

Aplicación de la selección *in vitro* en el mejoramiento genético de la papa para la resistencia al Tizón temprano

N. Veitía*, Y. Alvarado-Capó, L.R. García, I. Bermúdez-Carabaloso, M. Leiva-Mora *Autor para correspondencia.

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

RESUMEN

A nivel mundial se han realizado esfuerzos en el mejoramiento genético de la papa por métodos convencionales, no obstante, ha sido difícil obtener genotipos que presenten buena calidad desde el punto de vista comercial y resistencia estable al tizón temprano. La principal razón que limita los progresos en el mejoramiento genético ha sido la escasa resistencia al tizón temprano dentro de las variedades comerciales. Han sido identificadas fuentes de resistencia a esta enfermedad en especies silvestres de papa, pero existen dificultades para el cruzamiento con las variedades comerciales las cuales presentan un genoma poliploide altamente heterocigótico. Las herramientas biotecnológicas tales como el cultivo de tejidos, la mutagénesis y la selección *in vitro* pueden contribuir a reducir estas limitaciones unido a que la papa es una especie que ha sido muy trabajada por los biotecnólogos. El empleo de estas técnicas permitiría ampliar el conocimiento en la interacción planta-patógeno en el patosistema papa- *Alternaria solani*, así como, obtener plantas con resistencia al tizón temprano en un corto periodo de tiempo. En esta revisión, se describe el estado de la aplicación de la biotecnología en relación con el empleo de los filtrados del cultivo de *Alternaria solani* en la selección de plantas de papa con resistencia o tolerancia al tizón temprano y cómo se puede emplear esta herramientas para mejorar la resistencia a dicha enfermedad.

Palabras clave: *Alternaria solani*, filtrado del cultivo, evaluación en campo, *Solanum tuberosum* L.

ABSTRACT

Globally efforts have been made in the genetic improvement of potato by conventional methods, however, obtaining genotypes with good commercial quality and stable resistance to early blight has been difficult. Little resistance to early blight in commercial varieties has been the main reason that limits progress in genetic improvement. Sources of resistance to this disease have been identified in wild potato, but there are difficulties in the crossing with commercial varieties which have a high heterozygous polyploidy genome. Biotechnology tools, such as tissue culture, mutagenesis and *in vitro* selection, contribute to reduce these limitations. Besides, the fact that potato is a species which has been widely investigated by biotechnologists. The use of these techniques would enlarge the knowledge in plant-pathogen interaction in pathosystem potato-*Alternaria solani*. Also to obtain plants with resistance to early blight in a short period of time. The status of biotechnology application, in relation to the use of *Alternaria solani* culture filtrate in the selection of potato plants tolerant or resistant to early blight and how can be used as tools to improve this resistance to the disease, is described in this review.

Key words: *Alternaria solani*, culture filtrate, field evaluation, *Solanum tuberosum* L.

Contenido

INTRODUCCIÓN

Introducción, desarrollo e importancia de la papa

TIZÓN TEMPRANO

Síntomas

Agente causal

Epifitiología

Control

Control químico

Variedades resistentes

Variabilidad fisio-patogénica de *A. solani*

EMPLEO DEL CULTIVO *IN VITRO* PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE LA PAPA EN LA BÚSQUEDA DE RESISTENCIA A PATÓGENOS FÚNGICOS

Empleo de la mutagénesis

Métodos de evaluación de la respuesta de genotipos de papa al tizón temprano

Ensayos en casa de cultivo y campo

Ensayos *in vitro*

Selección *in vitro*

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el cuarto cultivo más importante en el mundo. Es un cultivo que requiere grandes insumos para lograr altos rendimientos. Además, durante la cosecha y el almacenamiento deben cumplirse complejos requisitos de calidad (Jansky, 2006). Sin embargo, las enfermedades fúngicas son un factor importante que conspira contra los altos rendimientos. Dentro de estas se encuentran los tizones tardío y temprano causados por los hongos *Phytophthora infestans* Mont. de Bary y *Alternaria solani* Sor. Esta última es la que más afecta el cultivo en Cuba, ya que el cultivo se desarrolla bajo condiciones de riego lo que favorece la producción y diseminación de las esporas del hongo patógeno (Castellanos, 2000).

A nivel mundial, la aplicación de fungicidas es el principal método para el control del tizón temprano

de la papa que utilizan los productores, lo cual encarece los costos de producción (Gent y Schwartz, 2003). Sin embargo, existen limitaciones para obtener nuevas variedades que muestren resistencia a dicha enfermedad y que cumplan los requisitos establecidos para su comercialización. Es por ello que se considera que la biotecnología, integrada a los esquemas clásicos de mejoramiento genético, permitirá obtener en menor tiempo nuevas variedades con resistencia o tolerancia a esta enfermedad (Estévez, 2005). En esta revisión, se presentan y se discute el avance en la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos combinada con la mutagénesis y la selección *in vitro* con el filtrado del cultivo de *Alternaria solani*, así como, métodos de evaluación de la respuesta de genotipos de papa frente al tizón temprano.

Introducción, desarrollo e importancia de la papa

La papa (*Solanum tuberosum* L.) pertenece a la clase *Angiospermae*, subclase *Dycotyledoneae*, orden *Tubiflorae*, familia *Solanaceae*, género *Solanum* y especie *tuberosum* (Hawkes, 1978).

Los primeros datos acerca de la introducción de la papa en Cuba aparecen en una comunicación presentada el 7 de febrero de 1778 al Real Consulado Español a través de la Junta de Fomento de la Isla de Cuba. El contenido exponía la imposibilidad de obtener semillas de la misma calidad que las que se importaban de Canadá, Estados Unidos e Islas Canarias, así como la inexistencia de un modo adecuado de conservar los tubérculos producidos en el país (Estévez, 2005).

La gran importancia económica de la papa se basa en su elevada capacidad de producción de sustancias alimenticias por unidad de superficie que es tres veces mayor que la de los cereales. Además, posee múltiples posibilidades de consumo, como alimento directo para el hombre y el ganado o como materia prima en la industria (López *et al.*, 1995). Por su variada utilización se cultiva en todas partes del mundo (Estévez y González, 2005).

La mayor parte de la semilla de papa que se utiliza en el país es importada desde Canadá y Europa, y el resto se obtiene nacionalmente. Toda la semilla utilizada es certificada sea nacional o importada. En el sector productivo se emplean 33 variedades comerciales foráneas mayormente holandesas y se trabaja en el desarrollo de variedades cubanas (Estévez, 2005).

En el país, la papa se produce prácticamente al nivel del mar, en áreas llanas y en una sola época del año de noviembre a abril, llamada 'de frío'. Durante este período las temperaturas son bajas, con poca ocurrencia de lluvias y alta humedad

relativa. Debido a estas condiciones climáticas el cultivo se desarrolla bajo riego por aspersión durante su ciclo productivo (ALAP, 2000). Todo ello favorece la aparición de enfermedades fúngicas, principalmente las que inciden en el follaje de la planta, que reducen el área fotosintética y en casos extremos puede conducir a la defoliación de la planta (Rotem, 1994; van der Waals *et al.*, 2001; Peralta *et al.*, 2005). Entre estas el tizón temprano se considera la más importante desde el punto de vista económico en Cuba (Piña, 1980; Castellanos, 2000).

TIZÓN TEMPRANO

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. Las pérdidas se estiman entre 10 a 50% de los rendimientos (Martin y Thurston, 1989).

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).

Síntomas

La enfermedad puede ocasionar síntomas en las hojas, tallos y tubérculos (Torres, 2002). Los primeros síntomas se manifiestan en las hojas más viejas de la planta. Posteriormente se produce infección secundaria y finalmente la fase de tizón (López *et al.*, 1995).

En las hojas se desarrollan pequeñas lesiones circulares de 1.0-2.0 mm de diámetro. En la medida que se expanden estas lesiones se vuelven ovoides a circulares de color pardo oscuro y presentan anillos concéntricos. Cuando las manchas son numerosas se van uniendo y comienza la fase de tizón. Los tallos afectados muestran lesiones necróticas de 0.5 a 1.5 cm de diámetro observables con mayor claridad en los cultivares susceptibles, en los tubérculos se producen lesiones de forma circular o irregulares, a menudo con un borde levantado de color purpúreo o bronceado (Torres, 2002).

La infección se origina desde los primeros estadios de la planta aunque los síntomas aparecen en las hojas más viejas, a partir de los 28 días de plantados los tubérculos. La infección secundaria se produce alrededor de los 55 días de las plantas y la fase de tizón, en condiciones adecuadas de cultivo, después de los 60 días (López *et al.*, 1995).

Agente causal

El microorganismo causante del tizón temprano fue descrito, por primera vez, por Ellis y Martín en 1882 en hojas muertas colectadas en campos de papa de New Jersey, aunque éstos lo nombraron *Macrosporium solani*. Fue Sorauer en 1896 el primero en nombrarlo como *Alternaria solani*. En la actualidad se denomina *Alternaria solani* Sor. (Pérez, 2003).

A. solani se ubica taxonómicamente dentro de los hongos imperfectos (*Fungi imperfecti*) en la clase *Hyphomycetes* y orden *Hyphales* (Agrios, 2005).

Dentro del género *Alternaria*, las especies se definen por las características de los conidios y se han descrito más de 100 (Thoma, 2003). Según Pérez (2003), el criterio de Ellis es el más utilizado para identificar las especies del género, el cual basa su descripción en especímenes aislados de sustratos naturales y los identifica según la especie hospedante, las dimensiones de los conidios y conidióforos, ornamentación, color de las paredes y las características de las colonias.

Debido a la gran diversidad de especies de *Alternaria*, una división en grupos subgéneros ha sido propuesta ocasionalmente; no obstante, hasta la fecha no existe una clasificación general de *Alternaria* (Thoma, 2003). Este autor, refirió la clasificación realizada por Neegaard en 1945, el cual basado en la formación de cadenas de conidios definió tres secciones dentro del género: *Longicatenateae* (largas cadenas de diez o más conidios), *Brevicatenateae* (cadenas cortas de tres a cinco esporas) y *Noncatenateae* (conidios independientes o raramente en cadenas de dos). La especie *A. solani* se ubica en esta última sección (Pérez, 2003). Los conidióforos de *Alternaria* se caracterizan por poseer uno o más septos transversales con apariencia geniculada (Ellis, 1971). Los conidios son de color marrón pálido a marrón oscuro, ovalados u obclavatos, con o sin cuello, poseen un annulus y son multicelulares con septos transversales, longitudinales y algunas veces oblicuos (Ellis, 1971; Thoma, 2003).

Las especies de *Alternaria* poseen dos rasgos importantes, la presencia de melanina, especialmente en los conidios y la producción de toxinas hospedero específicas en algunos casos de especies fitopatógenas como *Alternaria alternata* (Thoma, 2003). *A. solani* produce toxinas hospedero no específicas (Chaerani y Voorrips, 2006).

Aunque, *A. solani* es un hongo de reproducción asexual, se ha descrito variabilidad morfológica, fisiológica, patogénica y genética entre aislados (Pérez *et al.*, 2004; van der Waals *et al.*, 2004).

Epifitología

La enfermedad está extendida en el mundo fundamentalmente en áreas donde se cultive la papa y el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), pero prevalece especialmente en los trópicos y las zonas templadas (van der Waals *et al.*, 2003).

En Cuba, apareció por primera vez en campos cultivados de tomate en la zona de Güira de Melena en 1915; sin embargo, Bruner en 1920 la refirió oficialmente en las primeras publicaciones de la Estación Experimental de Santiago de las Vegas (Pérez y García, 2005). A partir de ese momento se ha considerado como endémica por aparecer cada año en los cultivos de la papa y el tomate en el país (Mayea y Hernández, 1983).

Piña (1980) respecto a las pérdidas que causa la enfermedad en el cultivo de la papa, en la variedad susceptible 'Red Pontiac', determinó que la nocividad del tizón temprano varió desde 4 a 38%, en dependencia del grado de protección fitosanitaria, mientras que Arzuaga (1982), estimó pérdidas entre 17 y 37% en tres años de evaluación. Por su parte, Castellanos (2000), obtuvo valores máximos de nocividad entre 37 y 43%, los cuales aumentaron en la medida que la enfermedad se estableció más tempranamente en las variedades 'Diamont', 'Spunta' y 'Cardinal'. Las pérdidas de cosecha se estimaron entre 7.5 y 8.1 t.ha⁻¹. Además, destacó la peligrosidad del tizón temprano en las condiciones de producción y no sólo para cultivares susceptibles, sino también en cultivares catalogados como poco susceptibles.

A. solani puede persistir en el suelo de una cosecha a la otra. Se plantea que la enfermedad presenta tres fuentes de inóculo principales: clamidósporas en el suelo, tubérculos semillas contaminados y las solanáceas silvestres que crecen todo el año en colindancia con los campos de cultivo (Pérez y García, 2005). Castellanos (2000) identificó las especies *Solanum melongena* L., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Solanum nigrum* L., *Solanum campechiensis* L. y *Lycopersicon pimpinellifolium* Dunal como hospedantes de *A. solani*.

La enfermedad presenta una alta incidencia cuando el clima es seco durante el día y húmedo por la noche. López *et al.* (1995) determinaron seis temperaturas óptimas para diferentes fases del ciclo de vida de *Alternaria solani*, estas fueron: 28°C para el crecimiento, formación de hifas, germinación de los conidios y el crecimiento del tubo germinativo; 22°C para la diferenciación de los conidióforos, conidios y apresorios; 20°C para la penetración en las hojas; 15°C para la penetración en los tejidos de los tubérculos; 16°C para el crecimiento de las lesiones en las hojas y 25°C para el crecimiento de las lesiones en los tubérculos.

Las condiciones climáticas de Cuba favorecen el desarrollo de la enfermedad en el follaje de las plantas y no en los tubérculos. Según Gómez *et al.* (1999) en plantaciones con más de 30 días de germinados los tubérculos, si durante dos días consecutivos se presentan valores de humedad relativa medios mayores o iguales al 84% o valores de humedad relativa mínimos superiores o iguales al 60%, temperaturas mínimas mayores o iguales a 18°C y precipitaciones mayores o iguales a 0.5 mm deben aparecer los primeros síntomas de la enfermedad. Si estas condiciones prevalecen en plantaciones de 50 días, con un porcentaje de intensidad de la enfermedad entre un 5-10% debe esperarse un desarrollo epifitológico acelerado.

Control

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).

Para 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. Mientras que las preventivas después de la plantación contemplan el manejo fitotécnico y fitosanitario, que incluye la señalización y el pronóstico. Las medidas curativas se concentran en el uso y manejo de fungicidas.

Los métodos biológicos para el control del tizón temprano son muy escasos (Pérez, 2003). En Cuba se emplean biopreparados a base de *Trichoderma* spp. contra muchos microorganismos patógenos. Castellanos (2000) informó que aplicaciones de *Trichoderma harzianum* no fueron eficaces para el control de este patógeno en plantaciones.

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).

Control químico

Para el control químico del tizón temprano se utilizan fungicidas de contacto y sistémicos. Dentro de los de contacto, se encuentran los fungicidas cúpricos como el oxiclورو de cobre y el óxido cuproso. Los compuestos por sales derivadas del estaño también

tienen buen efecto sobre el tizón temprano entre ellos se encuentran el hidróxido de trifenil estaño y el maneb +acetato de trifenil estaño (Piña, 1980). Su uso en el cultivo de la papa se autoriza hasta 30 días antes de la cosecha. Son inhibidores de la germinación de conidios y la esporulación sobre las hojas. En los últimos años su utilización se ha reducido en Cuba (Pérez y García, 2005).

Dentro de los fungicidas sistémicos empleados para el control del tizón temprano durante el desarrollo del cultivo de la papa se encuentran dos grupos los triazoles e imidazoles. Estos compuestos son inhibidores de la biosíntesis de ergosterol del tipo I en los hongos. Dentro del grupo de los triazoles se encuentran el tebuconazol (Folicur 25 CE), el tebuconazol+triacimenol (Silvacur combi 30) y el bromuconazol (Vectra) (Pérez y García, 2005). De los imidazoles se emplea el procloraz (Mirage 45 CE) que es un inhibidor de la biosíntesis del ergosterol tipo II en los hongos.

Además, han sido desarrollados un grupo de fungicidas pertenecientes a una familia análoga a la molécula natural estrobilurina, que es un metabolito secundario del hongo *Strobilurus tanacellus*. Son fungicidas de amplio espectro de acción con efectividad contra oomicetos, basidiomicetos, deuteromicetos y ascomicetos y pueden ser sistémicos o de contacto. El azoxystrobin (Amistar 25 CS) se ha demostrado su efectividad en el control del tizón temprano en papa (Castellanos, 2000).

A pesar de la efectividad de los tratamientos químicos, existe una tendencia a nivel mundial a reducir su uso. Dentro de las causas que sustentan este interés se encuentran: los altos costos de producción (el control del tizón temprano excede el 10% del costo de producción) (Cassells y Kowalski, 1998); la resistencia del hongo a los fungicidas sistémicos, la detección de niveles de residuos en tubérculos de papa por encima del límite máximo de residuos permitidos (Hernández *et al.*, 1998) y unido a esto, los daños al ambiente. Es por ello, que se debe profundizar en la búsqueda de alternativas para reducir el número de aplicaciones de fungicidas en el cultivo de la papa, donde la resistencia varietal puede jugar un papel importante, alternativa esta que ha demostrado ser suficientemente económica en muchos cultivos (Jaramillo, 2003).

Variedades resistentes

Es conocido que la resistencia de las variedades de papa al tizón temprano está relacionada con el ciclo vegetativo más largo de cultivo (maduración), ya que son más susceptibles las plantas de maduración temprana que las de maduración tardía. Además, las hojas viejas son más susceptibles que las jóvenes, por lo que se dificulta la discriminación entre variedades

susceptibles y resistentes en los programas de mejoramiento genético (Rodríguez *et al.*, 2007).

Boiteux *et al.* (1995), al evaluar 934 genotipos de papa, la mayoría presentaron una correlación entre la respuesta al tizón temprano y la maduración. Sin embargo, cuatro genotipos fueron la excepción. Tres de estos presentaron maduración media y resistencia al tizón temprano y uno de maduración temprana y medianamente resistente al tizón temprano.

En Cuba, Arzuaga (1982) evaluó 84 cultivares de papa durante tres generaciones en condiciones de campo, los cuales mostraron diferencias en la severidad de ataque del patógeno. Este autor, clasificó las variedades en cuatro grupos: dos de ellos, donde la enfermedad se desarrolla violentamente y de forma tardía como en 'Chieftan', temprana como en 'Red Pontiac' y 'Arka' y otros dos, donde la enfermedad se desarrolla tardía y lentamente como en 'Baraka', temprana y lentamente como en 'Cardinal' y 'Desirée'.

Como parte del programa de mejoramiento genético por cruzamiento, que se desarrolla en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Cuba, se han obtenido 11 variedades las cuales poseen rendimientos potenciales por encima de 40 t.ha⁻¹, resistencia al tizón temprano y buen comportamiento en campo frente al tizón tardío. Además, han presentado calidad para el consumo fresco y para la industria (Estévez *et al.*, 2005).

La obtención de variedades con resistencia al tizón temprano de la papa y con desarrollo aceptable ha sido difícil. Esto se ha relacionado con la limitada resistencia a la enfermedad en las variedades comerciales así como las dificultades para la introducción de los genes de resistencia debido a su genoma altamente heterocigótico poliploide. Además, desde el punto de vista económico existen limitaciones ya que las nuevas variedades para su inclusión en el mercado deben presentar un gran número de características como: brotes fuertes, crecimiento temprano, apropiada maduración y altos rendimientos. Los tubérculos de estas variedades deben poseer las siguientes características: alto rendimiento, regularidad en la forma y tamaño, resistencia a los daños mecánicos, dormancia apropiada, escaso crecimiento secundario, resistencia a las enfermedades y buenas características para el almacenamiento. Otras cualidades de los tubérculos son consideradas como el color de la pulpa, la textura, contenido de azúcar y ennegrecimiento después de cocinado (Cassells y Kowalski, 1998).

Al uso de variedades resistentes como medida de control, se le ha ofrecido un mayor apoyo en los programas de mejoramiento genético (Lawrence

et al., 2000; Foolad *et al.*, 2000). La evaluación de la resistencia frente al tizón temprano mediante la selección de genotipos promisorios, constituye una prioridad para lograr programas de mejoramiento genético eficientes (Christ y Haynes, 2001).

Variabilidad fisio-patogénica de *A. solani*

El género *Alternaria* en medio de cultivo crece rápidamente y produce un micelio denso, coposo, de color verde aceituna o pardo, tabicado, con colonias efusas, grises negruzcas o pardas (Mayea y Padrón, 1983). Sin embargo, el mayor problema se presenta en la esporulación en medios de cultivo artificiales. Esta limitante dificulta los estudios donde se requiera la aplicación de inóculo artificial en distintos genotipos hospedantes.

En la literatura científica se han descrito varios métodos para lograr la esporulación *in vitro* (Izquierdo, 1979; Liu y Wu, 1996; Rivas, 2001), no obstante, no todos los aislados responden de igual forma a estos (Pérez, 2003). Izquierdo (1979) planteó que la presencia de diferentes aislados dentro de una especie, también puede ser considerado un factor en la inducción de la esporulación.

Según Izquierdo (1979), el rango de temperatura óptimo para el crecimiento micelial de *A. solani* se encuentra entre 20 y 28°C y para la esporulación, por debajo de 20°C. Además, como temperaturas límites para el crecimiento *in vitro* se consideran entre 1 y 2°C como mínimo, y de 35 a 45°C como máximo.

Para el patógeno *A. solani* se han descrito valores de pH relativamente amplios desde tres hasta nueve. Izquierdo (1979) encontró que al evaluar 12 aislados de *A. solani* el rango de pH para el crecimiento micelial fue de tres a nueve. En la esporulación los valores de pH óptimos oscilaron entre 4.0 y 6.2, mientras que la geminación se correspondió con valores entre tres y seis.

Para determinar la especie de un aislado dentro del género *Alternaria* las dimensiones y las características de las esporas constituyen los indicadores fundamentales. Sin embargo, cuando se considera la variabilidad dentro de la especie *A. solani*, el color, la textura, el crecimiento, la capacidad de difundir pigmentos al sustrato y el color de este son los indicadores de mayor relevancia y en los cuales se ha descrito que existe variabilidad entre los aislados (Pérez, 2003).

En la literatura científica se refiere que el color y los tonos de las colonias son las características que más variabilidad han mostrado en *A. solani* (Pérez, 2003). Ellis (1971) describió las colonias de color carmelita grisáceo a negro; Mayea y Padrón (1983),

describieron las colonias de *A. solani* de color verde aceituna o pardo.

Diferencias en la apariencia del micelio en las colonias han sido informadas. Es por ello que con frecuencia se han observado diversos tipos de texturas combinadas en una misma colonia (Izquierdo, 1981; Pérez, 2003).

La difusión de pigmentos de diferentes colores al sustrato en *A. solani* ha sido descrito por varios autores. Se han encontrado aislados que pigmentan el sustrato de color rojo, amarillo, ámbar, naranja-lúteo, etc. (Izquierdo, 1981; Pérez, 2003).

La variabilidad patogénica entre aislados de *A. solani* ha sido analizada a través de la evaluación de variable epifitológicas como la duración del período de incubación, y el número de generaciones del patógeno, el número y tamaño de las manchas sobre los hospederos (Martínez *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2004) y con la aplicación de marcadores genéticos, tales como amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos de ácido desoxirribonucleico (RADP) y el polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) (Varona *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2004).

Basado en los grupos de compatibilidad vegetativa ha sido detectada una alta variabilidad genética entre aislados de *Alternaria solani* originarios de Turquía, Grecia, China, Rusia, Brasil, Cuba, Estados Unidos y África del Sur (van der Waals, 2004) y por la determinación del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción amplificados (AFLP) (Pérez *et al.*, 2004). En ambos estudios, entre aislados del mismo país no se pudieron establecer grupos en base al origen geográfico. Sin embargo, Pérez *et al.* (2004), encontraron diferencias genéticas entre aislados de tomate con los de papa, sugiriendo cierta especialización del patógeno por el hospedero.

EMPLEO DEL CULTIVO *IN VITRO* PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE LA PAPA EN LA BÚSQUEDA DE RESISTENCIA A PATÓGENOS FÚNGICOS

El mejoramiento genético de la papa ha sido abordado por numerosas instituciones en la mayoría de los países productores, con el objetivo de obtener variedades que posean altos rendimientos, calidad y resistencia a enfermedades. En Cuba, se realiza por dos vías: introducción (reproducción asexual) y por hibridación (reproducción sexual). La primera consiste en la introducción al país de genotipos o clones de diversa procedencia, que se han obtenidos en otras condiciones ambientales. Estos son seleccionados en las condiciones climáticas del país de acuerdo con los indicadores mencionados. De esta forma se puede aumentar el germoplasma existente y muchas de estas variedades pueden ser

incorporadas a la producción después de un proceso de evaluación durante cinco años. Otras son seleccionadas como progenitores para la realización de cruzamientos (López *et al.*, 1995).

El genoma altamente heterocigótico que presentan las variedades comerciales de papa dificulta el cruzamiento genético. Es por ello, que se hace necesario manejar poblaciones grandes ya que según refirió Howard en 1970, las posibilidades de que una plántula se convierta en una variedad útil son de 1: 10 000 (Estévez *et al.*, 2005).

Para la obtención de híbridos se presentan algunas dificultades. Primero: que las variedades quizás no florezcan o el polen sea estéril. En segundo lugar: la selección en el primer año puede ser ineficiente debido al método diferente de propagación y al tamaño de las plantas. Tercero: el material vegetal no puede almacenarse fácilmente y los clones deben ser cultivados anualmente en condiciones específicas de temperatura (Ritter, 2000).

En Cuba, muchas variedades de papa producen poca o ninguna floración; sin embargo, las variedades silvestres, la papa diploide cultivada y los clones andinos florecen profusamente. En algunas variedades se forma la inflorescencia, pero después de un corto período de tiempo, las yemas florales detienen su crecimiento y se desprenden. Existen algunos métodos para inducir floración como el injerto de esquejes en patrones de tomate y cultivos sobre ladrillo (Caligari, 1992), la utilización de reguladores del crecimiento y el método de decapitación. Este último ha resultado satisfactorio y consiste en utilizar tallos cortados de plantas de campo con flores, colocarlos en recipientes con agua y en estas condiciones realizar la emasculación y polinización (Estévez *et al.*, 2005).

Entre las especies silvestres y cultivadas de papa existen barreras de cruzamiento estas incluyen incompatibilidad entre el polen y el pistilo; barreras estilares que impiden la fertilización por detener o crecer muy lentamente el tubo polínico, esterilidad masculina genética citoplasmática y barreras del endospermo que impiden que ocurra el normal desarrollo de la semilla (Jansky, 2006).

El mejoramiento genético clásico en el cultivo de la papa para incrementar resistencia, 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, modernas técnicas y métodos de la biotecnología como el cultivo de tejidos, 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).

A través del cultivo de tejidos se han obtenido plantas de papa libres de patógenos, se ha logrado la multiplicación acelerada de plantas procedentes de esquemas de mejoramiento genético clásico, plantas transgénicas, y ha permitido el manejo y conservación de germoplasma (Ritter, 2000). Además, el cultivo de embriones y óvulos, la polinización y fertilización *in vitro* y la hibridación somática, han sido técnicas de cultivo de tejidos que se han utilizado para superar las barreras del mejoramiento genético convencional (Jansky, 2006).

La transformación genética de papa se ha desarrollado utilizando métodos directos (Romano *et al.*, 2001) e indirectos (Banerjee *et al.*, 2006). La transformación mediada por *Agrobacterium* es una de las más utilizadas para la introducción de genes foráneos en diferentes cultivares de papa (Banerjee *et al.*, 2006). Sin embargo, no todas las especies de este género pueden ser transformadas eficientemente por dicho método (Trujillo *et al.*, 2001).

La existencia de variación somaclonal en papa está ampliamente documentada (Cassells y Kowalski, 1998). Se conoce que es genotipo dependiente y característica de plantas regeneradas de tejido polisomático. Además, existen otros factores como los reguladores del crecimiento empleados en los medios de cultivo y su concentración, así como el número de subcultivos antes de la regeneración.

En el análisis de las variaciones provocadas por el cultivo *in vitro* ha quedado claro que en su gran mayoría corresponden con las mismas mutaciones que se producen espontáneamente o de forma artificial. También los resultados muestran que los mutantes predominantes son poliploides y aneuploides y las mutaciones genéticas o puntuales son las menos frecuentes. En el caso de los mutantes 'noveles', lo cual es una ventaja en la variabilidad somaclonal, no es la base fundamental para el empleo de esta técnica para el mejoramiento, pues la ingeniería genética es la que tiene todas las posibilidades para de forma dirigida obtener genotipos 'noveles' (García, 2000).

En la literatura científica sobre el cultivo de la papa se ha informado de la variabilidad en caracteres en los tubérculos, flores y hojas en plantas de papa regeneradas de diferentes tipos de tejidos (Rietveld *et al.*, 1991; Urrea *et al.*, 2000).

Empleo de la mutagénesis

La eficiencia del mejoramiento por mutagénesis en cultivos propagados vegetativamente aumenta considerablemente con el uso del cultivo *in vitro* (Maluszynsky *et al.*, 1995). Desde el punto de vista

práctico tiene dos grandes ventajas. Primero, los materiales vegetales a tratar con el agente mutagénico, ya sean ápices, meristemas, yemas axilares, adventicias, callos, suspensiones celulares organogénicas o embriogénicas son considerablemente más pequeños en comparación con cualquier órgano vegetativo *ex vitro*. Es por ello, que el tratamiento es más uniforme y permite manejar un mayor número de estos en un espacio reducido. En segundo lugar, se reducen los costos de los tratamientos mutagénicos físicos y químicos (Pérez, 1998).

A pesar de las ventajas que presenta la mutagénesis *in vitro* en el mejoramiento genético también existen dos limitaciones fundamentales. Una de ellas es que solo pueden ser mutados genes que existan en las plantas, ya que la mutación cambiará el estado alélico de los genes que existan. Esta limitación es relativa ya que en las plantas se estima que existan más de 100 000 genes, los cuales son susceptibles de cambiar. La otra limitación es que las mutaciones son al azar, por tanto todos los genes de la planta están expuestos a la mutación (García, 2000).

Según Alhoowalia (2001), en las plantas propagadas vegetativamente cuando son irradiadas necesitan varios ciclos de propagación para eliminar las quimeras y obtener el mutante. Sin embargo, *in vitro* si al material vegetal irradiado, se le realizan tres subcultivos se pueden eliminar las quimeras sin la pérdida de ningún genotipo y en condiciones controladas. En muchas plantas, tales como la papa y el banano (*Musa spp.*), este período se puede reducir de cinco años de propagación en el campo a menos de nueve meses en el laboratorio.

Por otro lado, Pérez (1998) planteó que cuando se emplea el cultivo *in vitro* se recomienda que los tratamientos mutagénicos reduzcan de un 40-60% el peso de los materiales vegetales tratados. En estudios de radiosensibilidad en papa variedad 'Desirée' se encontró una respuesta más sensible en las yemas axilares que siguen al ápice, las cuales presentaron los mayores porcentajes de mortalidad y los más bajos valores de enraizamiento y brotación. Por el contrario, la yema apical y la más distante del ápice mostraron ser las más resistentes al tratamiento mutagénico (Sonino *et al.*, 1986).

En general según Ahloowalia (1998), las células y tejidos de las plantas *in vitro*, requieren menores dosis de radiaciones para inducir mutaciones que en las semillas debido a que al aumentar la intensidad de multiplicación celular, la efectividad de los tratamientos se hace mayor a dosis más bajas. Este mismo autor (Ahloowalia, 2001) planteó que existe un limitado número de investigaciones que sugieren que el cultivo de callos es mucho más sensible a los tratamientos con radiaciones y se requieren dosis

mucho más bajas (2-5 Gy), que los esquejes y las semillas. Además, señaló, que existen laboratorios en tres países: India, Pakistán y Egipto que obtuvieron la dosis de 20 Gy como óptima para la irradiación de plantas micropropagadas de papa tetraploide. Sin embargo, en Holanda sugirieron dosis de 6-8 Gy, con rayos X, como óptimas para tratar material monoploide.

Diferentes tipos de explantes, como callos formados a partir de discos de tubérculos y de hojas, anteras, pecíolos, raquis, discos de hojas y yemas, han sido irradiados teniendo en cuenta la capacidad de regeneración de brotes que presenta la papa (Urrea, 2000).

Métodos de evaluación de la respuesta de genotipos de papa al tizón temprano

En la interacción tomate - *Alternaria solani* Sor. varios métodos se han utilizado para evaluar la resistencia de diferentes genotipos, tales como: pruebas en casa de cultivo y campo en plantas completas, en hojas sueltas o en folíolos, con inoculación artificial del patógeno o en condiciones naturales (Chaerani y Voorrips, 2006). En el caso de la papa también se han empleado estos métodos sobre discos de hojas, plantas cultivadas *in vitro*, plantas crecidas a partir de semilla verdadera y plantas de tubérculos (Bussey, 1991; Steward y Bradshaw, 1993).

Ensayos en casa de cultivo y campo

Comúnmente el método más utilizado para evaluar la resistencia al tizón temprano en papa y tomate ha sido la infección natural en condiciones de campo, sin embargo, la incidencia de la enfermedad depende de las condiciones climáticas (González *et al.*, 2003). Además, los ensayos realizados en condiciones de campo cuentan con varias desventajas, entre las más importantes se destacan: proceso lento, se requieren labores intensivas para el mantenimiento de la plantación, pueden interferir en las evaluaciones importantes plagas, no son útiles para la evaluación de plantas individuales en experimentos a gran escala, además de ser muy sensibles a las condiciones ambientales que se presenten durante el ciclo del cultivo o durante el período evaluativo (Chaerani, 2006).

El uso de la inoculación artificial ya sea a través de la aspersión del inóculo o mediante la creación de un fondo de provocación (surcos de plantas susceptibles diseminadoras de inóculo), son requeridas para reforzar el inóculo natural y la posibilidad de que la enfermedad pueda diseminarse en una región determinada y de esta forma obtener una presión de inóculo adecuada y uniforme (Chaerani, 2006).

Los ensayos en casas de cultivo se pueden realizar en condiciones de ambientes controlados o semicontrolados con plantas que poseen una mayor

uniformidad en su desarrollo, en condiciones más favorables, por ello las condiciones experimentales son reproducibles. Por otra parte, se pueden realizar varios ciclos de evaluación con resultados más confiables y datos precisos desde el punto de vista estadístico. Los resultados de campo y casa de cultivo comparten cierta correspondencia (Banerjee *et al.*, 1998; Foolad *et al.*, 2000).

Vloutoglou (1999) ha planteado, en el caso del tomate, que en condiciones controladas se pueden realizar evaluaciones de plantas jóvenes para hacer selecciones tempranas de la resistencia en genotipos de interés, en un amplio rango de colecciones. El tizón temprano usualmente se evalúa a los siete días de realizada la inoculación artificial en condiciones controladas y para ello, se calcula el porcentaje del área necrosada en las hojas inoculadas. Por el contrario si existiera una baja incidencia de manchas necróticas durante la evaluación, entonces se acostumbra evaluar el número de lesiones necróticas, puesto que de esta manera se puede determinar con mayor exactitud la severidad de la enfermedad. Generalmente en estas condiciones las plántulas (cuatro a seis semanas de cultivo), son asperjadas con suspensiones tanto miceliales como conidiales del patógeno (Banerjee *et al.*, 1998; Foolad *et al.*, 2000). Otras metodologías infringen daños a la superficie de las hojas previo a la inoculación. Las plantas son incubadas 24 horas en 100% de humedad relativa, seguida de intervalos 12- 16 horas con 100% de humedad relativa en el período nocturno durante 5-7 días en cámaras húmedas construidas al efecto, las cuales imitan el período natural de rocío nocturno (Vloutoglou y Kalogerakis, 2000).

Rodríguez *et al.* (2006), utilizando suspensiones conidiales desarrollaron un método para evaluar los componentes de la resistencia en papa frente al tizón temprano en condiciones de casa de cultivo. Estos autores evaluaron el índice de infección expresado en porcentaje del área afectada, así como emplearon diferentes variables epifitológicas (período de incubación, tiempo de evolución de los síntomas, tiempo de desarrollo de la enfermedad, período de generación de estructuras asexuales o conidios, número y tamaño de las lesiones necróticas, para caracterizar los fenotipos de la resistencia en otros genotipos promisorios de papa, lo cual valida y apoya la importancia que reviste el desarrollo de metodologías de evaluación temprana.

Ensayos in vitro

El método más apropiado para determinar la expresión diferencial en cuanto a la resistencia de las células a un patógeno es comparar la respuesta *in vitro* de variedades resistentes y susceptibles a dicho patógeno (García, 2000).

Según Pérez (1998), los métodos *in vitro* deben satisfacer dos criterios para ser realmente útiles dentro de cualquier esquema de mejoramiento. Como primer criterio, es que se deben producir plantas que puedan competir ventajosamente con plantas producidas por métodos convencionales. Como segundo, que el empleo de estas no entorpezcan la rutina usual de los métodos de selección y evaluación, y a la vez requieran un mínimo de equipos y recursos humanos.

Se han realizado estudios mediante el cultivo *in vitro* donde se emplean las toxinas o filtrados del cultivo de hongos patógenos para seleccionar células resistentes, aunque estos métodos no aseguran que las plantas regeneradas de los callos resistentes, puedan ser también resistentes al patógeno.

Probablemente el método más común, para el desarrollo de sistemas de selección para buscar resistencia a enfermedades fúngicas con el empleo de técnicas de cultivo de tejidos ha sido, el empleo de la toxina del hongo patógeno como agente selectivo. Es ampliamente conocido que los hongos patógenos producen toxinas durante los procesos de infección. Un gran número de metabolitos tóxicos han sido estudiados, así como su rol en la patogénesis en las plantas. Sin embargo, no todas las toxinas producidas por los hongos patógenos están bien caracterizadas y para algunos solo el filtrado del cultivo ha sido aplicado en los procesos de selección (Švábová y Lebeda, 2005).

De forma general, en la selección *in vitro* se han empleado como agentes selectivo el hongo patógeno, filtrados del cultivo de estos, extractos crudos, toxinas y componentes de la pared celular de los hongos (elicitors de la respuesta de resistencia). El empleo del hongo patógeno en sí mismo es el acercamiento más directo entre el agente causal de la enfermedad y el tejido de la planta *in vitro*. En la práctica los fitopatólogos raramente utilizan este tipo de inóculo, quizás porque puede ser dudoso el éxito en tales esquemas de selección (Kosky, 1998). Al respecto, García (2000) informó que para que las selecciones sean exitosas a nivel de células aisladas, cada célula debe ser expuesta al agente selectivo. Con este método al crecer el patógeno aumenta el proceso de infección, sin embargo no todas las células en el cultivo reciben uniformemente la infección.

Selección *in vitro*

La selección *in vitro* se ha incrementado por el 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. El empleo de filtrados del cultivo y toxinas de hongos e incluso cultivos duales para este proceso son prometedores (Pérez, 1998; Cassells y Kowalski, 1998).

Numerosos autores han realizado estudios *in vitro* y han encontrado diferencias entre variedades resistentes y susceptibles a determinadas enfermedades en condiciones *in vitro* en cultivos como: papa (*Solanum tuberosum* L.) (Hernández *et al.*, 1991; Lorenzo *et al.*, 1992; Martínez y Mantell, 1994), caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) (Kosky, 1996), tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) (Capote *et al.*, 2001; 2002) y otros no muestran diferencias entre variedades a nivel *in vitro* (Harelimana *et al.*, 1997). Esto está muy relacionado con el tipo de tejidos y las dosis óptimas del agente selectivo seleccionadas, ya que en ocasiones las concentraciones de toxinas utilizadas pueden exceder el nivel requerido para el desarrollo de la enfermedad y los organismos resistentes pueden comportarse susceptibles frente a estas concentraciones de toxinas (Harelimana *et al.*, 1997).

La selección *in vitro* debe cumplir algunos principios tales como: la acción del metabolito (filtrado del cultivo, toxina) debe ser irreversible, es decir no debe actuar como un inhibidor del crecimiento. El agente selectivo no debe ser degradado en el medio de cultivo por otros factores, si es degradado las células susceptibles deben morir antes de su degradación. Otro principio es que el único estrés en las células debe ser causado por el agente selectivo. La respuesta debe manifestarse a nivel celular y debe existir una correlación positiva con la respuesta de la planta desarrollada (Kosky, 1998).

A pesar de la aparente popularidad y utilidad de este método para la obtención de líneas resistentes a enfermedades muy pocas variedades han sido liberadas (Kosky, 1998). Parte de este problema es simple, ya que la mayoría de los estudios realizados no han pasado de nivel de laboratorio y casas de cultivo. En algunas ocasiones no se ha escogido adecuadamente el sistema para analizar cuidadosamente la resistencia a la enfermedad o para llevar adelante las investigaciones necesarias para conducir estos experimentos del laboratorio al campo. Además, varios estudios a nivel de campo han mostrado resultados negativos o difíciles de interpretar. Por ejemplo, varias líneas de papa con resistencia a los filtrados del cultivo de *P. infestans* perdieron la resistencia a otras enfermedades, lo cual ha provocado su no introducción en la producción (Wenzel y Foroughi-Wehr, 1993).

El filtrado del cultivo se ha utilizado ampliamente para evaluar la actividad biológica de las toxinas de agentes fitopatógenos y para la selección de genotipos resistentes a este. 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 expuestos fácil y uniformemente al agente selectivo, ya que estos pueden ser incorporados a los medios de cultivo. El empleo del filtrado del cultivo como agente selectivo incluye algunos problemas como la

falta de una toxina, la presencia de una toxina pero que no ha sido caracterizada y falta de información del rol de la toxina en la enfermedad (Kosky, 1998).

Se debe establecer una metodología precisa para el crecimiento *in vitro* del patógeno para que la concentración del metabolito se mantenga en una proporción constante y de la forma más homogénea posible. Es por ello, que se deben determinar todas las condiciones óptimas para el crecimiento *in vitro* del patógeno, como son: edad del inóculo, cantidad de inóculo, condiciones de incubación, tiempo de incubación, medio de cultivo, concentración del filtrado del cultivo y su esterilización (García, 2000).

La mayoría de las fitotoxinas empleadas por los hongos para invadir el tejido de la planta son diferentes metabolitos secundarios, son de bajo peso molecular, los cuales no son requeridos para un crecimiento normal o para la reproducción. Según la fitotoxicidad las toxinas se dividen en dos categorías: toxinas hospedero específicas y toxinas no hospedero específicas. Las toxinas hospedero específicas están relacionadas con el desarrollo de pocas enfermedades destructivas. Generalmente muestran severos efectos sobre un reducido rango de especies hospedantes de hongos y son indispensables para el desarrollo de la enfermedad (Agrios, 2005).

Algunos autores han descrito el empleo del filtrado del cultivo de *Alternaria solani* en la diferenciación de genotipos susceptibles y resistentes al tizón temprano principalmente en tomate, incluyendo progenies de varias fuentes de resistencia (Maiero *et al.*, 1991; Pérez *et al.*, 1997; Capote *et al.*, 2001).

Lynch *et al.* (1991) utilizaron toxinas de *Alternaria solani* producidas en caldo papa dextrosa con doce días de incubación y encontraron que el filtrado del cultivo de este tenía efectos fitotóxicos sobre un gran número de genotipos de papa. Estos autores encontraron una alta correlación entre los resultados en hojas sueltas inoculadas con toxina y con filtrado del cultivo del hongo.

En *Alternaria solani* han sido identificadas 12 toxinas en el filtrado del cultivo. Dentro de éstas 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).

Al analizar las estrategias de evaluación de la variación como fuentes de resistencia al tizón temprano y tardío de la papa, Cassells y Kowalski (1998) plantearon que la aplicación de la mutagénesis *in vitro* en combinación con la selección *in vitro* podría ser muy útil en la obtención de plantas resistentes. Sin embargo, en la literatura existen pocos trabajos donde se utilice la mutagénesis en combinación con la selección *in vitro* para la mejora de la

resistencia al tizón temprano en plantas de papa. Sólo Martínez y Mantell (1994), lo han aplicado y observaron una alta frecuencia de plantas resistentes al filtrado del cultivo de *A. solani* al aplicar rayos X para inducir variabilidad en el material vegetal, pero los individuos obtenidos solo se evaluaron en condiciones de casa de cultivo. Estos autores utilizaron el filtrado del cultivo de *A. solani* para la selección *in vitro* de plántulas de papita güera (*Solanum phureja* L.) provenientes de callos irradiados y demostraron la efectividad de este sistema de selección para la obtención de plantas resistentes al tizón temprano. Además, refirieron que el empleo de esquejes para la selección asegura una organización anatómica y fisiológica similar a las de las plantas *in vivo*, hecho que no ocurre con los protoplastos, células o callos.

En la literatura científica nacional e internacional analizada existen estudios relacionados con el empleo de los filtrados del cultivo de *A. solani* en la diferenciación de genotipos susceptibles y resistente. Sin embargo, las investigaciones relacionadas con los factores que inciden en la obtención del filtrado del cultivo y en la diferenciación de genotipos susceptibles y resistentes así como la aplicación de estos en plantas con variabilidad inducida en Cuba son escasas. Sólo los estudios realizados Veitía *et al.* (2007), incluyen los aspectos relacionados con la obtención de un filtrado del cultivo de *Alternaria solani* que permitieron una mejor diferenciación entre el genotipo de papa susceptible y el resistente. Asimismo, se demostró la utilidad del filtrado del cultivo como agente selectivo al ser aplicado sobre plantas *in vitro* con variabilidad inducida. Estos autores encontraron correspondencia entre la respuesta de las líneas al filtrado del cultivo y al patógeno ya que de un total de 1 000 líneas con variabilidad inducida el 4.5% fueron resistentes al filtrado del cultivo. En condiciones de cantero el 0.6% de las líneas mostraron resistencia al patógeno inoculado artificialmente y el 0.1% mantuvo esta respuesta en campo frente al patógeno inoculado de forma artificial y naturalmente. Finalmente estos autores propusieron un esquema de trabajo para el empleo de la selección con el filtrado del cultivo combinado con la inducción de mutaciones en plantas *in vitro* de papa var. 'Desirée', que puede ser utilizado en la selección de genotipos mejorados de este cultivo. Estos resultados contribuyen a ampliar el conocimiento sobre la interacción planta-patógeno en el patosistema papa-*A. solani* y permitirá a los mejoradores genéticos contar con una herramienta para reducir el tiempo para obtener nuevas variedades de papa.

REFERENCIAS

- Agrios, GN (2005) Plant pathology, 5th edition. Elsevier, London
- Ahloowalia, BS (2001) *In vitro* techniques for selection of radiation induced mutations adapted to adverse environmental conditions. Printed by the IAEA in Austria. P 7

- ALAP (2000) Resumen. La agricultura no cañera en Cuba. La producción de papa. XIX Congreso Latinoamericano de la Papa. La Habana. Cuba
- Arzuaga, J (1982) Estudio de la Resistencia genética de *Alternaria solani* Sor. en 84 variedades de papa. Tesis de grado para optar al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas, La Habana
- Banerjee, AK, Prat S, Hannapel A (2006) Efficient production of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L. ssp *andigena*) plant via *Agrobacterium* mediated transformation. Plant Science 170: 1732-1738
- Boiteux, LS, Reifschneider FJB, Fonseca MEN, Buso JA (1995) Search for sources of early blight (*Alternaria solani*) field resistance not associated with vegetative late maturity in tetraploid potato germplasm. Euphytica 83: 63-70
- Caligari, PO (1992) Breeding new varieties. En: Harris P (Ed). Potato Crop. 2nd Edition, pp. 344-372. London Chapman and Hall. New York
- Capote, A, Socorro A, Rodríguez de la Rosa, N, Pérez O, Marrero N (2002) Fitotoxicidad de los filtrados de cultivos de *Alternaria solani* Sorauer .I. Efecto sobre la permeabilidad celular en hojas y callos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Protección vegetal 17 (1): 30-33
- 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
- Cassells, AC, Kowalski B (1998) Strategies for the evaluation of variation as source of resistance to early blight and late blight of potato. Comprehensive potato technology. Malhotra Publishing House, New Delhi
- 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
- Chaerani, R, Voorrips RE (2006) Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics, and breeding for resistance. J. Gen. Plant Pathol. 72: 335-347
- Christ, BJ, Haynes KGV (2001) Inheritance to early blight disease in a diploid potato population. Plant Breed. 120: 169-172
- Ellis MB (1971) Dematiaceos, *Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. Kew. Surrey England
- Estévez, A (2005) La papa, importancia y situación mundial. En: Estévez, A (Ed.) El cultivo de la papa en Cuba. Ediciones INCA. La Habana
- Estévez, A, González ME (2005) Origen, evolución y migración de la papa. En: Estévez, A (Ed.) El cultivo de la papa en Cuba Ediciones INCA. La Habana
- Foolad, MR, Ntahimpera N, Christ BJ, Lin GY (2000) Comparison of field, greenhouse and detached-leaflet evaluation of tomato germplasm for early blight resistance. Plant Dis. 84: 967-972
- García, L R (2000) Selección *in vitro* a estrés biótico y abiótico. Curso en aplicaciones de la Biotecnología en la mejora genética de plantas y en la producción de semillas. Monografía. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba, Programa Nacional de Producción de Semillas, Bolivia. P18
- 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
- Gómez, G, Rodríguez J, Sarmientos A, Castellanos L (1999) Modelo de pronóstico del tizón temprano (*Alternaria solani* Sor.) en papa y tomate en Cuba. Fitosanidad 3 (3): 89-93
- Kosky, RG (1996) Selección *in vitro* en la caña de azúcar a la enfermedad del carbón (*Ustilago scitaminea*). Tesis de Doctorado Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Santa Clara
- González, ChM, Shagarodsky T, Barrios O, Fraga N (2003) Comportamiento varietal del tomate ante el tizón temprano en condiciones de campo. Rev. Protección Veg. 18 (1): 38-41
- Harelimana, G, Lepoivre P, Jijakli H, Mourichon X (1997) Use of *Mycosphaerella fijiensis* toxins for the selection of banana cultivars resistant to Black leaf streak. Euphytica 96: 125-128
- Hawkes, JG (1978) History of the potato. In potato crop, the scientific bases for improvement. Chapman and Hall. London
- Hernández, R, Suárez P, Castillo S (1998) Estudio comparativo de residuos de ditiocarbamatos en papa. Fitosanidad 2 (2): 10-15
- 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
- Jaramillo S (2003) Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Cali
- Kosky, RG (1998) Selección *in vitro* a enfermedades. En: Pérez JN (Ed.). Propagación y Mejora genéticas de las plantas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara
- Lawrence, CB, Singh NP, Qiu J, Gardner RG, Tuzun S (2000) Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as an elicitor release mechanism. Physiol. Mol. Plant Pathol. 43: 361-377
- Ligarreto, G A (2001) Los recursos genético: Un acervo importante para el mejoramiento de la producción de papa. Revista Corpoica 2(1): 12-17
- Liu, CH, Wu W (1996) Method for enhancing sporulation of *Alternaria solani*. Plant Pathology Bulletin 5: 196-198
- López, ZM, Vázquez, BE, López FR (1995) Raíces y tubérculos. Pueblo y Educación. La Habana.
- Lynch, D R, Coleman M C, Lyon G D (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
- Maluszynsky, M, Ahloowalia BS, Sigurbjornsson B (1995) Aplicación de *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. Euphytica 85: 303-315
- Martin, C, Thurston HD (1989) Factors affecting resistance to *Alternaria solani* and progress in Early blight research at CIP, pp. 101-118. CIP. Lima

- Martínez, B, Bernal A, Pérez S, Muñiz Y (2002) Variabilidad patogénica de aislamientos de *Alternaria solani* Sor. Revista Protección Veg. 17 (1): 45-53
- 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
- Mayea, S, Padrón J (1983) Bacterias y hongos fitopatógenos. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. Cuba
- Mayea, S, Hernández S (1983) Estudios sobre enfermedades tizón tardío y temprano de la papa. Trabajo de Diploma Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Santa Clara
- Peralta, IE, Knapp S, Spooner DM (2005) New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: *Solanaceae*) from northern Peru. Syst Bot 30: 424-434
- Pérez, L, García A (2004) Enfermedades fungosas y bacterianas de la papa: descripción, epidemiología y manejo. En: Estévez, A (Ed.) El cultivo de la papa en Cuba. Ediciones INCA. La Habana
- Pérez, L, García A (2005) Enfermedades fungosas y bacterianas de la papa: descripción, epidemiología y manejo. En: Estévez, A (Ed.) El cultivo de la papa en Cuba, pp. 338-480. Ediciones INCA. La Habana
- 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
- 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
- Piña, A (1980) Estudio biológico y control de *Alternaria solani* en papa. Problema Principal Estatal 04. La Habana
- Ritter, E (2000) Aplicación de la biotecnología en la mejora genética de la patata. En: Pascualena J, Ritter E (Eds). Libro de Actas del Congreso Iberoamericano de investigación y desarrollo de la patata 3-6 Julio, España
- Rivas, E (2001) Inducción de esporulación en *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout *in vitro*. Protección Veg. 16 (2-3): 107-110
- Rodríguez, MAD, Brommonschenkel SH, Matsuoka K, Mizubuti ES (2006) Components of resistance to early blight in four potato cultivars: Effect of leaf position. Phytopathology 154: 230-235
- Rodríguez, MAD, Brommonschenkel SH, Matsuoka K, Mizubuti ESG (2007) Histopathological study of the *Alternaria solani* infection process in potato cultivars with different levels of early blight resistance. J. Phytopathology 155 (7-8): 462-469
- Rotem, J (1994) The genus *Alternaria* biology, epidemiology, and pathogenicity, 1st edn. APS, St. Paul, MN
- Sonino, A, Ancora G, Locardi C (1986) *In Vitro* mutation Breeding of Potato. Nuclear Techniques and *in vitro* culture for plant improvement. International atomic Energy Vienna: 385-394
- 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
- Švábová, L, Lebeda A (2005) *In vitro* selection for improvement plant resistance to toxin-producing pathogens. J. Phytopathology 53: 52-64
- Thoma, BPHT (2003) Pathogen profile: *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. Molecular Plant Pathology 4 (4): 225-236
- Torres, H (2002) Manual de las enfermedades más importantes de la papa en el Perú. Centro Internacional de la Papa. Lima
- Trujillo, C, Podríguez-Arango E, Jaramillo S, Hoyos R, Orduz S, Arango R (2001) One step transformation of two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. subsp *andigena*). Plant Cell Report 20: 637-641
- Urrea, A, Gómez R, Orellana P, Herrera L, Veitia N, Alvarado Y (2000) Estudio de parámetros para la selección *in vitro* empleando medios derivados de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary para inducir respuesta de resistencia en papa (*Solanum tuberosum*). Revista Actualidades Biológicas 22(72): 5-15
- 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
- van der Waals, JE, Korsten L, Aveling TAS (2001) A review of early blight of potato. African Plant Prot 7:1-12
- 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
- Varona, J, Mendoza M, Meneses N, Dita MA (1999) Diferenciación de aislados de *Alternaria solani* utilizando RADP. Cuadernos de Fitopatología 60:14-17
- Veitia N, Kowalski B, Rodríguez LR, Carabaloso I, Suárez M, Pérez O, Quintana CR, González N, Ramos R (2007) *In vitro* and *ex vitro* selection of potato plantlets for resistance to Early Blight. J. Phytopathology 155: 582-586
- Vloutoglou, I (1999) Evaluation of tomato cultivars and hybrids for resistance to *Alternaria solani* infection. Tests Agrochem Cultiv 20: 48-49
- Wenzel, G, Foroughi-Wehr (1993) *In vitro* Selection. En: NO Bosemark, I Romagosa (eds) Plant Breeding: Principles and prospects, pp. 352-370. Hayward M.D. London