

## 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* L.)

STUDY OF PARAMETERS FOR THE SELECTION *IN VITRO* USING CULTURE FILTRATES FROM *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary TO INDUCE RESISTANCE RESPONSE IN POTATOS (*Solanum tuberosum* L.)

Aura Inés Urrea<sup>1</sup>, Rafael Gómez<sup>2</sup>, Pedro A. Orellana<sup>2</sup>, Lidcay Herrera<sup>2</sup>, Novise Veitfa<sup>2</sup> y Yelenis Alvarado<sup>2</sup>

### Resumen

En la incidencia de enfermedades sobre el cultivo de la papa, el tizón tardío causado por el hongo *Phytophthora infestans* es notablemente marcado en el ámbito mundial. En este trabajo se realizaron experimentos dirigidos a evaluar diferentes parámetros para la selección *in vitro* de plántulas de papa empleando el medio derivado del hongo y a estudiar la posibilidad de usar esta metodología como herramienta para la selección de resistencia en clones nuevos de papa.

La cepa del hongo empleada fue caracterizada con los genes de virulencia 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11. Se evaluaron para este patógeno las condiciones de crecimiento en cultivo líquido (se estudió la composición del medio y el tiempo de incubación) y para el filtrado del hongo la termoestabilidad y la concentración apropiada para inducir la respuesta de resistencia. El efecto fitotóxico del filtrado del hongo se determinó mediante el método de inmersión de raíces de vitropiantas de las variedades Diacol Monserrate y Diacol Capiro, reportadas como resistente y susceptible, respectivamente.

De acuerdo con los resultados el mejor crecimiento del hongo se alcanzó con el medio MS modificado según Dieter (1986), a los veinte días de cultivo, 21 °C y oscuridad constante. Se corroboró además el carácter termoestable del medio derivado y se encontró que la dilución adecuada para la selección de las vitropiantas fue 47 ml/100 ml del cultivo filtrado concentrado veinte veces, la cual permitió elaborar una escala de evaluación de acuerdo con las afecciones en las variedades de papa estudiadas.

**Palabras clave:** *Phytophthora infestans*, tizón tardío, *Solanum tuberosum*, papa, selección *in vitro*, cultivo filtrado.

### Abstract

In the incidence of disease on the potato crop, the late blight caused by the fungus *Phytophthora infestans* is notably marked in the world. In this work we carried out experiments to evaluate the parameters for the *in vitro* selection of potato seedlings using the culture filtrate of the pathogen and it was evaluated to study the possibility of using this methodology as a tool to the selection of resistant in new clones of potato.

The strain of the fungus with 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11 genes of virulence were characterized. For this pathogen we evaluated the conditions of growing in liquid culture (we studied the composition of the medium and incubation time) and for the culture filtrate we analyzed the thermostability and adequate concentration to induce response of resistance. The fitotoxic effect of the culture filtrate was determined using roots immersion method from vitroplants of two varieties of potatoes, the Diacol Capiro which is reported susceptible and Diacol Monserrate which is resistant.

According to the result the best fungi growth was reached with MS medium modified by Dieter (1986), at the 20th day after culture, under 21 °C and constant darkness. We ascertained the thermostable character in the culture filtrate and it was found that the best dilution for the selection was 47 ml/100 ml of the culture filtrate concentrated twenty times, which allowed us to elaborate a scale of evaluations according with the affections of the potato varieties that we studied.

**Key words:** *Phytophthora infestans*, late blight, *Solanum tuberosum*, potato, *in vitro* selection, culture filtrate.

Recibido: mayo de 1999; aprobado para publicación: noviembre de 1999.

<sup>1</sup> Departamento de Biología, Universidad de Antioquia, Apartado 1226, Medellín, Colombia. E-mail: aurea@matematicas.udea.edu.co.

<sup>2</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de las Villas, carretera Camajuaní, km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. E-mail: kosky@ibp.edu.cu.

## INTRODUCCIÓN

*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary es uno de los patógenos más devastadores de la papa en el mundo. Durante los últimos años las investigaciones en el área biotecnológica se han orientado a la búsqueda de plantas resistentes mediante la selección a nivel de callos, células, protoplastos, microsporas, etc. (Behnke, 1979; Dieter, 1986; Möllers et al., 1992), tanto con las toxinas como con el medio derivado del hongo, producidos en cultivo líquido.

Hay dos prerrequisitos para la selección exitosa *in vitro*: un efectivo agente selectivo y un sistema confiable de regeneración. Varias especies de *Phytophthora* han mostrado secretar metabolitos fitotóxicos en cultivo (Behnke, 1979, 1980; Plich y Rudnicki, 1979; Deaton et al., 1982; Stolle y Shöber, 1984, 1985a) y han sido empleados exitosamente en la selección de genotipos. Entre los compuestos encontrados en el medio derivado del hongo hay proteínas (elicitoras), carbohidratos (Protsenko et al., 1986) y antígenos extracelulares (Protsenko, 1987); además se ha identificado una toxina de un peso molecular de 20.000, negativamente cargada, comparable con la toxina excretada del tejido infectado (Stolle y Shöber, 1985a). Estos estudios han ampliado el entendimiento de la interacción planta-patógeno en los aspectos bioquímico y molecular y han proporcionado una valiosa herramienta en los esquemas de mejoramiento *in vitro*.

La variedad de papa Diacol Capiro es una de las más cultivadas en las zonas paperas de Colombia, tanto para el consumo local como por su aceptación para el procesamiento industrial, pero es altamente susceptible al tizón tardío. En el presente trabajo se planteó como objetivo estandarizar una metodología de selección *in vitro* para la resistencia a este patógeno en vitroplantas para posteriormente utilizarla en los programas de mejoramiento a *P. infestans*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Los experimentos se realizaron con vitroplantas de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) con diferentes grados de resistencia al ataque del hongo *P. infestans*. La variedad Diacol Capiro altamente susceptible y la variedad Diacol Monserrate con resistencia de campo.

Las vitroplantas de papa se propagaron asépticamente por cortes de los nudos y ápices en frascos con 30 ml de medio de cultivo, el cual está compuesto por las sales MS (Murashige y Skoog, 1962), tiamina (0.4 mg/l), mioinositol (100 mg/l) y sacarosa (30 g/l). El pH fue ajustado a 5.7 antes de la esterilización. Se realizaron subcultivos cada veinticinco a treinta días. Las vitroplantas se mantuvieron en cámaras de crecimiento a una temperatura de 22 °C, 100 µE/m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> y un fotoperiodo de dieciséis horas luz.

### *Phytophthora infestans*

La cepa de *Phytophthora infestans* utilizada para el presente trabajo fue donada por el Instituto de Sanidad Vegetal (INISAV) del MINAGRI, de Cuba. El aislado se obtuvo de la variedad de papa Baraka en mayo de 1994 y se identificó su grupo de cruzamiento como A1. La caracterización para determinar los genes de virulencia se realizó siguiendo la metodología descrita por Jaramillo et al. (1997), y se encontró la complejidad R1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 y 11. Esta cepa se mantuvo en un medio de cultivo compuesto por jugo de verduras V-8 (200 ml/l), carbonato de calcio (2.0 g/l), agar (20 g/l) y a un pH de 5.6, bajo condiciones de oscuridad y 20 °C de temperatura. Las transferencias a medio fresco se realizaron cada veinticinco a treinta días. Para conservar las características virulentas, la cepa se reactivó cada ocho semanas inoculando discos de tubérculos de la variedad Bintje, altamente susceptible al hongo, o asperjando hojas y vitroplantas compatibles con una solución de zoosporas de acuerdo con la metodología descrita por Rohwer et al. (1987).

## Obtención del extracto crudo del hongo

**Estudio del medio de cultivo y tiempos de incubación para la producción de los metabolitos de *Phytophthora infestans*.** Se estudiaron dos medios de cultivo reportados en la literatura: el jugo V-8 y el MS modificado según Dieter (1986). El hongo fue sembrado a partir de cuatro discos de micelio de 1 cm<sup>2</sup> en Erlenmeyers de 1.000 ml con 400 ml de medio de cultivo y se mantuvo a 20 °C y oscuridad constante. Después del tiempo de incubación se colectó el micelio formado usando una malla fina y luego el cultivo filtrado se pasó a través de papel Whatman No. 4 para eliminar restos de micelio. El filtrado se concentró veinte veces por rotoevaporación al vacío a 40 °C. La conservación se realizó a -20 °C en una ultracongeladora Koska modelo UCV- 40560.

Se comparó el efecto patogénico de los extractos crudos de *P. infestans* y se evaluaron diferentes tiempos de incubación (diez, veinte y treinta días) sobre vitroplantas de treinta días de edad de las variedades de papa Diacol Capiro y Diacol Monserrate. El pH del extracto crudo fue ajustado a 5.7 antes de proceder a la esterilización por filtración, para lo cual se pasó a través de un filtro de porcelana (25-4 mesh) estéril. Se evaluaron los siguientes tratamientos: 1) medio de cultivo sin inocular, 2) agua destilada estéril, 3) cultivo filtrado sin concentrar, 4) cultivo filtrado concentrado y diluido a la mitad.

Las vitroplantas se pusieron en tubos de ensayo (200 x 20 mm) con 5 ml de solución. Se utilizaron veinte tubos por tratamiento. La estimación del efecto patogénico se registró teniendo en cuenta la aparición y las características de los síntomas del tizón, el número de hojas y los tallos afectados en cada plántula y por cada tratamiento.

**Caracterización del cultivo filtrado de *Phytophthora infestans*.** Se determinó el consumo de azúcar, el pH y la absorbancia del filtrado crudo del hongo, además del peso fresco y seco del micelio obtenido a los diez, veinte y treinta días de cultivo en el medio de liberación de los metabolitos. El contenido de azúcares

reductores se determinó por el método de Fehling (1970) y las medidas de absorbancia se realizaron en un fotocolorímetro Espekol a una longitud de onda predeterminada de 320 nm. El peso seco se obtuvo después de someter el micelio de *P. infestans* colectado a una temperatura de 60 °C durante 24 a 48 horas.

Para evaluar el carácter termoestable del filtrado del hongo se comparó el grado de afección del cultivo filtrado, esterilizado en autoclave y por filtración sobre vitroplantas de las variedades en estudio. Para ello se siguió el mismo protocolo y tratamientos descritos en el epígrafe "estudio del medio de cultivo y tiempos de incubación para la producción de los metabolitos". El filtrado crudo fue sometido al proceso de esterilización por calor húmedo en autoclave durante veinte minutos a 120 °C y 1.2 kg/cm<sup>2</sup> de presión. Para la esterilización por filtración se hizo pasar el cultivo filtrado a través de un filtro de membrana de 0.22 µm.

## Determinación de la concentración óptima del filtrado crudo de *Phytophthora infestans* en la diferenciación de genotipos en vitroplantas

Se determinó el efecto patogénico de diferentes diluciones del extracto crudo sobre vitroplantas de treinta días de edad de las variedades Diacol Capiro y Diacol Monserrate. Las diferentes diluciones se prepararon a partir del filtrado crudo concentrado y agua destilada y se les ajustó el pH a 5.7 antes de la esterilización. Las vitroplantas se pusieron en los tubos de ensayo que contenían 5 ml de cada uno de los tratamientos descritos en la tabla 1. Cada tratamiento contó con veinte réplicas.

Las evaluaciones se realizaron cada veinticuatro horas, teniendo en cuenta el número de hojas por planta y tallos con síntomas característicos de *P. infestans* y el porcentaje de plantas afectadas por tratamiento. Las vitroplantas se mantuvieron en cámaras de crecimiento a una temperatura de 22 °C, 100 µE/m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> y un fotoperiodo de dieciséis horas luz.

## Procesamiento estadístico

El procesamiento estadístico de los datos en las diferentes fases experimentales consistió en el análisis de varianza de clasificación simple para los casos de variables continuas y la prueba de T para muestras pareadas. Para estos análisis se utilizó el paquete estadístico SPSS.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Obtención del filtrado crudo del hongo

**Medio de cultivo.** Los resultados de este experimento muestran que los medios de cultivo evaluados, jugo V-8 y MS modificado, fueron efectivos para la obtención de los metabolitos tóxicos del hongo. Sin embargo, al comparar la acción patogénica de los filtrados crudos se observó que el medio MS modificado alcanzó valores superiores a los del medio V-8 en cuanto a la afección tanto en las hojas como en los tallos, con diferencias significativas entre los dos medios (tablas 2 y 3).

Se encontró interacción entre las afecciones en las hojas con medio de cultivo, los tratamientos y la variedad. La interacción medio-variedad no fue significativa, ya que las hojas respondieron con igual intensidad en ambas variedades. El mayor porcentaje registrado en la variedad resistente Diacol Monserrate se explica por el mayor número de hojas en las vitroplantas de esta variedad (tabla 2) y por las características de su resistencia parcial, la cual se expresa claramente en los tallos, tanto así que para las afecciones en los tallos la interacción fue significativa, con un valor superior para Diacol Capiro (tabla 3).

Es importante señalar que los medios no ocasionaron efectos tóxicos sobre las vitroplantas, lo cual se observa en el tratamiento 1 (medio de cultivo del hongo sin inocular), con valores similares a los del tratamiento 2 (agua destilada estéril). La mayor respuesta patogénica se observó en el tratamiento 4 (filtrado concentrado y diluido a la mitad), con los valores más altos de afección. El filtrado crudo sin rotoevaporar (tratamiento 3)

Tabla 1. Diluciones estudiadas para la diferenciación entre variedades

Tratamiento	Partes de filtrado crudo	Partes de agua
1	1	1.0
2	1	1.2
3	1	1.8
4	1	2.0
5	1	3.0
6	1	4.0
7	1	9.0
8	1	14.0
9	Cultivo filtrado sin diluir	
10	Agua destilada	
11	Medio de cultivo sin inocular	

Tabla 2. Porcentaje de hojas afectadas en los dos medios de cultivo evaluados

Medio	Diacol Capiro				Diacol Monserrate			
	Tratamientos				Tratamientos			
	1	2	3	4	1	2	3	4
V-8	2.3 aA	3.7 aA	5.0 aA	13.3 aB	0.0aA	2.7aA	8.7 aA	40.0a
MS	2.3 aA	2.0 aA	11.7 bB	42.3bC	0.0 aA	1.0 aA	20.3 bB	51.3 bC

X ± E S	19.97 ± 0.08
CV	6.43%

Los valores con letras minúsculas iguales en la misma columna no difieren para  $p < 0.05$ .

Los valores con letras mayúsculas iguales en la misma fila no difieren para  $p < 0.05$ .

Tratamientos: 1. Medio sin inocular. 2. Agua destilada estéril. 3. Cultivo filtrado sin concentrar. 4. Cultivo filtrado concentrado y dividido a la mitad.

X = media; ES = error estándar; CV = coeficiente de variación.

Tabla 3. Porcentaje de tallos afectados en los dos medios de cultivo evaluados

Medio	Diacol Capiro				Diacol Monserrate			
	Tratamientos				Tratamientos			
	1	2	3	4	1	2	3	4
V-8	1.0 aA	1.0 aA	13.3 aB	14.7 aB	1.00 aA	1.00 aA	10.7 aB	10.0 aB
MS	1.0 aA	1.0aA	15.9 aB	62.3 bC	1.00 aA	1.00 aA	10.0aB	47.3 bC

X ± E S	25.63 ± 13.05
CV	7.43%

Los valores con letras minúsculas iguales en la misma columna no difieren para  $p < 0.05$ .

Los valores con letras mayúsculas iguales en la misma fila no difieren para  $p < 0.05$ .

Tratamientos: 1. Medio sin inocular. 2. Agua destilada estéril. 3. Cultivo filtrado sin concentrar. 4. Cultivo filtrado concentrado dividido a la mitad.

X = media; ES = error estándar; CV = coeficiente de variación.

induce una leve expresión de los síntomas y por tanto bajos niveles de afección.

Algunos autores coinciden en la necesidad de concentrar el filtrado crudo de este patógeno para lograr obtener un efecto patogénico (Rohwer *et al.*, 1987; Möllers *et al.*, 1992). Sin embargo, otros han encontrado respuesta al filtrado crudo sin concentrar o diluido al 50% (Behnke, 1979; Dieter, 1986; Crino *et al.*, 1989). El filtrado de otros hongos fitopatógenos requieren esta misma condición para inducir patogenicidad *in vitro* (Gómez, 1996; Dita, 1998).

Se eligió el medio MS modificado para continuar los estudios ya que además de lograr el crecimiento del hongo, las sales MS son usadas para el cultivo *in vitro* de la papa y por tanto se disminuye el riesgo de que sus componentes estén implicados en la respuesta de las vitroplantas o células al filtrado del hongo. También, para el caso del hongo *Ustilago scitaminea* Syd. en caña de azúcar, Gómez (1996) reporta la utilización de las sales MS con iguales fines. Por otra parte, el medio MS modificado (Dieter, 1986) es similar en su contenido al medio Henniger (1959) ampliamente usado para el cultivo líquido de *P. infestans* (Behnke, 1979; Stolle y Shöber, 1984; Rohwer *et al.*, 1987; Möllers *et al.*, 1992).

### Tiempos de incubación del hongo

La patogenicidad del filtrado crudo se incrementó con el tiempo de incubación y al igual que se explicó en el epígrafe anterior hubo diferencias significativas entre los tratamientos sin presencia del hongo (tratamientos 1 y 2) con respecto a los medios en los cuales creció éste (tratamientos 3 y 4), con una mayor expresión de fitotoxicidad en el tratamiento 4.

La interacción tiempo y variedad en la acción fitotóxica del filtrado crudo presentó diferencia significativa. Se observó que a los diez días de cultivo se producen leves síntomas de patogenicidad, lo cual se debe posiblemente a la insuficiente producción de metabolitos por el hongo durante este lapso de tiempo. A los veinte y treinta días se observaron afecciones características de *P. infestans* tales como hojas oscuras y arrugadas hacia los bordes y debilitamiento de los tallos. También se presentó clorosis en la base del tallo.

Las diferencias entre las variedades se observaron a partir de los veinte días de cultivo sin diferencia significativa para las hojas, pero sí para los tallos, con porcentajes superiores en la variedad susceptible Diacol Capiro (tabla 4).

Tabla 4. Porcentajes de afección del filtrado crudo a diferentes días de cosechado

Explante	Diacol Capiro			Diacol Monserrate		
	10 días	20 días	30 días	10 días	20 días	30 días
Hojas afectadas	26.3 aA	51.0 bB	46.7 bB	33.5aA	49.0 bB	55.0 bB
Tallos afectados	14.0 aA	66.0 bB	60.5 bB	10.0 aA	43.0 bC	45.9 bC

Los valores con letras minúsculas iguales dentro de las misma variedad y fila no difieren para  $p < 0.05$ . Los valores con letras mayúsculas iguales entre variedades y en la misma fila no difieren para  $p < 0.05$ .

Con base en los resultados obtenidos se escogió el periodo de veinte días para la obtención de los metabolitos de *P. infestans* ya que no había diferencias significativas con treinta días de cultivo. Estos resultados coinciden con lo reportado por Lai *et al.* (1988) y Crino *et al.* (1989), quienes encontraron la mayor expresión de la actividad tóxica del filtrado crudo después de los diecinueve y veinte días de cultivo, empleando éste como el tiempo óptimo para la selección de mutantes resistentes. De otro lado, Behnke (1979) utilizó el cultivo filtrado de tres semanas de cultivo para los patotipos 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 1, 2, 3, 4, y el de cuatro semanas para el patotipo 4, cuyo crecimiento fue más lento. Sin embargo, Stolle y Shöber (1984) encontraron la máxima actividad de toxicidad en *P. infestans* para el patotipo 1.4 a los catorce días de cultivo. Como lo plantea Durbin (1983), la producción de las toxinas es altamente dependiente de las condiciones nutricionales y ambientales y en este caso el patotipo también puede influir en la respuesta.

#### Caracterización del filtrado crudo del hongo.

En los análisis del consumo de azúcares reductores se encontró que la disminución de éstos, aunque poca en comparación con el contenido inicial (20 g/l), tuvo diferencias

significativas a lo largo del tiempo de incubación (tabla 5). En cuanto al peso fresco y seco de la masa micelial del hongo se registraron incrementos en los promedios que son significativos al comparar los tiempos de diez y veinte días, con un punto máximo a los veinte días, el cual se mantiene o es ligeramente superior hasta los treinta días, tiempo en el que se detecta pérdida de consistencia del micelio y se visualizan zonas pigmentadas.

Según Durbin (1983), la producción de toxinas en el medio de cultivo ocurre en diferentes fases de la curva de crecimiento. Sin embargo, generalmente está estrechamente relacionada a una fase particular en la cual se da mayor crecimiento del patógeno. Ya que el crecimiento del patógeno depende en gran medida de la fuente de carbono, se espera una relación directa entre el crecimiento del hongo y el consumo de sacarosa; sin embargo, no se vio una marcada disminución con respecto al contenido inicial, como se ha encontrado en los hongos *Ustilago scitaminea* (Gómez, 1996) y *Alternaria solani* (Dita, 1998).

Protsenko *et al.* (1986) encontraron en los metabolitos extracelulares de *P. infestans* proteínas y glicoproteínas que contienen

Tabla 5. Valores promedio de los parámetros evaluados en el filtrado crudo para diferentes tiempos de incubación

Tiempo (días)	Consumo de azúcar (mg/l)	pH	Absorbancia (320 nm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
10	0.90 a	4.1	0.023	2.08 a	0.39 a
20	2.51 b	3.6	0.038	5.04 b	0.65 b
30	3.50 b	3.2	0.045	5.58 b	0.68 b

Los valores con letras distintas en la misma columna difieren estadísticamente para  $p < 0.05$ .

diferentes cantidades de varios carbohidratos, entre ellos ramnosa, ribosa, arabinosa, xylosa, manosa, glucosa y galactosa. Estos azúcares posiblemente se suman durante el proceso de determinación de azúcares reductores y enmascararon los valores reales de consumo. Otra explicación de los resultados es los bajos requerimientos de carbono por parte del patógeno para su desarrollo, como lo sugiere Henniger (1959) al proponer un medio sintético para el cultivo de *P. infestans* con 10 g/l de dextrosa.

Protsenko *et al.* (1986) propusieron el cultivo líquido como una fuente de antígenos para la producción de antisueros contra algunos componentes de la pared celular de *P. infestans* y determinaron que la proporción de los componentes excretados al medio varía con la fuente de carbono usada en el medio de crecimiento del hongo.

#### Termoestabilidad del filtrado crudo de *Phytophthora infestans*

Se comprobó que el cultivo filtrado del aislado de *P. infestans* utilizado era termoestable ya que no se establecieron diferencias significativas al comparar las afecciones en las vitroplantas sometidas a los cultivos filtrados esterilizados en autoclave y por filtración. Sólo se presentaron diferencias entre las variedades (tabla 6), con lo que se confirma una vez más la diferencia de la respuesta entre variedades al cultivo filtrado.

Igualmente, Stolle y Shöber (1984), y Dieter (1986), reportan termoestabilidad en la toxina excretada por *P. infestans* en el medio líquido.

Esta característica también ha sido encontrada en otros hongos (Lorenzo *et al.*, 1992; Gómez, 1996), en los que se observa que la interacción de la toxina con la plántula provoca los síntomas característicos de la enfermedad.

#### Diferenciación de genotipos en vitroplantas

Una vez establecidos los parámetros para la obtención del filtrado crudo se determinó la concentración óptima de éste en la expresión de la fitotoxicidad. Se observó el efecto de la concentración del cultivo filtrado sobre las hojas y tallos de las vitroplantas. No se encontraron diferencias significativas entre las variedades para las hojas afectadas y sólo en las diluciones 1:2 y 1:3 este valor fue significativo y superior para Diacol Monserrate, debido al mayor número de hojas en este genotipo como se explicó en experimentos anteriores. En las tablas 7 y 8 se muestran las medias de las afecciones en los tipos de explante evaluados.

Los resultados obtenidos en los tallos indican que existe una relación entre la concentración del cultivo filtrado y la intensidad del daño de éste. En la dilución 1:1 los síntomas inducidos en las vitroplantas no fueron significativos en la diferenciación entre las variedades con altos valores en las medias en ambas variedades. La

Tabla 6. Efecto de los métodos de esterilización sobre la estabilidad patogénica del filtrado crudo del hongo

Esterilización	Porcentaje de afección			
	Tallos		Hojas	
	Diacol Capiro	Diacol Monserrate	Diacol Capiro	Diacol Monserrate
Filtración	2.89 a	1.69 b	1.60 a	1.14 a
En autoclave	2.62 a	2.23 b	1.63 a	0.95 a

Los valores con letras distintas en la misma columna difieren para  $p < 0.05$ .



**Tabla 7.** Efecto de la concentración del filtrado crudo sobre las hojas de las vitroplantas

Dilución	Medida del porcentaje de hojas afectadas	
	Diacol Capiro	Diacol Monserrate
1:1	4.181 aA	5.700 aA
1:1.2	2.900 aA	4.454 aA
1:2	2.100 bA	3.727 aB
1:3	3.360 aA	5.000 aB
1:4	3.300 aA	4.636 aA
1:9	2.000 bA	1.400 bA
1:14	2.000 bA	2.200 bA
X ± ES	3.386 ± 0.16	
CV	1.3%	

Los valores con letras minúsculas iguales en la misma columna no difieren para  $p < 0.05$ .  
 Los valores con letras mayúsculas iguales en la misma fila no difieren para  $p < 0.05$ .

**Tabla 8.** Efecto de la concentración del filtrado crudo sobre los tallos de las vitroplantas

Dilución	Medida del porcentaje de tallos afectadas	
	Diacol Capiro	Diacol Monserrate
1:1	3.545 aA	2.800 aB
1:1.2	2.545 bA	1.272 aB
1:2	2.636 bA	1.800 aA
1:3	1.800 bA	1.272 aA
1:4	1.900 bA	1.000 aA
1:9	1.330 bA	1.200 aA
1:14	1.200 bA	1.000 aA
X ± ES	1.951 ± 0.100	
CV	1.4%	

Los valores con letras minúsculas iguales en la misma columna no difieren para  $p < 0.05$ .  
 Los valores con letras mayúsculas iguales en la misma fila no difieren para  $p < 0.05$ .

dilución 1:1.2 (12% del medio derivado) mostró una mejor diferenciación entre las variedades. El número de plantas con síntomas en Diacol Monserrate fue significativamente menor que para Diacol Capiro.

Por tanto la diferencia entre variedades en cuanto a la respuesta al filtrado crudo se expresó mejor en los tallos y a una concentración del filtrado del hongo de 1:1.2.

El tallo fue la parte de la planta que determinó la respuesta al filtrado crudo. Éstos permanecieron verdes por mucho más tiempo en Diacol Monserrate que los tallos de Diacol Capiro que no poseen resistencia de campo. Este resultado corrobora lo reportado por diferentes autores sobre las características de la resistencia parcial (Cassells *et al.*, 1991; Colon *et al.*, 1995).

Tanto en Europa como en América, y particularmente en Méjico, ha habido mucho interés por los estudios sobre la resistencia parcial de la papa a *P. infestans*. Niederhauser *et al.*

(1961) encontraron diferentes grados de resistencia en tallos, al evaluar clones de diferentes partes del mundo, en el Valle de Toluca en Méjico bajo severas condiciones para el desarrollo del tizón tardío. La variedad Diacol Monserrate mostró esta resistencia *in vitro* con la concentración seleccionada para diferenciar las variedades.

Los diferentes grados de resistencia parcial que poseen los clones de papa están relacionados con el tiempo que requiere el patógeno para la penetración y la infección (Colon *et al.*, 1995).

Como conclusión general y tomando como base los anteriores resultados se estableció la siguiente escala como criterio de selección: 1) plantas sin síntomas, 2) plantas con hojas oscuras y arrugadas hacia los bordes, 3) hojas atizonadas y tallos con manchas pardas, 4) tallos necróticos hacia el ápice con partes sanas; 5) hojas y tallos necrosados totalmente.

## REFERENCIAS

- Behnke M. 1979. Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of *Phytophthora infestans* and regeneration of resistant plants. *Theor Appl Genet* 55:69-71.
- Behnke M. 1980a. General resistance to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrates of *Phytophthora infestans*. *Theor Appl Genet* 56:151-152.
- Cassells AC, Deadman ML, Broron CA, Griffin E. 1991. Field resistance to late blight (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in potato (*Solanum tuberosum* L.) somaclones associated with instability and pleiotropic effects. *Euphytica* 56:75-80.
- Colon LD, Budding J, Paul LC, Pieters MJ. 1995. Components of resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in eight South American solanum species. *Eur J Plant Pathol* 101:441-456.
- Crino P, Peñuela R, Martino L, Sonino A, Angora C. 1989. *In vitro* reaction of potato micronodes culture filtrate of *Phytophthora infestans*. NATO ASI Series, Vol. H 27. In: Callow LA (ed.). *Phytotoxins and plant pathogenesis*.
- Deaton WR, Keyes JC, Collins CB. 1982. Expressed resistance to black shank among tobacco callus cultures. *Theor Appl Genet* 63:65-70.
- Dieter R. 1986. Metodología de selección *in vitro* para resistencia a factores causadores de estresse. *Int Congr Plant Tissue Cell-Cult 6 Meet*, 376.
- Dita MA. 1988. Estudios biológicos de *Alternaria solani* Sor. para el desarrollo de una metodología de selección *in vitro* en papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis de maestría. IBP-Cuba. 65 p.
- Durbín RD. 1983. The biochemistry of fungal and bacterial toxins and their modes of action. *Biochem Plant Pathol* 137-161.
- Gómez R. 1996. Selección *in vitro* a la enfermedad carbón (*Ustilago scitaminea* Syd.) de la caña de azúcar. Tesis de doctorado. IBP-Cuba. 95 p.
- Henniger H. 1959. Versuche zur kultur verschiedener Rassen von *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary auf Kunstlichen Nährboden. *Phytopathol Zeitschrift* 34:285-306.

- Jaramillo S, Patiño LF, López JB, Márquez ME, Zapata JL, Mazo J.** 1997. Complejidad de las poblaciones del hongo *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en el departamento de Antioquia. *Rev Papa*, No. 17, junio de 1997.
- Lai A, Crino P, Saccardo F.** 1988. *In vitro* selection of tomato regenerated plants resistant to culture filtrate of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Genet Agraria* 42:78.
- Lorenzo P, Ramos M, Hernández M.** 1992. Extracción de las toxinas producidas por el hongo *Alternaria alternata*. *Cultivos Tropicales* 13 (1):98-100.
- Mollers C, Zitzlsperger J, Wenzel G.** 1992. The effects of a toxin preparation from *Phytophthora infestans* on potato protoplasts and microsporas. *Physiol Mol Plant Pathol* 41, 427-435.
- Niederhauser JS.** 1961. Genetic studie of *Phytophthora infestans* and *Solanum* species in relation to late blight resistance in the potato. In: *Recent advances in botany*, Proceedings of IX International Botanical Congress, Montreal 1959 (pp. 491-497). University of Toronto Press.
- Plich M, Rudnicki RM.** 1979. Studies of the toxins of *Phytophthora cactorum* pathogenic to apples trees. 1. Isolation, some of the properties and activities of a toxin produced by the fungus cultured in vitro. *Phytopathol Z* 94:270-278.
- Protsenko MA, Smirnova NI, Shcherbukhin VD.** 1986. Effect of the carbon source on the carbohydrate composition of biopolymers excreted by the potato blight fungus *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Prikl Biokhmi Mikrobiol* 22(6):822.
- Protsenko MA.** 1987. Extracellular antigens of the potato late blight fungus. *Mikol Fitopatol* 21(2):151.
- Rohwer F, Fritzemeier K, Scheel D, Hahlbrock K.** 1987. Biochemical reactions of different tissues of potato (*Solanum tuberosum*) to zoospores or elicitors from *Phytophthora infestans*. *Plant* 170:556-561.
- Stolle K, Schöber B.** 1984. Wirkung eines toxins von *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary auf Kartoffelknollengewebe. *Potato Research* 27: 173-84.
- Schöber B.** 1985a. Nachweis eines toxins im Kartoffelknollengewebe nach inokulation mit *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Potato Research* 28:193-201.