

## Empleo del cultivo de tejidos la mutagénesis *in vitro* para la mejora de resistencia a *Alternaria solani* en papa var. "Desirée"

Novisel Veitía<sup>1\*</sup>, Miguel Angel Dita<sup>1</sup>, Lourdes García<sup>1</sup>, Lidcay Herrera<sup>2</sup>, Idalmis Bermúdez<sup>1</sup>, Mayra Acosta<sup>1</sup>, Justo Clavero<sup>1</sup>, Pedro Orellana<sup>1</sup>, Carlos Romero<sup>1</sup>, Leonardo García<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de la Villas Carretera a Camajuaní Km 5 ½ . Santa Clara. Villa Clara Cuba. e-mail: [porellana@uclv.etecs.cu](mailto:porellana@uclv.etecs.cu)

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de las Villas Carretera a Camajuaní Km 5 ½ . Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

### RESUMEN

Con el objetivo de obtener somaclones que presentaran un comportamiento superior con respecto a la variedad Desirée, frente a la enfermedad tizón temprano causada por *Alternaria solani* (Sor.) y *A. alternata* (Fr) Keiser, se llevaron a cabo dos fases de trabajo: en la primera se estudiaron los aspectos relacionados con el patógeno, el tiempo de incubación y el método de aplicación del cultivo filtrado sobre las vitroplantas y se determinó que la inmersión de raíces fue el mejor método de inoculación. Se pudo comprobar la efectividad biológica de las diferentes concentraciones del filtrado sobre vitroplantas de las variedades Desirée (susceptible) y la especie *Solanum chacoense* (resistente), y se tomó la dilución 1:3 v/v como efectiva para la selección. Se elaboró una escala para evaluar la intensidad de los daños provocados por el filtrado y se estableció un esquema de selección para el mejoramiento genético en la variedad Desirée. La segunda fase tuvo por objeto la inoculación masiva con el cultivo filtrado del hongo 1 000 somaclones obtenidos a partir de callos irradiados con radiaciones gamma. Cuarenta y cinco somaclones presentaron grados de afectación inferiores a la variedad original. Se evaluó en invernadero el comportamiento de los somaclones seleccionados *in vitro*, frente a la enfermedad y seis presentaron grados de afectación inferiores a la variedad original.

Palabras clave: cultivo filtrado, selección *in vitro*, tizón temprano,

### ABSTRACT

Two phases of work were carried out with the objective of obtaining somaclones in Irish Potato (*Solanum tuberosum* L.) that present a superior behavior with respect to the variety Desirée against the early blight disease caused by *Alternaria solani* (Sor.) and *A. alternata* (Fr.) Keissler. In the first phase, the aspects related to the pathogen, the incubation time and the method of application of the filtered culture on the vitroplants were studied the immersion of the roots as the effective method of inoculation. The biological effectiveness of the different concentrations of the filtrate on the vitroplants of the variety Desirée (susceptible) and the specie *Solanum chacoense* (resistant) was checked, taking the dilution of 1:3 v/v as the effective for the selection. A scale was elaborated to evaluate the intensity of the damages caused by the filtrate and a selection scheme was established for the genetic improvement of the variety Desirée. The second phase had as its objective the massive inoculation with the filtered culture of the fungus 1 000 somaclones were obtained from the irradiated calli with gamma radiation. Forty-five somaclones presented levels of affectation inferior to that of the original variety. The behavior of the somaclones selected *in vitro* was evaluated in the greenhouse against the disease and six somaclones presented levels of affectation inferior to that of the original variety.

Key words: culture filtrate, early blight, , *in vitro* selection

### INTRODUCCIÓN

La Alternariosis, enfermedad causada por el hongo *Alternaria solani* (Sor.) y *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, según Arzuaga e Izquierdo (1983), constituye desde el punto de vista económico la enfermedad más importante que ataca las plantaciones de papa en Cuba. El principal método de control ha sido el químico pero se buscan

variedades resistentes como alternativa (Caligary y Nachmias, 1988) conjugado con el control biológico para otras plagas.

El empleo de toxinas de carácter hospedero-específico en la búsqueda de plantas resistentes a enfermedades brinda la posibilidad de su uso en programas de mejoramiento como agente selectivo, incorporado a los medios de crecimiento en callos

para la realización de bioensayos, así como estudios relacionados con la interacción huésped patógeno (Lorenzo *et al.*, 1992).

Se han realizado varios trabajos a través de la inducción de variación somaclonal en *Solanum tuberosum* a través del cultivo de callos (Matern y Strobel, 1987; Martínez, 1994), así como, el empleo de agentes mutagénicos (Ancora *et al.*, 1987; Sonino *et al.*, 1991; Urrea, 1998). Teniendo en cuenta las afectaciones de este patógeno en nuestras condiciones y las posibilidades que brinda el empleo de las técnicas biotecnológicas para el mejoramiento genético, este trabajo se realizó con el objetivo de emplear el cultivo filtrado del hongo *Alternaria solani* en la selección *in vitro* de plantas y la evaluación de los somaclones seleccionados *in vitro* en condiciones de canteros ante la enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Estudio del tiempo de incubación

Se estudió el efecto de los tiempos de incubación 12, 21 y 30 días respectivamente de una cepa de *A. solani* aislada de lesiones naturales sobre vitroplantas de la variedad Desirée y la especie *Solanum chacoense* las cuales fueron empleadas en todos los experimentos realizados. El hongo fue cultivado sobre medio de cultivo de Fries (Luke y Wheeler, 1955) incubado a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  en oscuridad constante y cultivo estático durante 30 días. Al cabo de ese tiempo se separó el micelio y se filtró el caldo por papel de filtro Whatman N° 4. Posteriormente el filtrado se concentró seis veces por rotoevaporación al vacío a  $40^\circ\text{C}$ . Los tratamientos establecidos fueron los siguientes: Cultivo filtrado sin diluir, dilución 1:1 v/v, medio de Fries sin inocular y agua destilada estéril. Se evaluó a las 72 horas el porcentaje de plantas afectadas por tratamiento y variedad.

### Métodos de aplicación del cultivo filtrado del hongo

Se establecieron dos métodos para determinar la aplicación del cultivo filtrado del hongo: inmersión de raíces y aspersión foliar. En el método de inmersión se colocaron las vitroplantas en frascos que contenían 20 ml del tratamiento y se sumergió todo el sistema radical en el mismo. En la variante de aspersión foliar se extrajeron las vitroplantas, se asperjaron con el cultivo filtrado del hongo y se colocaron en frascos que contenían medio de cultivo de multiplicación compuesto por sales MS suplidas con tiamina  $1.0 \text{ mg.l}^{-1}$ , mioinositol  $100.0 \text{ mg.l}^{-1}$  y sacarosa  $30.0 \text{ g.l}^{-1}$ . Para ambos métodos se emplearon 5 frascos por tratamiento. Los frascos fueron colocados en cámaras de crecimiento a temperatura de  $18^\circ\text{C}$  y fotoperíodos de 18 horas luz y 6 de oscuridad durante 72 horas. Para cada uno de los métodos se

usaron los siguientes diluciones: 1:1, 1:3, 1:5, 1:10 v/v, filtrado sin diluir, agua destilada estéril y medio de cultivo de Fries sin inocular. Se evaluó el porcentaje de plantas afectadas.

### Establecimiento de la concentración óptima del cultivo filtrado para la selección *in vitro*

Se estudiaron diferentes diluciones del filtrado del patógeno con el objetivo de buscar la que produjera un porcentaje de afectación por encima del 90.0% para la variedad Desirée y que no afectara considerablemente el patrón resistente (*S. chacoense*). Se establecieron los siguientes diluciones: 1:3, 1:5, 1:7, 1:10; medio de cultivo de Fries sin inocular y agua destilada estéril. Las evaluaciones se realizaron a las 72 horas. Además se elaboró una escala basada en la sintomatología observada en los ensayos anteriores, con el objetivo de evaluar la intensidad de las afectaciones. Se aplicó el método de inmersión de raíces y el cultivo filtrado se obtuvo de acuerdo a lo explicado anteriormente concentrándolo 10 veces por rotoevaporación al vacío.

### Ensayo masivo empleando el cultivo filtrado del hongo

Se comenzó la formación y multiplicación de callos de la variedad Desirée a partir de hojas de vitroplantas, las cuales fueron colocados en un medio de cultivo compuesto por sales MS, tiamina  $0.4 \text{ mg.l}^{-1}$ , pantotenato de calcio  $2.0 \text{ mg.l}^{-1}$ , mioinositol  $100.0 \text{ mg.l}^{-1}$  y sacarosa  $30.0 \text{ g.l}^{-1}$ . Los callos fueron irradiados a razón de 10 Gy con una fuente de Cobalto 60 y colocados en condiciones de oscuridad a  $27^\circ\text{C}$  durante 30 días. Posteriormente se colocaron en un medio cultivo de regeneración (Freire, 1993) durante 45 días. Las vitroplantas regeneradas se micropropagaron según la metodología propuesta por Espinosa *et al.* (1992). Se seleccionaron las vitroplantas que presentaron grados de afectación menor o igual a tres. Las vitroplantas de los somaclones seleccionadas se plantaron en cajas de polietileno de 247 orificios con un volumen de  $32 \text{ cm}^3$ . Para el riego se empleó la técnica de microaspersión con una frecuencia de 1.5 minutos cada dos horas. A los 15 días se trasplantaron a canteros sobre un suelo ferralítico rojo 60 vitroplantas por somaclón, empleándose como testigos vitroplantas de la variedad Desirée y la especie *Solanum chacoense*.

Para la evaluación de las afectaciones provocadas por el patógeno se empleó la escala propuesta por el Comité de Expertos de Sanidad Vegetal ampliada a la categoría de ataque (Mayea y Perdomo, 1990).

Este tiempo de incubación fue utilizado por Lorenzo *et al.* (1992), obteniendo elevados índices de afectación en vitroplantas y callos de papa.

Los análisis estadísticos consistieron en comparaciones múltiples de los porcentajes de afectación, empleando para ellos un programa estadístico para microcomputadoras en base al método descrito por Quenouville (1966).

Para el procesamiento estadístico del grado de afectación de los somaclones en condiciones de canteros se aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis complementándose con una comparación múltiple no paramétrica de medias de rango. Para estos procesamientos se empleó el paquete estadístico de programas STATISTIX (versión 1.0) sobre Window.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las variedades estudiadas presentaron diferencias en la respuesta ante la aplicación el cultivo filtrado de *Alternaria solani* alcanzando porcentajes de afectación superiores la variedad Desirée (susceptible), mostrándose la acción patogénica del filtrado de *Alternaria solani* sobre las vitroplantas. Broggio y

Ranucci (1992), señalaron que en una serie de trabajos realizados con los patógenos *Alternaria solani* y *Alternaria alternata* se demostró su carácter hospedante específico en la enfermedad tizón temprano en papas y tomates.

Este aspecto brinda la posibilidad de realizar selecciones *in vitro* para la búsqueda de plantas resistentes a esta enfermedad, utilizando las toxinas o fracciones fitotóxicas o el cultivo filtrado del patógeno.

Al comparar los tres tiempos de incubación del hongo estudiados (12, 21 y 30 días) se comprobó que a los 12 días no se produjeron afectaciones sobre las vitroplantas de la variedad Desirée y la especie *Solanum chacoense*. Estos resultados pueden estar dados porque en este tiempo es aún insuficiente la producción de metabolitos por el hongo. A los 21 y 30 días de incubación se observó claramente la acción del cultivo filtrado y aunque no existieron diferencias significativas entre ambos tiempos, las mayores afectaciones se observaron en la variante de 30 días de incubación (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de vitroplantas de papa afectadas por variedad y tratamiento a los 21 y 30 días de incubación del hongo *A. solani* en medio de cultivo de Fries.

Tratamientos	Tiempo de Incubación días	Desirée	<i>S. chacoense</i>
Cultivo filtrado	21	60 Aa	10 Ba
Filtrado sin diluir	30	80 Aa	20 Ba
Dilución 1:1	21	50 Aa	0 Ba
	30	60 Aa	10 Ba
Medio de cultivo de Fries sin inocular	21	0 Aa	0 Aa
	30	0 Aa	0 Aa
Agua destilada	21	0 Aa	0 Aa
Estéril.	30	0 Aa	0 Aa

Letras mayúsculas iguales en una misma fila no difieren para  $P < 0.05$ .

Letras minúsculas iguales no difieren para  $P > 0.05$  dentro del mismo tratamiento y variedad.

En los tratamientos utilizados como testigos (medio de cultivo de Fries sin inocular y agua destilada estéril) no se observaron afectaciones sobre las vitroplantas de la variedad Desirée y la especie *S. chacoense* ni para ninguno de los tiempos estudiados.

De los dos métodos de aplicación del cultivo filtrado: inmersión de raíces y aspersión foliar, se observó que con el primero se alcanzaron valores significativamente superiores (99.3%), además de ser un método más práctico y uniforme (Tabla 2). Sin embargo, con el método de aspersión foliar se alcanzaron valores de hasta un 80.0% de afectación en la variedad Desirée, lo que evidencia que el filtrado también penetra en los tejidos. Broggio y Ranucci (1992), buscando un método de "screening" para el tizón temprano en papa, lo utilizaron y obtuvieron resultados prometedores.

Al evaluar la efectividad biológica del cultivo filtrado del hongo en las diferentes diluciones en la tabla 4 se muestran los porcentajes de plantas afectadas que alcanzaron grados de afectación igual o superior a tres. Teniendo en cuenta las observaciones realizadas se elaboró una escala de valores (Tabla 3), para evaluar la intensidad de las afectaciones. Con la dilución 1:3 v/v se observó 33.3% de afectación para la variedad Desirée presentando diferencias significativas al compararla con la especie *S. chacoense* la cual no mostró valores de afectación en este rango. Los resultados indicaron que existió una relación directa entre la concentración del cultivo filtrado y la velocidad de aparición de los síntomas en las plántulas. También se pudo apreciar la acción del filtrado aún en bajas concentraciones. Resultados similares fueron obtenidos por Hernández *et al.* (1991).

Tabla 2. Porcentaje de vitroplantas de papa afectadas por tratamiento y variedad en los dos métodos de aplicación del cultivo filtrado del hongo *A. solani*.

Tratamientos	Métodos de inoculación	Desirée	<i>S. chacoense</i>
Dilución 1:1	Inmersión	99.3Aa	33.3Ba
	Aspersión	80.0Aa	0.6Bb
Dilución 1:3	Inmersión	86.6Aa	33.3Aa
	Aspersión	65.0Aa	0.5Bb
Dilución 1:5	Inmersión	93.3Aa	26.6Ba
	Aspersión	65.0Aa	10.0Ba
Dilución 1:10	Inmersión	46.6ABa	13.6Ba
	Aspersión	50.0Aa	2.5Bb
C. filtrado sin diluir	Inmersión	93.3Aa	33.3Ba
	Aspersión	55.0Ab	45.0Aa
Agua destilada Estéril	Inmersión	13.3Aa	6.6Aa
	Aspersión	15.0Aa	10.0Aa
Medio de cultivo	Inmersión	26.6Aa	20.0Aa
Fries sin inocular	Aspersión	10.0Aa	2.5Aa

Letras mayúsculas iguales en una misma fila no difieren para  $P < 0.05$ .

Letras minúsculas iguales no difieren para  $P > 0.05$  dentro del mismo tratamiento

Tabla 3. Escala de valores para evaluar los daños provocados por el cultivo filtrado de *Alternaria solani* sobre vitroplantas de papa en condiciones *in vitro*.

Grados	Caracterización.
0	Plantas sin síntomas.
1	Plantas con clorosis ligera en la zona basal.
2	Plantas con clorosis avanzada en la zona basal.
3	Plantas con la zona basal ligeramente necrosada y algunas hojas de la zona media con clorosis ligera.
4	Plantas con necrosis acentuada en la zona basal y clorosis avanzada en la zona media.
5	Plantas con hojas muertas en la zona basal, la zona media ligeramente necrosada y la zona apical con clorosis ligera.
6	Plantas necrosadas hasta la zona media y la zona apical con clorosis avanzada.
7	Plantas muertas, colapso total.

Tabla 4. Porcentaje de vitroplantas de papa afectadas con grado de afectación por el cultivo filtrado del hongo *A. solani* mayor o igual a tres, según la escala propuesta.

Variedades	Tratamiento					
	Dilución 1:3	Dilución 1:5	Dilución 1:7	Dilución 1:10	Medio de Fries Sin inocular	Agua destilada estéril
Desirée	33.3 Aa	13.3ABa	13.3 ABa	0.0 Ba	0.0 Ba	0.0 Ba
Solanum chacoense	0.0 Ab	0.0 Ab	0.0 Ab	0.0 Ab	0.0 Ab	0.0 Ab

Letras mayúsculas iguales en una misma fila no difieren para  $P < 0.05$ .

Letras minúsculas iguales no difieren para  $P > 0.05$  dentro del mismo tratamiento y variedad.

Al evaluar en condiciones de cantero el comportamiento de los somaclones seleccionados *in vitro*, se demostró que con el empleo desarrollado para el mejoramiento genético de la papa se logró seleccionar plantas *in vitro* y en condiciones de cantero (Figura 1) ya que seis de ellos presentaron grados de afectación inferiores a la variedad original de acuerdo a la escala propuesta por el Comité de Expertos de Sanidad Vegetal ampliada a la categoría de ataque (Mayea y Perdomo, 1990). Estos

resultados pueden estar relacionados con el factor escape que normalmente ocurre en un proceso de selección además están asociados los cambios epigenéticos y el efecto del rejuvenecimiento (Pérez, 1998).

Aunque no todos los somaclones seleccionados *in vitro* mostraron resistencia en cantero se observó una relación positiva en cuanto al comportamiento

ante la enfermedad. Sin embargo, Martínez y Sinclair (1994) obtuvieron que la resistencia frente al cultivo filtrado de *A. solani* expresada *in vitro* se mantuvo en porcentajes muy altos (88%) en el grupo de líneas derivadas de callos irradiados al evaluarlas en condiciones de invernadero. Otros autores argumentan que la respuesta en el laboratorio al nivel de plántula de papa puede ser difícilmente comparada con la respuesta de las plantas en el campo debido a que la fisiología y la organización anato-morfológica de ambas no es la misma (Broggio y Ranucci, 1992).

Varios autores han realizado estudios para determinar la existencia de diferencias entre variedades o la correlación de la variedad hospedante a nivel celular e *in vivo* empleando cultivo filtrado de varios patógenos como: *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*, *Alternaria solani*, *Verticillium* spp. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* y *Ustilago scitaminea* (Hammerschlag, 1984; Hartman y Secor, 1985; Hartman *et al.*, 1985; Martínez y Sinclair, 1994; Gómez, 1996). En todos los casos el uso de los cultivos filtrados permitió la selección de líneas resistentes.

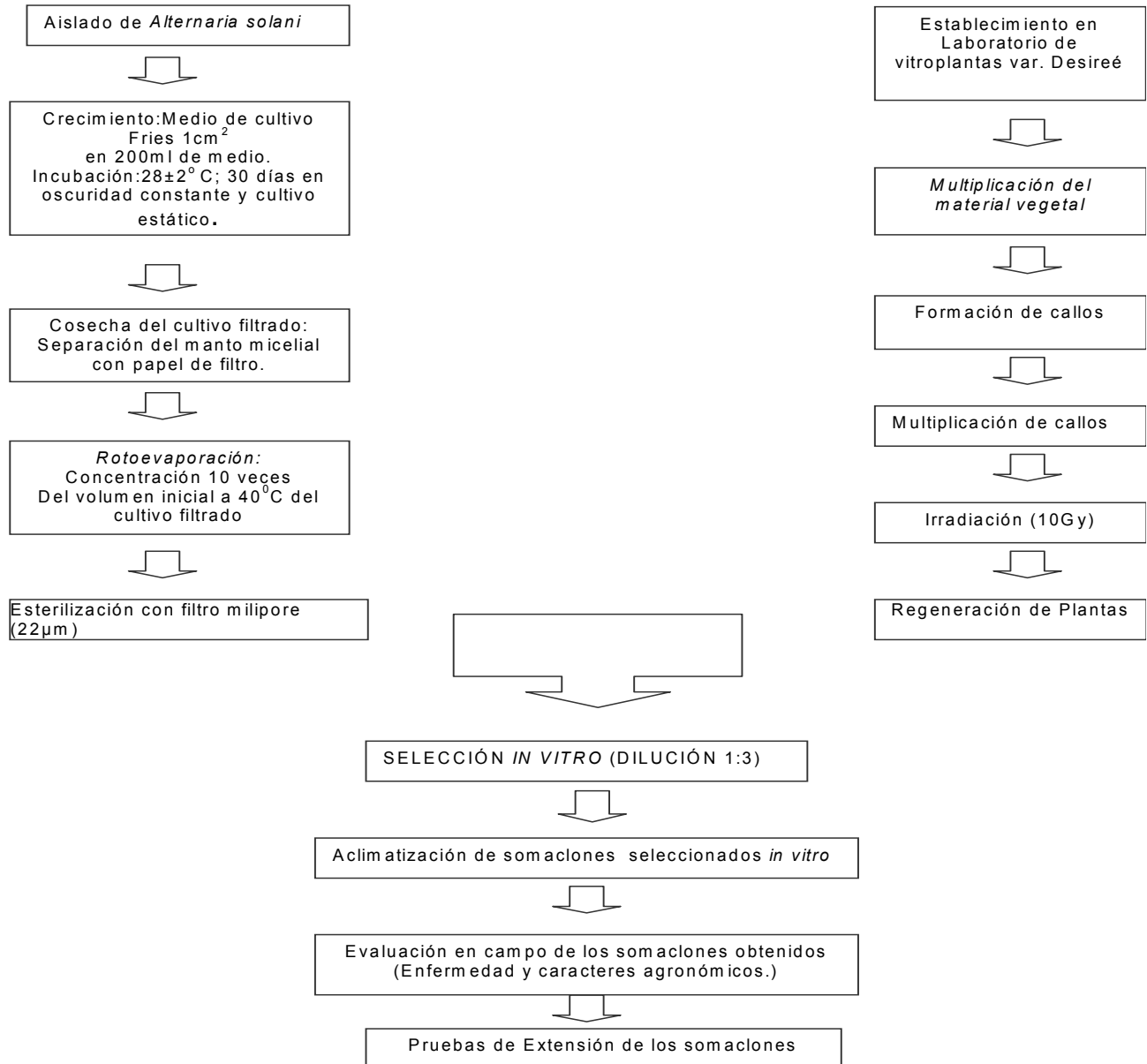


Figura 1. Esquema desarrollado para el mejoramiento genético en papa (*Solanum tuberosum* L. var. Desiree).

## CONCLUSIONES

Los resultados expuestos anteriormente evidencian la posibilidad de encontrar resistencia a *A. solani* mediante el empleo de la selección *in vitro* con el cultivo filtrado combinado con la mutagénesis *in vitro*. Además este método permite reducir en gran medida las poblaciones originales al eliminarse la mayor parte de las formas susceptibles en etapas tempranas.

## REFERENCIAS

- Ancora, G, Sonino, A (1987) *In vitro* induction of mutation in Potato. En Y.P.S. Bajaj (Ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 3. Springer-Verlag, Berlín, London pp. 408-424
- Arzuaga, J. e Izquierdo, F(1983) Comportamiento de la resistencia a *Alternaria solani* (Ellis y Martin.) de 9 variedades de papa *Solanum tuberosum* L. en condiciones controladas. Cultivos Tropicales 4(2): 303 -311
- Broggio, M, Ranucci A (1992) *In vitro* infection for potato early blight *Alternaria solani*. Rivista di Agricoltura Subtropicale e Tropicale:355-366
- Caligary, P D.S. y Nachmias A (1988) Screening for field resistance to early blight (*Alternaria solani*) in potatoes. Potatoes Res. 31:451-460
- Espinosa, N, Estrada, P, Tovar, P, Bryan, P y Dodds (1992). Tissue culture micropropagation, conservation and export of potato germoplasm. Especialized Technology Document 1, Centro Internacional de la Papa, Lima. Perú
- Gómez, KR (1996) Selección *in vitro* a la enfermedad carbón (*Ustilago scitaminea* Syd) de la caña de azúcar. Tesis de Doctorado. Universidad Central de las Villas
- Hammerschlag, FA (1984) Optical evidence for effect of culture filtrates of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. J. Amer. Soc. Hort. 115: 295-304
- Hartman, CL, Secor GA (1985) Comparative response of potato leaves, tuber tissue and stem callus to culture filtrate of *Verticillium* sp. Phytopathology 75: 1377 (Abstr.)
- Hartman CL, Secor GA, Venette JR, Albaugh (1985) Response of bean calli to filtrate from *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* and comparison to whole plant disease reaction. Phytopathology 75 (11): 1377 (Abstr.)
- Hernández, MM, Kowalski B, Lorenzo P y 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
- Lorenzo, P, Ramos M y Hernández, MM (1992) Extracción de la toxina producida por el hongo *Alternaria alternata* Cultivos Tropicales 13 (1): 67-69
- Luke , H y Wheeler, H.E (1955). Toxin production by *Helminthosporium victoriae*. Phytopathology 45:353-458
- Martinez, PR y Sinclair, M (1994) *In vitro* selection of resistance to early blight *Alternaria solani* (Sor.) in the Andean Potato *Solanum phureja* Juz. et Buk). Fitopatología Colombiana 8 (2): 90-99
- Matern, U. y Strobel, G (1987) *In vitro* production of potato bearing resistance to fungal diseases En: Y.P.S. Bajaj (Ed). Potato Biotechnology Agriculture and Forestry 3: 291-317
- Mayea, S y Perdomo O (1990) Sistema de lucha integrado contra el tizón temprano *Alternaria solani* (Sor.) en la papa (*Solanum tuberosum* Lin.). Trabajo de Diploma. Universidad Central de las Villas: 70
- Sonino, A, Ancora G, Locardi C (1986) *In vitro* mutation Breeding of Potato En: IAEA (Ed). Nuclear Techniques and *in vitro* culture for plant improvement. Proceed. International Atomic Energy pp. 386-394 Vienna