

Influencia del aislado en la fitotoxicidad del filtrado del cultivo de *Alternaria solani* Sor. sobre plantas de papa var. 'Desirée'

N. Veitía, I. Bermúdez-Caraballoso, L. R. García, M. Acosta-Suárez, Y. Alvarado-Capó, D. Torres, Y. Padrón. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5 . Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e.mail: novisel@ibp.co.cu

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la influencia del aislado en la fitotoxicidad del filtrado del cultivo de *Alternaria solani* Sor., se estudió el crecimiento en medio de cultivo PDA de seis aislados de *A. solani* provenientes de la colección de cultivos microbianos del IBP así como, la fitotoxicidad del filtrado del cultivo de cada uno de estos aislados sobre plantas de papa var. Desirée cultivadas *in vitro*. Los resultados mostraron que el filtrado de cultivo de los seis aislados fue fitotóxico sobre las plantas de papa var. Desirée cultivadas *in vitro*. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en los grados de afectación provocados por los filtrados del cultivo de cada aislado sobre las plantas de dicho genotipo. Estos resultados confirmaron la influencia del aislado en la producción del filtrado del cultivo de *A. solani*. Sobre esta base se seleccionó el aislado CCIBP-Vas₄, ya que provocó los mayores valores en el grado de afectación. Por otro lado no se encontró correspondencia con el crecimiento *in vitro* de los aislados y la fitotoxicidad de sus filtrados del cultivo.

Palabra clave: hongo, selección *in vitro*, *Solanum tuberosum* L.

ABSTRACT

Growth in a PDA medium of six isolate of *A. solani*, coming from the microbial cultivation collection of the IBP, and the phytotoxic of culture filtrate of each one were studied to evaluate the influence of isolate in the culture filtrate phytotoxicity of *A. solani*. Results showed that the six isolates were phytotoxic on potato plantlets var. Desirée. However, significant differences were observed in the degree of affectation caused by culture filtrates of each isolate on plants of this genotype. These results confirmed the influence of isolate in the production of culture filtrates of *A. solani*. Isolate CCIBP-Vas₄ was selected based on the results, since it caused the highest degrees of affectation. Besides, no correspondence among isolates *in vitro* growth and phytotoxicity of culture filtrates on potato plantlets var. 'Desirée' were found.

Keywords: fungus, *in vitro* selection, *Solanum tuberosum* L.

INTRODUCCIÓN

El tizón temprano en la papa (*Solanum tuberosum* L.), causado por el hongo *Alternaria solani* Sor., constituye desde el punto de vista económico la enfermedad más importante en Cuba (Castellanos, 2000). La aplicación de fungicidas es el principal método de control de esta enfermedad, empleado en el mundo (Gent y Schwartz, 2003). Es por ello, que el uso de variedades resistentes podría reducir el número de aplicaciones continuas de estos productos químicos mientras mantienen el control de la enfermedad (Rodríguez *et al.*, 2006).

En la interacción papa-*Alternaria solani* Sor. varios métodos han sido utilizados para evaluar la resistencia de diferentes genotipos, tales como: pruebas en campo y en casa de cultivo en plantas completas y en hojas arrancadas (Bussey, 1991; Steward y Bradshaw, 1993) así como otros ensayos con las toxinas o los filtrados del cultivo de *A. solani* (Lynch *et al.*, 1991; Hernández *et al.*, 1993; Martínez y Matell, 1994). Con estos últimos las principales investigaciones se han encaminado

fundamentalmente a evaluar el efecto fitotóxico de los filtrados del cultivo de dicho hongo patógeno. Sin embargo, existen pocos trabajos donde se tiene en cuenta el aislado para la producción de un filtrado del cultivo fitotóxico y los referidos en Cuba con diferentes aislados de *A. solani* han sido sobre plantas de tomate (Bernal *et al.*, 2002). Estas investigaciones serían de gran importancia ya que ha sido detectada variabilidad genética entre aislados de *Alternaria solani* (van der Waals, 2004). Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado el presente trabajo tuvo como objetivo determinar la influencia del aislado en la fitotoxicidad del filtrado del cultivo de *Alternaria solani* para su utilización en el programa de mejoramiento genético de la papa que se desarrolla en el Instituto de Biotecnología de las Plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados de *A. solani*

Se utilizaron los aislados CCIBP-HAs₄₆, CCIBP-PAs₁₁₄, CCIBP-VAs₄, CCIBP-VAs₉, CCIBP-CAs₂₄₁, CCIBP-CAs₂₄₂ de *Alternaria solani* Sor. pertenecientes

a la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biotecnología de las Plantas. Los aislamientos se realizaron de campos comerciales de papa var. Desirée en zonas productoras del país.

Material vegetal

Los experimentos se realizaron con plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Desirée cultivadas *in vitro*, susceptible al tizón temprano (Lorenzo *et al.*, 1992). Las plantas fueron propagadas *in vitro* según la metodología propuesta por Espinosa *et al.* (1992) en medio de cultivo semisólido.

Evaluación del crecimiento de aislados de *A. solani*

Los aislados se cultivaron en placas de Petri de 9.0 cm de diámetro que contenían 15 ml de medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) (Duchefa Biochemie). Cada placa de Petri fue inoculada con un disco de micelio de 1.0 cm de diámetro y se incubaron en cámaras climáticas (Gallenkamp) a 26 ± 2 °C y oscuridad constante según Izquierdo (1979). Se utilizaron cinco placas por cada aislado. Para determinar el crecimiento de los aislados se midió, con una regla graduada, el diámetro de las colonias en milímetros a los siete días de cultivo.

Obtención del filtrado del cultivo

Se emplearon erlenmeyers de 500 ml de volumen que contenían 200 ml de medio de cultivo líquido Richard (Martínez y Mantell, 1994), los cuales se inocularon con un disco de micelio de 1 cm de diámetro tomado de los bordes de las colonias de cada aislado crecidas en medio de cultivo PDA (durante siete días a 26 ± 2 °C y oscuridad constante). Los erlenmeyers se incubaron por un período de 30 días a 28°C en condiciones de cultivo estático y oscuridad constante. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.6. Pasado este período de tiempo se separó el estroma y se filtró el cultivo a través de papel de filtro Whatman No. 4 (Whatman). Posteriormente se concentró diez veces su volumen inicial por rotoevaporación al vacío a 40°C con un rotoevaporador (Heidolph, Bioblock), se filtró por un filtro de porcelana para eliminar posibles restos de micelio y finalmente por un filtro de 0.22 µm (Millipore).

La aplicación de los filtrados de los cultivos sobre las plantas se realizó por inmersión de raíces según lo descrito por Hernández *et al.* (1991). Se empleó la dilución 1:1 v/v (Filtrado del cultivo del aislado: agua destilada estéril) y como controles se incluyeron el medio de cultivo Richard sin inocular y agua destilada estéril.

Se utilizaron plantas en fase de multiplicación con no menos de 8.0 cm de altura, y al menos cinco

yemas axilares sin contar la yema del explante original (segmento de tallo de aproximadamente 1.0 cm con una yema axilar). Se colocó una planta por tubo de ensayo (150 x 20mm) que contenía 4.0 ml de la concentración del filtrado del cultivo del hongo y los controles. Se emplearon 15 plantas por filtrado del cultivo.

Posteriormente las plantas se colocaron en cámaras de cultivo a 22 ± 2 °C, luz artificial con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de $62 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y un fotoperíodo de 16 horas luz, durante 72 horas hasta la evaluación de las afectaciones.

Se evaluó el grado de afectación provocado por el filtrado del cultivo de cada aislado de acuerdo con la escala descriptiva para la evaluación *in vitro* propuesta por Veitia *et al.* (2001) sobre las plantas de papa var. 'Desirée' cultivadas *in vitro*.

Análisis estadísticos

Los datos relativos al diámetro de las colonias de los aislados de *A. solani* así como, los grados de afectación presentados por las plantas fueron analizados mediante una prueba no paramétrica de *Kruskal Wallis* previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza utilizando el paquete estadístico SSPS versión 13.0 sobre Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los aislados de *A. solani* crecieron sobre el medio de cultivo PDA. Sin embargo, se observaron diferencias entre estos en el diámetro de las colonias (Tabla 1). Los aislados CCIBP-HAs₄₆ y CCIBP-CAs₂₄₂ difirieron significativamente de los aislados CCIBP-VAs₄ y CCIBP-PAs₁₄ y no mostraron diferencias significativas con el resto.

Pryor y Michailides (2001), en la caracterización morfológica de aislados de *Alternaria* sp. observaron colonias con diámetros mayores de 70.0 mm, entre 50.0 y 70.0 mm y menores de 50.0 mm en evaluaciones realizadas entre los siete y diez días de incubación en medio de cultivo PDA. De igual forma, Pérez (2003) encontró variabilidad en el crecimiento *in vitro* entre aislados de *A. solani* y observó colonias con diámetros desde menores de 46.0 mm hasta más de 72.0 mm, lo que se corrobora con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Por otro lado, al analizar el efecto fitotóxico de los filtrados del cultivo de los seis aislados de *A. solani* se observó que estos provocaron síntomas sobre las plantas de papa var. 'Desirée' cultivadas *in vitro* (Tabla 2) tales como: necrosis y clorosis. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en

los grados de afectación provocados por los filtrados de cada uno de los aislados.

Los filtrados de los aislados CCIBP-VAs₂₄₁ y CCIBP-VAs₂₄₂ produjeron síntomas en la zona inferior de las plantas (grados uno y dos) mientras que los filtrados de los cultivos de los aislados CCIBP-VAs₉ y CCIBP-HAs₄₆ provocaron clorosis en el centro de las hojas en la zona media y necrosis en borde de las hojas en la zona inferior (grado tres). Estas afectaciones se correspondieron con valores promedios del grado de afectación que difirieron significativamente con los mostrados por las plantas a las cuales se les aplicó el filtrado del cultivo obtenido de los aislados CCIBP-VAs₂₄₁ y CCIBP-VAs₂₄₂.

El filtrado del cultivo del aislado CCIBP-PAs₁₁₄ provocó afectaciones más severas sobre las plantas

de papa var. 'Desirée' los cuales se correspondieron con grados de afectación superiores, con diferencias significativas a los mostrados por los cuatro aislados mencionados anteriormente (Tabla 2). Los síntomas se acentuaron en la zona media ya que se observaron hojas necróticas y en la zona apical se produjo clorosis (grado cinco).

El filtrado del cultivo del aislado CCIBP-VAs₄ fue el que produjo los mayores valores en el grado de afectación con diferencias significativas con el resto de los aislados evaluados. Este ocasionó síntomas en toda la planta (las tres zonas). Especialmente en la zona apical se observó clorosis en el centro de las hojas y necrosis en los bordes (grado seis).

De forma general, a las 72 horas de aplicado el filtrado del cultivo de todos los aislados, se observó marchitez en las plantas.

Tabla 1. Crecimiento *in vitro* de aislados de *A. solani* a los siete días de incubación en medio de cultivo PDA.

Aislados de <i>A. solani</i>	Diámetro de las colonias (mm)	Rangos medios
CCIBP- HAs ₄₆	53.9	7.9 b
CCIBP-PAs ₁₁₄	81.2	23.5 a
CCIBP-VAs ₄	97.3	25.9 a
CCIBP-VAs ₉	70.7	19.0 ab
CCIBP-CAs ₂₄₁	56.7	11.2 ab
CCIBP- CAs ₂₄₂	49.0	5.5 b

Rangos medios con letras diferentes difieren por prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para $p < 0.05$.

Tabla 2. Afectación provocadas por los filtrados del cultivo de diferentes aislados de *A. solani* a las 72 horas de aplicados sobre plantas *in vitro* de papa var. 'Desirée'.

Aislados <i>A. solani</i> (Dilución 1:1(v/v) filtrado del cultivo)	Grados de afectación*	Rangos medios
CCIBP-HAs ₄₆	2.93	73.1 c
CCIBP-PAs ₁₁₄	4.86	99.3 b
CCIBP-VAs ₄	5.80	111.7 a
CCIBP-VAs ₉	2.73	67.4 c
CCIBP-CAs ₂₄₁	2.40	57.9 d
CCIBP-CAs ₂₄₂	1.80	43.6 d
Medio cultivo Richard sin inocular	0.00	15.5 e
Agua destilada estéril	0.00	15.5 e

Rangos medios con letras diferentes en una misma columna difieren por prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para $p < 0.05$.

*Escala: grado 0- Plantas sin síntomas; grado 1- Clorosis en el centro de las hojas en la zona inferior de la planta; grado 2- Clorosis en toda la hoja, en la zona inferior de la planta; grado 3- Clorosis en el centro de la hoja en la zona media y necrosis en bordes de las hojas en la zona inferior; grado 4- Necrosis en toda la hoja en zona inferior y hojas totalmente cloróticas en la zona media de la planta, grado 5- Necrosis en bordes de las hojas en la zona media y clorosis en el centro de las hojas en la zona apical; grado 6- Necrosis en toda la hoja en zona media y necrosis y clorosis en bordes y centro de las hojas en zona apical; grado 7-Necrosis total.

Por otro lado, al analizar la correspondencia entre los resultados relacionados con la fitotoxicidad de los filtrados del cultivo de los aislados de *A. solani* y las características culturales de estos, se encontró que aislados con un crecimiento similar en medio de cultivo PDA, mostraron diferencias en cuanto a la fitotoxicidad de sus filtrados del cultivo. Por ejemplo, los aislados CCIBP-VAs₄ y CCIBP-PAs₁₁₄; CCIBP-VAs₉ y CCIBP-CAs₂₄₁. Los dos restantes: CCIBP-HAs₄₆ y CCIBP-CAs₂₄₂ fueron los de menor crecimiento *in vitro* en comparación con los cuatro aislados mencionados anteriormente y sin embargo, estos difirieron en las afectaciones que provocaron sobre las plantas de papa var. 'Desirée' cultivadas *in vitro*. Estos resultados no permitieron establecer una relación entre el crecimiento en medio de cultivo PDA de los aislados de *A. solani* y la fitotoxicidad de sus filtrados del cultivo. Ello indica que no resulta adecuado seleccionar los aislados para la producción de los filtrados del cultivo de este hongo fitopatógeno sobre la base del crecimiento en medio de cultivo micológico.

Otros autores han descrito síntomas similares después de la aplicación de filtrados del cultivo de *A. solani* sobre plantas de papa y tomate. Hernández *et al.* (1991) en plantas de papa (var. 'Desirée') *in vitro* observaron necrosis en los bordes de los foliolos y Martínez y Mantell (1994) en yemas apicales (2-3 cm) de plantas de papa (*S. phureja* Juz. et Buk) cultivadas *in vitro* informaron de la presencia de necrosis en la base de los explantes colocados en el medio de cultivo que contenía el filtrado del cultivo de *A. solani*.

Pérez (2003) observó síntomas tales como: necrosis en forma de manchas foliares oscurecidas, marchitez y necrosis, pero en plántulas de tomate al sumergirlas en el filtrado del cultivo de este patógeno. Se ha descrito que las toxinas hospedero no específicas que produce *A. solani* como el ácido alternárico, zinniol, antraquinonas, solanapironas A, B y C y alternasol A son las principales responsables de la acción fitotóxica (Chaerani y Voorrips, 2006). En general, este tipo de toxina tiene un moderado efecto fitotóxico, actúan como un factor de virulencia e intensifican los síntomas de la enfermedad (Thoma, 2003). Es por ello, que se han probado tanto los filtrados del cultivo como las toxinas; para seleccionar genotipos resistentes en papa (Lynch *et al.*, 1991; Hernández *et al.*, 1991; Martínez y Martell, 1994) y tomate (Maeiro *et al.*, 1991).

Según la literatura científica existen pocos trabajos donde se utiliza el filtrado del cultivo para la diferenciación de aislados de *A. solani* y hasta la fecha los referidos en Cuba han sido sobre genotipos de tomate. Por ejemplo, Bernal *et al.* (2002), observaron diferencias entre cuatro aislados de *A. solani* a través del efecto del filtrado de cultivo sobre plantas de tomate cultivadas *in vitro*, resistentes y susceptibles al patógeno *in vivo*.

Las diferencias observadas entre los aislados pudieran estar relacionadas con la variabilidad intraespecífica en *A. solani*, que es un hongo de reproducción asexual, sujeto al fenómeno de la heterocariosis que le proporciona una gran diversidad genética (Stall, 1958). De igual forma, las diferencias en la producción de toxinas en *Alternaria* se le atribuyen a esta misma causa (Kusaba y Tsuge, 1995).

Estudios realizados en los últimos años aportan elementos que confirman la diversidad genética en *Alternaria*. Por ejemplo, Roberts *et al.* (2000), en estudios genéticos mediante marcadores moleculares (RAPD) en especies de *Alternaria* encontraron una gran diversidad genética la cual fue congruente con las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas observadas en los aislados. Por su parte, Pérez (2003) con el empleo de marcadores moleculares (AFLP) detectaron diversidad genética entre aislados cubanos de *A. solani* provenientes de tomate y papa. Otros autores han informado de la variabilidad genética de *A. solani* en aislados procedentes de África del Sur (van der Waals *et al.*, 2004). Sin embargo, según Chaerani y Voorrips (2006), la asociación de marcadores moleculares con la variabilidad morfológica, fisiológica y la virulencia no es conocida en *A. solani*.

Los resultados indicaron que a partir de diferentes aislados de *A. solani* fue posible obtener filtrados del cultivo fitotóxicos sobre plantas de papa var. 'Desirée' cultivadas *in vitro*. Todos produjeron síntomas tales como: clorosis y necrosis y se observaron diferencias en cuanto a los grados de afectación según la escala utilizada. Ello confirmó que el aislado tiene influencia en la fitotoxicidad del filtrado del cultivo. En este sentido el aislado CCIBP-VAs₄ fue el más fitotóxico y se seleccionó para obtener filtrado del cultivo para su utilización en el programa de mejoramiento genético del cultivo de la papa. No se encontró correspondencia entre el crecimiento *in vitro* de los aislados y su capacidad de ocasionar síntomas en las plantas a través de su filtrado del cultivo.

CONCLUSIONES

Se demostró que el aislado influyó en la fitotoxicidad del filtrado del cultivo y se seleccionó el CCIBP-VAs₄ ya que produjo las mayores afectaciones sobre las plantas de papa var. 'Desirée' cultivadas *in vitro*. No se encontró correspondencia entre el crecimiento de los aislados y la fitotoxicidad de sus filtrados del cultivo.

REFERENCIAS

Bernal, A, Martínez B, Pérez S, Rivas E (2002) Diferenciación de aislamientos de *Alternaria solani* Sor. A través de los filtrados fitotóxicos. Rev. Protección Veg. 17 (1): 40-44

- Bussey, MJ (1991) A leaf disk assay for detecting resistance to early blight caused by *Alternaria solani* in juvenile potato plants. *Plant Disease* 75(4): 385-389
- Castellanos, L (2000) Nocividad, epidemiología y manejo del tizón temprano (*Alternaria solani* Sor.) en el cultivo de la papa. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias. Universidad Central de Las Villas. Cuba
- Chaerani, R, Voorrips RE (2006) Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics, and breeding for resistance. *J Gen Plant Pathol.* 72: 335-347
- Espinoza, N, Estrada P, Tovar P, Bryan P, Dodds J (1992) Tissue culture micropropagation, conservation and export of potato germoplasm. *Especialized Technology Document 1*, Centro Internacional de la Papa, Lima. Perú. P 17
- Gent, DH, Schwartz HE (2003) Validation of potato early blight diseases forecast models for Colorado using various sources of meteorological data. *Plant Disease* 87: 78-84
- Hernández, MM, Kowalski B, Lorenzo P, Ortiz U (1991) Efectividad del empleo de filtrados de *Alternaria solani* (Ellis y Martin) (J y G) en la selección *in vitro* de formas de resistencia. *Cultivos Tropicales* 12: 48-50
- Izquierdo, F (1979) La *Alternaria solani* (Ellis & Martin) Jones & Grout y su control en tomate. Resumen Tesis de Dr.C. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CENIC). La Habana
- Kusaba M, Tsuge T (1995) Phylogeny *Alternaria* fungi known to produce host specific toxins on the basis of variation in the internerval transcribed of ribosomal DNA. *Curr. Genet* 28:491-498
- Lorenzo, P, Ramos, M, Hernández MM (1992) Extracción de la toxina producida por el hongo *Alternaria alternata*. *Cultivos Tropicales* 13:67-69
- Lynch, DR, Coleman MC, Lyon GD (1991) Effect of *Alternaria solani* culture filtrate on adventitious shoot regeneration in potato. *Plant Cell Reports* 9:607-611
- Maiero, M, Bean GA, Ng TJ (1991) Toxin production by *Alternaria solani* and its related phytotoxicity to tomato breeding lines. *Phytopathology* 81: 1030-1033
- Martínez, PR, Mantell S (1994) Selección *in vitro* de resistencia al tizón temprano (*Alternaria solani* Sor.) en papa criolla (*Solanum phureja* Junz). *Fitopatología Colombiana* 18(2): 90-100
- Pérez, S (2003) Variabilidad cultural, patogénica y genética del agente causal del tizón temprano (*Alternaria solani* Sor.) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Cuba. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. La Habana
- Pryor, BM, Michaelides TJ (2001) Morphological, pathogenic and molecular characterization of *Alternaria* isolate associated with *Alternaria* late blight of Pitachio. *Phytopathology* 92 (4): 406-415
- Rodríguez, MAD, Brommonschenkel SH, Matsuoka K, Mizubuti ESG (2006) Components of resistance to early blight in four potato cultivars: Effect of leaf position. *Phytopathology* 154: 230-235
- Stall, RE (1958) An investigation of nuclear number in *Alternaria solani*. *Am. J Bot.* 45:657-659
- Stewart, H, Bradshaw JE, Wastie RL, Mackay GR, Erlich O, Livescu L, Nachmias A (1994) Assessing progenies of potato for resistance to early blight. *Potato Research* 37:257-269
- Thoma, BPHT (2003) Pathogen profile: *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4 (4):225-236
- van der Waals, JE, Korsten L, Slippers B (2004) Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. *Plant Dis.* 88: 959-964
- Veitia, N, Dita MA, García L, Herrera L, Bermúdez I, Acosta M, Clavero J, Orellana P, Romero C, García L (2001) Empleo del cultivo de tejidos y la mutagénesis *in vitro* para la mejora de resistencia a *Alternaria solani* en la variedad 'Desirée'. *Biotecnología Vegetal* 1: 43-48