EFECTIVIDAD DEL EMPLEO DE FILTRADOS DE Alternaria solani ELLIS Y MARTIN (JONES Y GROUT) EN LA SELECCION in vitro DE FORMAS RESISTENTES EN PAPA (Solanum tuberosum L.)

María M. Hernández[1], Britta Kowalski[2], P. Lorenzo[1] y Ursula Ortíz[1]
[1]Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas y [2]Universidad de Rostock, Alemania

Palabras claves: *Papa, Alternaria solani, plántulas, Solanum tuberosum, callo, toxicidad, cultivo in vitro, selección, genética*

ABSTRACT. Crude extracts from pure *A. solani* colonies under Fries' medium, incubated for 21 days, were applied at different concentrations to 30- day-old potato seedlings (Desirée cv.) and 4-month-old calluses (Baraka cv.), in order to prove its pathogenic power. Symptoms were observed in seedlings 24 hours after being placed in the filtrate. Coloration was directly related to symptom intensity. The effect of filtrate at high concentrations on sprout differentiation and growth from callus was proved, choosing 2:1 proportion for *in vitro* selection studies, since it achieves 15 % survival.

RESUMEN. Extractos crudos de colonias puras de *Alternaria solani* en el medio de Fries, de 21 días de incubación, fueron utilizados en diferentes concentraciones sobre plántulas de papa de 30 días, variedad Desirée y callos de cuatro meses de edad de la variedad Baraka, a fin de comprobar su poder patogénico. Los síntomas en las plántulas se manifestaron a partir de las 24 horas de colocadas en el filtrado. La coloración estuvo directamente relacionada con la intensidad de los síntomas. Se comprobó el efecto del filtrado a altas concentraciones sobre la diferenciación y el crecimiento de los brotes a partir de los callos, eligiéndose la proporción 2:1 para los trabajos de selección *in vitro*, ya que la misma produjo un 15 % de supervivencia.

INTRODUCCION

Wheeler y Luke (1955) fueron los primeros en emplear las fitotoxinas en el mejoramiento para la resistencia a enfermedades en plantas.

A partir de esa fecha, numerosos han sido los trabajos realizados en el mundo, utilizando toxinas producidas por patógenos de plantas en la selección de individuos resistentes, entre los que pueden citarse los llevados a cabo por Buther y Steiner (1972) en caña de azúcar, Gengenbach, Green y Donovan (1977) en maíz y Rayne y Yoder (1978) en este mismo cultivo.

En papa se han llevado a cabo trabajos encaminados a la obtención de formas resistentes a *P. infestans*, causante del tizón tardío, enfermedad que causa graves daños a las plantaciones en los países de clima templado, mediante el empleo de las sustancias producidas por dicho patógeno en la selección *in vitro* de individuos resistentes; entre ellos tenemos los realizados por Umaerus (1969), Umaerus y Lihnell (1976) y Matern, Strobel y Shepard (1978), siendo los más avanzados los realizados por Behnke (1979, 1980), habiéndose seleccionado plantas procedentes de callos cultivados en medio tóxico y comprobada su resistencia al patógeno.

Teniendo en cuenta la importancia de la enfermedad conocida como tizón temprano, producida por *Alternaria solani* y la susceptibilidad que en mayor o menor medida muestran las variedades de papa que comercialmente se plantan en nuestro país, se inició el presente trabajo, teniendo como objetivo primario comprobar el poder patogénico de los metabolitos producidos por el microorganismo sobre plántulas de papa, así como definir la proporción de filtrados apropiada para realizar la selección de material resistente.

MATERIALES Y METODOS

Para la comprobación del poder patogénico del filtrado, se tomó el obtenido a partir del cultivo de colonias puras de *A. solani*, Ellis y Martin (Jones y Grout) en el medio líquido de Fries, a los veintiún días de sembradas, mantenidas a una temperatura de 25 ^{0}C ± 2 ^{0}C y bajo condiciones de oscuridad.

A partir de este filtrado se realizaron cuatro soluciones como sigue:

1 parte de filtrado : 1 parte de agua destilada
1 parte de filtrado : 2 partes de agua destilada
1 parte de filtrado : 3 partes de agua destilada
1 parte de filtrado : 4 partes de agua destilada

Se utilizaron además del filtrado puro y un testigo con agua destilada, veinte plántulas obtenidas a partir de meristemos, de aproximadamente un mes de sembradas, de la variedad Desirée, que fueron colocadas en tubos de ensayo conteniendo 20 ml de las soluciones descritas anteriormente y cinco plantas control, por lo que se evaluaron un total de 105 plantas en el bioensayo.

Las evaluaciones se realizaron cada 12 horas a partir de las 24 horas hasta las 120 horas de montado el bioensayo. Las mismas consistieron en anotar el número de plántulas con síntomas.

Para la comprobación del efecto tóxico del filtrado sobre la regeneración de callos de papa, se utilizaron callos de cuatro meses de edad de la variedad Baraka, los cuales fueron colocados en medio de regeneración conteniendo distintas proporciones del filtrado crudo del patógeno:

filtrado		medio
1 parte	:	1 parte
1 parte	:	2 partes
1 parte	:	3 partes
2 partes	:	1 parte
3 partes	:	1 parte
4 partes	:	1 parte

En cada proporción se utilizaron 100 callos que se colocaron en erlenmeyers, a razón de 20 cada uno, con un tamaño aproximado de 0.5 cm^2.

Las evaluaciones se realizaron a partir de los doce días cada cuatro días, expresándose en porcentaje de callos con brotes.

RESULTADOS Y DISCUSION

Como se observa en la figura 1, las soluciones con mayor concentración de filtrado (33, 50 y 100 %) produjeron síntomas sobre las plantas a partir de las 24 horas de sometidas las mismas, aunque el número de plantas afectadas en este momento fue reducido(2 para 33 % y 3 para 50 y 100 %).

A partir de las 24 horas, el número de plantas con síntomas se incrementó hasta las 84 horas, momento a partir del cual se mantuvo casi constante.

Los síntomas se manifestaron primariamente como necrosis en los bordes de los foliolos, la cual iba en aumento del ápice al limbo en la medida en que transcurría el tiempo, hasta provocar la muerte total de la plántula alrededor de las 72 horas.

Es de destacar la aparición de lesiones circulares sobre el limbo foliar entre las nervaduras, de apariencia semejante a las causadas por *Alternaria solani* en plantas adultas en el campo; este fenómeno había sido informado por el autor (1987), trabajando con metabolitos producidos por *S. solani* Weber en plántulas de tomate.

Cuando la proporción del filtrado fue de 1:3 y 1:4, o sea, 25 y 20 %, los síntomas aparecieron más tardíamente como se observa en la figura, a las 36 y 48 horas respectivamente, siendo además el número de plantas con síntomas menor al final del ensayo y manifestándose éstos menos violentos que en las restantes concentraciones.

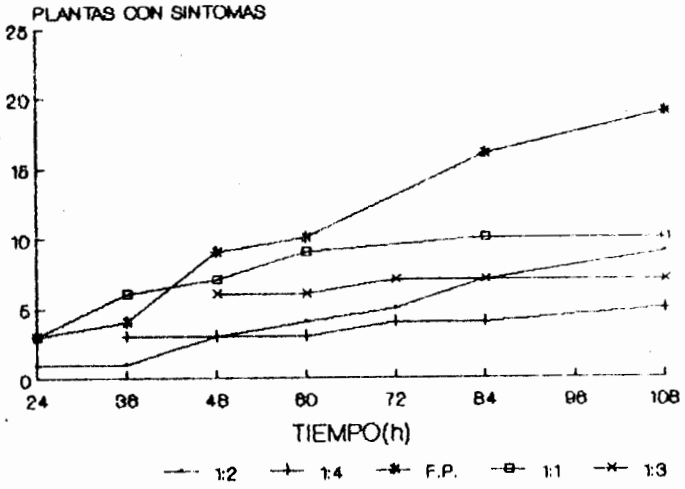

Figura 1. Efecto del filtrado sobre plántulas de papa

Los resultados obtenidos indican que existe una relación entre la concentración del filtrado y la velocidad de aparición e intensidad de los síntomas sobre las plántulas, sin embargo, se puso de manifiesto el poder patogénico de este filtrado aún en concentraciones bajas, lo cual abre una posibilidad para su empleo en la selección *in vitro* de formas resistentes mediante su adición al medio de cultivo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el bioensayo en plántulas, se procedió al montaje del bioensayo con callos de la variedad Baraka, cuyos resultados se brindan en la figura 2.

En esta se observa que a bajas concentraciones de filtrado (1:1; 1:2 y 1:3), el comportamiento en cuanto a la diferenciación fue un tanto errático aunque alto en todos los casos, destacándose el obtenido en 1:1, de más del 60 % de los callos con brotes a los 68 días.

La diferencia en relación con las mayores concentraciones fue marcada, puesto que para la proporción de 3:1, en la que mayor porcentaje de callos regenera, éste no sobrepasó el 25 % a los 52 días, llegando al final del bioensayo con un 20 % de callos con brotes.

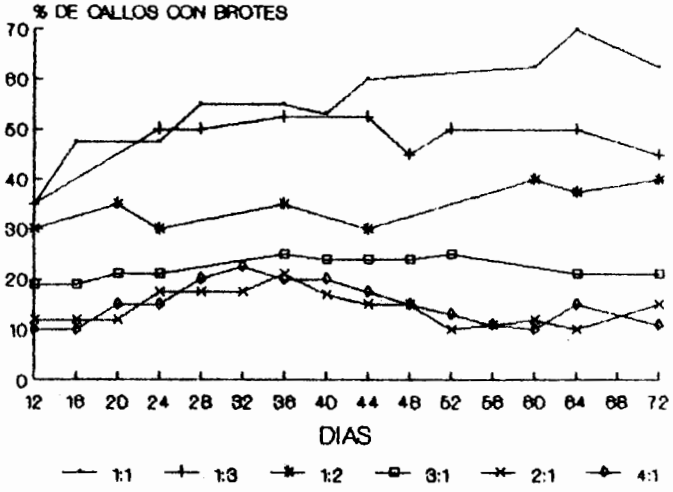

Figura 2. Comportamiento de la diferenciación en las distintas concentraciones

Como se aprecia en la figura, el porcentaje de callos regenerados con las tres proporciones mayores de filtrado (2:1; 3:1 y 4:1) no difirió marcadamente, siendo muy similar para 2:1 y 4:1, lográndose con la primera un 15 % de supervivencia, criterio que elegimos para la selección de la proporción de filtrado a utilizar, seleccionándose por tanto ésta para la aplicación masiva, teniendo en cuenta además, que en relación con 3:1 y 4:1 supone una menor cantidad de filtrado a emplear y, por tanto, mayor cantidad de material a probar en el medio tóxico, aumentando con ello la eficiencia en la selección.

El material seleccionado deberá pasar a ensayos de campo, a fin de comprobar su resistencia al patógeno.

BIBLIOGRAFIA

Behnke, M. Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of *Phytophthora infestans* and regeneration of resistant plants. Theor. Appl. Genet. (Heidelberg)55:69–71, 1979.

Behnke, M. General resistance to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrates of *P. infestans*. Theor. Appl. Genet. (Heidelberg)56:151–152, 1980.

Buther, R. S. y G. W. Steiner. Use of helminthosporoside to select sugarcane seedlings resistant to eye spot disease. Phytopathology (Nueva York)62:466–476, 1972.

Gengenbach, B. G.; C. E. Green y C. M. Donovan. Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. (Washington)74:5113–5117, 1977

Matern, U.; G. Strobel y J. Shepard. Reaction to phytotoxin in a potato population derived from mesophyll protoplasts. Proc. Nat. Acad. Sci. (Washington)75:4935–4939, 1978.

Payne, G. A. y O. C. Yoder. Effect of the nuclear genome of corn on sensitivity to *Helminthosporium maydis* race T–Toxin and on susceptibility to *H. Maydis* race *T. Phytopathology* (Nueva York)68:331–337, 1978.

Umaerus, U. Studies on field resistance to *Phytophthora infestans*. A method of screening young potato seedlings for field resistance to *P. infestans*. Z. Pflanz. (Berlín)61:167–194, 1969.

Umaerus, V. y D. Lihnell. A laboratory method for measuring the degree of attack by *P. infestans*. Potato Res. (Wageningen)19:91–107, 1976.

Wheeler, H. E. y H. H. Luke. Mass screening for disease resistant mutants in oats. Science (Washington)122:1229, 1955.

Recibido: 29 de enero de 1990
Aceptado: 16 de febrero de 1990

VIII

SEMINARIO CIENTIFICO

18,19 y 20 de noviembre de 1992