

## Protocolo para la selección *in vitro* de plantas de papa resistentes al filtrado de cultivo de *Alternaria solani* Sor.

Novisel Veitía\*, Lourdes R. García, Idalmis Bermúdez-Carabaloso, Mayra Acosta-Suárez, Michel Leiva-Mora, Yelenys Alvarado-Capó, Dámaris Torres, Yenny Padrón. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), 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

El empleo del filtrado del cultivo de *Alternaria solani* en la diferenciación de genotipos de papa susceptibles y resistentes ha sido descrito en la literatura científica. Sin embargo, existen pocos trabajos donde se tengan en cuenta el papel de los aislados de *A. solani* y otros factores que inciden en la obtención del filtrado del cultivo para emplear la selección *in vitro* como una herramienta que le permita a los fitomejoradores reducir el tiempo de obtención de nuevas variedades de papa. El presente trabajo tuvo como objetivo establecer un protocolo para la selección *in vitro* de plantas de papa resistentes al tizón temprano con el empleo del filtrado del cultivo de *Alternaria solani* Sor., en apoyo al Programa de Mejoramiento genético en el cultivo de la papa. El protocolo propuesto relaciona los aspectos: obtención del filtrado del cultivo, características de los aislados de *A. solani* y del material vegetal así como, la escala descriptiva de evaluación del efecto del filtrado de cultivo sobre plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) var. Desirée. Puede ser utilizado como una herramienta útil en ensayos en fase temprana para evaluar la resistencia a *A. solani* en genotipos de papa obtenidos por cualquier método de mejoramiento genético a esta enfermedad, lo cual contribuye a incrementar la eficiencia de la selección en las condiciones *ex vitro* ya que disminuye el número de individuos a evaluar bajo condiciones donde inciden otros factores que dificultan la diferenciación de genotipos susceptibles y resistentes.

Palabras clave: Desirée, programa de mejoramiento, tizón temprano

### ABSTRACT

The use of culture filtrate of *Alternaria solani* in the differentiation of susceptible and resistant potato genotypes has been described in scientific literature. However, few researches take into account the role of isolates of *A. solani* and other factors affecting the production of culture filtrate to use *in vitro* selection as a tool. This allows plant breeders to reduce the time to obtain new varieties of potato. This study aimed to establish a protocol for *in vitro* selection of potato plants resistant to early blight with the use of culture filtrate of *Alternaria solani* Sor, in support to the potato Genetic Improvement Program. The proposed protocol related aspects such as: obtaining of culture filtrate, characteristics of *A. solani* isolates and plant material, as well as, the descriptive scale for assessing the effect of culture filtrate on potato plants (*Solanum tuberosum* L.) var. Desirée. The protocol can be used as a useful tool in early stage trials to evaluate the resistance to *A. solani* in potato genotypes obtained by any method of genetic improvement to this disease. This contributes to increased efficiency of selection in natural conditions. The number of individuals to evaluate in field decreases. In these conditions other factors affect the differentiation of susceptible and resistant genotypes.

Keywords: Desirée, breeding program, early blight

### INTRODUCCIÓN

El tizón temprano causado por el hongo *Alternaria solani* es después del tizón tardío, la enfermedad foliar más importante del cultivo de papa (van der Waals *et al.*, 2003). Se presenta con mayor incidencia en las zonas paperas ubicadas en regiones húmedas y cálidas de países como India, Uruguay, Brasil y otros del Caribe. En Cuba, el tizón temprano se ha considerado como una enfermedad fúngica importante y se ha encontrado variabilidad genética y patogénica entre aislados procedentes de diferentes localidades del país (Pérez *et al.*, 2004).

Para el control de tizón temprano se han descrito medidas tales como prácticas culturales, aplicación

de fungicidas y el uso de variedades resistentes (Torres, 2002). En las condiciones de Cuba, Castellanos (2000), elaboró y validó un Sistema de Manejo Integrado para el tizón temprano en la papa, conformado por medidas preventivas y curativas. Las preventivas, que incluyeron el saneamiento y la resistencia varietal. Las medidas curativas se concentran en el uso y manejo de fungicidas.

En la práctica, el control químico es el más efectivo, pero encarece considerablemente los costos de producción y trae consigo la contaminación ambiental. El control de la enfermedad por la vía de la resistencia genética es el método más deseado, ya que contar con variedades resistentes reduciría el número de aplicaciones de fungicidas y por tanto los costos de

producción. Sin embargo, no se cuenta entre las variedades comerciales con genotipos con resistencia a esta enfermedad (Cassells y Kowalski, 1998).

El mejoramiento genético clásico en el cultivo de la papa para incrementar resistencia a enfermedades fúngicas, el rendimiento y la calidad industrial, ha jugado un papel preponderante como estrategia para generar nuevas variedades. No obstante, el abrumador crecimiento de la población mundial y el dinámico desarrollo de las plagas y enfermedades, han hecho que durante los últimos años, se haya considerado la importancia de integrar a los esquemas clásicos de investigación, técnicas modernas y métodos de la biotecnología como el cultivo de tejidos, la selección *in vitro* a factores bióticos y abióticos, la ingeniería genética y los marcadores moleculares, con la finalidad de acelerar el mejoramiento genético de la papa y contar con variedades sobresalientes (Ligarreto, 2001).

Los trabajos científicos donde se emplea el cultivo de tejidos y la selección *in vitro*, como una alternativa en la obtención de variedades resistentes a enfermedades, se han incrementado. Esto se debe al avance en los estudios tanto de los procesos de la planta y la biología de los patógenos como del entendimiento de las interacciones planta-patógeno (Pérez, 1998). Por otro lado, desde el punto de vista práctico la utilización de la toxina o el filtrado del cultivo de hongos, elimina uno de los problemas encontrados cuando se trabaja con el patógeno *in vivo* como agente selectivo, los cultivos de células pueden ser expuesto fácil y uniformemente al agente selectivo, ya que estos pueden ser incorporados a los medios de cultivo (Kosky, 1998).

Es conocido que *A. solani*, produce toxinas no hospedero específicas tanto *in vivo* como en medios de cultivo, de las cuales han identificado 12. Entre estas, se encuentran: el ácido alternárico, solanapironas A, B y C que son capaces de inducir puntos necróticos similares a los causados por el tizón temprano (Chaerani y Voorrips, 2006). Es por ello, que varios autores han descrito la utilización del filtrado de cultivo en la diferenciación de genotipos de papa susceptibles y resistentes al tizón temprano (Lynch *et al.*, 1991; Hernández *et al.*, 1991; Martínez y Mantell, 1994). Sin embargo, en la literatura científica consultada relacionada con el empleo de los filtrados de *A. solani* sobre plantas de papa no se describen protocolos que detallen la obtención y aplicación de los filtrados de cultivo de dicho hongo fitopatógeno para su empleo como agente selectivo en la búsqueda de plantas con resistencia al tizón temprano en apoyo a los programas de mejoramiento genético de papa que se desarrollan en el país.

El presente trabajo tuvo como objetivo proponer un protocolo para la selección *in vitro* de plantas de papa resistentes al filtrado de cultivo de *A. solani*.

## DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO

Teniendo en cuenta los resultados científicos descritos por Veitía *et al.* (2001) relacionados con los objetivos del Programa de mejoramiento genético, para la obtención de plantas de papa con resistencia al tizón temprano que se desarrolla en el Instituto de Biotecnología de las Plantas, se estableció un protocolo para la selección *in vitro* de plantas de papa var. Desirée con el empleo del filtrado de cultivo de *Alternaria solani*, el cual se describe a continuación.

### Material biológico

Se utilizarán aislados de *Alternaria solani* caracterizados en base a las características culturales, morfológicas y los más agresivos en ensayos de patogenicidad en casa de cultivo. Los aislamientos se deben realizar de campos comerciales de papa en zonas productoras del país.

Para la selección *in vitro* se utilizarán plantas de papa del genotipo de interés cultivadas *in vitro* así como, plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Desirée, susceptible al tizón temprano (Lorenzo *et al.*, 1992) y la especie silvestre de papa (*Solanum chacoense* BIT) tipo Pi275136 perteneciente a la serie Glabrescans Buk con resistencia en campo a la enfermedad (Estévez *et al.*, 1993). Ambos genotipos de respuesta conocida frente al filtrado del cultivo de *A. solani* (Veitía *et al.*, 2001).

La propagación *in vitro* de las plantas de papa se realizará mediante la metodología propuesta por Espinosa *et al.* (1992). Se utilizarán plantas *in vitro* 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) y abundantes raíces.

### Materiales de trabajo y equipos necesarios

- 1- Agua desionizada estéril
- 2- Asa de inoculación para hongos
- 3- Balanza técnica
- 4- Cabina de flujo laminar
- 5- Enlarmeyers 500 ml
- 6- Espátula de Drigalski
- 7- Filtro millipore de 0.22 µm
- 8- Horador de 10 mm de diámetro
- 9- Incubadoras
- 10- Mechero
- 11- Microscopio óptico
- 12- Papel de filtro (Whatman No 4)
- 13- Placas de Petri (9 cm de diámetro)
- 14- Pipet Boy
- 15- Phmetro
- 16- Rotoevaporador
- 17- Tubos de ensayo 15x20 mm
- 18- Vasos de precipitado de 1 000 ml estériles

### Medios de cultivo y soluciones

- Medio de cultivo Caldo papa dextrosa (PDB, Duchefa) (Extracto de papa 4g; dextrosa 20g; H<sub>2</sub>O 1 000 ml; pH =5.6).
- Medio de cultivo Agar papa dextrosa (PDA, Difco) (bacto dextrosa 20g; bacto agar 15g; H<sub>2</sub>O 1 000 ml; pH = 5.6).
- Medio de cultivo Richard: nitrato de potasio (10.0 g.l<sup>-1</sup>), dihidrogenofosfato de potasio (5.0 g.l<sup>-1</sup>), sulfato de magnesio heptahidratado (2.5 g.l<sup>-1</sup>), cloruro de hierro (III) (0.02 g.l<sup>-1</sup>) y sacarosa (50.0 g.l<sup>-1</sup>). H<sub>2</sub>O 1 000 ml; pH = 5.6.
- Alcohol (70%) (v/v)

### Precauciones y medidas de seguridad

Es conocido que *Alternaria solani* es potencialmente patógeno para la salud humana, es por ello que se recomienda: utilizar guantes, batas sanitarias, tapaboca y todos los medios de protección necesarios para su manipulación.

### Obtención del filtrado de cultivo

#### *Siembra en medio de cultivo sólido*

A partir de un tubo de ensayo que contenga el aislado de *A. solani*, tomar el inóculo con la aguja de siembra e inocular en placas de Petri de 9.0 cm de diámetro que contenga 15 ml de medio de cultivo Agar papa dextrosa (PDA). Seguidamente incubar en cámaras climáticas a 26±2°C y oscuridad constante según Izquierdo (1979). La colonia que crezca en las placas de Petri debe mantener las características culturales de la cepa inoculada.

#### *Inoculación en medio de cultivo líquido*

Una vez crecido el hongo en las placas de Petri, se procederá a la inoculación en el medio de cultivo Richard (Martínez y Mantell, 1994). Para ello, se tomará un disco de micelio de 1.0 cm de diámetro de la zona de crecimiento del micelio de la placa y se inoculará en Erlenmeyers de 500 ml que contendrán 100 ml de medio de cultivo Richard (Figura 1). Los erlenmeyers se incubarán por un periodo de 30 días a 28°C en condiciones de cultivo estático y oscuridad constante.

#### *Cosecha del cultivo del hongo*

Separar el estroma del medio de cultivo que contiene los metabolitos producido por el hongo con ayuda de un tamiz y filtrar el cultivo a través de papel de filtro Whatman No. 4 (Whatman, Clifton, NY USA) (Figura 2).

Una vez realizada la filtración se determinará al filtrado del cultivo de *A. solani*:

- Masa seca del micelio (el micelio se secará en estufa a 65°C hasta que el peso se mantenga constante, para lo cual se utilizará una balanza técnica).
- pH
- Determinación del contenido de azúcares reductores en el medio de cultivo (ICIDCA, 1974).

#### *Rotoevaporación del filtrado del cultivo*

Con el objetivo de concentrar 10 veces el volumen inicial del filtrado del cultivo se rotoevaporará al vacío a 40°C con un rotoevaporador (Heidolph, Bioblock) a una presión en la unidad de control no menor de 28mbar y una temperatura en el baño María de 50°C, lo cual se comprobará con la ayuda de un termómetro.

#### *Esterilización*

Se realizará por filtración y para ello se empleará un filtro de 0.22 µm (Millipore). Antes de la esterilización debe filtrarse mediante un filtro de porcelana para eliminar posibles restos de micelio.

### Selección *in vitro*

#### *Dilución del filtrado del cultivo*

Preparar una dilución 1:3 v/v del filtrado del cultivo concentrado con agua destilada estéril.

#### *Aplicación del filtrado del cultivo*

Se realizará por inmersión de raíces según lo descrito por Hernández *et al.* (1991). Las plantas *in vitro* se colocarán en tubos de ensayo de 15.0x20.0 mm, que contendrán 4.0 ml del filtrado del cultivo. Una planta por tubo de ensayo.

#### *Incubación de las plantas*

Una vez aplicado el filtrado del cultivo las plantas se colocaran en cámaras de cultivo a 22 ±2°C y luz artificial con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de 62 µE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, el fotoperíodo será de 16 horas luz, durante 72 horas hasta la evaluación de las afectaciones.

#### *Evaluación*

Las plantas se dividirán en tres zonas (Figura 2). La zona apical comprenderá una yema axilar y el ápice de la planta. La zona media incluirá dos yemas axilares y la inferior el resto de las yemas axilares del tallo de la planta. Como *criterio de selección* se empleará el siguiente: serán seleccionadas las plantas que muestren grados de afectación menor o igual a tres de acuerdo con la escala de evaluación *in vitro* propuesta por Veitía *et al.* (2001) (Tabla 1).

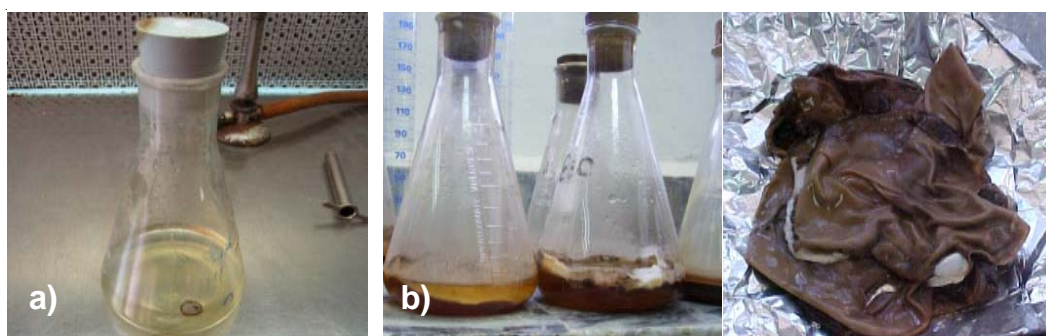


Figura 1. Producción del filtrado de cultivo del hongo *A. solani*. a) Inoculación de disco de micelio en el medio de cultivo Richard y b) Cosecha del cultivo del hongo (separación del estroma del medio de cultivo que contiene los metabolitos producidos por *A. solani*).



Figura 2. División de las plantas de papa cultivadas *in vitro* para la evaluación del efecto del filtrado del cultivo de *A. solani*.

Las plantas que se ajusten al criterio de selección serán multiplicadas *in vitro* y posteriormente se llevarán a condiciones *ex vitro* para determinar su respuesta a la enfermedad en condiciones de inoculación artificial y con fuente de inóculo natural. Para ello se regirán por el protocolo descrito por Leiva-Mora *et al.* (2006).

#### Factores a tener en cuenta para la aplicación del protocolo de selección *in vitro*

##### Selección del aislado de *A. solani* para la producción del filtrado del cultivo

Se debe evaluar la fitotoxicidad del filtrado del cultivo de cada uno de los aislados más agresivos. Se partirá de la dilución 1:1 (v:v) (Filtrado del cultivo concentrado: agua destilada estéril). Se empleará para la producción del filtrado del cultivo el aislado que provoque los mayores valores en el grado de afectación según la escala de evaluación *in vitro* descrita anteriormente sobre el genotipo de papa susceptible (Desirée) y el resistente (*S. chacoense*).

##### Conservación y mantenimiento de aislados de *A. solani*

Para la conservación de los aislados de *A. solani* se utilizarán dos métodos:

a) Conservación por transferencia periódica.

Se inoculará un fragmento de micelio del aislado de *A. solani* en tubos de ensayos (150 x 20mm) que contendrán 5ml de medio de cultivo Agar Papa

Dextrosa. Se incubarán a 28°C y oscuridad constante durante 14 días. Cada tubo será marcado y posteriormente se conservará a 4°C.

b) Conservación en aceite mineral a temperatura ambiente.









Se inoculará un fragmento de micelio frascos de vidrio de 5 ml de volumen o tubos de ensayo que contendrán medio de cultivo Agar Papa y Dextrosa. Se incubarán a 28° C y oscuridad constante por 14 días. Después de crecidos, se les adicionará aceite mineral previamente esterilizado hasta cubrir totalmente el crecimiento micelial.

Con los métodos de conservación descritos anteriormente en el Instituto de Biotecnología de las plantas se ha conservado gran parte de la colección de cultivos microbianos del laboratorio de Fitopatología. Los aislados de *A. solani* han sido conservados por más de 10 años y estos han mantenido sus características morfológicas y culturales así como los filtrados de cultivos obtenidos a partir de estos aislados han sido fitotóxicos sobre plantas de papa de la var. Desirée y de la especie silvestres *S. chacoense* tipo Pi 275136 cultivadas *in vitro*.

##### Culminación del ensayo

Una vez concluida la última evaluación se procederá a desmontar el experimento. El material vegetal así como los restos de filtrado de cultivo de *A. solani* serán esterilizados en autoclave y eliminados.

Tabla 1. Escala descriptiva para evaluar el efecto del filtrado del cultivo de *Alternaria solani* sobre plantas de papa cultivadas *in vitro* según Veitía *et al.* (2001).

Grados de afectación	Descripción de los síntomas	
0	Plantas sin síntomas.	
1	Clorosis en el centro de las hojas en la zona inferior de la planta.	
2	Clorosis en toda la hoja, en la zona inferior de la planta.	
3	Clorosis en el centro de la hoja en la zona media y necrosis en bordes de las hojas en la zona inferior.	
4	Necrosis en toda la hoja en zona inferior y hojas totalmente cloróticas en la zona media de la planta.	
5	Necrosis en bordes de las hojas en la zona media y clorosis en el centro de las hojas en la zona apical.	
6	Necrosis en toda la hoja en zona media, necrosis y clorosis en bordes y centro de las hojas en zona apical.	
7	Necrosis total de la planta.	

### CONSIDERACIONES FINALES

El protocolo descrito unido al informado por Leiva-Mora *et al.* (2006) para diferenciar genotipos de papa mediante la inoculación artificial de homogeneizados miceliales de *Alternaria solani* Sor. en cantero y campo, constituye una herramienta útil en ensayos en fase temprana para evaluar la resistencia a *A. solani* en genotipos de papa obtenidos por cualquier método de mejoramiento genético.

### REFERENCIAS

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, pp 21-36. Universidad Central de Las Villas. Cuba.

Cassells, AC, Kowalski B (1998) Strategies for the evaluation of variation as source of resistance to early blight and late blight of potato. En: Comprehensive potato technology, pp 49-64. Malhotra Publishing House, New Delhi.

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, pp. 17. Centro Internacional de la Papa. Lima

Estévez, A, González ME, Hernández MM, Ortiz U, Arzuaga J, Cordero M, González A, Martínez M, Lorenzo P (1993) Caracterización de un grupo de especies silvestres en papa. Cultivo tropicales 14(1):80-85

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
- ICIDCA (1974) Manual de Técnicas Analíticas. P. 18
- 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
- Jansky, S (2006) Overcoming hybridization barriers in potato. Plant Breeding 125:1-12
- Kosky, R (1998) Selección *in vitro* a enfermedades. En: Pérez J.N. (Ed.). Propagación y Mejora genéticas de las plantas. pp.25-44. IBP, Cuba
- Leiva-Mora M, Veitía N, Alvarado-Capó Y (2006) Protocolo para la diferenciación de genotipos de papa mediante la inoculación artificial de suspensiones miceliales de *Alternaria solani* Sor. en cantero y campo. Biotecnología Vegetal 6(1): 45 – 49
- Ligarreto, GA (2001) Los recursos genético: Un acervo importante para el mejoramiento de la producción de papa. Revista Corpoica 2(1):12-17
- 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
- Martínez, PR y 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, JP (1998) Mutagénesis *in vitro*. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez, PJ (Ed.) Editora GEO, pp. 297-326. IBP, Cuba
- Pérez, S, Snowdon R, Pons-Kuhnemann (2004) Variability of Cuban and international populations of *Alternaria solani* from different hosts and localities: AFLP genetic analysis. Eur J Plant Pathol 110: 399-409
- Torres, H (2002) Manual de las enfermedades más importantes de la papa en el Perú. Centro Internacional de la Papa. Editado por Teresa Ames, pp. 59. CIP. Lima
- van der Waals, JE, Denner FDN, van Rij N, Korsten L (2003) Evaluation of plant-plus, a decision support system for control early blight on potatoes in South Africa. Crop Prot. 22:821-828
- Veitía, 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