

## Protocolo para la diferenciación de genotipos de papa mediante la inoculación artificial de suspensiones miceliales de *Alternaria solani* Sor. en cantero y campo

Michel Leiva-Mora\*, Novisel Veitía, Yelenys Alvarado-Capó. \*Autor para correspondencia.

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

### RESUMEN

La evaluación de la resistencia al tizón temprano comúnmente se realiza a través de la infección natural posterior a la siembra en campo, sin embargo, la misma cuenta con varias desventajas como la lentitud del proceso, labores intensivas para el mantenimiento de la plantación, interferencia en las evaluaciones por la presencia de patógenos y plagas e influencia de las condiciones ambientales durante el período evaluativo. El presente trabajo tuvo como objetivo establecer un protocolo para la inoculación artificial de suspensiones miceliales de *Alternaria solani* Sor. en condiciones de cantero y de campo para diferenciar genotipos de interés en el programa de mejoramiento genético del cultivo de la papa. El protocolo propuesto resultó fácil, reproducible y apropiado para la inoculación artificial de *Alternaria solani* Sor en condiciones de cantero y campo. Asimismo permitió la evaluación de genotipos promisorios obtenidos del programa de mejoramiento genético de IBP mediante la mutagénesis inducida y la selección *in vitro* con los filtrados de cultivo de *A. solani*. El mismo puede ser utilizado no solo para la evaluación de la respuesta de genotipos de papa a la infección del patógeno, sino también para la caracterización patogénica y virulenta de *A. solani* así como una herramienta útil para el estudio de la interacción Papa-*A. solani*.

Palabras clave: mejoramiento genético, selección, *Solanum tuberosum* L., *Solanum chacoense*

### ABSTRACT

Early blight resistance evaluation in potatoes is commonly done under natural infection conditions, nevertheless there exist some disadvantages such as time consuming procedure, intensive labors for plantation maintenance, interference on evaluation due to pathogens and pest, and the influence of environmental conditions during evaluation period. This work was focused to establish a protocol for artificial inoculation of *Alternaria solani* mycelial suspensions in bedseeds and field condition to differentiate genotypes obtained in Potatoes breeding program. The protocol proposed was easy, reproducible and appropriate for artificial inoculation of *Alternaria solani* mycelial suspension in bedseeds and field condition. it also enables the evaluation of promising genotypes obtained from IBP Potatoes breeding program by induced mutagenesis and *in vitro* selection using *A. solani* cultures filtrated. This protocol can be used not only in the evaluation of potatoes genotypes response to pathogen infection, but also in the pathogenic and virulence characterization of *A. solani* and can be used as a tool in the study of potato-*A. solani* interaction.

Key words: breeding, screening, *Solanum tuberosum*, *Solanum chacoense*

### INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) fue introducida en Cuba a finales del siglo XVIII y se considera uno de los cultivos más importantes. Esta planta posee una extraordinaria capacidad de adaptación por lo que es capaz de desarrollarse en condiciones y climas muy diversos, siendo el cultivo que mayor cantidad de proteína produce por unidad de superficie. Es además, un cultivo de corta duración que elabora una gran cantidad de calorías en un corto período de tiempo (Vrolijk, 1994).

A pesar de que los rendimientos en Cuba sobrepasan la media para la región americana, los mismos son afectados por numerosos factores entre los cuales las plagas y enfermedades producen pérdidas millonarias (Veitía *et al.*, 2004).

Las enfermedades de origen fúngico son las que ocasionan mayores afectaciones a dicho cultivo. El tizón tardío causado por *Phytophthora infestans* Mont de Bary y el tizón temprano causado por *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Sorauer y *Alternaria alternata* (Fr) Keissler, producen severos daños al follaje de la planta (Rotem, 1994; Van der Waals *et al.*, 2001).

El tizón temprano de la papa reduce el área fotosintética y en casos extremos puede conducir a la total defoliación de la planta. En las variedades de papa no se encuentran genotipos altamente resistentes a este patógeno, sin embargo, existen especies silvestres como *Solanum chacoense* que sí pueden manifestar este fenotipo de resistencia. De igual modo, en el cultivo del tomate la especie *Lycopersicon esculentum* Mill, se manifiesta susceptible (Peralta *et al.*, 2005). Es conocido que

varias de sus líneas y variedades liberadas comercialmente responden de igual modo ante el ataque de este patógeno (Banerjee *et al.*, 1998; Vlutoglou, 1999; Gardner y Shoemaker, 1999). A pesar, de que algunas especies silvestres como *S. habrochaites*, *S. pimpinellifolium*, *S. peruvianum* y *S. chilense*, han sido identificadas como valiosas fuentes de resistencia para los programas de mejoramiento genético (Foolad *et al.*, 2000; Thirthamalappa y Lohithaswa, 2000).

En Cuba, el tizón temprano se ha considerado como la principal enfermedad debido a que en un tiempo breve provoca una gran defoliación y atizonamiento del follaje, lo cual conduce a grandes pérdidas (González *et al.*, 2003), así como también se ha encontrado cierta variabilidad genética y patogénica, entre aislados procedentes de diferentes localidades (Martínez *et al.*, 2004).

Asimismo, diferentes autores han ofrecido especial interés en estudios relacionados con la resistencia frente al tizón temprano, así como la heredabilidad de la misma, como apoyo a programas de mejoramiento genético del cultivo de la papa (Haynes y Christ, 2001). Al uso de variedades resistentes como medida de control, se le ha ofrecido un mayor apoyo y esfuerzo en los programas de mejoramiento genético (Lawrence *et al.*, 2000; Foolad *et al.*, 2002).

Gracias al desarrollo que ha experimentado la Biotecnología Vegetal de conjunto con el mejoramiento genético tradicional y la selección, se propicia un futuro más optimista en relación con la obtención de variedades mejoradas frente a patógenos causantes de enfermedades fúngicas.

Comúnmente el método más utilizado para evaluar la resistencia al tizón temprano es mediante la infección natural posterior a la siembra en campo, sin embargo, la incidencia de la enfermedad depende de las condiciones climáticas (Pandey *et al.*, 2003).

Además, los ensayos realizados en condiciones de campo cuentan con varias desventajas, entre las más importantes se destacan: la lentitud del proceso, se requieren labores intensivas para el mantenimiento de la plantación, pueden interferir en las evaluaciones otros patógenos así como 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).

Es por ello que el uso de aislados del patógeno caracterizados respecto a su patogenicidad y agresividad en genotipos de resistencia conocida, puede resultar apropiado para acortar el tiempo de selección así como suplir la ausencia de la enfermedad en campo (Rodríguez, 1998).

El uso de suspensiones miceliarias asimismo ha sido empleada para la inducción de la enfermedad en condiciones de campo (Piña, 1980).

Tanto la aspersión directa del inóculo artificial como la creación de un fondo de provocación, son utilizadas para diseminar uniformemente el patógeno (Chaerani, 2006). En la literatura científica consultada relacionada con el cultivo de la papa, no se describen protocolos que detallen el uso de una suspensión micelial de *A. solani* para diferenciar genotipos de papa en el marco de un programa de mejoramiento genético.

El presente trabajo tuvo como objetivo establecer un protocolo para la inoculación artificial de suspensiones miceliales de *Alternaria solani* en condiciones de cantero y campo, para diferenciar genotipos de papa acorde a su resistencia frente al tizón temprano.

### Descripción del Protocolo

Acorde con los resultados de trabajos realizados por Leiva-Mora *et al.* (2001) y Veitía *et al.* (2002), los cuales apoyaron el Programa de Mejoramiento genético del cultivo de la papa en el IBP para la búsqueda de resistencia al tizón temprano, se estableció un protocolo para la diferenciación de genotipos de papa en condiciones de cantero y campo mediante el uso de la inoculación artificial del patógeno, el cual se describe a continuación:

### Materiales biológicos

Se utilizarán cepas de *Alternaria solani* previamente caracterizadas en base a su patogenicidad y agresividad así como respecto a sus caracteres culturales y morfológicos. Se recomienda utilizar aquellas que mayor agresividad hayan mostrado en los ensayos de caracterización patogénica.

Asimismo se propone utilizar genotipos de papa que sean de interés para la evaluación del tizón temprano acorde con el programa de mejoramiento genético que se desarrolle. Se propone incluir la variedad 'Desirée' (*Solanum tuberosum* L.) como control susceptible y el genotipo silvestre *Solanum chacoense* como control resistente, los cuales servirán de referencia para la clasificación del fenotipo de la resistencia en los genotipos en estudio.

### Materiales de trabajo y equipos necesarios

1. Agua desionizada estéril.
2. Asa de inoculación para hongos.
3. Batidora.
4. Vasos de precipitado de 1 000 ml estériles.
5. Cabina de flujo laminar.
6. Cámara de Neubauer (hematocímetro).
7. Contador de colonias.

8. Enlermeyers 500 ml.
9. Espátula de Drigalski.
10. Higrotermógrafo.
11. Horador de 10 mm de diámetro.
12. Incubadoras.
13. Mechero.
14. Micropipetas de 5 000, 1 000 y 200  $\mu$ l.
15. Microscópio óptico.
16. Mochila de aspersión de 5 litros de capacidad.
17. Papel de filtro (Whatman No 4).
18. Placas de Petri (7 cm de diámetro).
19. Puntas estériles para Micropipetas de 5 000, 1 000 y 200  $\mu$ l.
20. Tamiz de 40  $\mu$ m.

### Medios de cultivo y soluciones

- Medio de cultivo Caldo papa dextrosa (PDB, Duchefa) (Extracto de papa 4g; dextrosa 20g; H<sub>2</sub>O 1 000 ml; pH = 5.6).
- Medio de cultivo Agar papa dextrosa (PDA, Difco) (bacto dextrosa 20g; bacto agar 15g; H<sub>2</sub>O 1 000 ml; pH = 5.6).
- Medio de cultivo de Richard (Sacarosa 50 g; KNO<sub>3</sub> 10 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.5 g; Fe Cl<sub>3</sub> 0.02 g; H<sub>2</sub>O 1 000 ml; pH = 5.6) (Martínez y Mantell, 1994)
- Alcohol (70%) (v/v)
- Gelatina (1%)

### Precauciones y medidas de seguridad

A pesar que *Alternaria solani* es un hongo fitopatógeno y que las estructuras infectivas (micelio o conidios) son las más comúnmente utilizadas, las cuales requieren producirse *in vitro*, se recomienda utilizar guantes, batas sanitarias, tapaboca y todos los medios de protección necesarios, ya que es conocido que este microorganismo es potencialmente patógeno para la salud humana.

### Características y condiciones de los canteros

Los tubérculos se plantan en canteros (que pueden ser de paredes de bloques de hormigón y fondo de concreto) sobre un sustrato adecuado para el cultivo de la papa. Se recomienda adicionar humus de lombriz y aplicar fertilizante a los 21 días después de plantados. El riego debe realizarse una vez al día en horas de la tarde. La distancia de siembra debe estar en correspondencia con el tamaño del cantero.

Los canteros deben estar en óptimas condiciones, con una adecuada limpieza, debidamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 3% y encalados.

### Plantación en campo

La plantación de los tubérculos en campo se hará de acuerdo con las normas técnicas establecidas para el cultivo. No se aplicarán fungicidas.

### Preparación del material vegetal

El material vegetal estará listo para ser inoculado después de 35 días de plantados los tubérculos. Previo a la inoculación debe realizarse una poda para eliminar cualquier parte del material vegetal que ha sufrido daños mecánicos o porciones de tejido afectadas por algún patógeno en cuestión que pueda enmascarar los resultados del experimento.

Se aconseja momentos antes de inocular el material vegetal garantizar una alta humedad relativa (95-100%), para ello se deben humedecer el suelo, las paredes del cantero, y de ser posible asperjar el follaje de las plantas para evitar cualquier tipo de estrés fisiológico en las mismas. Se incluirán siempre plantas inoculadas solo con agua desionizada estéril (controles de inoculación) así como plantas sin inocular (controles absolutos).

### Preparación y aplicación del inóculo

Para preparar el inóculo inicial se tomarán placas de Petri de 7.0 cm de diámetro que contengan 10 ml de medio de cultivo Agar Papa Dextrosa y se inocularán, con la ayuda de una aguja de inoculación para hongos mediante un fragmento de micelio procedente de un tubo de ensayo (conservados a 4°C) de cada aislado. Las placas se incubarán a 28°C durante 7 días en oscuridad total.

Para preparar el homogenizado micelial, con el cual se inocularán las plantas, se sembrará cada aislado en Enlermeyers de 500 ml de volumen, con 200 ml del medio de cultivo líquido de Richard. A cada uno se adicionará un disco de micelio de 1.0 cm de diámetro tomado de los bordes de las colonias y se incubarán a 28°C en oscuridad constante durante 30 días. El micelio de cada aislado se separará mediante filtración con papel de filtro Whatman No. 4. Posteriormente se tomarán 200 g de micelio y se homogeneizarán en 1 000 ml de agua destilada estéril durante 2 minutos con la ayuda de una batidora. Posteriormente se filtrarán a través de un tamiz de 40 $\mu$ m y se determinará la concentración del mismo con un hematocímetro.

La concentración de la suspensión micelial se ajustará a un valor aproximado de  $1.7 \times 10^5$  fragmentos de micelio. ml<sup>-1</sup> y se le añadirá gelatina (1%) como adherente. Se aplicarán cuatro litros por cantero de 1.5 x 22.0m y 1 litro por 25 m<sup>2</sup> en el área experimental de campo.

### Requerimientos para la infección de *A. solani*

Generalmente una vez culminada la inoculación artificial, se debe favorecer una alta humedad, mediante la aspersión de agua durante 3 días posteriores a la inoculación. Se realizará un registro diario de la temperatura, tratando de mantenerla entre 24-32°C, lo cual se logra en condiciones de cantero

y campo mediante la aplicación de riegos por aspersión hasta que aparezcan los primeros síntomas. Luego se aplica la norma de riego propia para dicho cultivo acorde con el tipo de suelo y las condiciones climáticas que prevalezcan.

#### Evaluación de la inoculación artificial de *A. solani*

A partir de la inoculación artificial de *Alternaria solani*, se revisarán diariamente las plantas hasta que aparezcan macroscópicamente los primeros síntomas. Se podrán evaluar diferentes tipos de variables de acuerdo con el interés del investigador.

A continuación se recomiendan algunas variables útiles en la evaluación de la respuesta de genotipos de papa en el patosistema Papa-*Alternaria solani*:

1. Grado de afectación acorde con escalas cualitativas (Horsfall y Barrat, 1945) (Tabla 1).
2. Período de incubación (Castellanos, 2000; Rodríguez *et al.*, 2006).
3. Período de generación de estructuras asexuales (Castellanos, 2000).
4. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (Rodríguez *et al.*, 2006) (\*).
5. Número de lesiones necróticas (Berger *et al.*, 1997)
6. Tamaño de las lesiones (Berger *et al.*, 1997)

(\*)Área bajo la curva del progreso de la enfermedad

$$A = \sum_{x=1}^n [x_i + x_{i+1}] / 2 \cdot t,$$

donde *n* representa el número de evaluaciones, *t* el tiempo entre cada evaluación, *x*, porcentaje de la hoja necrosada de acuerdo con una escala de evaluación cuantitativa.

Tabla 1. Escala de Horsfall y Barrat (1945) para la evaluación de la severidad de las afectaciones provocadas por el tizón temprano en campo.

| Grado | Sintomatología   |
|-------|--|
| 1     | Sin síntomas   |
| 2     | Manchas aisladas en las hojas especialmente en las inferiores.   |
| 3     | Manchas aisladas en las hojas de la mitad inferior de la planta. En las hojas inferiores nervios aislados muertos.   |
| 4     | Manchas aisladas en las hojas de toda la planta. Hojas inferiores parcialmente muertas. Las hojas de la mitad inferior de la planta parcialmente muertas. En la parte superior de la planta hojas aisladas fuertemente infectadas. |
| 5     | Las hojas de la mitad inferior de la planta casi totalmente muertas. En las hojas superiores nervios aislados necrosados.  |
| 6     | En la parte superior de la planta muchos nervios necrosados y hojas completamente muertas.   |
| 7     | Todas las hojas fuertemente dañadas, muchas muertas.   |
| 8     | Todas las hojas muertas.   |

#### Culminación del ensayo

Una vez concluida la última evaluación se procederá a desmontar el experimento. El material vegetal inoculado será retirado de los canteros y todos los restos vegetales se colocarán en bolsas de polietileno para evitar la diseminación del patógeno. Las bolsas serán incineradas.

#### Consideraciones finales

La evaluación de genotipos de papa obtenidos en programas de mejoramiento genético ya sea a través de la hibridación, mutagénesis inducida o transformación genética frente al agente causal del tizón temprano, constituye una etapa importante en la selección de variedades resistentes. Disponer de un protocolo de trabajo que permita diferenciar genotipos de papa mediante la inoculación artificial de suspensiones miceliales de *Alternaria solani* Sor. en cantero y campo, permitirá evaluar la respuesta de los mismos aun cuando las condiciones naturales no favorezcan el desarrollo de la enfermedad. Al utilizar cepas bien caracterizadas y conservadas de *A. solani*, se reducen las posibles interferencias en las evaluaciones por la presencia de otros patógenos foliares. Finalmente este protocolo puede ser útil, además, en la caracterización de la patogenicidad y virulencia de colecciones de aislados de *A. solani* procedentes de diferentes regiones del país. Puede adicionalmente constituir una importante herramienta para apoyar estudios relacionados con la interacción Papa-*A. solani* en la búsqueda de nuevas alternativas para encontrar genotipos resistentes.

## REFERENCIAS

- Banerjee, MK, Chhabra ML, Saini PS (1998) Responses of tomato cultivars to *Alternaria* blight. Tests of Agrochemicals Cultiv. 19: 50-51
- Berger, RD, Bergamin FA, Amorim L (1997) Lesion expansion as an epidemic component. Phytopathology 87:1005-1013
- 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 'Marta Abreu' de Las Villas. Santa Clara.
- Chaerani, R (2006) Early blight resistance in tomato: screening and genetic study. Ph.D. thesis, Wageningen University. Wageningen
- Foolad, MR, Ntahimpera N, Christ BJ, Li GY (2000) Comparison of field, greenhouse, and detached leaflet evaluations of tomato germplasm for early blight resistance. Plant Disease 84: 967-972
- Foolad, MR, Subbiah P, Ghangas GS (2002) Parent-offspring correlation estimate of heritability for early blight resistance in tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. Euphytica 126: 291-297
- Gardner, RG, Shoemaker PB (1999) Mountain Supreme early blight-resistant hybrid tomato and its parents, NC EBR-3 and NC EBR-4. HortScience 34: 745-746
- González, ChM, Shagarodsky T, Barrios O, Fraga Nérida (2003) Comportamiento varietal del tomate ante el tizón temprano en condiciones de campo. Rev. Protección Veg. 18 (1): 38-41
- Haynes, KG, Christ BJ (2001) Inheritance of resistance to early blight disease in a diploid potato population. Plant Breeding 120 (2): 169-172
- Horsfall JF, Barrat RW (1945) An improvement grading system for measuring plant diseases. Phytopathology 35: 655-656
- Lawrence, CB, Singh NP, Qiu J, Gardner RG, Tuzun S (2000) Constitutive associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* elicitor release mechanism. Physiol. Mol. Plant Pathology 57: 211-220
- Leiva, MM, Veitía RN, Rodríguez MAD (2001) Evaluación de diferentes mutantes de papa para la resistencia a *Alternaria solani* Sorauer, mediante el uso de la inoculación artificial en condiciones de campo. Biotecnología vegetal 1(2): 93-96
- Martínez, SP, Snowdon R, Kuhnemann P (2004) Variability of Cuban and international populations of *Alternaria solani* from different hosts and localities: AFLP genetic analysis. European Journal of Plant Pathology 110: 399-409
- Pandey, KK, Pandey PK, Kallo G, Banerjee MK (2003) Resistance to early blight of tomato with respect to various parameters of disease epidemics. Journal Gen. Plant Pathol. 69: 364-371
- Peralta, IE, Knapp S, Spooner DM (2005) New species of wild tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: *Solanaceae*) from northern Peru. Syst Bot 30: 424-434
- Piña, A (1980) Estudio biológico y control de *Alternaria solani* en papa. Instituto de investigaciones de Sanidad Vegetal. MINAGRI
- Rodríguez, MAD, Brommonschenkel SH, Matsuoka K, Mizubuti ESG (2006) Components of resistance to Early blight in four potato varieties: effect of leaf position. J. Phytopathology 154: 230-235
- Rotem, J (1994) The genus *Alternaria* biology, epidemiology, and pathogenicity, 1st ed. The American Phytopathological Society. Minnesota
- Thirthamalappa, HC, Lohithaswa HC (2000) Genetics of resistance to early blight (*Alternaria solani* Sorauer) in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Euphytica 113: 187-193
- Van der Waals, JE, Korsten L, Aveling, TAS (2001) A review of early blight of potato. African Plant Prot. 7: 1-12
- Veitía, N, Cardoso JF, Pérez JN, García L, Bermúdez I, García L, Padrón Y, Orellana P, Romero C, Hernández N (2002) Evaluación en condiciones de campo de somaclones de papa (*Solanum tuberosum* L.) de la variedad Desirée obtenidos por variación somaclonal y mutagénesis. Biotecnología Vegetal 2(1): 21-26
- Veitía, RN, Leiva MM (2004) Comportamiento de diferentes genotipos de papa frente al tizón temprano (*Alternaria solani*) (Sor.) en condiciones de invernadero. Biotecnología vegetal 4(1): 27-30
- Vloutoglou, I (1999) Evaluation of tomato varieties and hybrids for resistance to *Alternaria solani* infection. Tests of Agrochemicals and Varieties 20: 48-49
- Vrolijk, B (1994) Asian Potato Trade. Economic Analysis of the International Trade of potatoes and potato products to, from and within Asia. Ph.D. thesis. University of Wageningen. Wageningen