

Evaluación de diferentes somaclones de papa para la resistencia a *Alternaria solani* Sorauer, mediante el uso de la inoculación artificial en condiciones de campo

Michel Leiva Mora*, Novisel Veitía Rodríguez, Miguel Angel Dita Rodríguez. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km. 5^{1/2}, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: leivamichel@uclv.edu.cu

RESUMEN

El uso de microorganismos fitopatógenos en los programas de mejoramiento genético es de vital importancia para garantizar el éxito de los mismos. La utilización de aislados patogénicamente representativos de condiciones naturales permite estudiar genotipos promisorios respecto a las diversas enfermedades de interés económico. En el presente trabajo se utilizó como inóculo artificial un homogeneizado micelial de la cepa IBP As-4 (*Alternaria solani* Sorauer) con una concentración de 1.7×10^5 ufc.ml⁻¹. El mismo fue aplicado mediante aspersión foliar a diferentes somaclones de papa de la variedad Desireé, obtenidos por mutagénesis y selección *in vitro*. Los primeros síntomas aparecieron a los siete días después de efectuada la inoculación. Se observaron diferencias respecto al desarrollo de los síntomas entre los somaclones y los testigos en las distintas evaluaciones. *Solanum chacoense* se comportó como el genotipo más resistente mientras que los somaclones evaluados registraron valores intermedios, aun cuando algunos de ellos alcanzaron grados de afectación promedio superiores al testigo Desireé. Se pudo comprobar la importancia del empleo de la inoculación artificial para efectuar la selección de individuos promisorios donde la presión de inóculo sea débil.

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

ABSTRACT

The use of plant pathogens, for the genetic improving programs is an important matter to guarantee its success. Utilization of phytopathogenic isolates from natural source, let us to employ rapid screening in some important genotypes. In this work it was used a mycelium homogenized of *Alternaria solani* Sor (strain IBP-As-4), with a relative concentration of 1.7×10^5 ufc ml⁻¹. The inoculum was applied by spraying to the somaclons (obtained by mutagenic and *in vitro* selection with culture filtrated of the fungus), also to the susceptible (Desireé) and resistant (*Solanum chacoense*) cultivars, respectively. The first symptoms appeared after seventh day of inoculation. The behavior between somaclons and testers in the final evaluation were different. *Solanum chacoense* was the most resistant genotype, the somaclons IBP-93 and IBP-38 were more susceptible than Desireé. The somaclons IBP-27 reached a similar affectation score respect to *Solanum chacoense*. The rest of the somaclons had an intermediate performance. It was proved the important of using of pathogenic strains of *Alternaria solani* Sor, for making selection where the natural inoculum source it is weak.

Key words: genetic, improvement, selection, *Solanum tuberosum* L.

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L), ocupa el cuarto lugar en importancia alimentaria a escala mundial, superada sólo por el trigo, el arroz y el maíz. En América Latina es desplazada por cultivos como el maíz, yuca, trigo, arroz, plátanos, frijol y sorgo. Es un cultivo de corta duración que produce una gran cantidad de calorías en un corto período de tiempo (Vrolijk, 1994).

En Cuba se ha desarrollado una metodología de trabajo en este cultivo que ha asegurado rendimientos apreciables. Según datos de la FAO en 1997, nuestro país en el contexto regional logró rendimientos de 24.4 t.ha⁻¹, superando a Costa Rica y Argentina (Valdés, 2000). No obstante, estos han

sido afectados por numerosos factores que en mayor o en menor medida han provocado un descenso en las producciones.

Las afectaciones por plagas y enfermedades son una de las más importantes limitantes y traen consigo que se inviertan cuantiosos recursos por concepto de importación de productos químicos para su control. Dentro de las enfermedades que más afectan este cultivo se destacan las de origen fungoso, principalmente las que atacan el follaje de la planta como: el tizón tardío (*Phytophthora infestans* de Bary) y el tizón temprano (*Alternaria solani* Sorauer y *Alternaria alternata* (Fr) Keissler). Esta última constituye la de mayor importancia para el cultivo en Cuba (Piña, 1980; Mayea *et al.*, 1983) y se ha considerado como la principal enfermedad debido a

que en un tiempo reducido provoca la desfoliación de las plantaciones por lo que ocasiona grandes pérdidas (Mayea y Perdomo, 1990).

El uso de variedades resistentes como medida de control se le ha brindado más apoyo y esfuerzo en la actualidad. La Biotecnología Vegetal, ha creado mayores esperanzas respecto al mejoramiento genético de variedades susceptible a enfermedades. La combinación de la misma con los métodos tradicionales de mejora amplían las posibilidades de obtener éxito.

Las fuentes de inóculo natural son empleadas con frecuencia para los estudios de resistencia en condiciones de campo (Boiteux *et al*; 1995). Sin embargo en ocasiones estas no son suficientes para que se desarrolle la enfermedad con la intensidad deseada. Las condiciones ambientales así como la ausencia de razas virulentas puede influir en la manifestación de una falsa resistencia.

En condiciones naturales resulta difícil procurar una distribución homogénea de la carga de inóculo en los diferentes genotipos de interés sometidos a la selección. Es por ello que en ocasiones se requiere de inoculaciones artificiales para lograr el desarrollo de la enfermedad. En tal sentido se pueden utilizar estructuras infectivas como: conidios, tejidos enfermos, fragmentos de micelio, entre otros (Herrera, 1990).

El presente trabajo se propuso los siguientes objetivos: comprobar la patogenicidad de la cepa de *Alternaria solani* Sor IBP-As-4 en condiciones de campo, valorar si mediante la inoculación artificial era posible lograr un adecuado desarrollo de la enfermedad del tizón temprano y evaluar el comportamiento de diferentes somaclones de papa respecto a los genotipos resistentes y susceptibles utilizados como testigos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se utilizaron seis somaclones de papa de la variedad Desireé (IBP-27, IBP-30, IBP-101, IBP-93, IBP-38,

IBP-107), obtenidos por mutagénesis y selección *in vitro* empleando el filtrado de cultivo de *Alternaria solani* Sor como agente selectivo (Veitia y Dita, 1995). Además, como testigo susceptible se empleó la variedad Desireé y como testigo resistente la especie *Solanum chacoense*. Para cada somaclón así como los testigos se utilizaron un total de 3 000 plantas obtenidas por cultivo *in vitro*.

Preparación y aplicación del inóculo de *Alternaria solani* Sor IBP-As-4.

La cepa IBP-As-4 se sembró en Enlermeyers de 500 ml de volumen, cada uno contenía 200 ml del medio de cultivo líquido de Richard (sacarosa; 50 g, KNO₃; 10 g, KH₂PO₄; 5 g, MgSO₄; 7H₂O; 2.5 g; Fe Cl₃; 0.02 g, H₂O; 1000 ml, pH = 5.3). Se inocularon con un disco de micelio de un centímetro de diámetro, desarrollado en el medio de cultivo sólido PDA (Fluka), se incubaron a 28°C de temperatura en oscuridad constante durante 30 días. El manto micelial se separó empleando un tamiz fino. Se tomaron 200 g del mismo y se homogeneizaron en 1 000 ml de agua destilada estéril con la ayuda de una batidora (Waring) durante dos minutos. Posteriormente se filtró a través de una gasa estéril y se determinó la concentración con un hematocímetro.

La concentración del inóculo artificial para aplicar en campo se ajustó a un valor aproximado de 1.7x10⁵ ufc ml⁻¹ y se le añadió gelatina al 1% como adherente. El volumen de inóculo empleado en condiciones de campo fue de 20 l. El mismo se aplicó al material vegetal con la ayuda de una mochila manual MATABI de 4 000 ml de capacidad, con una sola boquilla de aspersión. Durante la primera semana, se utilizó un intervalo de riego de 2h al atardecer (4:00pm-6:00 pm).

Evaluaciones

A partir de los 45 días se comenzaron a realizar las evaluaciones respecto a la enfermedad. Se utilizó la escala propuesta por Mayea (1989) para evaluar el grado de afectación promedio expresado en porcentaje, así como una escala de resistencia correspondiente, según el grado de afectación promedio alcanzado (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Escala para evaluar las afectaciones producidas por la enfermedad del Tizón temprano, causada por *Alternaria solani* Sor, en condiciones de campo, según Mayea (1989).

Grado de afectación expresado en %.	Caracterización
10	Manchas en hojas inferiores.
20	Manchas en la mayoría de las hojas inferiores y algunas del centro.
30	Manchas en todas las hojas inferiores y algunas del centro.
40	Atizonamiento en hojas inferiores.
50	Tizón en hojas inferiores y atizonamiento en la mayoría del centro
60	Tizón en hojas inferiores y la mayoría del centro
70	Tizón en hojas inferiores y en todas del centro.
80	Tizón en hojas inferiores, todas las del centro y atizonamiento superior.
100	Tizón en todas las hojas.

Tabla 2. Escala para evaluar la resistencia al tizón temprano (*Alternaria solani*, Sor) en correspondencia con el grado de afectación promedio alcanzado, según Mayea (1989).

Grado de afectación expresado en (%)	Tipo de resistencia
0	Inmune.
10	Resistente.
20-40	Moderadamente resistente.
41-59	Moderadamente Susceptible.
60-80	Susceptible.
81-100	Muy Susceptible.

Análisis estadístico

El análisis estadístico empleado para comparar el comportamiento de los somaclones frente a la enfermedad respecto a la variedad original se realizó por medio de pruebas no paramétricas para K muestras independientes y un ANOVA multifactorial incluido en el paquete estadístico STATGRAFICS sobre Window versión 2.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se pudo comprobar la patogenicidad de la cepa de *Alternaria solani* Sor IBP As-4 la cual reprodujo los síntomas típicos de la enfermedad del tizón temprano en condiciones de campo. Los primeros daños aparecieron a los siete días después de efectuada la inoculación. Este resultado confirmó la posibilidad de utilizar en inoculaciones artificiales aislados virulentos que representen condiciones naturales, cuando la carga de inóculo natural sea débil y la enfermedad no se desarrolle con la intensidad requerida. Castellanos (1998) en un estudio de nocividad de este patógeno en tres cultivares de papa logró mediante el empleo de una suspensión conidial, observar diferencias apreciables entre los mismos. Colon *et al.* (1992), en condiciones de campo, después de utilizar un complejo de diferentes razas de *P. infestans* Mont de Bary de como inóculo artificial, logró diferenciar varios genotipos de *Solanum tuberosum* frente al tizón tardío. En este sentido Leiva (1998) consiguió reproducir la enfermedad de la Sigatoka negra en condiciones de invernadero en dos genotipos de bananos diferentes, utilizando cepas patogénicas de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. La inoculación artificial abre nuevas posibilidades para el empleo de aislados de *Alternaria solani* Sor obtenidos a partir de condiciones naturales que puedan crear una presión de inóculo adecuada para la selección de genotipos promisorios. La combinación de varias cepas en la elaboración de un inóculo con mayor espectro de agresividad permitiría realizar selecciones más eficientes.

El inóculo artificial de *Alternaria solani* Sor, permitió reproducir el comportamiento de los genotipos de resistencia conocida utilizados como testigos, lo cual evidenció que el método utilizado fue útil para evaluar la respuesta de los somaclones obtenidos por métodos

biotecnológicos en la búsqueda de resistencia a este importante patógeno. Además se observaron diferencias respecto al comportamiento de la enfermedad entre los somaclones utilizados en el experimento (Tabla 3). Los somaclones IBP-38 y IBP-93 tuvieron un comportamiento similar al testigo Desireé, alcanzando el mayor grado de afectación promedio con diferencias significativas respecto al resto. Los somaclones IBP-107, IBP-30, y IBP-101 se ubicaron en un grupo intermedio con similares valores promedios, aún cuando existieron diferencias estadísticas entre los mismos. El desarrollo de gran cantidad de síntomas, incluso en la variedad más resistente, sugiere la presencia de una elevada presión de inóculo en la inoculación artificial efectuada en condiciones de campo. El testigo *Solanum chacoense* se comportó como el más resistente seguido por el somaclon IBP-27 con una respuesta similar. Bouček-Mechiche *et al.* (2000) lograron obtener diferencias en varios cultivares de papa, empleando cuatro especies de *Streptomyces* reconocidas como agentes causales de la costra en Francia. Boiteux *et al.* (1993) obtuvieron diferencias en la selección de varios genotipos de papa, empleando como agente selectivo hojas enfermas como fondo de provocación.

El inóculo artificial demostró su utilidad en condiciones experimentales de campo, al apreciarse una adecuada homogeneidad en su distribución sobre la superficie foliar del material vegetal. Respecto a lo anterior se pudo constatar la uniformidad en la aparición y desarrollo de los síntomas en los somaclones estudiados. Por ello se deduce la importancia para el mejoramiento varietal de poseer métodos artificiales de inoculación del agente causal que sean reproducibles y de fácil aplicación. En estudios epidemiológicos se ha demostrado que la uniformidad y homogeneidad del inóculo permiten una mayor eficiencia en el desarrollo de las lesiones, con un peso importante en los componentes de la resistencia del hospedero (Oijen, 1992). El homogeneizado micelial se ha utilizado en varios cultivos en condiciones de invernadero como: la papa (Dita *et al.*, 1998), en el tomate (Bernal, 2001), en plátanos y bananos respecto a la enfermedad de la Sigatoka negra (Mourichon, 1987; Fouré, 1990; Mobambo, 1993; Fullerton, 1995). Los resultados obtenidos podrían permitir la reducción del tiempo de evaluación de los síntomas así como seleccionar genotipos durante todo el año.

Tabla 3. Comportamiento de diferentes somaclones de papa frente al tizón temprano, en condiciones de campo.

SOMACLONES	N ^o OBSERVACIONES.	MEDIAS DEL GRADO DE AFECTACIÓN± E.E
Testigo <i>Desireé</i>	120	7.27a±0.1300
L-27	157	5.00d±0.1136
L-107	158	6.35b±0.1132
L-30	150	5.61c±0.1162
L-38	118	7.53a±0.1311
L-101	156	5.72c±0.1140
L-93	127	7.40a±0.1263
Testigo <i>Solanum chacoense</i> .	120	4.69d±0.1300

Letras iguales no difieren estadísticamente para P<0.05.

CONCLUSIONES

Se comprobó la patogenicidad de la cepa de *Alternaria solani* Sor IBP-As-4 en condiciones de campo mediante la inoculación artificial efectuada.

Se logró un adecuado desarrollo de la enfermedad el tizón temprano a través de la inoculación artificial en condiciones de campo.

Mediante la inoculación artificial se pudieron evaluar las diferencias entre el comportamiento de los somaclones y los testigos empleados en su respuesta al tizón temprano.

REFERENCIAS

Bernal, CA (2001) Variabilidad cultural, patogénica y toxigénica de aislamientos de *Alternaria solani* (Ellis y Martín, Jones y Graut) en el cultivo del tomate. Tesis presentada para optar por el título académico de Master en Sanidad Vegetal, Mención Fitopatología. UNAH. La Habana

Boiteux, LS, Reifschneider, FJB, Fonseca, MEN y 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

Boiteux, LS y Reifschneider, FJ (1993) Identificao e caracterizacao da resistencia do tipo redutora da taxa de progresso do crestamento foliar (*Alternaria solani*) em clones e cultivares de batata. *Fitopatol. Bras.* 18: 87-90

Boucek-Mechiche, K, Pasco, C, Andrivon, D y Jouan, B (2000) Differences in host range, pathogenicity to potato cultivars and response to soil temperature among *Streptomyces* species causing common and netted scab in France. *Plant Pathology* 49: 3-11

Castellanos, L (1998) Nocividad de *Alternaria solani* Sor en tres cultivares de Papa. *Centro Agrícola* 2: 82-83

Castellanos, L (2000) Nocividad, epidemiología y manejabilidad 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

Colon, LT, MMJ y Budding DJ (1992) Field experiments on component of resistance to *Phytophthora infestans* MONT de Bary in wild *Solanum* species. *Plant Pathology* 40: 51-57

Dita, R, MA (1998) Estudios biológicos de *Alternaria solani* Sor, para el desarrollo de una metodología de selección *in vitro* en papa (*Solanum tuberosum*). Tesis de Maestría. IBP Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara.

Fouré, E, Mouliom, P, Mourichon, A, X (1990). Etude de la sensibilité variétale des bananiers et des plantains á *Mycosphaerelle*

fijiensis Morelet, au Camerum. Caractérisation de la resistance au champ de bananiers appartenant a deviers groups génétiques. *Fruits* 45: 339-345

Fullerton, RA y Olsen, TL (1995). Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of Black Sigatoka in banana and Plantain. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 3: 39-48

Herrera, IL (1990) Métodos para evaluar la resistencia de las plantas. En: Mayea, S (Ed) Inmunología vegetal, pp 151-167. Ministerio de Educación Superior. La Habana

Leiva, MM (1998) Estudios de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet para la diferenciación de genotipos de *Musa* spp en invernadero. Tesis de Grado. Universidad Central de las Villas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Santa Clara

Mayea, S, Perdomo, O (1990) Sistema de lucha integrado contra el tizón temprano (*Alternaria solani* Sor) en la papa (*Solanum tuberosum* Lin.). Trabajo de Diploma. Universidad Central de Las Villas. 70p.

Mayea, S, Herrera, L, Andreu, CM (1983) Enfermedades de las plantas cultivadas en Cuba. Editorial Pueblo y Educación. La Habana

Mobambo, K, N, Gauhl, F, Vuylsteke, D, Ortiz, R, Pasberg-Gaulh, Swennen, R (1993) Yield loss in plantain from Black Sigatoka leaf spot and field performance of resistance hybrids. *Field Crops. Research* 35: 35-42

Mourichon, X, Peter, D, Zapater, MF (1987) Inoculation experimentale de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, sur jeunes plantules de bananier issues de culture *in vitro*. *Fruit* 45: 195-198

Oijen, V, M (1992) Evaluating components of resistance to *Phytophthora infestans* MONT de Bary in potato, using mathematical models of general epidemics. *Netherlands, Journal of Plant Pathology* 50: 150-158

Piña, A, (1980) Estudio biológico y control de *Alternaria solani* en papa. Instituto de investigaciones de Sanidad Vegetal. MINAGRI. p. 23

Valdés, AE (2000) Resumen. La agricultura no cañera en Cuba. La producción de papa. XIX Congreso Latinoamericano de la papa. La Habana

Veitía, RN y Dita, RMA (1995) Estudio de los metabolitos producidos por *Alternaria alternata* Keissler sobre vitroplantas y callos de papa (*Solanum tuberosum* L). Tesis de Grado. Universidad Central de las Villas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Santa Clara

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. p. 53