

SELECCIÓN *In Vitro* DE FORMAS TOLERANTES DE PAPA (*Solanum tuberosum*, L.) A FILTRADOS DE *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary

María M. Hernández[✉], Ana Estévez, Olivia Moré, María E. González, Ramona Márquez, J. G. Castillo y Ursula Ortiz

ABSTRACT. Several experiments were carried out to determine the pathogenic action of *P. infestans* (Mont.) de Bary filtrates on different potato organs and confirm their possible use on *in vitro* selection of new tolerant forms to this pathogen. Some detached leaves, as well as clonal pollen with different response to pathogen in the field, which were previously exposed to filtrate action, were used. It was found that the filtrate had a specific host action, in other words, clonal response to its action depended on their pathogenic resistance, that is why the filtrate could be used on the selection of resistant forms. Callus shoots under filtrate action were selected and finally taken to the field, where its pathogen tolerance was evaluated. The process included the evaluation of *Alternaria solani* occurrence, the most important species after *Phytophthora infestans*, in order to verify the superiority of the somaclonal tolerance degree obtained over that of the donor plant in general terms. The donor plant used was var. Desirée due to its good tuber quality and yield, even though it is sensible to *P. infestans* blight. Results showed that, in general, clones were superior to the donor plant, not only in terms of pathogen resistance but also concerning the main agricultural characters and yield. This issue arises great expectations for using these methods on crop breeding.

RESUMEN. Se realizaron una serie de experimentos para determinar la acción patogénica de filtrados de *P. infestans* (Mont.) de Bary, sobre diferentes órganos de papa y verificar si éstos podían ser empleados en la selección *in vitro* de formas tolerantes a este patógeno. Se emplearon hojas desprendidas, así como el polen de clones con diferente respuesta al patógeno en el campo, los cuales fueron sometidos a la acción del filtrado y se encontró que éste poseía una acción hospedero específica, o sea, los clones respondieron a su acción en dependencia de su resistencia al patógeno, por lo cual este podía ser usado para la selección de formas resistentes. Los filtrados fueron empleados para seleccionar brotes de callos sometidos a su acción y estos fueron llevados finalmente al campo para evaluar su tolerancia frente al patógeno, incluyéndose la evaluación de la incidencia de *Alternaria solani*, que es la más importante después de *Phytophthora infestans*, para comprobar si los somaclones obtenidos presentaban un nivel de tolerancia superior al donante en sentido general. El donante empleado fue la var Desirée, que presenta buenas características en cuanto a rendimiento y calidad de los tubérculos, pero es susceptible al tizón causado por *P. infestans*. Los resultados demostraron que los clones superaron al donante de manera general, no sólo en cuanto a resistencia a ambos patógenos, sino en los principales caracteres agronómicos y el rendimiento, lo cual abre grandes perspectivas para el empleo de estas técnicas en el mejoramiento genético del cultivo.

Key words: pathogenicity, *Phytophthora infestans*, potatoes, *Solanum tuberosum*, selection, plant breeding

Palabras clave: patogenicidad, *Phytophthora infestans*, papa, *Solanum tuberosum*, selección, fitomejoramiento

INTRODUCCIÓN

La papa es uno de los productos más importantes del país y sin duda uno de los de mayor significación en la alimentación mundial, ya que junto a la yuca y el camote, contribuye a satisfacer los requerimientos energéticos de más de 2 000 millones de personas (1).

En Cuba, la papa representa un renglón fundamental en cuanto a producción agrícola se refiere, estando priorizada la atención a este cultivo, debido a los rendimientos por área que proporciona y al hábito de consumo de la población; sin embargo, las condiciones edafoclimáticas cubanas resultan adversas para el desarrollo óptimo del cultivo, debido a las altas temperaturas, la elevada humedad relativa, abundantes precipitaciones y otros factores que, además de afectar la fisiología de la planta, favorecen el desarrollo de un número elevado de plagas y enfermedades que constituyen serios problemas para la producción y a los cuales es necesario dedicar enormes sumas en moneda libremente convertible por concepto de plaguicidas para su control, el cual, por otra parte, no resulta siempre efectivo.

Dra.C. María M. Hernández y Dra.C. Ana Estévez, Investigadoras Titulares; Dra.C. María E. González, Investigador Auxiliar; Ms.C. Olivia Moré y Ms.C. J. G. Castillo, Investigadores, Ramona Márquez y Ursula Ortiz, Especialistas del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, CP 32 700.

✉ mhdez@inca.edu.cu

Si bien en nuestro país se desarrolla actualmente un programa de mejoramiento de papa por métodos clásicos, este está encaminado principalmente a caracteres agronómicos relacionados con el rendimiento, ya que los genes de resistencia a las enfermedades se encuentran presentes en especies silvestres del género, lo cual haría muy largos los programas para su introducción en las nuevas variedades.

Basados en esta problemática y considerando el avance alcanzado por nuestro país en la aplicación de las técnicas de la Biotecnología para el mejoramiento genético de los cultivos, se ejecutaron las investigaciones que a continuación describimos, con el objetivo de emplear los metabolitos producidos por *P. infestans* en la selección *in vitro* de somaclones de papa var. Desirée tolerantes a este patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de colonias de *P. infestans* provenientes de cultivos monospóricos correspondientes al aislado A1 del patógeno, empleando la metodología propuesta por Urrea (2), se obtuvieron los filtrados crudos en el medio empleado por el mismo autor. La incubación se realizó en oscuridad a 25±2 °C durante 21 días.

Se realizaron bioensayos en hojas desprendidas provenientes de plantas de 30 días de las variedades Desirée (medianamente resistente) y Red Pontiac (altamente susceptible), así como en folíolos separados de ambas variedades. Se empleó el método de inmersión del peciolo de las hojas en el filtrado puro contenido en tubos de cultivo y en el caso de los folíolos, estos se asperjaron con el filtrado y se colocaron en una cámara húmeda, consistente en una placa de Petri con papel de filtro humedecido, evaluándose los daños a las 24 y 48 horas posteriores.

A fin de establecer una metodología de *screening* a nivel celular, se empleó el polen de tres especies silvestres del género *Solanum* y dos clones provenientes del CIP, los cuales fueron seleccionados sobre la base de los diferentes niveles de resistencia al patógeno que estos poseen, de acuerdo a las evaluaciones realizadas en campo. Los granos de polen fueron colocados en el medio para la germinación (3) y la tinción se realizó a las 24 horas, con la metodología propuesta por estos mismos autores. Se evaluaron 200 granos por tratamiento, empleándose un medio compuesto por una parte de filtrado crudo y una parte de medio de germinación y un control con medio de germinación solamente. Se emplearon cuatro repeticiones por tratamiento.

A partir de la regeneración de callos en un medio que contenía la toxina del patógeno como agente selectivo, en una proporción de 2:1 de medio y extracto respectivamente, fueron plantados en campo, luego de una generación bajo aislador a fin de obtener el material de plantación, 14 clones, con un diseño aumentado modificado (4), que consistió en una parcela formada por surcos de 10 plantas de cada clon y el testigo (Desirée) intercalado al azar dentro de ella. Los clones fueron evaluados al igual que el resto del germoplasma de papa.

Las variables evaluadas fueron:

- * altura de la planta (cm)
 - * número de tallos
 - * número de entrenudos
 - * número de tubérculos
 - * peso de los tubérculos por planta (g)
 - * color de los tubérculos
- } Estas variables se evaluaron a los 65 días de la plantación
- } Estas variables se evaluaron en el momento de la cosecha

Teniendo en cuenta que el tizón temprano (*A. solani*) es una de las enfermedades que más severos daños causa a la papa en nuestras condiciones, conjuntamente con el tardío (*P. infestans*), se evaluó la incidencia de ambos patógenos.

La incidencia de *Alternaria solani* se evaluó a los 65 días de la plantación, según escala de nueve grados (5) y el *P. infestans* se evaluó en el momento de la aparición de los síntomas (6). La clasificación de los clones atendiendo a la resistencia se realizó según el siguiente criterio:

Alternaria solani

Valor de la escala	Clasificación.
1	Inmune
2 y 3	Muy resistente
4 y 5	Resistente
6 y 7	Susceptible
8 y 9	Muy susceptible

Phytophthora infestans

Valor (%)	Clasificación
0	Inmune
De 0.1 a 1 %	Muy resistente
De 2 a 25 %	Resistentes
De 26 a 50 %	Susceptibles
De 51 a 100 %	Muy susceptibles.

Los datos fueron procesados estadísticamente según ANOVA de clasificación simple desbalanceado y las medias se docimaron según prueba de rangos múltiples de Duncan en caso de significación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de los bioensayos realizados. A las 24 horas de haberse sometido las hojas a la acción del filtrado, se apreciaron síntomas de marchitez y clorosis en ellas, siendo éstos más marcados en la variedad Red Pontiac; este efecto pudo apreciarse más claramente a las 48 horas, en que las hojas de dicha variedad estaban casi completamente destruidas, mostrando síntomas muy semejantes a los ocasionados por el patógeno sobre plantas en el campo, mientras que Desirée, presentada como medianamente resistente, mostró menor intensidad de daños sobre el follaje. El bioensayo realizado con los folíolos separados no mostró resultados marcados en cuanto a diferencia varietal o nivel de daños expuestos, lo que pudiera estar determinado por la técnica empleada en este caso, debido a que estos se deterioraron rápidamente, no pudiendo evaluarse adecuadamente los daños ocasionados por el patógeno sobre ellos.

Evaluación de las afectaciones en el polen. La Tabla I presenta a continuación estos datos.

Tabla I. Daños producidos por el filtrado sobre la germinación del polen en especies y variedades de papa

Especie o variedad	Germinación del polen (%)	
	Medio normal	Medio tóxico
<i>S. chacoense</i>	70.5	39
<i>S. saltense</i>	42.8	2.3
<i>S. simplicifolium</i>	17.6	0
Clon 1-88-95	15.0	3.3
Clon CIP-143	12.3	0

Como puede observarse, hubo una respuesta diferenciada de los genotipos ante la acción del filtrado y aún cuando los porcentajes de germinación en algunos casos fueron bajos, se aprecian daños diferentes. Como era de esperar, la especie *S. chacoense* presentó los menores niveles de afectación, siendo esta la única resistente al patógeno, mientras que *S. simplicifolium* muy susceptible y el clon CIP-143, que presentó uno de los peores comportamientos en cuanto a resistencia en el campo, sufrieron la mayor afectación en la germinación.

Al evaluar la calidad del polen en variedades cultivadas de papa, algunos autores (7) encontraron porcentajes de viabilidad entre 65 y 13.53 %, valores que están en el entorno de los encontrados por nosotros en especies silvestres del género *Solanum*.

Estudios relacionados con el empleo de los metabolitos producidos por *P. infestans* para la diferenciación de genotipos de papa con diferente grado de resistencia al patógeno, han sido desarrollados (2) y empleados en plántulas obtenidas *in vitro* y en somaclones a partir de callos cultivados en medio tóxico, encontrando una respuesta diferenciada con el empleo de una concentración de filtrado de 1:1.2.

Igualmente, al evaluar diferentes clones de caña de azúcar frente a los filtrados de *U. scitaminea*, se encontró que éstos producían en las plántulas síntomas semejantes a los causados por el patógeno (8).

Numerosos autores han empleado metabolitos producidos por *P. infestans* para la evaluación de la tolerancia en especies vegetales; así, estos han sido empleados sobre el crecimiento de yemas de nudos de papa (9) y se estudió el daño producido por estos sobre la pared celular de raíces de papa (10).

Se han empleado filtrados de *A. solani* y *A. alternata* en vitroplantas de papa, logrando diferenciar niveles de tolerancia a estos (11).

Al realizar evaluaciones de calidad del polen en clones y variedades de papa (12), se encontraron valores entre 6.00 y 78.25 % de viabilidad, lo que corrobora la alta variabilidad en el comportamiento de los genotipos para este carácter.

Evaluación de los clones en campo. Como se observa en la Tabla II, se detectaron diferencias significativas para todos los caracteres agronómicos evaluados, lo cual evidencia la variabilidad creada por la técnica empleada en la obtención

de los clones; en relación con las variables del rendimiento, se destacaron los clones 12, 9, 13 y 1, que resultaron superiores al resto, con diferencias altamente significativas con el testigo, presentando los clones 12 y 9 un promedio de siete tubérculos por planta, sin diferencia con los clones 13 y 1 que presentaron 6 y 5.6 tubérculos por planta respectivamente.

Tabla II. Resultado de la evaluación morfoagronómica de los clones

Clon	Altura (cm)	Número de tallos	Número de entrenudos	Número de tubérculos.	Peso de tubérculos/planta (g)
11	38.0 a	3.0 a	6.0 bcd	3.0 cd	100 cde
10	37.0 a	2.0 abc	8.0 abc	3.0 cd	100 cde
8	30.0 ab	2.0 abc	8.0 abc	3.0 cd	200 bc
5	29.0 abc	2.0 abc	9.0 ab	4.0 bcd	200 bc
1	28.0 bc	2.3 abc	11.0 a	5.67 abc	330 ab
12	25.67 bcd	2.33 abc	6.0 bcd	7.0 a	460 a
7	24.0 bcd	1.0 bc	8.0 abc	4.0 bcd	100 cde
9	20.0 bcde	3.0 a	9.0 ab	7.0 a	350 ab
16	15.5 cdef	1.0 bc	4.5 cd	3.5 bcd	150 bcde
3	15.0 def	1.0 c	9.0 ab	3.0 cd	10 de
Desirée	10.3 ef	1.3 bc	5.0 cd	1.6 d	20 cde
4	10.0 ef	1.0 c	4.0 d	4.0 bcd	10 de
13	9.0 ef	3.0 a	5.0 cd	6.0 ab	500 a
6	9.0 ef	3.0 a	5.0 cd	5.5 abc	60 cde
2	4.5 f	2.5 ab	4.0 d	2.0 d	10 de
Esx	0.98**	0.30**	0.58**	0.48**	3.60**

El resto de los clones no difirieron significativamente del testigo para este carácter, aunque este presentó la menor media (1.67).

El clon 6 presentó un número de tubérculos por planta bastante elevado (5.5); sin embargo, los tubérculos fueron muy pequeños, con un peso promedio de 10 g aproximadamente.

En cuanto al peso de los tubérculos por planta, los clones mencionados mantuvieron la superioridad, presentando valores entre 500 y 330 g, siendo 13 y 12 los mejores clones en cuanto a este carácter, con valores de 500 y 460 g respectivamente, sin diferencia significativa con los clones 9 y 1.

La variedad testigo (Desirée) presentó una media para este carácter de 20 g, quedando entre los últimos lugares, estando solamente los clones 2, 4 y 3 por debajo de ella, aunque sin diferir significativamente.

Como puede observarse, de manera general, el rendimiento por planta fue bajo, lo cual pudo estar condicionado por la naturaleza del material empleado para la plantación, ya que este consistió en minitubérculos provenientes de plantas obtenidas *in vitro* y se conoce la influencia de este proceso sobre el comportamiento de las plantas obtenidas.

Sin embargo, rendimientos similares a los encontrados en el presente trabajo, fueron informados por otros autores (4), al evaluar progenies de cruces intraespecíficos de papa, estando las medias de los caracteres evaluados por ellos en correspondencia con los obtenidos por nosotros.

Evaluación de la incidencia de enfermedades. En cuanto a la incidencia de las enfermedades evaluadas (Tabla III), se apreció claramente la superioridad de los clones con respecto al donante, ya que en ambas este presentó las

mayores medias, difiriendo significativamente del resto en el caso de *Phytophthora* (tizón tardío), con una media de 90 % de afectación, mientras que para *Alternaria* (tizón temprano), también presentó el mayor valor de la escala conjuntamente con otros dos clones (7 y 10).

Tabla III. Resultado de las evaluaciones de la incidencia de las enfermedades

Clon	<i>Alternaria solani</i>		<i>Phytophthora infestans</i>	
15 (Testigo)	6 a	S	90 a	M S
1	4 bc	R	75 b	M S
4	5 ab	R	75 b	M S
5	3 bc	M R	75 b	M S
9	4 bc	R	75 b	M S
11	5 ab	R	75 b	M S
13	5 ab	R	75 b	M S
2	5 ab	R	50 c	S
3	5 ab	R	50 c	S
6	5 ab	R	50 c	S
7	6 a	S	50 c	S
10	6 a	S	50 c	S
16	4 bc	R	50 c	S
8	4 bc	R	25 d	R
12	4 bc	R	25 d	R

Como se puso de manifiesto en este trabajo, la técnica empleada permitió incrementar el nivel de tolerancia a ambas enfermedades, resultando los clones obtenidos con menos afectación por ambas enfermedades que el donante empleado (Desirée), lo cual posee un gran valor, teniendo en cuenta que el tizón tardío es la enfermedad fungosa más importante de la papa en todo el mundo (13).

Es de destacar el comportamiento de los clones 1, 9, 16, 8, y 12 en relación con la resistencia mostrada ante *A. solani*, y especialmente el clon 5 que resultó muy resistente ante dicha enfermedad. Estos resultados pudieran estar relacionados con el papel de los metabolitos presentes en los extractos empleados en la elicitación de reacciones de resistencia frente a otros patógenos, lo cual ha sido referido por otros autores (14).

Los clones 8 y 12 resultaron también resistentes a *P. infestans*, con un valor de afectación de 25 %, por lo cual deben ser tomados en consideración para futuros trabajos de mejoramiento en este sentido.

El trabajo de mejoramiento con vistas al incremento de la resistencia a estos patógenos, ha estado basado en programas de cruzamiento y selección fundamentalmente (15), en los cuales la obtención de una variedad resistente se lleva a cabo en alrededor de 10 a 13 años, aunque en la actualidad este tiempo se ha visto reducido con el empleo de las técnicas biotecnológicas (16). Es importante señalar que el comportamiento de estos clones ante las enfermedades estudiadas debe continuar observándose, ya que este pudiera variar con los sucesivos ciclos de reproducción y en los diferentes años, por lo que estos resultados no deben tomarse como definitivos; sin embargo, resultan válidos desde el punto de vista de que son los primeros somaclones evaluados en el campo a partir de la metodología propuesta, los cuales muestra-

ron superioridad en relación con el donante Desirée en cuanto a la resistencia al tizón tardío, lo cual abre nuevas posibilidades desde el punto de vista del mejoramiento para la resistencia a dicha enfermedad.

REFERENCIAS

- Oyarzun, P. J. La Papa. Una panorámica del desarrollo actual. *Cultivos Controlados*, 2000, vol. 2, no. 5, p. 13-16.
- Urrea, A. Estudio de parámetros para la selección *in vitro* en la mejora de la resistencia a *P. infestans* en papa var. Diacol Capiro. [Tesis de Maestría], IBP. 1998.
- González, M. E.; Estévez, A.; Castillo, J. y Moré, O. Métodos para la evaluación de la calidad del polen en papa (*S. tuberosum* L.). *Cult. Trop.*, 1999, vol. 20, no. 2, p. 63-67.
- González, M. E. Mejoramiento por hibridación de la papa (*S. tuberosum* L.) en Cuba. [Tesis de grado], INCA. 1998.
- Horsfall, J. G. y Barrat, R.W. An improved system for measuring plant diseases. *Phytopat.*, 1945, vol. 35, p. 655.
- Mijailova, P.; Straka, F.; Apostolov, I. Pronóstico y señalización en la protección de plantas. Sofía Zemizdat. 1982.
- Salomón, J. L. Estudio y selección de progenies híbridas de semilla sexual de papa (*S. tuberosum* L.) en Cuba. [Tesis de Maestría], INCA. 2001.
- Gómez, R. Selección *in vitro* a la enfermedad del carbón (*Ustilago scitaminea*, Syd.) de la caña de azúcar. [Tesis de grado], IBP. 1996.
- Crino, P.; Penuela, R.; Martino, R.; Sonino, A. y Angora, C. *In vitro* reaction of potato micronode culture filtrates of *P. infestans*. *Phytotoxins and Plant Pathogenesis*, 1989, vol. 27, p. 441-442.
- Galal, A. A.; Barna, S. y Ersek, T. Use of toxic substances from *P. infestans* in screening for late blight resistance of potatoes. *Acta Phytopathologica y Entomológica*, 1991, vol. 26, no. 3-4, p. 263-270.
- Veitía, N. y Dita, M. A. Estudio de los metabolitos producidos por *Alternaria alternata* sobre vitroplantas y callos de papa. [Tesis de Diploma], 1995, 61 p.
- Castillo, J. G. Estimación de la variabilidad genética en poblaciones híbridas de papa (*S. tuberosum* L.). [Tesis de Maestría]. INCA. 2000.
- Haler, M. The late blight. Worldwide of The Netherlands Potato Consultive. Potato Leaves. *NIVAA*, 1998, vol. 4, no. 2, p. 1-3 p.
- Hammond-Kosack, K. y Jones, D. J. J. Responses to plant pathogens. *Biochemistry and molecular biology of plants*. 2000. 1156 p.
- Fernández-Northcote, E. N.; Plata, G. Bases para una resistencia duradera al tizón mediante la utilización de cultivares de papa con genes R vencidos dentro de un manejo integrado. En: Reunión ALAP. Proc. (18:1998: Bolivia), 1998. p. 83-85.
- Veitía, N.; García, L.; Bermúdez, I.; Pérez, J. N.; Acosta, M.; Padrón, Y.; García, L. y Romero, C. Comportamiento de los componentes del rendimiento en somaclones y variedades de papa (*S. tuberosum* L.). En: Taller Nacional de Prod. de Papa en los Trópicos. Compendio de Exposiciones (4:2001:La Habana), 2001. p. 68-70.

Recibido: 22 de noviembre del 2001

Aceptado: 4 de septiembre del 2002