

Respuesta *in vitro* de plantas papa frente al filtrado de cultivo de *Alternaria solani* Sor. obtenidos en diferentes medios de cultivo

Novisel Veitía*, Lourdes R. García, Idalmis Bermúdez-Carabaloso, Mayra Acosta-Suárez, Yelenys Alvarado-Capó, Damaris Torres, Yenny 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

El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de determinar la respuesta *in vitro* de plantas de papa frente al filtrado de cultivo de *Alternaria solani* Sor. obtenido en dos medios de cultivo. Para la obtención del filtrado de cultivo se empleó el aislado CCIBP-VAs₄ y los medios de cultivo utilizados fueron Fries y Richard. La fitotoxicidad de los filtrados se evaluó en plantas cultivadas *in vitro* susceptibles (cv. 'Desirée') y resistente (especie *S. chacoense* tipo Pi 275136) por inmersión de las raíces de las plantas. Los resultados mostraron que los filtrados obtenidos en ambos medios de cultivo fueron fitotóxicos sobre los dos materiales vegetales. Sin embargo, los filtrados de cultivo que se produjeron en el medio de cultivo Richard permitieron una mejor diferenciación entre las plantas de papa cv. 'Desirée' (susceptible) y las de la especie silvestre *Solanum chacoense* tipo Pi 275136 (resistente). Esto se correspondió con que en este medio de cultivo se produjo un mayor crecimiento del hongo.

Palabra clave: diferenciación *in vitro*, medios de cultivo Fries y Richard, *Solanum tuberosum* L.

In vitro reaction of potato plants against the culture filtrate of *Alternaria solani* Sor. obtained in different culture media

ABSTRACT

This work was developed in order to determine the *in vitro* response of potato plants against the culture filtrate of *Alternaria solani* Sor. obtained in two culture media. To obtain filtrate culture were used CCIBP-VAs₄ isolate and Fries and Richard culture media. The phytotoxicity of the filtrates was evaluated on *in vitro* plants susceptible (cv. 'Desirée') and resistant (the specie *S. chacoense* type Pi 275136) by immersion of the roots of plants. The results showed that the filtrates obtained in both culture media were phytotoxic on both plant materials. However, culture filtrates that produced in Richard culture medium gave a better differentiation between potato plants cv. 'Desiree' (susceptible) and those of the wild species *Solanum chacoense* PI 275136 (resistant). This result was corresponded with the higher growth of the fungus in this culture medium.

Keywords: *in vitro* differentiation, Fries and Richard culture medium, *Solanum tuberosum* L.

INTRODUCCIÓN

Como parte de programas de mejoramiento genético de plantas para la resistencia a patógenos fúngicos se emplean métodos de selección *in vitro*. Estos permiten evaluar un gran número de plantas antes de realizar los experimentos a nivel de casa de cultivo y campo. Como agentes selectivos se utilizan estructuras infectivas del patógeno, filtrados del cultivo de estos, extractos crudos, toxinas y componentes de la pared celular.

En el caso de *Alternaria solani* Sor., agente causal del tizón temprano en papa (*Solanum tuberosum* L.), se ha descrito que produce toxinas no hospedero específicas tanto *in*

vivo como *in vitro* (Chaerani y Voorrips, 2006). Entre ellas, el ácido alternárico, zinniol, antraquinonas, solanapironas A, B y C y alternasol A son las principales responsables de la acción fitotóxica. En general, este tipo de toxina no son determinantes primarios de la enfermedad, pero actúan como un factor de virulencia, e intensifican los síntomas (Thoma, 2003). Sobre esta base, se ha evaluado la respuesta de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y papa frente a los filtrados de cultivo (Chaerani y Voorrips, 2006).

La diferenciación *in vitro* de genotipos susceptibles y resistentes en papa con el empleo del filtrado de cultivo de *A. solani* ha

sido estudiado por varios autores (Lynch *et al.*, 1991; Hernández *et al.*, 1993; Martínez y Mantell, 1994). Sin embargo, pocos han sido las investigaciones en las que se tenga en cuenta las condiciones bajo las cuales estos son producidos. Es por ello, que el presente trabajo se realizó con el objetivo determinar la respuesta *in vitro* de plantas de papa frente al filtrado de cultivo de *Alternaria solani* Sor. obtenido en dos medios de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Plantas cultivadas *in vitro* de papa en fase de multiplicación, de *Solanum tuberosum* L. cv. 'Desirée' (susceptible al Tizón temprano) y *Solanum chacoense* tipo Pi 275136 (especie silvestre, resistente al Tizón temprano).

Aislado de *A. solani*

Se empleó el aislado CCIBP-VAs₄ de la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas.

Obtención de los filtrados de cultivo

Para obtener el filtrado del cultivo a partir del aislado CCIBP-VAs₄ de *A. solani*, se emplearon erlenmeyers de 500 ml de volumen que contenían 200 ml de los medios de cultivo líquido Fries (Lorenzo *et al.*, 1992) y Richard (Martínez y Mantell, 1994). El pH de cada medio de cultivo se ajustó a 5.6. Estos recipientes de cultivo se inocularon con un disco de micelio de 1.0 cm de diámetro tomado de los bordes de las colonias crecidas en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) (durante 7 días a 26±2 °C y oscuridad constante). Posteriormente se incubaron por un período de 30 días a 28°C en condiciones de cultivo estático y oscuridad constante. Se emplearon cuatro erlenmeyers por medio de cultivo. Pasado este período de tiempo se separó el estroma y se filtró el cultivo a través de papel de filtro Whatman No. 4. El filtrado del cultivo se concentró diez veces el volumen inicial por rotoevaporación al vacío a 40°C. Posteriormente se filtró por un filtro de porcelana para eliminar posibles restos de micelio y por último por un filtro de 0.22 µm (Millipore).

Respuesta de plantas *in vitro* de papa al filtrado de cultivo

Los filtrados de cultivo obtenidos en cada medio de cultivo después de 30 días de incubación se aplicaron por inmersión de raíces (Hernández *et al.*, 1993) sobre plantas de papa cv. 'Desirée' (susceptible) y la especie *S. chacoense* tipo Pi 275136 (resistente) cultivadas *in vitro*. Para ello, se empleó la dilución 1:1 (v/v) (filtrado del cultivo concentrado: agua destilada estéril). Como controles se incluyeron los medios de cultivo Fries y Richard sin inocular con el hongo, pero incubados y concentrados y agua destilada estéril.

Se emplearon 15 plantas *in vitro* de cada material vegetal por medio de cultivo empleado para la obtención del filtrado del cultivo. Las plantas fueron colocadas en cámaras de cultivo a 22 ±2°C, luz artificial con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de 62 µEm⁻²s⁻¹ y un fotoperíodo de 16 horas luz, durante 72 horas hasta la evaluación de las afectaciones.

Las afectaciones provocadas por el filtrado del cultivo obtenido en ambos medios de cultivo fueron evaluadas mediante la escala descriptiva de grados propuesta por Veitía *et al.* (2001) (Tabla 1). A partir de los grados de afectación presentados por cada material vegetal (susceptible o resistente) en cada medio de cultivo, se calculó la diferencia entre estos. Con estos valores se determinó la intensidad de afectación mediante la fórmula propuesta por Townsend y Heuberger (1943) que se describe a continuación:

$$I = \left[\frac{\sum(n \cdot v)}{iN} \right] * 100$$

Donde: I significa la intensidad de afectación (%); n, total de plantas por grado de la escala; v, grado respectivo de la escala; N, total de plantas evaluadas e i, grado máximo de la escala (i=7).

Además, se midió el pH del filtrado del cultivo del aislado de *A. solani* obtenido en cada medio de cultivo y se determinó la masa seca (g) del micelio. Para esto último, el micelio se colocó en estufa a 65.0°C hasta que el peso se mantuvo constante.

Tabla 1. Escala de valores para evaluar los daños provocados por el cultivo filtrado de *Alternaria solani* sobre plantas *in vitro* de papa (Veitía *et al.*, 2001).

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.

Los datos de los grados de afectación, los valores de intensidad de afectación, pH y masa seca del micelio, fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de *Mann Whitney* previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza a través de paquete estadístico *Statistical Package for social Science* (SPSS) versión 13.0 sobre Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respuesta de plantas *in vitro* de papa al filtrado de cultivo

Se comprobó a través de este estudio que la respuesta de las plantas cultivadas *in vitro* de papa varió en dependencia de la fitotoxicidad del filtrado del cultivo que se produjo en los medios de cultivo Fries y Richard.

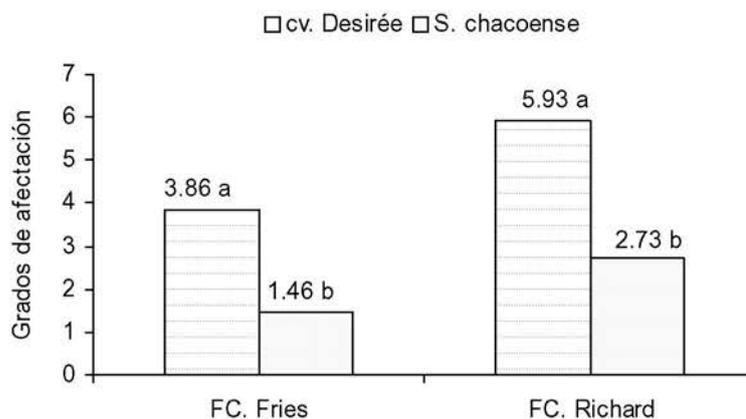
Con los filtrados del cultivo del aislado CCIBP-Vas₄ que se produjeron tanto en el medio de cultivo Fries como en Richard se logró diferenciar las plantas de papa cv. 'Desirée' (susceptible) de las de la especie silvestre *S. chacoense* (resistente). Sin embargo, el que se obtuvo en el medio de cultivo Richard, produjo los mayores valores en el grado de afectación en los dos genotipos de papa (Figura 1).

Los controles, medio de cultivo Richard sin inocular y el agua destilada estéril no provocaron síntomas en ninguno de los genotipos evaluados. Por el contrario, el medio

de cultivo Fries sin inocular (control), produjo afectaciones sobre las plantas de papa cv. 'Desirée'. Estas presentaron un valor promedio del grado de afectación de 0.26 (cuatro plantas con clorosis ligera en el centro de las hojas de la zona inferior, esta sintomatología se correspondió con el grado 1).

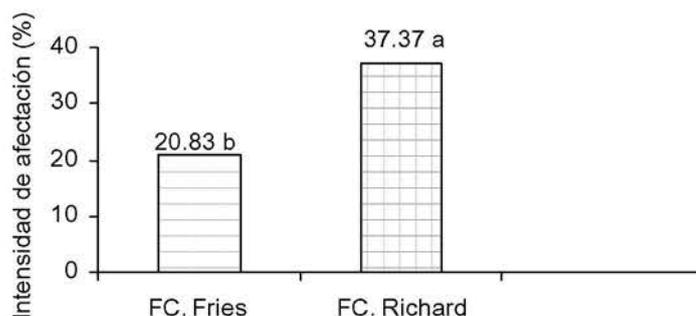
Los porcentajes de intensidad de afectación del filtrado del cultivo de *A. solani* (CCIBP-VAs₄) calculados a partir de la diferencias entre los grados de afectación presentados por el cultivar susceptible y la especie resistente fueron mayores en medio de cultivo Richard en comparación con los obtenidos en medio de cultivo Fries (Figura 2). Este resultado indicó que el medio de cultivo influyó en la fitotoxicidad de los filtrados del cultivo de *A. solani*, lo cual permitió una mejor diferenciación entre ellos. De igual forma se comprobó que el crecimiento *in vitro* del aislado CCIBP-VAs₄ estuvo relacionado con el tipo de medio de cultivo utilizado y fue en Richard donde se obtuvieron los mayores valores de masa seca (g) (Tabla 2) y (Figura 3 a y b). Esto puede estar asociado a la composición química del medio de cultivo. Por ejemplo, el medio de cultivo Richard posee mayor concentración de la fuente de carbono y de nitrógeno.

Otro elemento importante fue la modificación del pH de los medios de cultivo. Se encontró un incremento en el medio de cultivo Richard y una disminución en el de Fries (Tabla 1).



Valores medios sobre barras con letras desiguales en cada tratamiento difieren por la prueba de Mann Whitney para $p < 0.05$

Figura 1. Grados de afectación provocados por el filtrado del cultivo de *A. solani* (CCIBP-VAs₄) producido en los medios de cultivo Fries y Richard sobre plantas *in vitro* de papa cv. 'Desirée' (susceptible) y *Solanum chacoense* tipo Pi 275136 (resistente) de papa según la escala propuesta por Veitia *et al.* (2001). FC. Filtrado del cultivo.



Valores medios sobre barras con letras desiguales difieren por la prueba de Mann Whitney para $p < 0.05$.

Figura 2. Intensidad de afectación (%) calculada a partir de la diferencia entre los grados de afectación presentados por plantas *in vitro* de papa cv. 'Desirée' (susceptible) y *Solanum chacoense* tipo Pi 275136 (resistente) frente a los filtrados del cultivo de *A. solani* (CCIBP-VAs₄) producidos en los medios de cultivos Fries y Richard. FC. – filtrado del cultivo.

Se ha comprobado que los microorganismos ocasionan variaciones en el pH de los medios de cultivo durante su crecimiento *in vitro* y esto puede estar relacionado con los procesos metabólicos que tienen lugar según la composición química del tipo de medio de cultivo empleado. Por ejemplo, Pérez (1997) estudió el pH inicial, la temperatura y el tiempo de incubación que pudieran potenciar la toxicidad de los filtrados crudos de *A. solani* y observaron poca influencia del pH inicial en la fitotoxicidad, sin embargo, el pH de los medios de cultivo inoculados varió en el tiempo.

De igual forma, Capote *et al.* (2001), informaron sobre las variaciones observadas del pH final

en tres variantes del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) utilizados para la obtención de filtrado del cultivo a partir de un aislado de *A. solani* y utilizaron como control medio de cultivo Richard. Estos autores plantearon que el pH del medio de cultivo cambia en el tiempo debido al metabolismo microbiano por concepto de degradación de compuestos y excreción de metabolitos al medio. Los valores de pH en el medio de cultivo Richard en el presente trabajo coinciden con los descritos por estos autores al emplear este mismo medio de cultivo como control.

Estos resultados demuestran que el tipo de medio de cultivo utilizado tiene una importancia

significativa para la obtención del filtrado del cultivo de *A. solani* y corroboran evidencias experimentales descritas por otros investigadores acerca de la relación entre el crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo y su capacidad de producir metabolitos tóxicos. Así, Moriseau *et al.* (1999) en *Alternaria alternata* observaron una similitud en la dinámica del crecimiento y la producción de toxinas en el medio de cultivo y Sutherland y Pegg (1995) encontraron una correspondencia entre el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* var. *lycopersici* W.C. Snyder y H.N. Hansen y la fitotoxicidad de su filtrado del cultivo sobre protoplastos de tomate.

Para la obtención de filtrados del cultivo de *Alternaria solani* se han empleado varios medios de cultivo tales como: medio de cultivo Richard (Lorenzo *et al.*, 1993; Martínez y Martell, 1994; Capote *et al.*, 2001),

medio de cultivo Fries (Lorenzo *et al.*, 1992; Bernal *et al.*, 2002), medio de cultivo Sachs (Pérez, 2003) y medio de cultivo MS con 50 g l⁻¹ de sacarosa y 1.0 g l⁻¹ de levadura (Capote *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta la variabilidad de esta especie uno u otro medio de cultivo podría ser útil en dependencia del aislado con que se cuente lo cual ha sido corroborado con el estudio realizado por Pérez (2003) el cual evaluó un grupo de aislados de *A. solani* en tres medios de cultivo y no todos los filtrados de cultivo obtenidos a partir de diferentes aislados tuvieron la misma actividad fitotóxica.

Con los resultados mostrados se profundizan los de este autor quien informó que para la utilización de los filtrados fitotóxicos de *A. solani* debe estudiarse la relación entre el medio de cultivo, el genotipo hospedante y el aislado.



Figura 3. Micelio del aislado de *A. solani* CCIBP-VAs₄ en medio de cultivo líquido a) medio de cultivo Fries y b) medio de cultivo Richard.

Tabla 2. Valores de masa seca del micelio y pH del filtrado del cultivo de *A. solani* (CCIBP-VAs₄) en los medios de cultivo Fries y Richard a los 30 días de incubación.

Medios de cultivo	Masa seca del micelio (g)	Rangos medios	pH	Rangos medios
Fries	1.0	2.50 b	3.8	2.50 b
Richard	1.87	6.50 a	6.9	6.50 a

Rangos medios con letras desiguales difieren por la prueba de Mann Whitney para $p < 0.05$.

CONCLUSIONES

Se comprobó que la respuesta de plantas *in vitro* de papa al filtrado de cultivo de *A. solani* aplicado por inmersión de las raíces depende del medio de cultivo en el cual se obtenga el filtrado. De acuerdo con los resultados, el filtrado del cultivo obtenido en medio de cultivo Richard fue más fitotóxico sobre las plantas cultivadas *in vitro* de papa y permitió una mejor diferenciación entre el cultivar susceptible y la especie resistente. Esto se correspondió con que en este medio de cultivo se produjo un mayor crecimiento del hongo.

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
- Capote, A, Rodríguez de la Rosa N, Castañeda RF, Pérez O, Marrero N (2001) Obtención de filtrados crudos de *Alternaria solani* Sorauer y la evaluación de su actividad fitotóxica en cultivares de *Lycopersicon esculentum* Mill. Revista Protección Vegetal 16(1): 44-49
- 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
- Lorenzo, P, Ramos M, Hernández MM (1992) Extracción de la toxina producida por el hongo *Alternaria alternata*. Cultivos Tropicales 13:67-69
- 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
- Morisseau, C, Ward BL, Gichrist DG, Hammock B (1999) Multiple epoxide hydrolases in *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* and their relationship to medium composition and host specific toxin production. Applied and Environmental Microbiology 65 (6): 2388-2395
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473-479
- Pérez, S, Martínez B, Díaz B (1997) Diferenciación de genotipos de tomate por su resistencia frente a *Alternaria solani* Sor. estudio de factores para potenciar sus efectos. Revista Protección Vegetal 12 (2): 103-108
- 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. p7-19
- Sutherland, ML, Pegg GF (1995) Purification of a toxin from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Syd. and Hans race 1. Phys. Mol. Plant Pathol. 46: 243-254
- Townsend, G R, I W Heuberger (1943) Method for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. Plant Diseases Report 27 (17): 340-343
- 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

Recibido: 5-12-2011

Aceptado: 7-2-2012