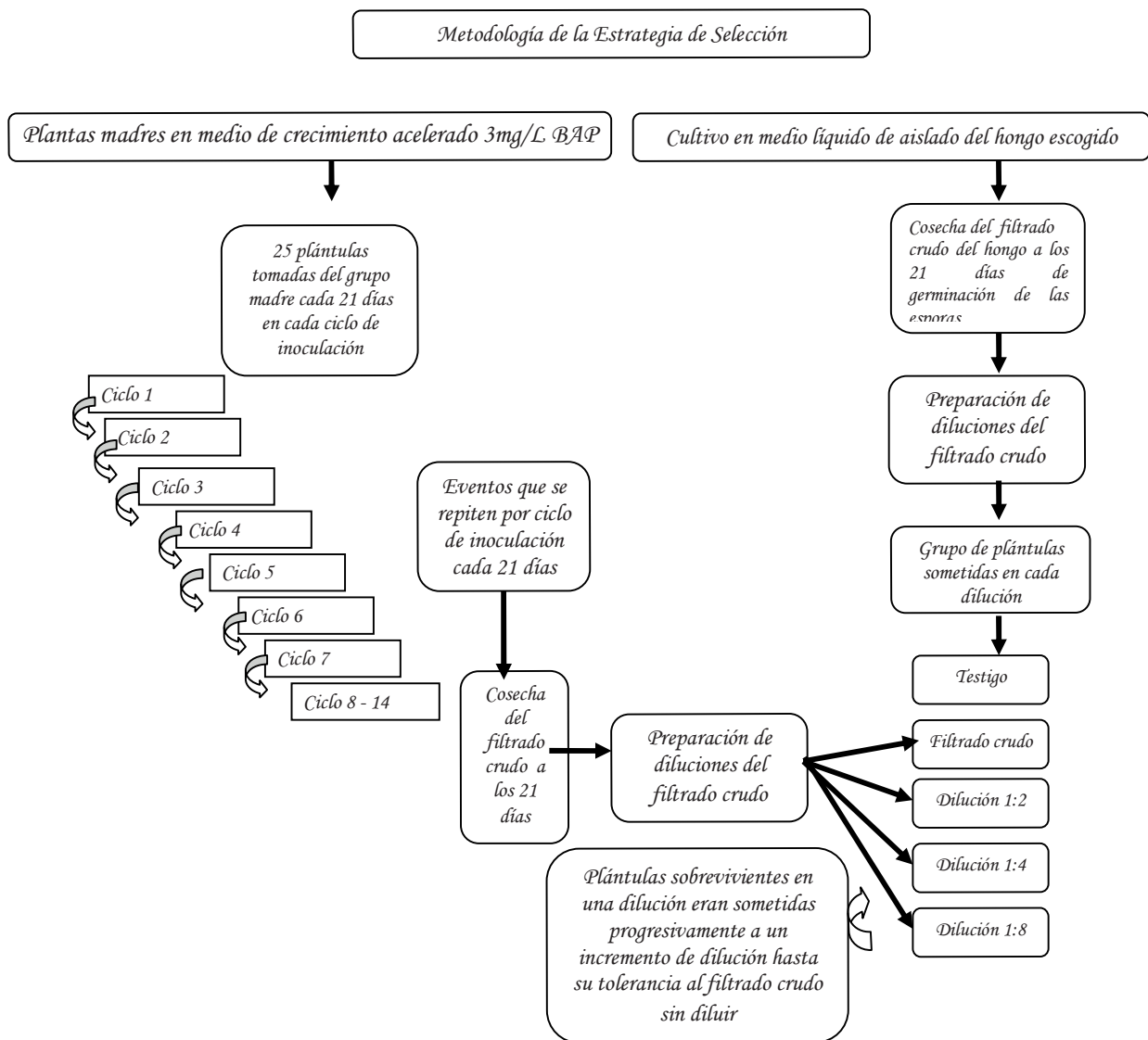


Figura 2. Diagrama de flujo para la generación de variantes somaclonales de cardamomo, resistentes a *F. oxysporum*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de patogenicidad en invernadero

El protocolo de patogenicidad en invernadero fue efectivo. Los análisis demostraron que la inoculación de aislados monospóricos a los clones 5 y 9 de cardamomo contribuye de manera eficiente al proceso de selección de la interacción del clon 5 como el más susceptible, y aislado 4 (cuatro) de *Fusarium* como el más virulento. La tabla 1 muestra una interacción altamente significativa ($P=0,005$), con un coeficiente de variación del 12,97%, que selecciona la interacción entre susceptibilidad y patogenicidad para realizar pruebas de patogenicidad *in vitro*.

Teniendo en cuenta los resultados de la tabla 1 y la figura 3, se puede afirmar que los aislados monospóricos del hongo, rotulados como 3, 4, 7, y 8 ocasionaron mayor mortalidad por necrosis sobre el clon 5, en contraste con el efecto que causan estos mismos aislados en el clon 9, en donde las medias de los tratamientos transformados muestran mayor supervivencia de las plantas. Por consiguiente, las combinaciones clon 5, aislados 3, 4, 7 y 8, fueron escogidos para la selección *in vitro* por presentar el mismo valor en medias transformadas.

Tabla 1. Análisis de varianza de comportamiento de los clones de cardamomo vs cepas de *Fusarium oxysporum*.

Factor	GL. ¹	Suma de los Cuadrados	Media de los Cuadrados	Valor de F2	Probabilidad > F ²
Clones (A)	1	0,340	0,340	18,6923	0,0001
Cepas (B)	7	2,310	0,330	18,1648	0,0000
AB	7	0,432	0,062	3,3956	0,0050
Error	48	0,872	0,018		
Total	63	3,954			

Coeficiente de variación: 12,97%
1. Grados de Libertad
2. Coeficiente de Fisher

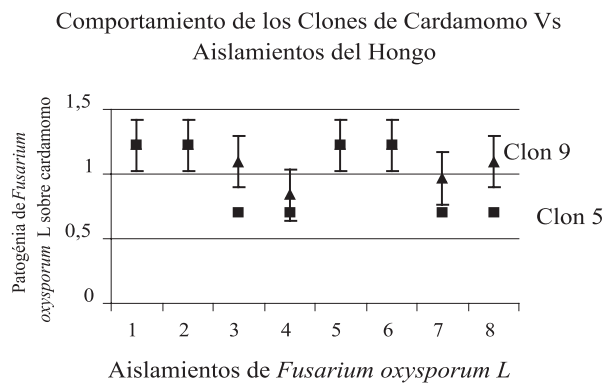


Figura 3. Comportamiento de los clones 5 y 9 de *Elettaria cardamomum* frente a los aislamientos de *Fusarium oxysporum* Link.

El análisis de resultados permitió apreciar diferencias estadísticas significativas entre algunos de los tratamientos; la acción virulenta de los aislados ocasionó necrosis de la corteza de los cormos, decoloración vascular al nivel de la raíz y el tallo, clorosis intervenal, necrosis foliar, defoliación prematura, reducción del crecimiento, amarillamiento y enrojecimiento de las hojas adultas y pardeamiento vascular. Se dieron diferencias significativas en la susceptibilidad de los clones; así, se halló una afección del 89% de plántulas evaluadas del clon 5, en comparación con un 45% en el clon 9, después de cuatro semanas de inoculación con el hongo.

Los síntomas de afección por *Fusarium* se observaron a las cinco semanas de inoculación, resultado concordante con los obtenidos por Hartman y Wildholm (16), cuando en sus ensayos con soya, al realizar cortes al nivel del tallo y sumergirlos en suspensión de esporas antes de la siembra, pudieron apreciar los efectos tóxicos con un nivel de significancia de ($P=0,01$), lo que indica que se trata de un método rápido para determinar la toxicidad del

hongo, que puede resultar útil en la identificación de fracciones de toxinas en el filtrado.

La diferencia de susceptibilidad que pudo apreciarse concuerda con la informada por Roca y Mroginski, 1993 (17), quienes afirman que en clones provenientes de tejidos organizados de una misma planta madre se puede dar la segregación de ciertos tipos celulares presentes en el explante primario como resultante de mutaciones o cambios ocasionados por el medio de cultivo, la presión de selección ejercida por el tiempo en cultivos *in vitro*, el medio de cultivo y las condiciones ambientales, que conducen a reordenamientos cromosómicos y modificaciones del cariotipo, en respuesta diferencial a los procedimientos de cultivo, siendo causa de variación somaclonal.

Estas afirmaciones podrían conducir a análisis más detallados y reevaluar el concepto de clon en cultivo de tejidos. Más importante sería que, existiendo plasticidad en el genoma de las plantas, la programación del genoma y la modificación de su expresión según el desarrollo fuera lo que caracterizara al clon.

La diferencia en el nivel de afección de los aislados monospóricos de *Fusarium* obedece, según lo reportado por Pagliuso *et al.*, 1988 (11), a que las variaciones somaclonales de la especie son las utilizadas en la selección de plantas por su resistencia a las enfermedades que el hongo ocasiona, ya que al seleccionar aislados fitopatogénicos se puede incrementar la resistencia a las enfermedades específicas producidas por patógeno, mediante el uso de los filtrados crudos donde se encuentran sus micotoxinas.

Las cepas no patogénicas pueden ser el resultado de derivaciones resistentes de variaciones somaclonales en cepas patogénicas, ya que las cepas no patogénicas (denominadas así por su incapacidad de causar enfermedad) son colonizadores agresivos de la corteza de la raíz que actúan como barreras biológicas al establecer competencia con cepas patogénicas, contrarrestando así los efectos de estas últimas. Esta afirmación es respaldada por Schneider, 1984 (18).

Según Gaot *et al.*, 1995 (19), se presume que las cepas no patogénicas, por su habilidad para entrar en el tejido vascular, en contraste con las patogénicas, suscitan una rápida respuesta en el hospedero para localizar un sitio de infección, activar su maquinaria genética y organizar una respuesta rápida al ataque, lo que constituye un importante recurso en fitopa-

tología. La colonización sintomática es el efecto de una infección latente, cuyo crecimiento agresivo induce rápidamente la muerte en el hospedero cuando se activa el hongo.

Selección *in vitro* y regeneración de variantes somaclonales de cardamomo

El mayor número de regenerantes por explante se observó en los tratamientos de medio de crecimiento acelerado, donde se utilizó 3 mg/L de BAP. La figura 4 representa la morfología de los explantes evaluados. Al igual que en los estudios realizados por Patiño *et al.*, 2007 (6), los tratamientos con concentraciones de BAP normal sin filtrado se mantuvieron vivos y su morfología estable.

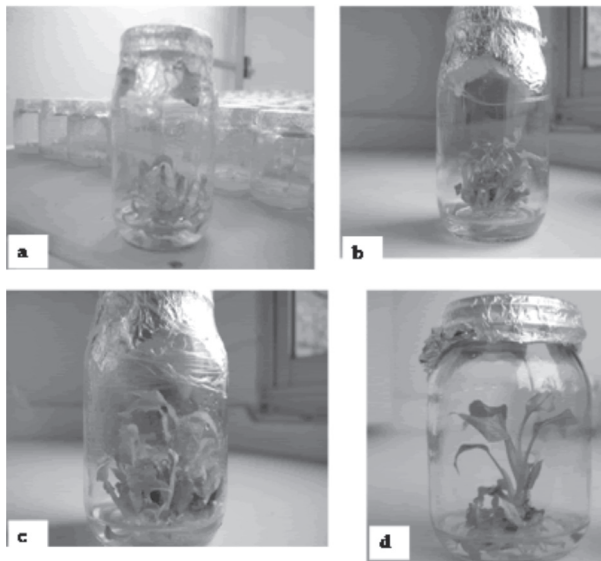


Figura 4. Efecto de la concentración de BAP en la producción de brotes en cardamomo. a) 10 mg/L BAP (30 – 25 brotes); b) 7 mg/L BAP (20 – 25 brotes); c) 4 mg/L BAP (15 – 20 brotes); d) 3 mg/L BAP (5 – 10 brotes).

Se descartaron los tratamientos con concentración de BAP por encima de los 3 mg/L porque los explantes producidos fueron amorfos, lo que indica que, dependiendo del nivel endógeno de la fitohormona en el testigo, la adición de sustancias reguladoras de crecimiento puede provocar resultados contradictorios en varias especies cultivadas *in vitro*, y resultar anormalidades mitóticas.

Atendiendo a lo mencionado, en esta investigación se escogió la concentración de 3 mg/L de BAP, que genera un número adecuado de explantes (10 brotes por frasco), morfológicamente deseables. Esta concentración, además de incrementar la tasa de divisiones celulares, presiona a la planta a gene-

rar variación somaclonal en sus tejidos. Es de anotar que en los cinco primeros ciclos de inoculación con el filtrado, cuando a la presión ejercida por el incremento de citocininas se le sumó la adición del filtrado fitotóxico, se redujo significativamente la tasa de aparición de regenerantes en los explantes de cardamomo, causando una mortalidad del 99%, comportamiento que, según Patiño *et al.*, 2007 (6), se puede dar cuando se utiliza un agente de selección adecuado. No obstante, en la presente investigación, a partir del sexto ciclo se presentaron los primeros regenerantes a partir de los explantes.

Los mismos autores destacan un aspecto importante que se manifiesta con la adición de citocinina (BAP) al medio de cultivo al contrarrestar los efectos fitotóxicos del filtrado. Esta observación respalda el ya conocido papel de las citocininas en las respuestas de las plantas al estrés ambiental, como presencia de fitotoxinas en el medio (22).

Los resultados corroboran que la interacción citocinina - filtrado contribuye de manera eficiente a seleccionar *in vitro* variantes somaclonales con resistencia inducida a *Fusarium*. Esto se respalda en el hecho de que durante el cultivo de tejidos, las células individuales o los tejidos de los explantes se desdiferencian y luego se rediferencian nuevamente dando origen a nuevos tejidos. Esta reprogramación del genoma, sumada a una presión por metabolitos fitotóxicos en el medio de cultivo, infringe a las células y/o tejidos una serie de experiencias traumáticas (23) ocasionando nuevos cambios en ellas.

Además, teniendo en cuenta que en los cultivos de tejidos los explantes están expuestos a diferentes condiciones de tensión (desequilibrios osmóticos, lesiones causadas en el aislamiento de los tejidos de los explantes, niveles y calidades atmosféricas anormales, etc), se puede prever que aparezcan alteraciones en sus niveles de citocininas, y posiblemente otros reguladores y, por ende, posibles ploidias.

El diseño experimental demostró que *in vitro* también se pueden apreciar diferencias significativas entre varios tratamientos. Se destaca que el grupo de plantas madres mantenidas en medio básico, no presentó ningún regenerante resistente, independientemente de que el mismo contuviera o no filtrado fitotóxico en cualquiera de las concentraciones evaluadas; la fototoxicidad de los tejidos del explante se hizo evidente por el pardeamiento y el necrosamiento.

La figura 5 muestra los regenerantes hallados en los tratamientos con inóculos. Estos datos con-

cuerdan con los que suministran Patiño *et al.*, 2007 (6) cuando, al evaluar segmentos foliares de tomate de árbol con toxinas de *Colletotrichum*, encontraron que no hubo ningún regenerante a partir de los explantes sembrados en medios sin BAP, contuvieron o no filtrado fitotóxico, presentando también pardeamiento y necrosis.



Figura 5. (a). Efecto del filtrado fitotóxico de dilución 1:8 sobre plántulas de cardamomo con filtrado (derecha), y sin filtrado (izquierda). (b). Regenerantes de plántulas de cardamomo en la dilución 1:8 después del sexto ciclo de inoculación con el filtrado.

Estos autores demostraron que la interacción citoquininas – filtrados contribuía de manera eficiente en el proceso de selección *in vitro*. Los resultados encontrados en cardamomo son congruentes con los de Roca y Mroginski, 1993 (17), quienes afirman que cuando se experimenta *in vitro* con tejidos diferenciados, como meristemos, ápices de tallo y yemas apicales, se cuenta con estructuras genéticamente estables importantes para producir material uniforme de experimentación; pero no cuando se

pretende producir variabilidad, razón por la cual en esta investigación se intervino el ciclo celular de cardamomo usando citoquininas para que, al incrementar la tasa de divisiones mitóticas, se causaran saltos génicos que condujeran a la obtención de variantes somaclonales.

Ciclos de inoculación con el filtrado y estrategias de selección

En el primer ciclo de inoculación con el filtrado crudo a las plantas madres de crecimiento acelerado, se inhibió completamente la aparición de regenerantes en los explantes que tuvieron un 99% de mortalidad. Este comportamiento se mantuvo hasta los ciclos tercero y quinto de inoculación, cuando un total de 125 plántulas evaluadas, provenientes del grupo de plantas madres de crecimiento acelerado, mostraron los primeros indicios de resistencia, con el resultado de un 6,4% y un 3,2% de plántulas vivas en la dilución 1:8 y 1:4 respectivamente, como se muestra en la figura 6.

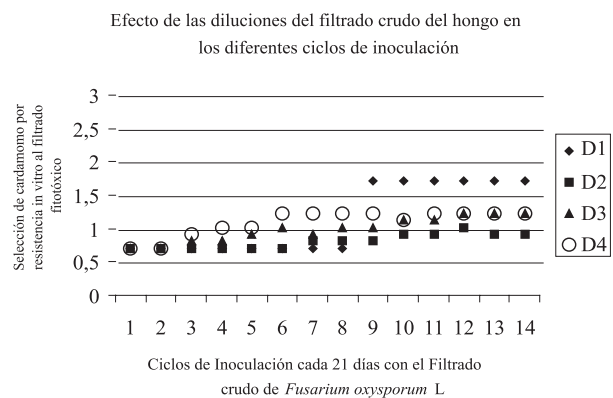


Figura 6. Efecto del tiempo en la resistencia *in vitro* de cardamomo a las diferentes diluciones a las toxinas del hongo.

La tabla 2 indica el efecto de la dilución y el mantenimiento de las plántulas en medio de crecimiento acelerado, en donde el nivel de significancia de 0,09 indica que la interacción ciclo por dilución es altamente significativa, lo que determinó que en la medida que se incrementó el tiempo de permanencia en medio de crecimiento acelerado, las plantas lograron tolerar tratamientos mensuales progresivos en la dilución del filtrado crudo del hongo.

Tabla 2. Análisis de varianza del efecto de las diluciones del filtrado crudo del hongo sobre los ciclos de inoculación vs selección por resistencia.

Factor	GL.1	Suma de los Cuadrados	Media de los Cuadrados	Valor de F2	Probabilidad >F2
Ciclos (A)	13	3,293	0,253	9,6112	0,0000
Dilución (B)	3	6,286	2,095	79,5152	0,0000
AB	39	2,058	0,053	2,0028	0,0009
Error	224	5,903	0,026		
Total	279	17,541			

Coeficiente de variación: 18,05%
1. Grados de Libertad
2. Coeficiente de Fisher

Para el sexto ciclo de inoculación, el 32% de plántulas de cuatro meses de sometimiento a medio de crecimiento acelerado toleraron el primer incremento de dilución del filtrado fitotóxico cuando fueron trasladadas de la dilución 1:8 a la dilución 1:4, datos que resultaron concordantes con los de Rutkowska-Krause *et al.*, 2003 (20), quienes informan que, a los seis meses de inocular cultivos de callos de *Linum usitassinum* L. con *Fusarium oxysporum* L., pruebas citométricas revelaron un aumento diferencial en los niveles de ploidías en un 41%, ligado a un incremento altamente significativo de resistencia callogénica al filtrado fitotóxico, comparadas con el control.

Los regenerantes de plántulas de cardamomo mantenidas seis meses en medio de crecimiento acelerado en la dilución 1:8 lograron tolerar sometimientos progresivos mensuales a las diluciones 1:4, 1:2, 1:0, llegando a obtener una resistencia directa de la plántula al filtrado crudo sin dilución (figura 6). Las convenciones D1, D2, D3, D4 corresponden a cada una de las diluciones evaluadas donde la convención D1=1:0, D2=1:2, D3=1:4, D4=1:8. Al cabo de dos meses fueron subcultivadas a medio básico de micropropagación.

Resulta interesante el efecto del BAP sobre los explantes, inoculados o no con el filtrado fitotóxico. Al adicionar esta fitohormona al medio de cultivo, la tasa de supervivencia y viabilidad se incrementó notablemente según aumentaba el tiempo de sometimiento al medio de crecimiento acelerado. Según Patiño *et al.*, 2007 (6), la adición de BAP al medio de cultivo contrarresta de manera significativa los efectos del filtrado fitotóxico sobre los explantes.

Švábová y Lebeda, 2005 (5) afirman que la obtención de líneas resistentes a enfermedades mediante el proceso de selección *in vitro* utilizando filtrados fitotóxicos, toxinas aisladas o elicitores, ha sido exitosa en banano, clavel, uva, fresa y trigo.

Buitrago y Pacheco, 1991 (21) afirman que, para la selección de un material por resistencia al filtrado de un patógeno, una de las condiciones esenciales en el procedimiento es la utilización de un agente de selección adecuado, como base para establecer un protocolo de regeneración que permita la obtención de plántulas resistentes a un nivel eficiente y que garantice repetibilidad.

Al trabajar con filtrados crudos no se define con precisión la causa de la fitotoxicidad. Es probable que se deba en parte a la presencia en los filtrados de enzimas pectinasas (6). Al igual que en trabajos realizados por los investigadores mencionados, en éste se evidenció que con la adición de la citocinina (BAP) al medio de cultivo se contrarrestaron los efectos fitotóxicos del filtrado, como respuesta de las plantas al estrés ambiental que éste les ocasiona (22, 23).

La metodología empleada demostró ser útil en la obtención y regeneración de plántulas de cardamomo con resistencia inducida *in vitro* a la acción del filtrado fitotóxico cuando, en sinergia con citocininas utilizadas en tejidos diferenciados, se incrementa la tasa de división celular. Cuando el propósito es obtener variantes somaclonales, el uso de filtrados crudos de *Fusarium oxysporum* L. como agentes de selección *in vitro* para obtener material de cardamomo con resistencia inducida a la pudrición basal, es un método rápido, eficaz y seguro que permite la obtención de plantas con resistencia a enfermedades.

En esta investigación, la selección se hizo utilizando filtrado crudo y no aislando una molécula tóxica en particular, basando nuestra decisión en las investigaciones realizadas por Shahin y Spivey, 1986 (24), quien concluye que en el modo principal de infección de *Fusarium oxysporum* no parece estar involucrado una toxina específica, afirmación que respaldan Hartman *et al.*, 1984 (12) en su trabajo con

alfalfa resistente a *Fusarium*, donde se incrementó en mayor medida la regeneración de plántulas en medios que contenían filtrado crudo que cuando se trabajó con toxinas aisladas.

CONCLUSIONES

Las pruebas previas de patogenicidad realizadas en invernadero constituyen un método rápido y determinante en la identificación y escogencia de las cepas más virulentas del hongo, lo cual garantiza filtrados crudos altamente fitotóxicos para seleccionar *in vitro* plantas de cardamomo resistentes a *Fusarium oxysporum*.

Someter plántulas de cardamomo por largos períodos de tiempo a medios de crecimiento acelerado (en concentraciones relativamente altas de citocininas) y alta presión de selección, mediante el incremento de los metabolitos tóxicos del filtrado crudo del hongo en el medio, aumenta la posibilidad de generar variantes somaclonales, lo que implica alteraciones fisiológicas de interés, en respuesta a la selección *in vitro*.

Someter plántulas de cardamomo durante amplios períodos de tiempo a medios de crecimiento acelerado y a altas presiones por incremento de los metabolitos tóxicos del filtrado crudo, aumenta la posibilidad de seleccionar variantes somaclonales que posean resistencia inducida *in vitro* a *Fusarium oxysporum*.

Se debe tener en cuenta que *in vitro* podrían no seleccionarse plantas con resistencia completa a la enfermedad, pero sí materiales que muestren diferencia en la expresión de los síntomas, puesto que un pequeño cambio en la susceptibilidad del hospedante o en la patogenicidad del microorganismo puede tener efectos significativos en el desarrollo de la enfermedad, y por tanto, en la biología de la evolución de la interacción planta-patógeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ríos L, Lopera G, Caicedo R, Granda F, Montoya A, Restrepo G. Extracción y caracterización de aceite de cardamomo (*Ellettaria cardamomum*). DYNA Rev Fac Nac Minas. 2007 Mar; 74 (151): 47-52.
- Jaramillo JW, Herrera JA. Enfermedades del cardamomo (*Ellettaria cardamomum* (L) Maton) en el municipio de Jericó, departamento de Antioquia. [Tesis Doctoral]. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín - Centro de Publicaciones; 1995. 71 p.
- Kerala Agricultural University. Package of practices recommendations: Crops. 12^a ed. Trichur: José AJ. 2002. 278 p.
- Daub ME. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. Annu Rev Phytopathol. 1986 Sep; 24: 159-186.
- Švábová L, Lebeda A. *In vitro* selection for improve plant resistance to toxin-producing pathogens. J Phytopathol. 2005 Jan; 53(1): 52-64.
- Patiño CT, Hoyos R, Afanador L. Selección y regeneración *in vitro* de somaclones de tomate de árbol (*Solanum betacea* cav. Sendt) utilizando filtrados de cultivo de *Colletotrichum acutatum* con actividad pectinasa. Rev Fac Nac Agr. 2007 Jul - Dec; 60 (2): 3923-3937.
- Orlando R, Magro P, Rugini E. Pectic enzymes as a selective pressure tool for *in vitro* recovery of strawberry plants with fungal disease resistance. Plant Cell Rep. 1997 Feb; 16 (5): 272-276.
- Jayasankar S, Litz RE, Schnell RJ, Hernández A. Embryogenic mango cultures selected for resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* culture filtrate show variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 1998 Abr; 34 (2): 112-116.
- Rappaport L, Pullamn GS. Tissue culture induced variation in Celery for *Fusarium yellow*. Phytopathology. 1983;73: 818.
- Orton TJ, Duncan ME, Hurbert SH. Studies on the inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *apii* in Celery. Plant Disease. Jul 1984; 68 (7): 574-578.
- Pagliuso H, Pullman J, Rappaport L. Somaclonal variation in Celery: Screening for resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *apii*. Theor Appl Genet. 1988 Mar; 75 (3): 446-451.
- Hartman GL, McCoy TJ, Knous TR. Selection of Alfalfa (*Medicago sativa*) cell lines and regeneration of plants resistant to the toxin(s) produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Medicaginis*. Plant Sci Lett. 1984 Abr; 34 (1-2): 183-194.
- Evenor D, Pressman E. Somaclonal variation in celery and selection by coculturing toward resistance to *Septoria apiicola*. Plant Cell Tiss Org. 1994 Dec; 39 (3): 203-210.
- Ahmed KZ, Mesterház A, Bartók T, Sagi F. *In vitro* technique for selecting wheat (*Triticum aestivum* L.) for Fusarium – resistance. Part II. Culture filtrate technique and inheritance of Fusarium – resistance in the somaclones. Euphytica. 1996 Jan; 91 (3): 341-349.
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 1962 Jul; 15 (3): 473-497.
- Li S, Hartman GL, Wildholm JM. Viability staining of soybean suspension-cultured cells and a seedling stem cutting assay to evaluate phytotoxicity of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* culture filtrates. Plant Cell Reports. 1999 Jan; 18 (5): 375- 380.
- Roca WM, Mroginski LA. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT; 1993. Pp. 79-93.
- Scheinmider RW. Effects of nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* on celery root infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* and a novel use of the LineWeaver- Burk double reciprocal plot technique. Phytopathology. 1984 Jun; 74 (6): 646-653.
- Gao H, Beckman C, Muller WC. The rate of vascular colonization as a measure of the genotypic interaction between various cultivars of tomato and various formae speciales of *Fusarium oxysporum*. Physiol Mol Plant Pathol. 1995 Jan; 46 (1): 29-43.
- Rutkowska-Krause I, Mankowska G, Lukaszewicz M, Szopa J. Regeneration of flax (*Linum usitatissimum* L.) plants from another culture and somatic tissue with increased resistance to *Fusarium oxysporum*. Plant Cell Rep. 2003 Sep; 22 (2): 110-116.
- Buitrago AR, Pacheco MP. Efecto del filtrado de *Colletotrichum sp.* en la expresión de síntomas de mancha mantecosa en cafetos cultivados *in vitro*. CENICAFE; 1991 Jan; 42 (1): 5-11.
- Hare PD, Cress WA, van Staden J. The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress. Plant Physiol. 1997 Oct; 128 (2): 354-362.
- Madlugin A, Comai L. The effect of stress on genome regulation and structure. Ann Bot. 2004 Oct; 94 (4): 481-495.
- Shahin EA, Spivey R. A single dominant gene for Fusarium wilts resistance in protoplast-derived tomato plants. Theor Appl Genet. 1986 Dec; 73: 164.