

INDUCCION DE CALLOS Y RESPUESTA DE  
CULTIVARES DE PAPA AL FILTRADO TOXICO  
DEL HONGO *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary



BIBLIOTECA  
EGIDIO G. REBONATO  
BANCO DE TESIS  
U.A.A.A.N.

CARLOS ESPINOSA ZAPATA

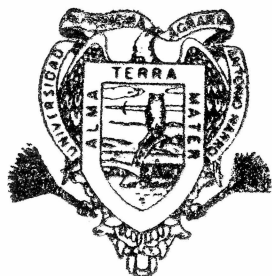
T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS  
EN FITOMEJORAMIENTO

Universidad Autónoma Agraria  
"Antonio Narro"

PROGRAMA DE GRADUADOS  
Buenvista, Saltillo, Coah.

FEBRERO DE 1999



**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**SUBDIRECCION DE POSTGRADO**

**INDUCCION DE CALLOS Y RESPUESTA DE CULTIVARES DE  
PAPA AL FILTRADO TOXICO DEL HONGO *Phytophthora*  
*infestans* (Mont.) de Bary**

**TESIS**

**POR**

**CARLOS ESPINOSA ZAPATA**

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de Asesoría y  
aprobada como requisito parcial para optar al grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS  
EN FITOMEJORAMIENTO**

**COMITÉ PARTICULAR**

Asesor principal:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. M. Humberto Reyes Valdés

Asesor:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Sergio Rodriguez Herrera

Asesor:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jesús Ortega Pérez

Asesor:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Valentín Robledo Torres

Asesor:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. J. Antonio Garzón Tizado

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Ramiro López Trujillo  
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Febrero de 1999



# AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias por la oportunidad y apoyo otorgado para mi superación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado durante mis estudios de postgrado.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por recibirme en su seno para continuar mi superación académica.

Al Dr. M. Humberto Reyes Valdés por sus valiosas enseñanzas, y contribución en esta investigación.

A la MC. Leticia Escobedo Bocardo por el apoyo orientación y facilidades brindadas para realizar la investigación en el laboratorio a su cargo.

Al Dr. Sergio Rodríguez Herrera por su apoyo durante mi estancia en la UAAAN y por su contribución en esta investigación.

Al Dr. Jesús Ortegón Pérez por su participación y apoyo en la presente investigación .

Al Dr. J. Antonio Garzón Tiznado del INIFAP por su orientación y apoyo decidido durante mi preparación.

Al Dr. Sathyanarayanaiah Kuruvadi por sus enseñanzas y aportaciones en esta investigación.

Al Dr. Valentín Robledo Torres por sus atinadas observaciones en esta investigación y por su apoyo incondicional durante mi estancia en la UAAAN

Al Dr. Gelasio Pérez y al MC. Enrique Charles del Programa de papa por su colaboración y apoyo incondicional para sacar adelante esta investigación.

Al Dr. Rafael Rivera Bustamante del CINVESTAV por aceptarme en su laboratorio para complementar mi formación.

A la MC. Rosa María Rangel por sus enseñanzas y tiempo dedicado durante mi estancia en el CINVESTAV.

Al MC. Alberto Flores Oliva por su orientación y donación de la línea clonal del hongo utilizado en esta investigación.

Al Dr. Juan Frías Hernandez por su hospitalidad durante mi estancia en el CINVESTAV.

AL MC. Victor Parga por su disposición y compartir sus experiencias que fueron de mucha utilidad en la presente investigación.

A la T.L.Q Graciela González por su apoyo en la obtención de los filtrados tóxicos utilizados para realizar esta investigación.

A la Sra. Ernestina Solis Rangel Auxiliar del laboratorio de biotecnología de la UAAAN por su valiosa ayuda en la ejecución del trabajo de laboratorio.

A la T.L.Q. Ursula Casar Belmares por su participación en parte del trabajo de investigación y por su apoyo incondicional cuando fue requerido.

Al personal del laboratorio de *Drosophyla melanogaster*: M.C. María Elena García, Beatriz Jaime y Ana María Ochoa por su disposición y apoyo para sacar adelante esta investigación.

A mis compañeros del programa de Doctorado que me apoyaron en todo momento, especialmente a: Victor Zamora, Mario Vásquez, Fernando Borrego, Francisco Ponce, Ramón Cortéz, Armando Muñoz, Rosalinda Mendoza, Francisco Chable, Mariano Mendoza, Francisco Nieto, Alfredo de la Rosa y a todas aquellas personas que de alguna u otra forma me apoyaron durante mis estudios de Doctorado y contribuyeron para realizar esta investigación.

# DEDICATORIA

À mi esposa: Norma Martínez por su constante apoyo y comprensión durante mis estudios.

A mis hijas: Maribel, Fabiola, Erika y Norma Liliana.

A mis Padres: Angel Espinosa Y Carlota Zapata.

A mis Hermanos: Consuelo, Rubén, Arturo, Angel, Eunice, Roberto, José Luis, Pedro, Maribel y Araceli.

# COMPENDIO

INDUCCION DE CALLOS Y RESPUESTA DE CULTIVARES DE PAPA AL FILTRADO TOXICO DEL HONGO *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary

POR

CARLOS ESPINOSA ZAPATA

DOCTORADO EN CIENCIAS

EN FITOMEJORAMIENTO

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, FEBRERO DE 1999

Dr. M. Humberto Reyes Valdés. Asesor.

Palabras clave: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, callo, cultivares, filtrado tóxico.

Se realizaron pruebas para evaluar el efecto de cuatro medios nutritivos en la formación de callo en discos de tubérculo de cuatro cultivares de papa, así como para evaluar la respuesta a la aplicación del filtrado tóxico del aislado 97104 de *Phytophthora infestans*. El filtrado fue probado en callos derivados del cultivar AN-1 y en siete cultivares de papa.

Aunque la inducción de callos fue posible con los cuatro medios nutritivos en los cuatro cultivares, el mejor medio fue el Engvild (1973) conformado por: sales inorgánicas M/S (1962), vitaminas N&N, 2 mg/l de glicina, 8mg/l de ac. naftalenacético y 0.5 mg/l de kinetina. Los callos con las mejores características fueron obtenidos con el cultivar AN-1, mientras que la mejor combinación cultivar - medio nutritivo fue lograda con la combinación AN-1 - Engvild (1973). La superioridad de esta combinación es atribuida al sistema de reguladores de crecimiento del genotipo, así como a la proporción de reguladores de crecimiento con que fue suplementado el medio Engvild (1973).

La respuesta de los callos a las diferentes concentraciones del filtrado tóxico se evaluó sobre la base de dos transferencias. En la primera transferencia se hizo una evaluación (27 días) y dos en la segunda transferencia (23 y 34 días). Para el crecimiento se considero el diámetro promedio así como la coloración de los callos en cada concentración del filtrado. En la primera transferencia los callos tuvieron un crecimiento muy similar en el medio testigo (sin filtrado) y en el medio

con el 10 por ciento de concentración del filtrado. En ambos medios el diámetro de los callos fue notoriamente superior al resto de las concentraciones y, a la vez, el diámetro de los callos crecidos en el medio con 20 por ciento de filtrado fue ligeramente superior a las concentraciones 30 y 40 por ciento. Para evaluar la respuesta de los callos en la segunda transferencia fue considerado el diámetro inicial promedio, el diámetro promedio a los 23 y a los 34 días, así como su tasa de crecimiento. El comportamiento de los callos en la segunda transferencia fue muy semejante al de la primera. Mientras, la tasa de crecimiento que tuvieron en los primeros 23 días (primera lectura) fue menor que en los últimos 11 días (segunda lectura).

En la evaluación de los siete cultivares a la aplicación del filtrado tóxico, el cultivar Gigant fue estadísticamente superior al resto de los cultivares, ya que aún en la concentración del 100 por ciento su grado de marchitez fue de 41 por ciento, seguido por Alpha y Atlantic, ambos con un grado de marchitez del 75 por ciento, Excel con 83 por ciento, y los cultivares Mondial, Norteña y AN-1 con el 90 por ciento. En esta concentración

el daño mostrado por Gigant fue inferior aun al grado de daño mostrado por el resto de los cultivares en la concentración del 25 por ciento (con excepción de AN-1).

Por otra parte, no hay coincidencia de la respuesta de los cultivares en la prueba con los filtrados tóxicos, con la respuesta que tienen en condiciones de campo al ataque de *P. infestans*. Es importante destacar que los genotipos que son reportados como resistentes al ataque del patógeno en cuestión, son considerados en su país de origen como genotipos con resistencia horizontal.

De acuerdo a estos reportes y a los resultados obtenidos en otras pruebas con filtrados tóxicos y con la inoculación con zoosporas de *P. infestans*, es señalado que con la reacción de los genotipos de papa al filtrado tóxico es posible medir el grado de resistencia horizontal. Es posible que el cultivar Gigant posee altos niveles de resistencia horizontal pero que ésta no se manifiesta en las pruebas de campo en la región debido a que la expresión de este tipo de resistencia está fuertemente influenciada por el ambiente. Además, la falta de coincidencia entre el filtrado tóxico y las pruebas de campo puede ser atribuido

# ABSTRACT

CALLUS INDUCTION AND RESPONSE OF POTATO CULTIVARS  
TO A TOXIC FILTERE OF THE FUNGUS *Phytophthora*  
*infestans* (Mont.) de Bary

by

CARLOS ESPINOSA ZAPATA

DOCTOR OF SCIENCES

PLANT BREEDING

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, FEBRUARY, 1999

Ph.D. M. Humberto Reyes Valdés. Advisor.

Key words: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*,  
callus, cultivars, toxic filtrate.

Tests were carried out tests to evaluate the effect  
of four culture media, in the formation of callus from  
tuber of four potato cultivars, as well as to evaluate  
the response to the application of toxic filtrate from the  
strain 97104 of *Phytophthora infestans*. The toxin was



también a que las toxinas de la cepa utilizada tal vez no corresponden a las toxinas de las cepas presentes en la región.

tested in callus derived from the cultivar AN-1 and in seven potato cultivars.

Although callus induction was possible with the four culture media in the four cultivars, the best medium was the so called Engvild (1973) conformed by: inorganic salts M/S (1962), N&N vitamins, 2 mg/l of glicine, 8 mg/l of naphtalenacetic acid and 0.5 mg/l of kinetina. The calluses with the best characteristics were obtained with the cultivar AN-1, whereas the better combination cultivar - culture medium was achieved with the combination AN-1 - Engvild (1973). The superiority of this combination is attributed to the genotype growth regulation system, as well as to the proportion of growth regulator with which the Engvild (1973) medium was supplemented.

The behavior of the calluses to the different concentrations of the toxic filtrate was evaluated on the basis of two transfers. One evaluation was made in the first transfer (27 days) and two in the second transfer (23 and 34 days). The growth was considered average diameter) as well as the coloration of the callus in each concentration of the filtrate. In the first transfer the

calluses had a very similar growth in the standard medium (without filtering) and in the medium with the 10 por ciento of concentration of the filtrate. In both media the diameter of the callus was plainly superior to the rest of the concentrations and, at the same time, the diameter of the callus grown in the media with 20 por ciento of the filtrate was slightly superior to the concentrations 30 and 40 por ciento. In order to evaluate the behavior of the callus in the second transfer there were considered the average initial diameter, the average diameter at 23 days at 34 days, as well as their rate of growth. The behavior of the callus in the second transfer was very similar to the first one. However, the rate of growth they had in the first 23 days (first reading) was less than in the last 11 days (second reading).

In the evaluation of the seven cultivars to the application of the toxic filtrate, the cultivate Gigant was statistically superior to the rest of the cultivars, since even in the concentration of 100 percent their withering degree was of 41 percent, followed by Alpha and Atlantic, both with a Withering degree 75 percent, Excel with 83 percent, and the Mondial, Norteña, and AN-1 cultivars with

90 percent. In this concentration damage shown by Gigant was inferior even to the damage shown by the rest of the cultivars in the concentration of 25 por ciento (with exception of AN-1).

On the other hand, there is no coincidence of the behavior of the cultivars in the test with the toxic filtrates, with the behavior they have in field conditions to the attack of *P. infestans*. It is important to highlight that the genotypes are reported as resistant to the attack of the pathogen in question, are considered in their country of origin as genotypes with horizontal resistance.

According to these reports and to the results obtained in other tests with toxic filtering and with inoculation with zoospores of *P. infestans*, it is pointed out that it with the reaction of the genotypes of potato to the toxic filtrate is possible to measure the degree of horizontal resistance. It is possible that the cultivar Gigant possess high levels of horizontal resistance but that this do not show up in the regional field tests because the expression of this type of resistance is strongly influenced by the environment. Moreove, the lack

of coincidence between the toxic filtrate and field tests and field tests could also be attributed to that the toxins of the used strain perhaps do not correspond the toxins of the strains present in the region.

# INDICE DE CONTENIDO

	Paginas
INDICE DE CUADROS.....	xviii
INDICE DE FIGURAS.....	xx
INTRODUCCION .....	1
REVISION DE LITERATURA .....	6
Generalidades sobre las toxinas. ....	8
<i>Phytophthora infestans</i> .....	11
Antecedentes e importancia de <i>Phytophthora</i>	
<i>Infesta</i> .....	12
Origen y ecología de <i>Phytophthora</i>	
<i>Infestans</i> .....	16
Etiología y evolución de la Enfermedad ...	18
Variación patogénica .....	20
Estado sexual de <i>Phytophthora infestans</i> ...	23
Grupos de compatibilidad .....	24
Reproducción.....	26
Mecanismos de defensa de las plantas ante el	
ataque de <i>Phytophthora infestans</i> .....	29
Defensas estructurales.....	29
Defensas bioquímicas .....	31
Mejoramiento genético .....	33
Antecedentes sobre el desarrollo de	
variedades Resistentes .....	33
Resistencia horizontal.....	36
Resistencia vertical.....	38
Antecedentes sobre la respuesta de los cultivares	
a <i>Phytophthora infestans</i> en condiciones de campo...	40
Pruebas de evaluación de resistencia <i>in vivo</i>	
e <i>in vitro</i> .....	43
Evaluación <i>in vivo</i> .....	44
Evaluación <i>in vitro</i> .....	49
Inducción de callos y variación somaclonal .....	56
Inducción de callo.....	56
Variación somaclonal. ....	60
Selección <i>in vitro</i> de líneas tolerantes a toxinas y	
filtrados tóxicos.....	68
Toxinas y filtrados tóxicos en la selección <i>in vitro</i>	
para resistencia a <i>Phytophthora</i> .....	79
MATERIALES Y METODOS .....	84
Etapa 1: Inducción de callo a partir de cuatro	
cultivares de papa .....	84
Material genético utilizado .....	84

Medios nutritivos para inducción de callo..	86
Establecimiento de la prueba .....	86
Análisis estadístico.....	87
Variables evaluadas.....	90
Etapa 2: Manejo de hongo <i>Phytophthora infestans</i> y preparación del filtrado tóxico .....	91
Desarrollo del hongo .....	92
Conservación de la agresividad del hongo...	93
Obtención del filtrado tóxico de <i>P.</i> <i>infestans</i> .....	94
Etapa 3. Evaluación de la repuesta <i>in vitro</i> de callos de papa a la aplicación de diferentes concentraciones del filtrado tóxico de <i>P. infestans</i> .....	96
Cepa del hongo utilizada.....	96
Material genético utilizado .....	96
Establecimiento de la prueba .....	97
Variables evaluadas .....	98
Etapa 4. Respuesta de siete cultivares de papa a la aplicación de diferentes concentraciones del filtrado tóxico de <i>P. infestans</i> .....	99
Material genético utilizado .....	99
Establecimiento de la prueba .....	100
Análisis estadístico .....	100
Variable evaluada .....	101
RESULTADOS Y DISCUSION .....	103
Inducción de callo a partir de diferentes cultivares de papa .....	103
Análisis de varianza .....	103
Respuesta de callos de papa <i>in vitro</i> a diferentes concentraciones del filtrado tóxico de <i>P. infestans</i> .....	115
Respuesta de cultivares de papa a diferentes concentraciones de filtrado tóxico de <i>P. infestans</i> .....	124
CONCLUSIONES .....	134
RESUMEN .....	137
LITERATURA CITADA .....	145

# INDICE DE CUADROS

Cuadro No.	Páginas
3.1. Medios nutritivos para la inducción de callos.....	82
3.2. Composición de los medios nutritivos utilizados para la inducción de callo (mg/).....	83
3.3. Compuestos que conforman el medio Huang Xu & Wang para la preparación del filtrado tóxico.....	89
4.1. Análisis de varianza para formación de callo de cultivares de papa en los medios nutritivos.....	99
4.2. Prueba de Tukey ( $P < 0.01$ ) para peso fresco de callo, peso seco de callo y diferencia peso fresco menos peso seco de callo de cuatro cultivares de papa.....	100
4.3. Análisis de varianza ajustado por covarianza para formación de callo de los cultivares (Factor A) de papa en los medios nutritivos (Factor B).....	101
4.4. Prueba de Tukey ( $P < 0.01$ ) para peso fresco de callo (p.f.c.), peso seco de callo (p.s.c.) y diferencia peso fresco menos peso seco (p.f.c.-p.s.c.) de callo en los medio nutritivos...	103
4.5. Prueba de Tukey ( $P < 0.01$ ) para peso fresco de callo, peso seco de callo y diferencia peso fresco menos peso seco de callo en las diferentes combinaciones.....	105
4.6. Variables de tipo cuantitativo y tipo cualitativo evaluadas en los diferente tratamientos .....	108
4.7. Primera transferencia. Diámetro promedio (cm) y color de callos del cultivar AN-1 como respuesta a la aplicación del filtrado tóxico de <i>Phytophthora infestans</i> .....	110



4.8.	Segunda transferencia. Diámetro promedio (cm) de callos del cultivar AN-1 como respuesta a la aplicación del filtrado tóxico de <i>P.infestans</i> .....	111
4.9.	Diámetro de callos a los 23 y 34 días y tasa de crecimiento de los callos a los 23 días iniciales y 11 días posteriores a la primera lectura.....	114
4.10.	Análisis de varianza para la variable grado de daño causado por el filtrado tóxico de <i>P.infestans</i> (Factor A = cultivares, Factor B=concentraciones)..	118
4.11.	Respuesta promedio de los cultivares a distintas concentraciones del filtrado tóxico de <i>P.infestans</i> ..	119
4.12.	Efecto promedio de las concentraciones en los cultivares.....	119
4.13.	Grado de daño del filtrado tóxico en hojas de siete cultivares de papa.....	121

## INDICE DE FIGURAS

Figura No.	Página
4.1. Respuesta promedio de los cultivares considerando los períodos de almacenamiento.....	102
4.2. Peso fresco de callos (g) de los cultivares en los medios nutritivos .....	107
4.3. Peso seco de callo (g) de los cultivares en los edios nutritivos .....	107
4.4. Diferencia p.f.c. menos p.s.c. (g) de los cultivares en los medios nutritivos .....	107
4.5. Segunda transferencia. Diámetro promedio (cm) de los callos en la primera lectura (23) y segunda lectura (34 días).....	113
4.6. Efecto promedio de las concentraciones del filtrado tóxico en los cultivares.....	120

# INTRODUCCION

Las enfermedades de las plantas afectan notablemente el desarrollo social y económico en muchos países debido a que por efecto de éstas, frecuentemente se reduce su producción agrícola en forma drástica. Para el estudio y control de las enfermedades se debe tomar en cuenta que las reacciones de los organismos, huéspedes o patógenos varían con relación a la serie de factores del medio ambiente a que se hallan expuestos, lo que da por resultado una variación importante en la calidad y rendimiento de las plantas y sus productos.

El mejoramiento genético tradicional aplicado hasta ahora se ha realizado principalmente para generar variedades de elevada productividad, pero que requieren gran cantidad de insumos agrícolas; principalmente fertilización y pesticidas. El empleo de técnicas biotecnológicas tales como, la selección *in vitro* y/o la selección *in vivo* a nivel laboratorio, puede contribuir grandemente en la obtención de variedades diseñadas para producir bajo condiciones adversas de: clima, suelo, plagas y enfermedades. Esto permitiría

ampliar el número de tierras cultivables y reducir la cantidad de plaguicidas químicos que en muchos de los casos representan un serio problema de contaminación ambiental y un gasto que no pueden enfrentar la mayoría de los productores agrícolas del tercer mundo.

En el cultivo de papa en particular, el principal problema que limita la producción es la enfermedad conocida como tizón tardío, causada por el hongo *Phytophthora infestans*, ya que para su control se realizan hasta 30 aplicaciones de fungicidas durante el ciclo de cultivo, lo cual además de contaminar tanto el producto como el medio ambiente, eleva los costos de producción. El ataque del tizón tardío puede ser tan devastador que puede reducir la producción de un 80 a 100% cuando el control no se realiza en forma adecuada. En nuestros días, la papa recibe los volúmenes más grandes de agroquímicos y estos son más cuantiosos que los aplicados a otros cultivos alimenticios de importancia mundial. Cifras de la FAO indican que el valor de los fungicidas usados durante 1991 para controlar el tizón tardío de la papa, fue de 1,800 millones de dólares. En 1994, éste valor se elevó a 4,000 millones de dólares (PICTIPAPA, 1995).

Un aspecto importante que debe ser considerado en los programas de mejoramiento genético es el uso de metodologías complementarias a las clásicas, que permitan seleccionar materiales tolerantes a la enfermedad y que puedan ser realizadas a nivel laboratorio para que la selección pueda hacerse de manera más eficiente y económica. Para la producción de variedades tolerantes a enfermedades es posible utilizar una estrategia que consiste en seleccionar líneas tolerantes a las toxinas producidas por el parásito. Aunque todavía son pocas las toxinas aisladas y debidamente caracterizadas, es posible emplear también métodos indirectos como son los filtrados tóxicos del cultivo de patógenos. La selección se puede realizar a nivel de planta, callos, células en suspensión o protoplastos (aplicando las mismas toxinas o filtrados como condición de estrés en el medio nutritivo), con el propósito final de regenerar plantas tolerantes a los hongos en condiciones de campo. De acuerdo con la condición de estrés, esta técnica también ha mostrado ser eficiente para obtener plantas tolerantes a otras condiciones adversas tales como: heladas, grado elevado de salinidad, alta concentración de metales pesados y otras.

El cultivo de callos, células aisladas, protoplastos y su subsecuente desarrollo en plantas completas, ofrece la posibilidad de seleccionar mutantes bioquímicas con características de interés para el fitomejoramiento. La ventaja de este sistema radica en la posibilidad de muestrear millones de células cultivadas *in vitro*, de manera parecida a como se hace con bacterias, y recuperar fenotipos especiales que no se presentan en las plantas completas. El proceso es tan simple como hacer crecer callos o células en suspensión en medio semisólido en presencia del agente selectivo y subcultivar las colonias hasta obtener líneas que crezcan normalmente en él.

#### Objetivos generales

- Determinar el medio de cultivo en el cual los cultivares de papa Alpha, AN-1, Norteña y Mondial producen los mejores callos.
- Evaluar la resistencia de los callos derivados del clon AN-1 a diferentes concentraciones del filtrado tóxico procedente de la línea clonal 97104 del hongo *P. infestans*.
- Determinar la respuesta de siete cultivares de papa a

- la aplicación de diferentes concentraciones del filtrado tóxico de la línea clonal 97104 de *P. infestans*.

El trabajo se planteó bajo las hipótesis siguientes:

- La Formación de callo difiere de acuerdo con el medio nutritivo utilizado y el cultivar empleado.
- El crecimiento de los callos se afecta a medida que la concentración del filtrado tóxico de *P. infestans* es mayor.
- Los cultivares poseen diferente grado de tolerancia al filtrado tóxico del hongo en cuestión.

## REVISIÓN DE LITERATURA

Todas las plantas superiores pueden sufrir enfermedades causadas por diferentes tipo de patógenos que pueden transmitirse de una planta a otra. Los hongos a diferencia de otros microorganismos patógenos, presentan mayor variedad en cuanto a forma, función y ciclo de vida. Se considera como enfermedad cualquier alteración de una o varias series ordenadas de procesos fisiológicos de utilización de energía que da por resultado la pérdida de la coordinación de esta utilización dentro del huésped. Como se establece con frecuencia, el concepto incluye la alteración progresiva de la actividad celular, que finalmente se manifiesta en forma de cambios morfológicos llamados síntomas.

De acuerdo con Agrios (1989), la enfermedad de las plantas puede definirse como cualquier alteración ocasionada por un agente patógeno o un factor del medio ambiente que afecta la síntesis, traslocación o utilización del alimento, los nutrimentos minerales y el agua, en tal forma que la planta afectada cambia de apariencia y tiene una producción menor que una planta sana de la misma variedad.



Los microorganismos patógenos causan enfermedades en las plantas mediante: 1) el consumo de los contenidos de las células del hospedero, con las que entran en contacto, 2) la alteración o la inhibición del metabolismo de las células hospederas debido a la secreción de toxinas, enzimas o sustancias reguladoras del crecimiento, 3) el debilitamiento del hospedero a causa de la absorción continua del alimento de sus células para su propio uso, y 4) el bloqueo de la traslocación de los nutrimentos minerales, alimentos y agua, a través de los tejidos conductores.

Para que el hongo dañe la planta se requiere que éste penetre e infecte al hospedero, lo cual se logra parcial o totalmente mediante una fuerza mecánica que ejercen algunos de ellos sobre la pared celular de las plantas. Sin embargo, la penetración de las barreras que ofrecen las plantas ante el ataque de los hongos y plantas superiores parásitas, casi siempre se logra debido a que el patógeno secreta enzimas en el sitio de penetración, lo cual da como resultado el ablandamiento o la disolución de esas barreras por la acción enzimática para posteriormente infectar a las plantas principalmente a través de la secreción de compuestos químicos que afectan a ciertos

componentes o mecanismos metabólicos de sus hospederos (Agrios, 1989).

De acuerdo al mismo autor, las principales sustancias que secretan los patógenos en las plantas y que al parecer participan en la aparición de una enfermedad, ya sea directa o indirectamente, incluyen enzimas, reguladores de crecimiento, polisacáridos y toxinas. En general las enzimas que secretan los fitopatógenos desintegran los componentes estructurales de las células de su hospedero, degradan las sustancias nutritivas inertes de las células o afectan directamente al protoplasto interfiriendo en sus sistemas funcionales. Los reguladores del crecimiento ejercen un efecto hormonal sobre las células que aumenta o disminuye su capacidad para dividirse y crecer, y es probable que los polisacáridos sean importantes sólo en las enfermedades vasculares, en las que interfieren pasivamente con la translocación y en un momento dado, pueden llegar a ser tóxicos.

### **Generalidades sobre las Toxinas**

De acuerdo a Dickinson (1987), el término toxina se

refiere a cualquier producto del patógeno que es nocivo para el hospedero y se restringe por lo general a compuestos de bajo peso molecular que no atacan la integridad estructural de los tejidos de la planta pero si afectan el metabolismo de ésta en alguna otra forma más sutil.

La característica esencial de una toxina es que actúa directamente sobre los protoplastos vivos del hospedero y ocasiona daños considerables que incluso pueden destruir a las células de una planta. Algunas de ellas actúan como venenos protoplásmicos generales que afectan a muchas especies de plantas representativas de distintas familias; otras son tóxicas solo para algunas especies. Sin embargo las toxinas son sustancias extremadamente venenosas aún y cuando se encuentran a concentraciones muy bajas (Graniti, 1972)

Agrios (1989) señala por su parte, que las toxinas son sustancias producidas por los microorganismos fitopatógenos que causan alteraciones en las reacciones metabólicas y producen una desorganización en los procesos fisiológicos de las plantas. Las toxinas actúan directamente sobre los protoplastos de su hospedero y ocasionan daños

considerables o incluso pueden destruir a las células de una planta. Las toxinas dañan a las células hospederas al afectar la permeabilidad de su membrana celular o al inactivar o inhibir a las enzimas e interrumpir posteriormente sus reacciones enzimáticas correspondientes. Algunas toxinas actúan como antimetabolitos que propician la deficiencia de un factor esencial para el desarrollo normal.

Con relación a esto Strobel (1974) señala que *Rhizopus spp.* sintetiza ácido fumárico en el mesocarpio de ciertos frutos, el cual se transporta en forma de fumarato a los sitios de acción. Así el fumarato se convierte en ácido tartárico, el cual interfiere el ciclo de Krebs. En conclusión parece que el efecto primario de la toxina se manifiesta en la membrana plasmática y los otros efectos observados son secundarios al daño de la membrana.

Pringie y Scheffer (1967) mencionan que entre los efectos secundarios de las toxinas se encuentran: 1) incremento en la respiración, el cual se interpreta como intervención a través del sistema de oxidasas del ácido ascórbico y como posible desacople de procesos de oxidación Y fosforilación y 2) inhibición de síntesis de proteínas,

de materiales orgánicos y pérdida de electrolitos.

Graniti (1972), señala además que, para ser considerada como la causante de una enfermedad específica, una toxina debe reunir los requisitos siguientes: a) cuando se aplica a una planta susceptible a bajas concentraciones, producirá todos o casi todos los síntomas característicos de la enfermedad, pero también puede ser que varias toxinas, cada una cause diferentes síntomas de una misma enfermedad, b) toxina y patógeno tendrán similares efectos en el hospedero y las plantas inmunes o altamente resistentes serían poco afectadas por la toxina, c) la patogenicidad del organismo estaría correlacionada con su capacidad para producir la toxina (razas débilmente patogénicas producirán menos toxina).

### ***Phytophthora infestans***

El tizón tardío es una de las principales enfermedades de la papa y el tomate sobre todo en regiones húmedas y frescas. Además el hongo también ataca otras especies de solanáceas. El tizón tardío de la papa con una

área de impacto potencial cercana a los tres millones de hectárea en 40 países, se mantiene como la prioridad más alta en los proyectos de investigación del CIP (CIP, 1996).

Este patógeno ha causado daños de consideración desde 1840, cuando el biotipo A1 escapó de su tierra natal México y atacó sin piedad a los cultivos de papa en Europa y Estados Unidos de Norteamérica, pero fue en Irlanda en 1845, donde el tizón tardío destruyó totalmente la cosecha de papa que era el alimento básico de la población de ese país y ocasionó la trágica hambruna irlandesa. De Europa, el tizón tardío se dispersó por todo el mundo y en la actualidad es la enfermedad más devastadora de este cultivo.

### **Antecedentes e Importancia de *Phytophthora infestans***

Lozoya (1996) señala que lo que ahora se conoce como tizón tardío de la papa, se presentó en proporciones de epifítia por primera vez en Bélgica a finales de junio de 1845. A mediados de julio se detectó en Holanda y Francia, un mes después en la isla de Wight, en Inglaterra, y a finales de agosto en todo el sur de la Gran Bretaña. Sin embargo, fue

en Irlanda donde más afectó, pues redujo a la mitad la producción de papa de ese año y a la totalidad de la cosecha al año siguiente. Se estima que para finales de 1847 un millón de personas había muerto de hambre y enfermedades y otro tanto había emigrado. Una vez iniciada la epifítia, el gobierno inglés conminó a los terratenientes a dar asistencia a sus empleados, en vez de dejar la responsabilidad al estado. Sucedió lo contrario, pues los terratenientes capitalizaron la situación exportando la poca papa rescatable y los precios, tanto del tubérculo como de los granos, se duplicaron a finales de 1845. Los decesos por hambre y enfermedades, los asaltos y las rebeliones aumentaron considerablemente de 1846 a 1849, lo mismo que las cocinas públicas, orfanatorios y actos de caridad por organizaciones religiosas internacionales. Se registraron migraciones de 250,000 personas en 1847, y 200,000 o más cada año hasta 1852, primero a Inglaterra, y posteriormente a Estados Unidos, Canadá y Australia. Para 1850, lo peor había pasado, la población se redujo en por lo menos tres millones de habitantes (30 por ciento de la original), hubo reformas tanto en la tenencia como en la administración de la tierra y se impulsó a la ganadería.

Lo descrito anteriormente pone de manifiesto los problemas tan graves que pueden ocasionar los patógenos en las plantas y la atención que estos merecen en el mejoramiento genético.

Lozoya (1996) señala además, que a pesar de la larga tradición en el conocimiento de los hongos por los Irlandeses, que data de principios del siglo XVIII, los trabajos de Moore y del Dublin Microscopical Club sobre *Phytophthora infestans* a mediados del siglo pasado, no repercutieron dada la creencia de la generación espontánea y de la ausencia del concepto de fitopatogenicidad de los hongos. En los 1880`s se enfocó la atención hacia el mejoramiento genético para la obtención de variedades resistentes al tizón. Para este propósito se distribuyó semilla botánica a las escuelas de todo el país, junto con instrucciones para su uso y criterios de evaluación. Asimismo hubo premios para los estudiantes y maestros con las mejores selecciones.

Señala también este mismo autor que a finales del siglo pasado, el profesor Thomas Carroll, en el Condado de Carlow, demostró que la principal fuente de infección del tizón tardío al follaje y al tubérculo era por esporas



dispersadas por el viento, y empezó a experimentar el control químico con caldo bordelés, con tal éxito que la aspersión foliar se adoptó como rutina entre las prácticas culturales contra tizón de papa. A principios de 1900`s se avanzó en el aislamiento, morfología y citología de *Phytophthora infestans*. G.H. Pethybridge observaron oosporas en cultivo *in vitro* en 1913, con lo que se podría pensar en la presencia de grupos de compatibilidad sexual en esos años en Irlanda, aunque no fue sino hasta en la década de 1950`s cuando se identificó a las razas 0 y 4 como las únicas presentes en aquel país (actualmente se sabe de la presencia de las razas 1, 3, 4, 7, 10, y 11 y que la raza 2 con combinaciones es la última en presentarse cada año). En el lapso de 1900 a 1930, diferentes autores contribuyeron al conocimiento general, epidemiología, evaluación de materiales genéticos y control de tizón. Las décadas de los 1930`s y 40`s se caracterizaron por la poca investigación en tizón, que se enfocó principalmente al control químico con los nuevos fungicidas orgánicos. La atención se giró hacia otras patologías de la papa, principalmente virosis y certificación de semillas. En la segunda mitad del presente siglo los estudios en tizón han sido intensos y diversos, empezando con la identidad de las razas fisiológicas del patógeno en los 50`s y continuando con la de los grupos de compatibilidad en los 90`s. Así, el tipo

A2 se encontró en un 35 por ciento de los muestreos en 1991, bajando a 3 por ciento en 1994. Otros estudios incluyen epidemiología, nutrición, fisiología del hongo y del hospedero, predicción y control químico.

### Origen y Ecología de *Phytophthora infestans*

Reddick (1932), Niederhauser (1986) y Fernandez (1985) indican que *P. infestans* es originario de México, ya que en este país se encuentra una población de razas altamente especializadas. Por su parte Mendoza y Pinto (1985) indican que México es el único lugar del mundo donde se producen oosporas sexuales, por tal motivo, se presupone que de aquí fue distribuido a otras partes del mundo. De esta manera a México no solo se le conoce como la fuente principal de germoplasma para la resistencia a tizón tardío, sino que también es reconocido como la fuente única de material genético de *P. infestans* para el estudio de su genética y de los mecanismos, tanto sexuales como asexuales, responsables de su variabilidad.

Goodwin (1996) señala que tres tipos de evidencias relativas al centro de origen de *P. infestans* (históricas,

biológicas y genéticas) fueron evaluadas con el objetivo específico de desmentir las aseveraciones de que este patógeno se desarrolló en Sudamérica. No se encontraron evidencias históricas que indicaran la presencia del tizón tardío en Sudamérica antes de 1840. Muchas de las descripciones históricas fueron también vagas para ser capaces de asociarlas con alguna enfermedad específica. Las evidencias biológicas consistieron en la diversidad de genes de resistencia en especies Mexicanas silvestres *Solanum* (y su ausencia en cualquier otra parte), en la alta virulencia de los hongos en México, y el descubrimiento del tipo de apareamiento A2 en México. Hubo cuatro líneas de evidencias genéticas: i) el pariente más cercano de *P. infestans*, *P. mirabilis*, es también endémico de México; ii) la más alta diversidad con marcadores moleculares ocurre en México; iii) hasta muy recientemente las poblaciones en todos los otros países tuvieron sólo una línea clonal de el patógeno; y iv) hubo subdivisión genética entre poblaciones en México. Todos los tres tipos de evidencia apuntan claramente a México como el centro de origen de *P. infestans*, y son suficientes para desmentir la hipótesis de que el centro de origen es Sudamérica.

## Etiología y Evolución de la Enfermedad

*P. infestans* es un oomiceto con micelio cenocítico, que produce esporangioforos de crecimiento indeterminado. En la punta de los esporangióforos se forman esporangios en forma de limón. Estos esporangios se desechan cuando maduran y queda una pequeña hinchazón característica en ese lugar. Si los esporangios germinan entre 12 y 15°C, producen 8 zoosporas biflageladas. Las zoosporas nadan durante un tiempo, luego se enquistan, absorben los flagelos y producen un tubo germinativo. En temperaturas superiores a los 15°C los esporangios producen un tubo germinativo y actúan como conidios. Inverna como micelio en tubérculos infectados. Cuando en la primavera germina el tubérculo, el patógeno invade los brotes y produce lesiones en la parte inferior del tallo. Los esporangios que se forman sirven como inóculo primario y salen de la planta a través de los estomas de las hojas y tallos. Los tubérculos infectados que pasan el invierno en el suelo, o en almacenamiento son las fuentes de inóculo primario. Los esporangios se diseminan por el agua de lluvia y viento y cuando caen en hojas y tallos húmedos de papa germinan y producen zoosporas o germinan directamente. El hongo esporula con humedad relativa de 100

por ciento y temperatura de 16 a 22°C. Los esporangios mueren en tres a seis horas en humedades relativas inferiores al 80 por ciento (De la Garza, 1996).

Los esporangios germinan casi siempre por medio de zoosporas a temperaturas menores a 12 o 15°C en tanto que por arriba de los 15°C los esporangios germinan directamente produciendo un tubo germinal. Cada uno de los esporangios produce de tres a ocho zoosporas (o en ocasiones un número mayor), las cuales son diseminadas cuando se rompe la pared esporangial a nivel de su papila. *P. infestans* requiere un par de tipos de compatibilidad para reproducirse sexualmente, y debido a que solo uno de ellos ocurre en la mayoría de los países, la fase sexual de este hongo rara vez se ha observado. Sin embargo, en México y en otras áreas de Centro y Sudamérica, ambos tipos de compatibilidad se encuentran ampliamente distribuidos y las oosporas del hongo son muy comunes. Cuando los dos tipos de compatibilidad crecen uno cerca del otro, la hifa femenina crece en dirección al anteridio joven y forma un oogonio, el cual después de fecundado por el anteridio se desarrolla en una oosfera dura y de pared gruesa, las oosporas germinan por medio de un tubo germinal, el cual produce un esporangio

aunque algunas veces forman directamente un micelio (De la Garza, 1996).

### Variación Patogénica

Según Agrios (1989), variación es la propiedad o capacidad que tienen los organismos para cambiar sus características de generación en generación. Por su parte McDonald (1989) dice que la cantidad de variación en las poblaciones influye en su habilidad para altamente variables son más hábiles para adaptarse a condiciones cambiantes que aquellas con poca variación. Si la variación en el patógeno les permite infectar una variedad considerada como resistente a la cepa progenitora, el patógeno variante abatirá la resistencia de la variedad.

Umaerus, et al. (1983) mencionan que, de la capacidad de variación de la población, depende muy a menudo el éxito o el fracaso de la mejora para resistencia a patógenos.

Robertson (1991) por su parte señala, que se han realizado múltiples esfuerzos para entender las bases de la variabilidad en *P. infestans* y el respaldo genético de tal Variación. Señala también que, por si sola, la reproducción

sexual normal no explica la gran variación de ese hongo.

Al respecto, Brasier (1992) menciona que especies de *Phytophthora* manifiestan a menudo una amplia variación en muchos caracteres, dice también que el sistema genético en este género presenta una amplia gama de mecanismos para la expresión de variación, y según McDonald (1989), la variación en patogenicidad o virulencia no están necesariamente correlacionadas con la cantidad de variación genética en el genoma del patógeno como un todo.

Gidding y Berg (1919) fueron los primeros que notaron la variación patogénica en *P. infestans*. En su trabajo se inocularon plantas de papa y jitomate con cepas aisladas de estas especies, con lo anterior encontraron que la cepa proveniente de papa, a la que llamaron raza de papa fue incapaz de afectar plantas de jitomate, mientras que la cepa aislada de jitomate, atacó tanto a jitomate como a papa.

Aun después de haber notado ésta especialización con respecto a papa y tomate, pasaron 13 años para que se encontrara especialización en papa exclusivamente. Así, Galindo y Romero (1958) mencionan que para 1932, Schick

encontró por primera vez la presencia de razas fisiológicas en ese patógeno en el cultivo de papa.

Black et al. (1953) propusieron un sistema internacional de nomenclatura para los genes de resistencia de la planta y las razas del hongo, en el que las razas son denominadas con números de acuerdo al genotipo más complejo de la planta a la que es capaz de atacar, así la raza que solo puede infectar a plantas con genotipo  $r$  y  $R_1$ , se le llama raza 1, si ataca a plantas con el gene  $R_2$  se le llamará raza 2, a las razas que solo pueden infectar plantas que no tienen genes  $R$  de resistencia, se les llama raza cero.

Con relación a lo anterior Gallegly (1968) menciona que el descubrimiento de razas fue posible solo hasta que fueron identificados marcadores genéticos en la forma de genes de resistencia. En el mismo sentido, Erwin et al. (1963) señalan que la aparición universal de razas de *P. infestans*, o al menos su detección, no ocurrió hasta que los genes de resistencia de *Solanum demissum* fueron transferidos dentro de la papa comercial, *Solanum tuberosum*.

Son varios los mecanismos diferentes a la reproducción sexual, que se mencionan como responsables de la



variación en *P. infestans*; así, se menciona a la mutación (Gallegly y Eichenmuller, 1959, Mills y Peterson, 1952) y a la recombinación somática

### Estado Sexual de *Phytophthora infestans*

El primer reporte de oogonios con anteridios anfigenos y oosporas en cultivo puro fue hecho por Clinton en 1911 (Smoot et al., 1958).

Fry et al. (1989) señalan que la reproducción sexual proporciona a este patógeno dos ventajas biológicas importantes: la formación de nuevas y más virulentas razas a través de la recombinación genética que permiten al hongo atacar un mayor número de variedades de papa, y la producción de oosporas incrementan la probabilidad de sobrevivencia del hongo durante el invierno en regiones donde las condiciones climáticas son adversas al desarrollo del patógeno; asimismo, el suelo puede servir como fuente de inóculo inicial.

Después de los reportes de Clinton, numerosos investigadores realizaron trabajos buscando obtener las oosporas de este hongo. Al respecto Galindo y Romero (1958) mencionan que la formación de oosporas siempre se caracterizó

por ocurrir en números muy reducidos y en forma ocasional e inconsistente. Esto trajo como consecuencia la sospecha de que *P. infestans* fuera más bien un hongo heterotálico, o sea que requiere de la participación de dos talos para que la reproducción sexual se efectúe.

### Grupos de Compatibilidad

En este aspecto, Smoot *et al.* (1958) señalan que de las cruzas realizadas entre 105 aislamientos provenientes de Estados Unidos, Canadá, Europa Oriental, Sudáfrica y las Indias Orientales, se produjeron pocas oosporas viables. Posteriormente se incluyeron cuatro aislamientos de México (26 M, 42 M, 43 M y 66 M), los cuales se cruzaron con los 105 aislamientos anteriores. De los resultados de estas cruzas se encontró que existían dos grupos de apareamiento sexualmente compatibles. Al cruzarse cualquier aislamiento de un grupo con cualquiera del otro, se formaban oosporas con anteridios anfígenos en gran abundancia y cuando se realizaron cruzamientos entre los aislamientos de un mismo grupo no se formaban oosporas en abundancia. Tres de los cuatro aislamientos mexicanos, el 26 M, 42 M y 43 M formaron un grupo de apareamiento, mientras que el aislamiento 66 M se comportó como cualquiera de los 105 y conformaron otro grupo.

Con lo anterior fue evidente que los dos grupos de compatibilidad estaban presentes solo en México.

Por su parte Gallegly y Galindo (1957, 1958), señalan además que a raíz de los reportes de Smoot en 1958, en México se iniciaron trabajos para determinar las reacciones de apareamiento de un gran número de aislamientos, con el propósito de determinar si existían otros tipos de apareamiento, en adición a los dos ya descritos y también para esclarecer si el estado sexual de *P. infestans* ocurría en forma natural en México. De esta manera, al realizar cruces entre 95 aislamientos mexicanos, se encontró que los dos tipos de apareamiento se presentaban en México en una relación aproximada de 1:1. Otro hallazgo importante fue el realizado en el Valle de Toluca donde sobre hojas de papa de la variedad Katahdin, infectadas naturalmente, se encontraron oosporas, las cuales fueron semejantes en todos los aspectos a las formadas en cultivo puro.

Aún y cuando se ha demostrado que *P. infestans* es principalmente heterotálico, algunos investigadores lo han observado en forma ocasional como homotálico, tal es el caso que reportan Graham y Romero (1958), quienes de 88 aislamientos encontraron 53 del grupo A1, 33 del A2 y 2 se

comportaron como homotáticos. Para descartar la posibilidad de que las cepas homotáticas se debieran a una mezcla de talos de signo diferente, de una de las cepas, la n 53, se realizaron 40 cultivos monozoospóricos y se les determinó su grupo de compatibilidad, así 25 reaccionaron como A2, 3 como A1 y 12 se siguieron comportando como homotáticas. Se continuó el reanálisis de esta cepa hasta la tercera generación y los resultados fueron similares, pero se notó además que algunos cultivos del grupo A2 cambiaron a homotáticos, mientras que los del grupo A1 permanecieron constantes en su reacción.

### Reproducción

El hongo *P. infestans* puede presentar el tipo de reproducción tanto asexual como sexual. Se reproduce asexualmente en forma indirecta por zoosporas, o directamente por los esporangios. Los esporangios pueden germinar directamente mediante la producción de un tubo germinativo, o indirectamente produciendo un numero variable de esporas, llamadas zoosporas cuando son flageladas y esporangiosporas cuando no lo son. El tipo de germinación esta considerablemente regulado por la temperatura. Las temperaturas bajas favorecen la producción de zoosporas; las

temperaturas más altas, la producción de un tubo de germinación. La temperatura óptima para la germinación directa (mediante tubo de germinación) es de 24°C, en tanto que para la germinación indirecta es de 12°C. Las zoosporas nadan en la película de agua durante 15 minutos a alta temperatura (24°C) y hasta 24 horas cuando la temperatura es mas baja (12°C). Una vez que las zoosporas entran en reposo, se enquistan y germinan, cada una mediante un tubo germinal. El tubo germinal produce un apresorio, órgano hifal aplanado, adherido a la superficie, a partir del cual se forma una diminuta cuña de infección que se clava y penetra en la célula epidérmica del huésped (Pristou y Gallegly, 1954).

Graham et al. (1959) reunieron 104 aislamientos o cepas de *P. infestans* provenientes de varias partes del mundo, incluyendo cuatro de México, e hicieron todas las combinaciones posibles, encontrando que tres de las cepas mexicanas formaban oosporas con las cepas restantes por lo que concluyeron que *P. infestans* es una especie heterotálica. A su vez Gallegly y Galindo (1957 y 1958a), reafirman tal sugerencia mencionando que el hongo requiere líneas sexuales diferentes, y puesto que cada núcleo de *P. infestans* ha heredado potencialidad para la formación de

los dos sexos (oogonio y anteridio), es evidente que ésta es controlada por factores de compatibilidad; denominándose A1 al cosmopolita y A2 al que solo ha sido hallado en México. La reproducción sexual tiene lugar por conjugación de anteridios y oogonios de tipo de apareamiento opuestos, el anteridio en desarrollo es atravesado por el oogonio, que crece a través de él, llegando a formar una oospora, en caso contrario puede continuar su ciclo asexual formando esporangios en los tejidos afectados para luego liberar zoosporas y continuar infectando plantas. Las oosporas pueden servir como estructuras de resistencia que al ciclo siguiente germinan e infectan tejido susceptible para iniciar un nuevo ciclo (Ramírez y Romero, 1980; Alexopoulos y Mims, 1985).

Se menciona que existe gran preocupación entre los científicos porque la nueva variante A2, representa un problema de mayor grado e intensidad. Primero, es más agresiva porque causa epidemias más severas de la enfermedad y en etapas más tempranas del cultivo (CIP, 1996). Segundo, desarrolla resistencia al fungicida Metalaxyl con más facilidad. Tercero, las esporas que resultan de la recombinación sexual, llamadas oosporas, sobreviven en estado latente en el suelo durante años e incrementan los

veles de inóculo. Esta característica significa una adaptación más rápida al ambiente y a las medidas de control. Las oosporas pueden infestar al suelo y prolongar por años la permanencia del tizón tardío, considerando que la persistencia de las oosporas puede ser desastrosa. En cuarto lugar, algunas variantes del hongo pueden atacar papa y tomate al mismo tiempo, y esto dificulta aún más el control.

### **Mecanismos de Defensa de las Plantas ante el Ataque de *Phytophthora infestans***

En general, las plantas contrarrestan el ataque de los patógenos ya sea mediante características estructurales que actúan como barreras físicas e impiden que el patógeno penetre y se propague en ellas, o por medio de reacciones bioquímicas que tienen lugar en sus células y tejidos, las cuales producen sustancias tóxicas para el patógeno o crean condiciones que inhiben su desarrollo.

#### **Defensas Estructurales**

De acuerdo a Agrios (1989), después de que el

patógeno ha penetrado las estructuras de defensa preformadas, las plantas muestran varios grados de resistencia que consisten en la formación de uno o más tipos de estructuras que tienen cierta efectividad para contrarrestar las invasiones posteriores de los patógenos sobre ellas. Algunas de las estructuras de defensa formadas incluyen a los tejidos que impiden el avance del patógeno, otras comprenden las paredes de las células invadidas, todavía otras incluyen al citoplasma de las células atacadas. Por último, la muerte de las células invadidas puede proteger a la planta de otras invasiones, por lo que se le denomina al proceso reacción necrótica o de defensa hipersensitiva. Este último tipo de defensa es bastante común, y al parecer los tejidos necróticos aíslan al parásito obligado de las sustancias vivas (de las que depende por completo para nutrirse, crecer y propagarse), lo cual conduce a su inanición y muerte.



## Defensas Bioquímicas

Aún cuando las características estructurales proporcionan a las plantas varios grados de defensa contra el ataque de los patógenos, cada vez se hace más evidente que la resistencia de una planta al ataque de un patógeno no estriba tanto en las barreras estructurales sino en las sustancias que producen las células antes o después de haberse producido la infección. Una vez que el hongo ha superado las barreras estructurales de la planta, las células y tejidos responden al daño mediante una serie de reacciones bioquímicas que tienden a aislar al agente causal y a sanar la zona afectada. Algunos de los agentes químicos producidos se hallan en concentraciones lo bastante altas como para inhibir el desarrollo de la mayoría de los hongos. Dichos agentes incluyen a la mayoría de los compuestos fenólicos tales como los ácidos clorogénicos y cafeíco, a los productos de la oxidación de los compuestos fenólicos y las fitoalexinas, que en su mayoría también son compuestos fenólicos. Con frecuencia se ha observado que ciertos compuestos fenólicos que son tóxicos para los patógenos, se producen y acumulan a un ritmo mucho mayor después de haberse producido una infección en una variedad resistente

que en una susceptible. Entre los agentes químicos producidos por las plantas como defensa contra los patógenos se encuentran: fitoalexinas, fenoles fungitóxicos, formación de substratos y destoxificación de las toxinas del patógeno. En el último caso, las variedades resistentes metabolizan con gran rapidez las toxinas de los hongos o las combinan con otras sustancias para formar compuestos no tóxicos. Se sabe que la destoxificación de algunas toxinas, como es el caso del ácido fusárico, la piricularina, etc., es un fenómeno bastante común en las plantas y que tiene una importante función en la resistencia a la enfermedad. Con frecuencia la cantidad de estos compuestos es proporcional a la resistencia de la variedad vegetal a la enfermedad. Por lo menos en algunas de las enfermedades en las que el patógeno produce toxinas, la resistencia a la enfermedad es la misma que la resistencia a las toxinas. Sin embargo, aún no se ha dado una explicación satisfactoria acerca de la resistencia a las toxinas. Las plantas resistentes y las no hospederas no se ven afectadas por las toxinas específicas que producen *Helminthosporium*, *Periconia* y *Alternaria*, pero aún no se sabe si la acción selectiva de esas toxinas depende de la presencia de sitios receptores en las variedades susceptibles (pero no en las resistentes), o de

la destoxificación de esas toxinas en las plantas resistentes (Agrios, 1989).

## Mejoramiento Genético

### **a) Antecedentes Sobre el Desarrollo de Variedades Resistentes**

De acuerdo con la historia del cultivo, el uso de variedades resistentes a la enfermedad se inició con la selección de las plantas que sobrevivieron a la gran epifítia del siglo XIX, aunque el mejoramiento genético para resistencia al tizón tardío se inició propiamente a finales de ese mismo siglo con la búsqueda de fuentes de resistencia, sobre todo en especies silvestres de México y algunos países de Sudamérica (Umaerus et al., 1983). Este mismo autor señala que el control de la enfermedad por medio de la resistencia genética es una de las maneras más recomendables para hacer frente al daño del patógeno.

Robertson (1991) menciona que hay evidencia histórica que indican que después de la gran epifítia de tizón tardío en 1845, algunas variedades seleccionadas por los productores fueron más resistentes al ataque del patógeno que otras.

En la década de 1920 se vio surgir el uso de genes de resistencia de *S. demissum* como fuente para producir variedades resistentes al tizón tardío. En 1925, se iniciaron en Alemania ensayos de campo con las llamadas variedades "W", que fueron derivadas de *S. tuberosum* y *S. demissum*, y tenían un gene dominante para resistencia, el gene R1. Las variedades "W" se mostraron como inmunes al tizón tardío y para 1927 estas variedades se distribuyeron a mejoradores del extranjero. Fue hasta inicios de los 30`s cuando en Alemania se liberaron diversos cultivares con el gene R1, entonces surgieron las razas de *P. infestans* que vencieron la resistencia dada por ese gene. En Norteamérica, las variedades con gene R1 fueron liberadas a inicios de los 50`s y estas permanecieron inmunes hasta que la raza 1 se hizo más común y venció la resistencia de estas variedades, lo cual comprendió un período de seis años. Los genes R2 y R3 se usaron poco después que el gene R1 y la historia se volvió a repetir, las nuevas variedades con esos genes se comportaron primero como inmunes, pero pronto aparecieron las razas que vencieron la resistencia de estos genes (Van der Plank, 1968).

Westie (1991) por su parte señala que en los años iniciales de mejoramiento genético de papa, alguna

resistencia de campo estuvo disponible, la cual fue desarrollada de las plantas sobrevivientes de la gran epifítia de mediados del siglo XIX.

De inicios de la década de los 20's a inicios de los 70's, el énfasis principal de la mayoría de los programas de mejoramiento genético fue obtener inmunidad al hongo *Phytophthora infestans* por medio del uso de los genes R. Pero como menciona Jellis (1992), la falla de la resistencia vertical para controlar la enfermedad permitió un renovado interés en la resistencia horizontal. Al respecto Niederhauser\_et al. (1954), mencionan que la experiencia de campo en México ha mostrado repetidamente que la resistencia vertical sola no es de mucho valor.

Por otra parte, según Beukema y Van der Zaag (1990), en los programas de mejoramiento, se ha puesto atención a todas las características, pero debe considerarse que la variedad ideal todavía no ha sido encontrada y que todas las variedades tienen ciertas debilidades. Es más realista considerar buena adaptación, rendimientos estables, aceptable calidad y aceptables niveles de resistencia a enfermedades, como el mejor criterio de selección.

Hodgson (1961) señala que la resistencia en papa al tizón tardío generalmente es de dos tipos: una controlada por genes dominantes los cuales son llamados genes mayores o genes R y la otra gobernada por un sistema poligénico, la cual es llamada de genes menores. Van der Plank (1966) le llama al primer tipo resistencia vertical y al segundo resistencia horizontal.

### **b) Resistencia Horizontal**

Son muchos los nombres que se dan a los tipos de resistencia y estos en muchos casos se usan como sinónimos. Así, a la resistencia horizontal también se le conoce como resistencia general, resistencia de campo, resistencia parcial, resistencia poligénica, resistencia de genes menores, resistencia no específica y resistencia multigénica entre otros (Browning *et al.* 1979; Niederhauser *et al.* 1954; Thurston, 1971 y Van der Plank, 1966 y 1982).

Todas las formas de resistencia en las que se excluye la reacción de hipersensibilidad, puede considerarse como resistencia de campo o poligénica. Esto puede explicarse como un complejo, debido a características morfológicas y/o fisiológicas de la planta que permiten mayor grado de

tolerancia a la infección, y que confieren resistencia a todas las razas (Hodson, 1962).

Black (1954) señala que la resistencia de campo está controlada por una serie de genes menores, los cuales determinan el grado de susceptibilidad en las variedades y la extensión de la necrosis en forma inmune de campo. La resistencia de campo confiere protección parcial contra todas las razas especializadas del parásito.

Por otra parte, Graham (1962) estudió la heredabilidad de la resistencia general en *Solanum verrucosum* y concluyó que la resistencia fue heredada en una base cuantitativa que puede ser gobernada por una serie de genes menores.

La resistencia horizontal es estable a largo plazo; algunos cultivares comerciales europeos, como Alpha, Vran, Epoca y algunas norteamericanas como Arenaca, Emmot, Kennebec, Saco, Marrimac, Sebago, etc., han mostrado cierto nivel de resistencia que ha persistido más o menos constante por un período de casi 60 años (Niederhauser, 1986).

Diversos autores, entre ellos Niederhauser y Cervantes (1956), reportan que las especies silvestres de México poseen un elevado nivel de resistencia horizontal, lo cual les ha permitido sobrevivir por miles de años a pesar de estar expuestas al ataque de un gran complejo de razas de *P. infestans*, razón por la cual en todas las partes del mundo donde se realizan trabajos de mejoramiento en papa, están interesados por el germoplasma mexicano como fuente de resistencia.

### c) Resistencia Vertical

A la resistencia vertical se le llama resistencia específica, resistencia de genes mayores, resistencia hipersensitiva, resistencia monogénica, resistencia racial y resistencia de genes R, entre otros (Niederhauser *et al.*, 1954 y Singh, 1986).

La resistencia vertical retrasa el inicio de una epidemia. Su acción es reducir la cantidad efectiva del inóculo inicial con el cual inicia la epidemia (Van der Plank, 1968). Esta resistencia es controlada por genes dominantes llamados R; a la fecha se conocen 12 de ellos, los que causan una reacción hipersensitiva en los tejidos de la



planta (Henfling, 1987), aún cuando la reacción hipersensitiva no es una característica general de esta resistencia (Van der Plank, 1978).

La resistencia vertical o monogénica está dirigida contra razas específicas del patógeno y se debe a la condición hipersensitiva del protoplasma, originada por la presencia de genes mayores. La reacción de las plantas con genes dominantes hacia las razas para las cuales son resistentes, es una pequeña mancha necrótica la cual ha sido llamada reacción de hipersensibilidad. La principal diferencia entre resistencia y susceptibilidad, parece ser la reacción y la velocidad de la célula susceptible a la hifa invasora del patógeno. En variedades resistentes el patógeno puede penetrar la pared celular, pero tan pronto como el haustorio hace contacto con el protoplasma de la célula huésped, el núcleo de esta se desplaza hacia el sitio de penetración y en poco tiempo se desintegra y aparecen en el citoplasma gránulos pardos, primero en torno al patógeno, después por todo el citoplasma, simultáneamente ocurre un engrosamiento de la pared celular. Conforme aumenta la coloración café del citoplasma de la célula hospedera éste se torna denso y se inicia la necrosis celular, las hifas invasoras se degeneran paulatinamente y al mismo tiempo sus

oleos se desintegran y forman una masa homogénea. En la mayoría de los casos las hifas no sobrepasan esta fase y se tiene la infección. La hipersensibilidad, en el caso del zón, ha sido atribuida a la infiltración de las células susceptibles por compuestos fenólicos o fitoalexinas (Niederhauser et al., 1956)

Niederhauser et al. (1954) concluyeron que la resistencia específica del tizón tardío no provee suficiente protección en ambientes mexicanos. Es notorio que la resistencia determinada por genes R en las variedades de papa, es vencida por nuevas razas del hongo, por lo que en la actualidad casi todo el mejoramiento genético está basado sobre la resistencia general, que depende de un mayor número de factores ofrece más estabilidad de las variedades y menos riesgo de pérdidas sorpresa.

#### **Antecedentes Sobre la Respuesta de los Cultivares a *Phytophthora infestans* en condiciones de campo**

Niederhauser (1986) señala que el cultivar Alpha y otros cultivares europeos, han mostrado buen nivel de resistencia horizontal que ha persistido más o menos

constante por un período de 60 años; sin embargo Muñiz (1998), reporta que este cultivar junto con Atlantic, se comporta como uno de los más susceptibles en la región papera de Coahuila y Nuevo León.

A este respecto, Niederhauser (1986) señala que la causa de variación en los niveles de resistencia mostrada por los materiales con resistencia horizontal es la influencia de los factores ambientales en la expresión de este tipo de resistencia, y pone como ejemplo la variedad Atzimba que en climas cálidos, como en Costa Rica, no ha mostrado la resistencia esperada, en cambio bajo otras condiciones muestra niveles altos de resistencia.

Muñiz (1998) señala que el cultivar Norteña ha presentado altos niveles de resistencia en evaluaciones regionales, pero que en la localidad de Buenavista, Coahuila, sufrió infección en etapas tardías del cultivo. Se puede pensar que fue afectada por una raza compleja que aparece tarde en el ciclo y la cual debe tener baja frecuencia, pero por ejemplos vividos con otras variedades, en otros países, se puede esperar que de incrementarse la superficie sembrada con este material, se incremente la frecuencia de la raza que

U.A.A.A.N

lo afecta, por lo que en un período corto de tiempo, esta variedad puede volverse más susceptible a la enfermedad.

Flores y Cadena (1997), por su parte, reportan que en pruebas realizadas bajo condiciones naturales en el Valle de Toluca, el cultivar Norteña se comportó como uno de los cultivares con mayor tolerancia, y no sucedió lo mismo con el cultivar Alpha que fue uno de los dos más susceptibles.

Van Hoogan (1989), por su parte, señala que las variedades europeas formadas para condiciones de días largos (15 a 16 h) y para temperaturas generalmente templadas (15 a 25°C), maduran en forma más temprana en condiciones de días más cortos y son más sensibles al ataque de *Phytophthora infestans*. Bajo condiciones de Holanda, la variedad Alpha y Gigant se comportan como cultivares medianamente susceptibles a tizón de la hoja y poco sensibles a la del tubérculo. El cultivar Mondial se comporta como susceptible a tizón de la hoja y poco sensible a la del tubérculo.

Con relación a lo anterior, Niederhauser (1954) señala que en 1948 se probó la resistencia de diversas variedades desarrolladas en E.U. Estas variedades fueron probadas en el Valle de México, donde rápidamente fueron

severamente atacadas y después murieron. En 1949 y 1951 fueron probadas otras variedades, sucediendo lo mismo del caso anterior. En 1952 se probaron 143 clones que tenían los genes R1 y R2 y se habían reportado resistentes en ensayos realizados en EU pero cuando fueron plantados en el Valle de Toluca las plantas desarrollaron tizón y la mayoría murieron. En esta prueba se observó variación en susceptibilidad y los clones más resistentes se seleccionaron para ensayos posteriores. En 1953 cerca de 4,000 líneas fueron probadas en Toluca, estas líneas se habían comportado como resistentes en EU. Solo seis semanas después de plantadas, el 94 por ciento de estas líneas estaban seriamente afectadas por tizón o muertas. De estos materiales se seleccionaron aquellos que mostraron resistencia para estudios posteriores.

#### **e) Pruebas de Evaluación de Resistencia *in vivo* e *in vitro***

Las pruebas para evaluar la resistencia de genotipos de papa a *Phytophthora infestans* pueden ser realizadas a través de dos métodos: a) *in vivo* y b) *in vitro*. Las pruebas *in vivo* pueden realizarse en condiciones naturales (de campo) o en laboratorio, para lo cual se utilizan plantas completas o parte de ellas, y las pruebas *in vitro* pueden involucrar

toxinas o filtrados tóxicos, mismos que pueden ser aplicados en: callos, células en suspensión y protoplastos.

### Evaluación *in vivo*

En la evaluación *in vivo*, se debe tomar en cuenta que hay un número de mecanismos a través de los cuales es posible controlar el nivel de infección en inoculaciones en invernadero. Algunos de ellos se refieren al ajuste de temperatura, humedad, edad de la planta, concentración del inóculo y uniformidad en la aplicación. En el campo, sin embargo, el mejorador depende de las condiciones naturales y sería muy afortunado obtener registros de un nivel de infección uniforme y óptimo. Los registros de campo son muchas veces confundidos por la presencia de múltiples enfermedades y desarrollo irregular de las plantas. Es por lo tanto imperativo que las pruebas de enfermedades sean conducidas bajo condiciones de inoculación controlada. En el caso de tamizar un gran número de líneas de germoplasma, sería deseable cribarlas bajo condiciones de campo, y que solo las promisorias fueran evaluadas bajo condiciones controladas de invernadero (Andrus, 1953).

Según Beukema y Van der Zaag (1990), es muy complejo valorar la resistencia a tizón tardío bajo condiciones de campo debido entre otras cosas a que el nivel de resistencia varía en diferentes estados de desarrollo de la planta o madurez. El ataque del tizón tiene lugar solo cuando las condiciones ambientales son favorables y el inóculo está presente. Como la resistencia de campo está ligada a la madurez, es esencial no solo registrar el ataque del tizón sino también el estado de madurez de las variedades involucradas. Por otra parte el efecto de la longitud del día sobre la madurez también afecta la susceptibilidad de esas variedades al tizón tardío (condiciones de día corto afectan la susceptibilidad). Para determinar diferencias en resistencia, las observaciones deben realizarse en forma frecuente. Cuando el tizón tardío es valorado en pruebas de campo en áreas donde no hay la certeza de que las condiciones sean favorables para el desarrollo del hongo, deben tomarse medidas apropiadas (tales como riego por aspersión, prevención de las fuentes de infección, inoculación en el campo).

De acuerdo con Singh (1986), para hacer la prueba de resistencia basada en hipersensibilidad o resistencia vertical se pueden inocular hojas de plantas de *Solanum*

*tuberosum* con zoosporas del hongo y llevarlas a una cámara húmeda a 18°C por 24 h. Las hojas son colocadas en cajas petri y una gota de la suspensión de zoosporas es colocada bajo la superficie de cada hoja. Las manchas necróticas aparecen usualmente al tercer día de la inoculación. La resistencia de campo puede ser valorada en pruebas de campo después de la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad. Si se usan cuatro repeticiones, pueden ser valoradas 1000 hojas por cultivar (5 folíolos por hoja x 5 hojas por tallo x 10 tallos por parcela x 4 repeticiones por cultivar). El número de folíolos destruido es expresado como porcentaje del total. Es necesario hacer observaciones semanales para darle seguimiento al desarrollo de la enfermedad.

Por otra parte, Hodgson (1961), señala que la resistencia de campo puede ser evaluada en el laboratorio o por pruebas con peroxidasa. La valoración en laboratorio de resistencia de campo es realizada en discos de hoja inoculadas con una gota de suspensión de zoosporas. Los discos inoculados son dejados sobre papel filtro húmedo a 15°C y valoradas después de una semana. Las hojas para tales evaluaciones son tomadas de plantas de dos meses de edad y colectadas en la tercera parte superior de la planta. Con



esta prueba se ha encontrado una buena correlación entre los resultados en el campo y el laboratorio. La prueba de peroxidasa está basada en la relación de la actividad de la peroxidasa en hojas y la resistencia de campo de la papa al tizón tardío Sakai y Toriyama (1964) han mostrado una buena correlación entre la actividad de estas enzimas y la resistencia en estado adulto pero es incierto en estados jóvenes.

Singh (1986) señala que la selección para resistencia para algunos patógenos puede ser llevada en ausencia del mismo. Esto es, por el uso de toxinas producidas por los patógenos que matan los tejidos de la planta hospedera. Las toxinas han sido usadas para selección de mutantes de avena resistentes a *Drechslera victorieae*; en caña de azúcar resistente a *D. sacchari* y de maíz resistente a *D. maydis*, raza T. La variedad Victoria y sus derivados son susceptibles al tizón Victoria *D. victorieae*. La toxina producida por el hongo es llamada Victorin. Es altamente específica para matar semilla en germinación de avena Victoria. La concentración de la toxina letal para las plantas de la variedad Victoria no tiene efecto en plantas de variedades de avena resistentes a *D. victoriae*. El procedimiento de selección usado en la variedad Victoria es uno de los más eficientes para detectar

mutantes. En 1956 Konzak las usó para selección de plántulas resistentes provenientes de semillas expuestas a rayos X. Las semillas cosechadas de plantas individuales  $M_1$ , fueron enrolladas en toallas de papel húmedo, llevadas a germinar en una cámara húmeda por alrededor de dos días, después fueron asperjadas con solución de toxinas diluidas. Después del tratamiento con toxinas, las semillas fueron llevadas para continuar su germinación por otros 3 o 4 días de 75° a 80°F. Los rollos fueron abiertos y los mutantes resistentes transferidos a suelo. Las toxinas mataron las raíces de las plantas sensibles, pero las raíces de aquellos individuos resistentes no fueron afectadas.

Schertz y Tai (1969) seleccionaron plántulas de sorgo para resistencia a la enfermedad causada por *Pericornia circinata*. Ellos sumergieron raíces de plántulas en cultivo de filtrados de *P. circinata* por cuatro días. Las plántulas sobrevivientes fueron transplantadas y autopolinizadas y su progenie fue probada. Una de diez probaron ser mutantes.

Dutrecq (1977) desarrolló una técnica para probar la inhibición de la germinación de semilla de cebada por cultivo de filtrados de *D. sativa*. Las semillas fueron remojadas por 24 h en la preparación tóxica y después colocadas por 48 h en

ena húmeda. Se encontró una relación cuasilinear entre terminación de la semilla y concentraciones tóxicas. Este efecto tóxico fue marcadamente afectado por el pH del cultivo filtrados, siendo el máximo pH de 2.0.

### evaluación in vitro

Singh (1986) señala que los programas de mejoramiento básico y no convencional se realizan sobre la variación presente en la población seguida por la selección de individuos deseables. Las fuentes primarias de variación genética son mutación y recombinación. La recombinación es rutinariamente explotada en el mejoramiento y recientemente se ha dirigido mucho trabajo para incrementar el nivel de selección en plantas superiores. El problema en el nivel celular no es de inducción, sino de selección. Sin embargo, recientemente ha sido mostrado que la mutación puede ser seleccionada en plantas superiores a nivel celular. Las técnicas de selección a nivel celular consisten en el crecimiento de las células que pueden o no ser tratadas con mutágenos en un medio que contiene una sustancia tóxica en una concentración que normalmente inhibe el crecimiento normal de todas las células. Las células que proliferan en el medio pueden ser consideradas presumiblemente como

mutaciones. Las células que proliferaron pueden ser rediferenciadas a plantas, y la planta completa puede mostrar el fenotipo mutante. Sin embargo, algunos de los reportes publicados sugirieron que no hay relación entre la reacción de la planta contra patógenos en el cultivo de tejidos y la reacción del mismo genotipo como planta y viceversa. Keen y Horsch (1972), basados en su trabajo con *Phytophthora megasperma*, advirtieron contra el uso no natural para selección en el de sistema huedped-patógeno. La ventaja de ésta técnica es que permite la selección de un gran número de células tratadas con mutágenos en más de  $10^6$  en caja petri, mientras una gran cantidad de plantas en campo es requerida para seleccionar  $10^3$  plantas diploides. Este enfoque puede ser usado para cualquier enfermedad de plantas, proporcionando la toxina producida por el patógeno, o un compuesto relacionado a la toxina que ha sido identificado y puede ser usado directamente como el agente selectivo. Para la aplicación de ésta técnica pueden ser utilizados: callos, células en suspensión o también protoplastos.

El tipo primario de crecimiento que uno usualmente encuentra en el cultivo de tejidos de plantas en un medio sintético es el callo. Para promover la formación de callos, el explante de un tejido es asépticamente removido de la

planta y colocado en un medio que contiene las sustancias promotoras necesarias. El resultado del crecimiento puede consistir de un solo tipo de células, o generalmente de varios tipos de células. Después de que el callo es establecido, usualmente es transferido del medio sólido a medio líquido para el establecimiento de un cultivo en suspensión de células. Alternativamente, el explante original puede ser colocado en medio líquido para obtener un cultivo en suspensión y muy pequeños grupos de células. El cultivo en suspensión puede ser filtrado para obtener células simples y grupos de pocas células en el filtrado. Los clones de células simples pueden ser aislados por suspensión de células simples en una gota de medio líquido o por aspersion de ellas en medio con agar en cajas petri (Singh, 1986).

Con relación a lo anterior, Bajaj y Saettler (1970) observaron que cultivos de callos de frijol (*Phaseolus vulgaris* cv. *Manitou*) mostraron respuesta en crecimiento reciente cuando se cultivaron en filtrado de toxina de huésped-específico a partir de la bacteria *Pseudomonas phaseolicola*. Hubo inhibición en el crecimiento en un 77 por ciento; sin embargo, algunas células aisladas mostraron tolerancia diferencial a las toxinas del filtrado. En maíz, el polen proveniente de plantas sensibles o resistentes puede

ser seleccionado contra patotoxinas de *Drechslera maydis*. El polen proveniente de las plantas resistentes germinó al nivel de la toxina a la que se inhibió la germinación del polen proveniente de las plantas susceptibles (Laughnan y Gabay 1973). Se demostró también la existencia de diferente respuesta de protoplastos aislados a partir de plantas resistentes y susceptibles de maíz a la toxina de la raza T producida por *D. maydis* (Pelcher et al., 1975). Fue demostrado además que callos provenientes de plantas susceptibles (esterilidad masculina) mostraron sensibilidad a la toxina T en el medio, mientras que callos de líneas celulares resistentes resultaron en la regeneración de plantas completas las cuales fueron resistentes a *D. maydis*.

La relación entre la reacción de protoplastos o callos y la reacción de los mismos genotipos como plantas completas puede ser muy estrecha cuando los compuestos tóxicos responsables de la virulencia es usado para detectar protoplastos sensibles (Singh, 1986).

Singh (1986) señala que el mejoramiento de plantas de propagación vegetativa usando técnicas de selección in vitro, el cultivo de embriones, callos, anteras, células somáticas o protoplastos, abrió nuevas oportunidades para la selección de

individuos los cuales son resistentes o tolerantes a enfermedades de plantas ya que La selección para resistencia para algunos patógenos puede ser llevada en su ausencia. Las plantas regeneradas a partir del cultivo de células, son frecuentemente diferentes para una o más características de sus progenitores de los cuales fueron derivadas.

Singh (1986) señala además, que las ventajas más importantes del cultivo de células en el mejoramiento son: a) control de los efectos del clima y ambiente natural, lo cual hace más fácil medir pequeñas diferencias cuantitativas en resistencia poligenicamente heredadas; b) habilidad para manejar gran número de individuos en un pequeño lugar; y c) la facilidad para trabajar con microsporas y haploides, lo cual permite detectar características recesivas y caracteres aditivos dentro de poblaciones relativamente pequeñas.

Estas ventajas combinadas aceleran la producción de nuevas variedades. Sin embargo, las técnicas no convencionales nunca pueden remplazar totalmente o ser usadas independientemente del mejoramiento clásico, pero pueden ser usadas en forma complementaria en los procesos de mejoramiento (Wenzel 1984).

Existen algunos problemas mayores que confronta el mejorador de plantas que desea utilizar la selección a nivel de cultivo de células para el mejoramiento de cultivos. Primeramente, no todos los cultivos regeneran plantas rápidamente. Algunas veces, esta dificultad puede ser superada utilizando cultivo de embriones, pero en general, la regeneración de plantas completas a partir de cultivo de tejidos de cereales no se realiza en forma rápida cuando son utilizados pequeños agregados de células y protoplastos (Bhojwani *et al.*, 1977; King *et al.*, 1978). Por lo tanto se requiere mayor trabajo básico para desarrollar técnicas simples para la regeneración de plántulas a gran escala. En segundo lugar, no siempre puede ser predicho con cierto grado de certeza que las características seleccionadas a nivel de células o callos sean expresadas en el total de las plantas regeneradas a partir de ellas y que estas características sean transmitidas a la siguiente generación.

En cuanto a los protoplastos, Cocking (1972) señala que son una porción de las células que permanecen después de que la pared celular ha sido removida por medios enzimáticos o físicos.



Por otra parte Carlson (1973) ha discutido las razones para usar protoplastos en experimentos genéticos. Estos incluyen: a) el potencial para obtener una gran población homogénea de células de composición genética conocida a partir de una sola planta, b) la ausencia de pared celular permite a los protoplastos fusionarse con otro, c) es posible una siembra más eficiente que con células intactas, y d) existe la posibilidad de regenerar plantas completas a partir de un solo protoplasto.

Protoplastos derivados de callos de tabaco fueron seleccionados por su resistencia a toxinas de *Pseudomonas syringae* cv. *Tabaci* y de *Alternaria alternata*. Un gran porcentaje de plantas obtenidas a partir de callos del segundo ciclo de selección fueron resistentes a la infección por estos patógenos y se encontró variación en las características morfológicas de las plantas regeneradas. Resultados de la generación  $R_1$  indican que la resistencia mostrada por plantas  $R_0$  contra ambas enfermedades es heredable. Mecanismos de resistencia heredados cuantitativamente de *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae*, fueron expresados en cultivo de callos de tabaco en un sistema de cultivo *in vitro* huésped-patógeno que puede ser útil en seleccionar líneas de tabaco para resistencia a *P.*

*parasitica* (Singh, 1986).

## **Inducción de Callos y Variación Somaclonal**

### **Inducción de Callo**

El cultivo de callos se refiere a la proliferación de células en forma desorganizada de las cuales se pueden transferir pequeñas porciones para que continúe la proliferación en medios sólidos o líquidos. La organización de estos callos ya sea hacia la organogénesis o la embriogénesis, producirá un número ilimitado de plantas que pueden ser diferentes entre sí, fenómeno conocido como variación somaclonal. Esta variación somaclonal que se presenta en el cultivo de tejidos, es una opción adicional que puede ser utilizada en el mejoramiento de plantas, y puede ser lograda a través del cultivo de callos, células en suspensión y cultivo de protoplastos.

En particular el cultivo de callos se utiliza en mejoramiento genético para aprovechar la variación somaclonal, ya que cuando las células vegetales se cultivan a partir de una fase callosa desorganizada, las plantas que se regeneran después, pueden exhibir varios caracteres

fenotípicos distintos a los del material original, (Lindsey y Jones, 1989). Un ejemplo muy notable de variación somaclonal e inestabilidad genética se puede ver en el cultivar de papa "Russet Burbank" y el cultivar Bintje. En este aspecto, el material inicial tiene un efecto importante, y se ha observado que las especies poliploides presentan anomalías cromosómicas con más frecuencia que los diploides (Pierik, 1990)

En un tiempo, estas variantes se descartaban por considerarse como "artefactos". Sin embargo recientemente se ha acumulado información para apoyar el hecho de que estas variantes, producto de la clonación (somaclonas) no son del todo indeseables y hoy en día se ha visto que puede ser una técnica para obtener plantas resistentes a condiciones adversas como un grado elevado de salinidad, la presencia de toxinas, la alta concentración de metales pesados y otras (Villalobos, 1985).

Al respecto, Pierik (1990) señala que para iniciar la formación de callos de un explante se recomienda el suministro de reguladores exógenos. Las exigencias de reguladores exógenos, dependen en gran medida del genotipo y

de su contenido de reguladores endógenos. Estas necesidades en principio pueden ser: solo auxinas, solo citocininas o auxinas y citocininas.

Por su parte, Devlin (1980) señala que las auxinas en altas concentraciones suprimen la morfogénesis y dan por resultado la rápida proliferación de células tipo callo. En general, las auxinas son los reguladores de crecimiento más usados en la iniciación y mantenimiento del cultivo de callos, en concentraciones que generalmente oscilan de 0.1 a 10 mg/l.

Con relación a lo anterior, Po-jen Wang y Ching-yeh Hu (1985), reportan que para la formación de callo en papa, el 2,4-D (2mg/l) solo o combinado con AIA (3.2 mg/l) y kinetina (1.0 mg/l) fueron eficientes para inducir callo.

Aloni (1980), por su parte, agrega que los efectos sinérgicos de los reguladores de crecimiento pueden ser modificados por factores tales como los constituyentes del medio (azúcar, vitaminas, aminoácidos, etc.), y las condiciones físicas (iluminación, consistencia del medio),

aunque siempre se manifiesta como factor dominante el balance de los reguladores de crecimiento.

Quraishi *et al* (1987) mencionan que la iniciación de calogénesis con subsecuente organogénesis *in vitro* de varios explantes depende mucho de la fisiología del tubérculo semilla, ya que la fisiología del tubérculo de papa acondicionada determina el grado de calogénesis, por lo que juega un papel importante la edad y la temperatura de conservación.

En cuanto al crecimiento de los callos relativamente indiferenciados, puede cuantificarse de distintas maneras, pero normalmente se expresa como incremento del peso fresco, incremento del peso seco o del número de células en un intervalo de tiempo (Lindsey y Jones, 1989).

Dodds y Roberts (1990) concluyen que la medida de peso seco de un callo proporciona un aceptable estimador de la actividad biosintética de un cultivar; además en pesos frescos abajo de 500 mg la relación entre peso fresco y peso seco es aproximadamente lineal.

Por lo que respecta a variables de tipo cualitativo, Lindsey y Jones (1989) mencionan que en condiciones nutritivas y hormonales adecuadas, la morfología del callo puede describirse como friable o compacta. Al respecto, Barba (1994) señala que los callos varían según la apariencia externa, textura y composición celular, indicando que algunos callos son masas celulares compactas y duras, con células íntimamente unidas, mientras otras forman tejidos esponjosos con una gran cantidad de espacios intercelulares que varían en coloración aún los derivados de la misma especie.

Según Haberlach *et al.* (1978), la reacción de los callos también depende de la composición del medio y de las temperaturas de crecimiento, condiciones que afectan la morfología de los callos.

### Variación Somaclonal

La tendencia que ha prevalecido hasta ahora en el fitomejoramiento es la de producir variedades de elevada productividad, pero que requieren gran cantidad de insumos agrícolas; por ejemplo fertilización y empleo exhaustivo de

pesticidas. Con el uso de herramientas biotecnológicas, como lo es la selección de nuevos genotipo a nivel celular así como aumentando la gama de cruzas amplias, se pueden generar variedades diseñadas para producir bajo condiciones adversas tanto de clima como de suelos que puedan tolerar mejor la amenaza de enfermedades y plagas. Esto significa que con este tipo de variedades se podrá ampliar el número de tierras cultivables y reducir la cantidad de plaguicidas químicos que en muchos de los casos representan un serio problema de contaminación ambiental y un fuerte gasto que no pueden enfrentar los pequeños productores en el Tercer Mundo.

La variación somaclonal puede ser una estrategia muy promisoría para mejoramiento genético ya que puede simplificar dos etapas del proceso de mejoramiento de plantas: la inducción de nueva variación y la selección en una población grande. El cultivo de tejidos revela un método efectivo para incrementar la variación genética y su utilización juega un papel aún más importante para especies poliploides y de reproducción vegetativa (Foroughi-Wehr et al. 1986).

A la variación somaclonal se le ha conocido como la

diversidad detectada entre plantas regeneradas provenientes de cualquier técnica de cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro* (Larkin y Scrowcroft, 1981)

Al respecto, Shepard *et al.* (1980) consideran que es más fácil mejorar por selección una variedad ya probada a crear una nueva, y es aquí donde puede encontrarse el mayor potencial de esta técnica. Aunque la variación clonal puede ser una fuente muy importante de diversidad genética para aumentar la heterocigocidad de las plantas cultivadas en cruces con otras variedades, las mutantes seleccionadas son variantes naturales de cultivares agronómicos superiores que, tras pruebas de campo para determinar la estabilidad genética de las nuevas características, pueden ser empleadas de inmediato reduciendo mucho el tiempo requerido en el mejoramiento tradicional. Tal es el caso de la variedad Russet Burbank, que es un valioso cultivar de papa pero que no puede ser cruzado debido a su esterilidad. De 1700 somaclones regenerados de protoplastos de esta variedad y evaluadas respecto a varias características morfológicas durante los períodos de siembra, se seleccionaron 65 a los que se analizaron 35 caracteres. En todos ellos se encontraron diferencias significativas en 22 de los 35



caracteres y cada somaclon difirió de los padres en cuando menos una característica; una de las plantas difería de la planta madre en por lo menos 17 caracteres. Aproximadamente 20 por ciento de las somaclonas mostraron una mayor resistencia al tizón tardío producido por *P. infestans* que fue transmitida a generaciones subsecuentes. También se recuperaron varias somaclonas con resistencia al tizón temprano producido por el hongo *Alternaria solani*. La variabilidad natural asociada con el cultivo de tejidos representa una fuente sobre la cual la presión de selección puede ser impuesta para aislar clones.

Se ha señalado que la variación somaclonal parece ser tanto el resultado de la variación genética preexistente en el explante, como de la variación inducida durante la fase de cultivo de tejidos (Evans et al. 1984)

De este modo parece haber dos tipos de variación somaclonal: la heredable y la epigenética. La variación heredable es estable a través del ciclo sexual o de propagación asexual repetida; la variación epigenética puede ser inestable aún en propagación sexual. La variación somaclonal involucra genes simples o múltiples y puede ser

ida a alteraciones en las bases del ADN, de genes, de cromosomas o de un grupo de cromosomas completo (Evans et al., 1984).

Uno de los principales beneficios de la variación somaclonal en los programas de mejoramiento genético, es la conservación de variación genética en cultivares genéticamente útiles, lo cual se ha obtenido tradicionalmente recurriendo a la hibridación (Hall et al., 1986; Heath-Pagliuso et al., 1989; Hanson et al., 1994; y Sorensen et al., 1994).

López (1995) señala que la variación somaclonal fue propuesta por Novak en 1984 como un sistema nuevo de mejoramiento genético de ajo (*Allium sativum* L.), considerando que el ajo es una planta apomíctica obligada a ninguna posibilidad de mejoramiento genético vía combinación sexual. De acuerdo a este autor, Novak obtuvo clones euploides y poliploides a partir del cultivo de callos mantenidos por un período de tiempo prolongado, y también se observaron variaciones fenotípicas en 40 por ciento de las plantas regeneradas. La variación somaclonal también fue estudiada en tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) para

establecer su base genética y evaluarlo con la finalidad de mejoramiento genético. De las plantas regeneradas obtenidas se determinó variación en el número de cromosomas, varias mutaciones puntuales con una alta frecuencia y también mutaciones a nivel del ADN de cloroplastos.

La mayoría de las investigaciones sobre este tópico se han efectuado con individuos élite o clones con potencial conocido como cultivares o líneas mejoradas. La variación observada en cada material puede resultar de varias fuentes incluyendo la inducción de la expresión de genes presentes en el genoma pero que han sido suprimidos en algún estado del desarrollo. Por ejemplo, se aisló un somaclon de caña de azúcar con resistencia a la mancha del ojo. Este carácter fue estable por diez años de propagación asexual, pero se perdió recientemente, lo cual sugiere que puede haber sido debido a una resistencia de naturaleza epigenética o a la aparición de una cepa resistente del hongo (Smith y Drew, 1990).

Es factible usar la variación somaclonal en el mejoramiento genético de plantas y será muy útil para

incorporar nuevas características a una variedad o para modificar las que ésta tiene. De hecho, la variabilidad genética inherente al somacultivo permite mejorar significativamente el valor agronómico de una especie cultivada. Hasta hoy, la variación somaclonal ha sido un proceso al azar, pero será de mayor utilidad cuando se pueda controlar y dirigirla a metas específicas. El desarrollo de protocolos de regeneración para especies recalcitrantes facilitará el acceso a variaciones naturales e inducidas (López, 1995).

Según López (1995), la combinación de la variación somaclonal y la selección *in vitro* ofrecen potencialmente una ruta muy poderosa para el mejoramiento genético de plantas, ya que un gran número de posibles variantes celulares pueden ser tamizadas en relativamente poco tiempo con escasos recursos. Es sabido que los mecanismos de la variación somaclonal operan aparentemente a nivel de un gen individual, por lo que los caracteres que son de herencia simple pueden ser más fáciles de manipular que aquellos complejos como el rendimiento y otros, que se considera son de herencia poligénica.

La selección *in vitro* se ha aplicado para características importantes para la agricultura como tolerancia a herbicidas (Swanson y Tomas, 1983; Chaleff y Gay, 1984; Baillie et al., 1983); a enfermedades (Shepard et al., 1980; Behnke, 1980; Larkin y Scowcroft, 1981; Acristán, 1982; Hartman et al., 1984); a factores ambientales adversos como sales (Dix y Street, 1975; Smith y McComb, 1983; Tal, 1990; Watad et al., 1991; Saranga et al., 1992) a déficit hídrico; Sumaryati et al., 1992); a temperatura (Van Swaij et al., 1986; Trolinder y Shang, 1991; y a deficiencias de minerales y toxicidad (Smith y Brew, 1990).

Dentro del cultivo de tejidos vegetales, el cultivo de callo, células aisladas, protoplastos y su subsecuente desarrollo en plantas completas ofrece la posibilidad de seleccionar mutantes bioquímicas con características de interés tanto para el fitomejoramiento como para la investigación de los procesos subcelulares fundamentales. La ventaja de este sistema radica en la posibilidad de muestrear millones de células cultivadas *in vitro*, de manera parecida a como se hace con las bacterias, y recuperar fenotipos especiales que no se presentan en las plantas completas. El proceso es tan simple como hacer crecer

células en suspensión o sembrarlas en medio semisólido en presencia del agente selectivo y subcultivar las colonias hasta obtener líneas que crezcan normalmente en él. Características tales como: la tolerancia a herbicidas, tolerancia a las enfermedades o el estrés se pueden detectar con relativa facilidad aplicando la presión de selección adecuada. De esta manera se han obtenido líneas tolerantes a salinidad, elevada resistentes a toxinas o filtrados de hongos que heredan estas características. Las líneas seleccionadas, con una determinada característica, se denominan variantes hasta que se establece la naturaleza del cambio fenotípico. Si es heredable se clasifica como una mutación y si es inestable como un cambio epigenético (López, 1995).

### **Selección *in vitro* de Líneas Tolerantes a Toxinas y Filtrados Tóxicos**

Wheeler y Luke (1955) usaron primero fitotoxinas en mejoramiento para resistencia y señalan que la correlación de resistencia a un parásito y la resistencia a sus toxinas es un prerequisite para el uso de fitotoxinas.

Posteriormente Byther y Steiner (1972) y Matern et al. (1978) probaron esta correlación con algunos hongos. Strobel (1973) demostró el mecanismo molecular de la susceptibilidad o resistencia a *Helminthosporium sacchari*. El demostró que este mecanismo depende de la conexión de la toxina Helmintosporoside al plasmalema; aunque Payne y Yoder (1978) no pudieron encontrar una correlación entre resistencia a *Helminthosporium maydis* y resistencia a su toxina.

Una estrategia que puede producir organismos resistentes a algunas de las muchas enfermedades causadas por hongos y bacterias que sufren las plantas, es seleccionar líneas tolerantes a las toxinas producidas por el parásito. Aunque todavía son pocas las toxinas aisladas y debidamente caracterizadas, es posible emplear también métodos indirectos o filtrados de cultivos de patógenos.

Carlson (1973) demostró que las células vegetales y los protoplastos pueden ser seleccionados en cultivo por su resistencia a la toxina de un patógeno, y que ha partir de estas células se pueden regenerar plantas que ofrecen una respuesta diferente a la infección por el patógeno.

Al respecto, Singh (1986) señala que diversos investigadores han demostrado que las mutaciones pueden ser seleccionadas en plantas superiores en el nivel celular. La técnica selectiva consiste en cultivar células que pueden o no ser tratadas con mutágenos en un medio que contiene una sustancia tóxica que normalmente inhibe el crecimiento de las células. Las células que proliferen en tal medio presumiblemente serán consideradas como mutantes y pueden ser rediferenciadas en plantas que pueden mostrar tal fenotipo mutante.

Carlson (1973) obtuvo mediante la selección de líneas resistentes a la metionina sulfoximina, plantas de tabaco resistentes a la infección por *Pseudomonas tabaci* que transmiten esta propiedad como un carácter sencillo semidominante.

Behnke (1980) obtuvo callos en hojas de papa resistentes al filtrado tóxico del hongo *Fusarium oxysporum*, y señala que la preservación de resistencia al filtrado tóxico de este hongo, aún después de la regeneración y segunda inducción de callo, es causada por mutación y no por la actividad alterada del gene y que, probablemente, los callos seleccionados son una mezcla de células resistentes y



susceptibles, y algunas plantas regeneradas de ellos pueden ser quimeras.

En maíz, el polen de plantas sensibles o resistentes puede ser tamizado contra la patotoxina de *Drechslera maydis*. El polen de las plantas resistentes germina en niveles de la toxina que inhiben la germinación del polen de plantas susceptibles (Laughnan y Gabay 1973). Por su parte, Pelcher *et al.* (1975), reportó respuesta diferencial de protoplastos aislados de plantas resistentes y susceptibles de maíz a la toxina de la raza T producida por *D. maydis*. Fue demostrado además que los callos de plantas susceptibles (con esterilidad masculina) mostraron sensibilidad al medio con la toxina T., y los callos de líneas celulares resistentes dieron como resultado la regeneración de plantas completas también resistentes a *D. maydis*.

Daub (1986), señala algunas especies donde se han utilizado toxinas de hongos para hacer selección *in vitro*.

Espece vegetal	Resistencia contra
<i>Brassica napus</i>	<i>Phomona lingam</i>
<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
	<i>Phytophthora infestans</i>
<i>Zea mays</i>	<i>Cochliobolus heterostrophus</i>
	<i>Helminthosporium maydis cepa T.</i>
<i>Saccharum officinale</i>	<i>Helminthosporium sacchari</i>
	<i>Drechslera sacchari</i>

El cultivo con filtrados tóxicos también es utilizado para la selección *in vitro*. Es conocido que hongos del genero *Fusarium* producen metabolitos secundarios que causan fitotoxicidad, pero su papel en la patogénesis todavía no es muy claro (Hartman et al., 1984).

Aunque este método no asegura que las plantas regeneradas a partir de callos resistentes sean también resistentes al patógeno, ha sido efectivo para varios sistemas planta-parásito (Gengenbach et al., 1978; Ling et al., 1985. y Hartman et al., 1984).

Diversos investigadores, entre ellos Hartman et al. (1984) y Arcioni et al. (1987), utilizaron esta técnica en la selección de callos de alfalfa para resistencia al filtrado de *Fusarium oxysporum f. sp. Medicaginis*, y obtuvieron callos resistentes a dicho patógeno. Las Plantas regeneradas a partir de ellos tuvieron un aumento en su resistencia a la infección *in vivo* del hongo en cuestión.

Gengenbach et al. (1978), por su parte reportan plantas resistentes a *Helminthosporium* empleando la toxina T del hongo como agente de selección.

Con relación a lo anterior, Bajaj y Saettler (1970) observaron que los callos de *Phaseolus vulgaris* cv. *Manitou*, mostraron diferente respuesta de crecimiento cuando se cultivaron en filtrados tóxicos de *Pseudomonas phaseolicola*. Hubo inhibición en el crecimiento al 77 por ciento; sin embargo, algunas células recuperaron su crecimiento, mostrando tolerancia diferencial al filtrado tóxico.

Por su parte, Sanabria (1977) usó el filtrado tóxico del cultivo de *Alternaria cartami*, conteniendo el metabolito tóxico específico y el propio patógeno en plantas de cártamo en laboratorio e invernadero, para evaluar la resistencia de las variedades a la mancha de la hoja, reportando que la sustancia tóxica afecta la respiración y disminuye la sobrevivencia en las plantas, por lo que reportaron que el método es muy eficiente.

Salinas (1979) evaluó la resistencia de variedades de tomate (*Lycopersicum esculentum*) a *Alternaria solani*, empleando el filtrado tóxico de este hongo, encontrando también que es factible el uso de metabolitos tóxicos para selección de variedades resistentes.

Trapaga (1980) también coincide con el empleo del filtrado tóxico para evaluar la resistencia en trigo. De esta forma evaluó de 12 materiales de trigo a *Fusarium culmorum*, reportando que con la aplicación de los filtrados tóxicos es factible evaluar resistencia en materiales genéticos.

Binarova et al. (1990) señalan que al utilizar una suspensión celular altamente embriogénica de alfalfa derivada a partir de un genotipo sensible a *Fusarium oxysporum*, para selección *in vitro* para resistencia al cultivo de filtrados de *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. avenaceum*, regeneraron plantas a partir de líneas celulares resistentes al filtrado del patógeno; en contraste a la respuesta del grupo de plantas regeneradas a partir de líneas celulares testigo. Encontraron también que los genotipos de alfalfa derivados del cultivo de suspensiones celulares y con mayor resistencia a *Fusarium* spp. toleraron mejor los filtrados del patógeno. Los resultados de una comparación de virulencia de varias especies de *Fusarium* con plantas *in vivo* y con individuos sometidos a la toxicidad de sus filtrados en cultivos celulares fueron similares.

Sacristán (1982) reporta que pueden ser regeneradas plantas resistentes y plantas con reducida susceptibilidad

ontra el patógeno *Phomona lingam* a partir de callos eleccionados y cultivos embriogénicos de colza haploide. demás, algunas plantas regeneradas con tolerancia ncrementada fueron obtenidas de callos sin seleccionar. Las ruebas de resistencia en las plantas regeneradas fueron ealizadas por inoculación de la planta total en el nvernadero, reproduciendo tanto como fue posible los ecanismos de infección, los cuales tienen lugar bajo ondiciones naturales. Resultados preliminares en esistencia de la progenie de regenerantes susceptibles y olerantes parecen indicar que la resistencia adquirida es le naturaleza genética.

Binarova *et al.* (1990) reporta también una posible elación entre el grado de virulencia de un aislado dado de *Fusarium* spp. y el grado de toxicidad de su filtrado, tanto ara plantas *in vivo* como para células cultivadas *in vitro*. Sin embargo los resultados encontrados con el aislado 162 de *F. oxysporum* son contradictorios (exhibiendo baja virulencia ero alta toxicidad del filtrado). Por su parte Manka y helkowski (1985) encontraron una respuesta similar en ruebas en plantas, donde la más baja virulencia de un hongo o siempre es acompañada por un más bajo nivel de la toxicidad de su filtrado. El nivel de conocimiento del papel

de esas toxinas en la patogénesis y las otras bases fisiológicas y bioquímicas de la interacción de *Fusarium* con las plantas es todavía limitado. Similarmente, en los experimentos de Arcioni *et al.* (1987) los callos derivados de material resistente de *M. sativa* fueron capaces de crecer en más altas concentraciones de toxinas que los callos provenientes de material sensible.

Daub (1986) señala que en la selección para filtrado del patógeno, se deben seleccionar tantas líneas celulares como sea posible, ya que muchas de ellas pueden haber sido seleccionadas para resistencia a otros componentes de la toxina supuesta, pero si son generadas suficientes, algunas pueden llevar la resistencia deseada.

Con relación a lo anterior, Behnke (1980b) y Sacristán (1982), señalan que la selección para resistencia al filtrado tóxico de *Phytophthora infestans* y *Phomona lingam* puede producir plantas resistentes, aunque no es conocido exactamente que toxinas están presentes en los filtrados o que papel juegan en la patogénesis. Esta respuesta también se presenta en los filtrados de *Fusarium* spp. usados exitosamente en la selección de cultivo de callos de alfalfa (Arcioni *et al.*, 1987; Hartman *et al.*, 1984).

Arcioni *et al.* (1987), seleccionó callos resistentes a *Fusarium oxysporum* f. *medicaginis* obtenidos de dos líneas de *Medicago sativa*, caracterizadas por una alta capacidad de regeneración. En esos callos la capacidad de regeneración fue reducida y solo una planta por callo fue recuperada. Las plantas regeneradas se evaluaron para resistencia al cultivo de filtrado y para resistencia *in vivo* al patógeno. Tres plantas de ocho fueron resistentes al hongo y se observó una alta correlación entre resistencia al cultivo del filtrado y resistencia *in vivo*. La capacidad de los callos que se originaron a partir de plantas regeneradas después de la selección para crecer en presencia del filtrado es un indicador de que la selección inducida fue probablemente de naturaleza genética.

En otros trabajos realizados por Hartman *et al.* (1983) en que utilizaron cultivos de filtrado tóxico conteniendo compuestos tóxicos producidos *in vitro* por *Fusarium oxysporum*, para seleccionar líneas celulares resistentes y plantas regeneradas que en pruebas preliminares parecen ser resistentes, se regeneraron un total de nueve líneas clonales, de las cuales dos fueron hexaploides y siete octaploides. Tres de los clones

resistentes regenerados fueron probados contra el patógeno y se mostraron resistentes.

En el aspecto citológico, Alicchino *et al* (1984), realizaron estudios en plántulas regeneradas a partir de callos derivados de explantes de hoja de *Solanum melongena* (dos genotipos parentales y su híbrido). Los análisis citológicos mostraron que: a) todas las plantas regeneradas mostraron diferentes niveles de ploidia, b) el medio tóxico (medio basal con el filtrado tóxico de *Verticillum dahliae*) adicionado, fue capaz de evidenciar diferencias cariotípicas no mostradas entre genotipos de plantas regeneradas a partir de callos crecidos en el medio testigo, c) aparecieron mosaicos cromosomales persistentes hasta la madurez de las plantas y también en la progenie autofecundada. Los resultados son discutidos en términos de un proceso selectivo que involucra genes que controlan el número de cromosomas y/o un efecto directo del medio tóxico sobre la actividad de esos mismos genes. Hay un acuerdo general en que la inestabilidad citológica del cultivo de callos se manifiesta en el número de cromosomas en las plántulas regeneradas. Muchos autores han encontrado que los cambios en el nivel de ploidia tienen efectos deletéreos tales que evitan la regeneración de plantas (Torrey 1967;



Murashige y Nakano 1965, 1967) y actualmente solo plantas diploides han sido regeneradas en muchas especies.

Sobre esta base se puede suponer que es recomendable el uso de estas técnicas *in vitro* para selección temprana en el mejoramiento genético tradicional y para selección de genotipos resistentes (Buiatti et al., 1985).

### **Toxinas y Filtrado Tóxico en la Selección *in vitro* para Resistencia a *Phytophthora infestans***

Stolle y Schöber (1982) menciona por su parte que en pruebas de resistencia, la toxina de *P. infestans* dañó únicamente las hojas de *Solanum tuberosum* y no de otras solanáceas o plantas representativas de otras familias. El efecto del daño de la toxina está por lo tanto, restringido a *Solanum tuberosum*.

En un estudio posterior, Stolle y Schöber (1985), purificaron por ultrafiltración la toxina secretada por *P. infestans* en cultivo líquido y su efecto fue examinado en pruebas con hojas, resultando necrosis y marchitamiento en tres días, así como una drástica reducción de peso de hojas

nuevas, contenido de clorofila y muerte de la hoja completa después de cinco días.

Por su parte Wenzel et al. (1984) reportan que se obtuvieron plantas resistentes a *P. infestans* a partir de callos crecidos en la presencia de filtrados de *P. infestans*, las cuales permanecieron libres de infección por otros patógenos por dos años.

Helgeson (1983) reportó que callos friables son altamente susceptibles a todas las razas de *P. infestans*. Sin embargo, cuando la proporción de auxinas-citocininas es ajustada para producir callos compactos, se puede obtener resistencia a una raza específica.

Behnke (1980a) por su parte regeneró plantas de papa a partir de callos, resistentes al filtrado de cultivo de *P. infestans*. El reporta la resistencia de las plantas al filtrado del cultivo de *P. infestans*. En esta prueba obtuvo 15 plantas testigo regeneradas de 8 callos sin seleccionar. Todos los callos se originaron de hojas de diferentes clones diploides de *S. tuberosum*. Las hojas de plantas regeneradas de callos resistentes exhibieron más resistencia al filtrado

que las hojas de las plantas testigo. Concluye que tres factores determinan la resistencia general a *P. infestans*: la eficiencia de la infección, el crecimiento del hongo, y la esporulación del parásito.

Behnke (1979), en otro estudio reporta que la resistencia a la toxina del hongo está correlacionada con la resistencia al parásito y que debido a que el más bajo crecimiento del hongo esta correlacionado con la resistencia a su cultivo de filtrado, la selección de callo puede ser una técnica apropiada para mejoramiento de plantas con resistencia general a *P. infestans*. Menciona además que el crecimiento en el medio tóxico depende del tamaño de los callos y que las toxinas probablemente son transportadas muy pobremente en los callos. En estos trabajos Behnke utilizó callos de 1 mm de diámetro. Menciona que pudo haber ocurrido mutación antes de la selección. Por lo tanto, es posible que algunos de los callos son seleccionados de los mismos eventos de mutación y que no pierden su resistencia si son mantenidos por cuatro o seis semanas en medio no tóxico. Los callos crecieron en todos los medios tóxicos a pesar del patotipo utilizado en la preparación del medio tóxico. También menciona que los callos seleccionados pudieran ser una mezcla de células resistentes y sensibles. Debido a que se desconoce si la regeneración en

callos inicia de una célula o de numerosas células, pudiera ser asumido que las plantas resistentes a toxinas son quimeras consistentes de una mezcla de células sensibles y resistentes, pero alguna evidencia de que las plantas regeneradas no son quimeras es la observación de que sus hojas reaccionaron uniformemente al medio tóxico. En su estudio este investigador concluye que como el más bajo crecimiento del hongo esta correlacionado con resistencia a su filtrado, la selección de callos puede ser una técnica apropiada para mejoramiento de plantas con resistencia general a *P. infestans*. Menciona además que esta técnica de selección puede ser combinada con otros métodos de mejoramiento de clones resistentes.

Behnke (1979) fue de los primeros en realizar experimentos en filtrados tóxicos, seleccionando callos de tres clones diploides de papa en un medio conteniendo extractos del filtrado del medio usado para cultivar *Phytophthora infestans*. Los callos que sobrevivieron en el medio conteniendo el compuesto tóxico fueron transferidos al menos cinco veces en medios tóxicos idénticos antes de que fuera inducida la regeneración. Sus primeras pruebas para resistencia en plantas completas fueron realizadas en clones regenerados de callos sobrevivientes y cultivados en el

invernadero. Los callos fueron resistentes a las cuatro cepas de *P. infestans* usadas en estos experimentos y la resistencia no fue perdida a través de las generaciones y la inducción de nuevos callos. Después de la inoculación mecánica de las hojas de las plantas regeneradas con esporas de *P. infestans*, el diámetro de la lesión local fue significativamente menor comparado con las plantas testigo no seleccionadas. El número de esporangios que subsecuentemente se formaron en las lesiones locales no difirió entre las plantas resistentes, sugiriendo que la tasa de infección pero no esporulación en la tasa de crecimiento del hongo fue retardada. Este investigador menciona que esta resistencia no fue de un gene específico de la raza y que fue probablemente cuantitativo en naturaleza.

## MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y comprende cuatro etapas:

Etapa 1) Inducción de callo a partir de cuatro cultivares de papa

Etapa 2) Manejo del hongo *P. infestans* y preparación del filtrado tóxico

Etapa 3) Evaluación *in vitro* de callos de papa a la aplicación de diferentes concentraciones de filtrado tóxico de *P. infestans*.

Etapa 4) Respuesta de siete cultivares de papa a diferentes concentraciones del filtrado tóxico.

## **Etapa 1: Inducción de Callo a Partir de Cuatro Cultivares de papa**

### **Material Genético Utilizado**

Para la realización de esta prueba se utilizaron tubérculos de los cultivares: Alpha, Norteña, Clon AN-1 y Mondial.

Los tubérculos de estos cultivares variaron en su período de almacenamiento, peso y consistencia al momento de ser sembrados en los diversos medios nutritivos. Los tubérculos de la variedad Alpha se almacenaron por dos meses, tuvieron un peso promedio de 100 g y su consistencia fue buena. La variedad Norteña se almacenó por dos años, los tubérculos pesaron en promedio 56 g y también tuvieron buena consistencia. Los del clon AN-1 tuvieron cinco meses de almacenamiento, pesaron en promedio 121 g y su consistencia se considero como muy buena . Finalmente, los tubérculos del cultivar Mondial tuvieron un período de almacenamiento de dos años, peso de 50 g y su consistencia fue media. Todos estos materiales tuvieron buena sanidad y fueron conservados a temperatura ambiente en un almacén acondicionado para este fin.

## Medios Nutritivos para Inducción de Callo

Los medios nutritivos que se evaluaron para la inducción de callo se presentan en le Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1. Medios nutritivos para la inducción de callos.

Medio nutritivo	Identificación del medio
Engvild (1973) M&N	M1
Murashige & Skoog (1962)	M2
Stantz & Steward (1959B)	M3
Lam (1975)	M4

La formulación de estos medios se tomó de George et al. (1987) y se presentan en el Cuadro 3.2. Los medios nutritivos se prepararon con agua desionizada, el pH se ajustó con NaOH y HCl al 1 y 0.1N y se esterilizaron a una temperatura de 121°C por espacio de 18 minutos.

## Establecimiento de la Prueba

Los tubérculos utilizados como fuente de explante se lavaron en agua corriente y detergente, posteriormente se procedió a su desinfección en la campana de flujo laminar, para lo cual fueron colocados en alcohol al 70 por ciento por espacio de 30 segundos, se dejaron secar por 15 minutos y posteriormente se colocaron en hipoclorito de sodio al 5 por ciento más dos gotas de Tween 20 por un



espacio de 10 minutos, finalmente se enjuagaron en agua estéril por tres ocasiones. Una vez desinfectado el material vegetativo y en condiciones de asepsia se procedió a eliminar la cutícula de los tubérculos con un bisturí. Posteriormente se extrajeron cilindros de tejido con un sacabocados de 6 mm de diámetro, eliminando 5 mm de los extremos del cilindro; después se hicieron cortes de discos de tubérculo de aproximadamente 3 mm. Cada uno de los discos fue colocado en una caja petri con papel filtro estéril para eliminar el exceso de agua y finalmente se colocaron tres discos en cada frasco tipo gerber con 25 ml de medio nutritivo.

Una vez hecha la siembra los frascos fueron colocados en el cuarto de incubación a una temperatura de 25°C por un espacio de seis semanas y en condiciones de oscuridad.

### Análisis Estadístico

Para este estudio se utilizó el diseño de bloques completos al azar con arreglo factorial y cinco repeticiones, donde el factor A correspondió a los

cultivares y el factor B a los medios de cultivo. El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha^i + \beta^j + (\alpha\beta)^{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Con:

$i = 1, 2, 3, 4$  cultivares

$j = 1, 2, 3, 4$  medios nutritivos

$k = 1, 2, 3, 4, 5$  repeticiones

Donde:

$Y_{ij}$  = Variable aleatoria observable del  $i$ -ésimo cultivar con el  $j$ -ésimo medio nutritivo en la  $k$ -ésima repetición.

$\mu$  = Media general

$\alpha_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo cultivar

$\beta_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo medio nutritivo

$\alpha\beta_{ij}$  = Efecto de la interacción del  $i$ -ésimo cultivar en el  $j$ -ésimo medio de cultivo

$\varepsilon_{ijk}$  = Error experimental

Cuadro 3.2. Composición de los medios nutritivos utilizados para la inducción de callo (mg/l).

Constituyentes	M1	M2	M3	M4
<b>Macronutrientes</b>				
KNO <sub>3</sub>	1,900.000	1,900.000	80.000	1,900.000
NH <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>	1,650.000	1,650.000		1,650.000
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440.000	440.000		440.000
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370.000	370.000	360.000	370.000
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	170.000	170.000		170.000
KCl			65.000	
NaH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O			61.500	
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			200.000	
<b>Micronutrientes</b>				
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.300	22.300	6.648	22.300
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.600	8.600	2.672	8.600
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200	6.200	1.500	6.200
KI	0.083	0.830	0.750	0.830
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025		0.025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.250	0.250		0.250
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025		0.025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.850	27.850		27.850
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37.250	37.250		37.250
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>			2.000	
<b>Vitaminas</b>				
Myo-inositol	100.000	100.000		100.000
Thiamina HCl	0.500	0.500	0.100	0.500
Ac. Nicotínico	5.000	5.000	0.500	5.000
Piridoxina HCl	0.500	0.500	0.100	0.500
Biotina	0.050	0.050		0.050
Ac. Fólico	0.500	0.500		0.500
<b>Reguladores de crecimiento</b>				
2,4-D		2.000	6.000	3.000
Ac. Naftalenacético	8.000			
Kinetina	0.500			
Agua de coco		10%	10%	
<b>Aminoácidos</b>				
Glicina	2.000	2.000	3.000	
Proteína Hidrolizada			0.500	1,000.000
<b>Sacarosa</b>	30,000.000	30,000.000	20,000.000	30,000.000
<b>Agar</b>	7,000.000	8,000.000	8,000.000	9,000.000
<b>PH</b>	5.8	5.7	5.6	5.8

Para la realización del análisis estadístico se consideró como una repetición cada frasco gerber con el medio nutritivo en el cual se desarrollaron los callos a partir de los tres discos de tubérculo sembrados con cada uno de los cultivares.

### Variables Evaluadas

Se evaluaron variables de tipo cuantitativo y cualitativo mencionadas por Lidnsey y Jones (1989) y las señaladas por Pierik (1990), que son las siguientes: peso fresco de callo (p.f.c.), peso seco de callo (p.s.c.), diferencia peso fresco- peso seco (p.f.c. - p.s.c.), color, tamaño, y consistencia. La evaluación de estas variables se hizo a las seis semanas de haber realizado la siembra de los discos de tubérculo usados como explantes. Para determinar el peso fresco de los callos se extrajeron estos del medio nutritivo y se pesaron en una balanza analítica con aproximación a diezmilésimas de gramo. El peso fresco de los callos se expresa en gramos (g) y se determinó inmediatamente después de extraer los callos del medio nutritivo donde fueron colocados, cuidando de que estuvieran libres de dicho medio. Para evaluar el peso seco, los callos

se colocaron en una estufa a temperatura de 70°C por espacio de 72 horas, utilizando para ello la balanza analítica. La diferencia de peso fresco menos peso seco se obtuvo restando el peso seco del peso fresco.

Además de variables de tipo cuantitativo, se realizó la evaluación de variables de tipo cualitativo que también son importantes en la formación de callos. Tales variables son: color, consistencia y tamaño. Para la variable color, se clasificaron desde color blanco, cristalino gris y café. Para consistencia solo se consideraron callos de dos tipos: callos de consistencia suave y dura; finalmente para tamaño se utilizó una escala arbitraria de chico a grande.

El análisis estadístico se realizó en el programa Mstat y las medias de los tratamientos fueron comparadas con la prueba de Tukey ( $P < 0.01$ ).

## **Etapa 2): Manejo del Hongo *Phytophthora infestans* y Preparación del filtrado Tóxico**

Para llegar a la obtención del filtrado tóxicos, fue necesario realizar las actividades siguientes:

- 1) Desarrollo del hongo
- 2) Conservación de la agresividad del hongo
- 3) Obtención del filtrado Tóxico de *P. infestans*.

### Desarrollo del Hongo

La línea clonal 97104 se sembró y fue mantenida en los medios nutritivos Centeno y V-8.

#### Medio nutritivo Centeno

El medio nutritivo Centeno se preparó de la manera siguiente: se hirvieron 60 g de centeno en 1 l de agua durante 1 hr., posteriormente se tamizó en gasa (triple dobléz), se eliminaron los restos del centeno y solo se tomó la infusión, a la cual se le agregaron 20 g de sacarosa más 2 g de extracto de levadura; se aforó a 1 l y se ajustó el pH a 7.00, se agregaron 7 g de agar bacteriológico y se esterilizó a 121°C por 15 minutos. Finalmente, antes de que el medio solidificara y en condiciones de asepsia se vaciaron aproximadamente 25 ml de medio en cajas petri utilizando para ello la campana de flujo laminar.

## Medio nutritivo V-8

Se colocaron 200 ml de jugo V-8 en 1 l de agua, se agitó en la parrilla de agitación con un agitador magnético, posteriormente se centrifugo a 3,200 r.p.m. durante 25', se vació el sobrenadante en un matraz y se eliminaron los residuos de V-8 precipitados en el fondo de los tubos. Se agregaron 4.5 g/l de  $\text{CaCO}_3$ , se agitó y se aforó a un litro. Se ajustó el pH a 7.00 y se agregaron 15 g de agar bacteriológico. Se esterilizó a  $121^\circ\text{C}$  durante 15'. Una vez esterilizado y poco antes de que el medio solidificara se vaciaron 25 ml de medio en cajas petri utilizando para ello la campana de flujo laminar. Para la siembra del hongo en las cajas petri, se tomó una porción del mismo con una asa de siembra y posteriormente se incubó a una temperatura aproximada de  $21^\circ\text{C}$ .

## Conservación de la Agresividad del Hongo

Con objeto de mantener la agresividad del hongo, con el asa de siembra se tomó y transfirió parte del mismo a Frascos gerber donde previamente se habían colocado granos de maíz (esterilizados en autoclave) con una poca de agua (también estéril).

Obtención del Filtrado Tóxico de *P. infestans*.

Una vez que el hongo creció en los granos de maíz, de nueva cuenta se transfirió parte del hongo con el asa de siembra al medio Centeno y posteriormente al medio Huang Xu & Wang (Strange et al. 1982), el cual se presenta en el Cuadro 3.3.

Cuadro 3.3. Compuestos que conforman el medio Huang Xu & Wang para la preparación del filtrado tóxico.

Compuesto	g/l
Glucosa	20.000000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.320000
Ac. Fumárico	2.320000
CaCl <sub>2</sub>	0.996000
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.500000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.720000
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.300000
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O	0.010450
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.000550
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.000889
Thiamina HCl	0.000500
PH	5.5



Una vez que se preparó el medio nutritivo para el cultivo del filtrado tóxico, la esterilización se hizo por filtración. Para realizar la esterilización primero se filtró a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{M}$ . Posteriormente se procedió a la esterilización final bajo condiciones de asepsia, utilizando para ello la membrana de 0.22  $\mu\text{M}$  y una bomba de vacío. Una vez que se realizó la esterilización se inoculó el hongo en matraces de 500 ml de medio. Para realizar la inoculación se transfirieron cinco pequeños discos de medio de centeno donde creció el hongo. El corte de los discos se realizó en la periferia del crecimiento del hongo con un sacabocados de 2 mm de diámetro y se transfirieron al medio nutritivo con una asa de siembra. Una vez hecha la inoculación los matraces fueron colocados en un agitador a 500 r.p.m. y a los 23 días fueron retirados y en condiciones de asepsia se obtuvieron los filtrados tóxicos del hongo a través de filtración con una membrana de 0.22  $\mu\text{M}$ .

### **Etapa 3. Evaluación de la respuesta *in vitro* de Callos de Papa a la Aplicación de Diferentes Concentraciones de Filtrados Tóxicos de *P. infestans***

#### **Cepa del Hongo Utilizada**

Para la realización de estas pruebas, se utilizó la cepa identificada como 97104 del hongo *P. infestans* colectado en la localidad denominada "La Silva" ubicada en el Valle de Toluca, Edo. de México, caracterizada por su agresividad y que de acuerdo a su compatibilidad pertenece al tipo A2. Esta cepa fue proporcionada por el MC. Alberto Flores Oliva del Departamento de Parasitología de la UAAAN.

#### **Material Genético Utilizado**

Los callos utilizados en estas pruebas corresponden al cultivar AN-1, y fueron obtenidos de discos de tubérculo sembrados y mantenidos en condiciones de oscuridad a través de seis transferencias; mismas que se hicieron alrededor de los 25 días en el medio Engvild (1973) M&N, cuya composición se describió con anterioridad.

### **tapa 3. Evaluación de la respuesta *in vitro* de Callos de tapa a la Aplicación de Diferentes Concentraciones de Filtrados Tóxicos de *P. infestans***

#### **Cepa del Hongo Utilizada**

Para la realización de estas pruebas, se utilizó la cepa identificada como 97104 del hongo *P. infestans* colectado en la localidad denominada "La Silva" ubicada en el Valle de Toluca, Edo. de México, caracterizada por su agresividad y que de acuerdo a su compatibilidad pertenece al tipo A2. Esta cepa fue proporcionada por el MC. Alberto Flores Oliva del Departamento de Parasitología de la UAAAN.

#### **Materia Genético Utilizado**

Los callos utilizados en estas pruebas corresponden al cultivar AN-1, y fueron obtenidos de discos de tubérculo sembrados y mantenidos en condiciones de oscuridad a través de seis transferencias; mismas que se iniciaron alrededor de los 25 días en el medio Engvild (1973) M&N, cuya composición se describió con anterioridad.

## Establecimiento de la Prueba

Para la realización de la prueba se hicieron los cálculos para determinar el volumen del filtrado tóxico correspondiente a cada concentración. Una vez hecha la estimación y bajo condiciones de asepsia se adicionó el volumen correspondiente de filtrado tóxico al medio nutritivo previamente preparado y cuando éste no se había enfriado totalmente. Las concentraciones utilizadas fueron en porcentajes de: 0, 10, 20, 30 y 40.

La prueba comprendió dos transferencias. Para la primera de ellas se utilizaron cuatro cajas petri por cada concentración y dentro de cada caja petri se sembraron cuatro porciones de callo con un tamaño promedio aproximado de 1.0 cm de diámetro. Para la segunda transferencia se tomaron porciones de callo (diámetro promedio 1.0 cm) de las cajas petri utilizadas en la primera transferencia. En esta segunda transferencia se utilizaron cinco cajas petri para el testigo (Concentración 0 por ciento) donde se sembraron 20 porciones de callo. Para la concentración del 10 por ciento se utilizaron cinco cajas petri donde se sembraron 19 porciones; para la concentración del 20 por ciento se utilizaron tres cajas petri donde se sembraron

12 porciones; para la concentración del 30 por ciento se utilizaron dos cajas petri donde se sembraron siete porciones y para la concentración del 40 por ciento se utilizaron tres cajas petri donde se sembraron nueve porciones de callo. En la segunda transferencia se redujo el número de porciones de callo transferidas debido a que en la primera transferencia los callos tuvieron muy poco crecimiento en concentraciones mayores del 10 por ciento.

### **Variables Evaluadas**

La respuesta de los callos en las diferentes concentraciones se realizó de acuerdo con el crecimiento en diámetro promedio (cm) que estos tuvieron en cada repetición tanto en la primera como en la segunda transferencia. Debido a que en la primera transferencia no se cuantificó el diámetro inicial de los callos, la estimación de su crecimiento se realizó a los 26 días de la siembra, tomando únicamente el dato de crecimiento final, para lo cual se hizo la consideración de que todos los callos transferidos tenían un diámetro aproximado a 1.0 cm al momento de realizar la siembra. Para la segunda transferencia se tomó en cuenta el diámetro inicial de los

llos transferidos y el diámetro final, así como la diferencia entre los mismos, lo cual se estimó a los 23 y días de la siembra. La comparación de estos tratamientos realizó solo de manera aritmética y se ilustran con una grafica.

#### **Capa 4. Respuesta de Siete Cultivares de Papa a la Aplicación de Diferentes Concentraciones del Filtrado Tóxico de *P. infestans***

##### **Material Genético Utilizado**

En esta prueba se utilizaron los cultivares comerciales: Alpha, AN-1, Norteña, Mondial, Atlantic, Excel y Gigant, los cuales fueron sembrados en el predio denominado "El Cuije" que se encuentra localizado en el km 80 al sur de Attillo, por la carretera 57. Las plantas de los cultivares utilizadas para la colecta de las hojas empleadas en la prueba se encontraban aparentemente libres de enfermedades y tenían 8 días de haber sido sembradas.

fueron sometidos y que fueron: 0, 25, 50, 75 y 100 por ciento. El grado de marchitez varió de 0 a 100 por ciento considerándose como 0 ausencia de daño y 100 por ciento marchitez total. Para el análisis estadístico se transformaron los datos de acuerdo con la tabla de arco seno y una vez transformados se aplicó el programa Mstat. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ( $P < 0.01$ ). La transformación de los datos se realizó debido a que la prueba de Kolmogorov Smirnov detectó significancia, lo cual indicó que los datos no tuvieron una distribución normal, además la prueba de homogeneidad de varianza desarrollada por Bartlett detectó que no existe homogeneidad de varianza dada la significancia reportada en el valor de  $\chi^2$ -cuadrada.

# RESULTADOS Y DISCUSION

## Inducción de Callo a Partir de Diferentes Cultivares de Papa

### Análisis de Varianza

Se logró inducir callo en los cuatro cultivares con los cuatro medios nutritivos evaluados; aunque los callos variaron en cuanto a sus características cuantitativas y cualitativas. El análisis de varianza para las características de tipo cuantitativo que se presentan en el Cuadro 4.1. muestra diferencias altamente significativas para todas las variables evaluadas en las diferentes fuentes de variación, excepto en la interacción para la variable peso seco de callo. Estos resultados indican que el comportamiento promedio de los cultivares en los medios nutritivos fue diferente en el caso de las tres variables de tipo cuantitativo evaluadas y que el efecto promedio de los medios nutritivos a través de los cultivares también fue diferente. Así mismo, la diferencia detectada para las variables peso fresco de callo y diferencia peso fresco -



peso seco de callo en la fuente de variación factor A x factor B, indica la influencia que tiene un factor sobre otro en dichas variables; influencia que no es significativa para la variable peso seco de callo debido en parte a los valores tan pequeños que registraron los callos al deshidratarse.

Cuadro 4.1. Análisis de varianza para formación de callo de cultivares de papa en los medios nutritivos

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Cuadrados medios		
		P. fresco de callo	P. seco de callo	Diferencia p.f.c.-p.s.c.
Factor A	3	11.077**	0.022**	10.124**
Factor B	3	8.978**	0.021**	8.161**
Interac.AxB	9	1.402**	0.001NS	1.340**
Error	64	0.145	0.001	0.129
Total	79			
C.v.		27.09%	21.35%	28.08%

La prueba de Tukey ( $P < 0.01$ ) que se presenta en el Cuadro 4.2. detecta que en las variables peso fresco promedio de los callos y diferencia promedio del peso fresco menos el peso seco de los callos, el cultivar AN-1 es estadísticamente superior al resto de los cultivares, le sigue el cultivar Norteña que es estadísticamente igual al cultivar Alpha pero superior a Mondial.

Con relación a peso seco de los callos, se observa que el cultivar AN-1 es superior en forma numérica al resto

de los cultivares, aunque en el aspecto estadístico es igual a Norteña y Alpha.

En todas las variables se manifiesta la superioridad del cultivar AN-1 y se mantiene el mismo orden entre los cultivares. La diferente respuesta de los cultivares coincide con lo mencionado por Pierik (1990), quien señala que la exigencia de reguladores exógenos depende en gran medida del genotipo y de su contenido de reguladores endógenos; además Qurashi *et al.* (1987), afirma que la fisiología del tubérculo de papa acondicionada determina el grado de calogénesis y que la edad y temperatura de conservación juegan un papel muy importante. Considerando lo anterior, la superioridad del cultivar AN-1 puede atribuirse al genotipo mismo y/o a la condición fisiológica del explante al momento de la siembra, pues los tubérculos utilizados de este cultivar tuvieron un período de almacenamiento de cinco meses, lo que tal vez permitió que los reguladores de crecimiento endógenos combinaran mejor con los reguladores exógenos que el resto de los cultivares, pues en el caso de los cultivares Norteña y Mondial fue muy largo (24 meses) y en el cultivar Alpha, el período de almacenamiento fue corto (2 meses).

Cuadro 4.2. Prueba de Tukey ( $p < 0.01$ ) para peso fresco de callo, peso seco de callo y diferencia peso fresco menos peso seco de callo de cuatro cultivares de papa

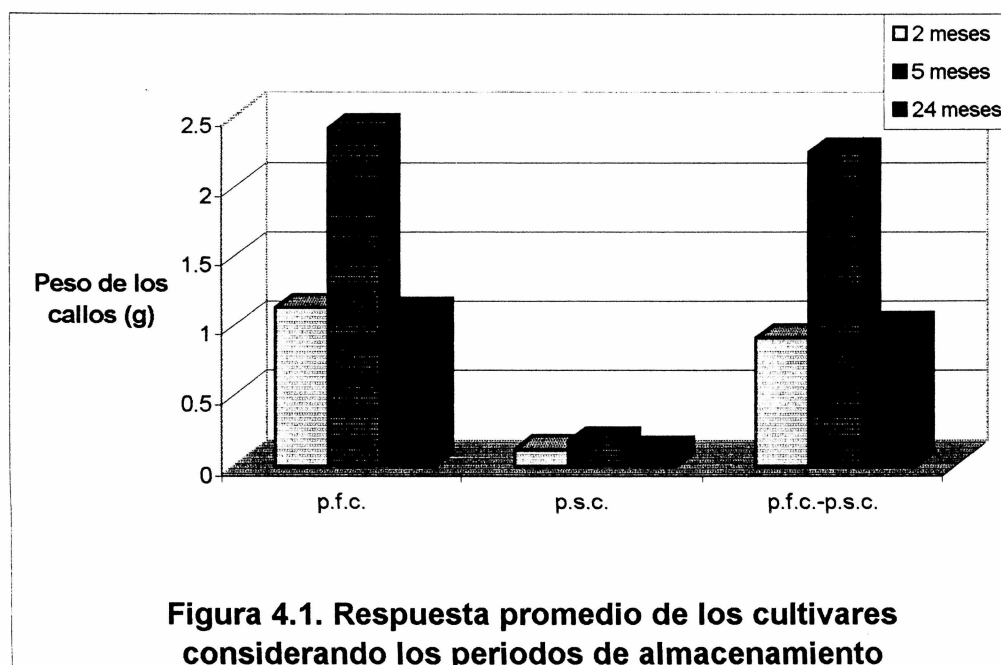
Cultivares	Peso fresco de callo	Peso seco de callo	Diferencia p.f.c.-p.s.c.
AN-1	2.413 A	0.170 A	2.242 A
Norteña	1.485 B	0.119 AB	1.366 B
Alpha	1.120 BC	0.113 AB	0.899 BC
Mondial	0.708 C	0.092 B	0.616 C

Con objeto de estimar la influencia de los períodos de almacenamiento de los tubérculos en la respuesta que tuvieron los cultivares en los diferentes medios nutritivos, se realizó el análisis de varianza ajustado por covarianza con cada una de las variables de tipo cuantitativo, donde se consideró como covariable los periodos de almacenamiento. De acuerdo a dicho análisis (Cuadro 4.3.), la prueba de F, reporta que no existe significancia en la covarianza, indicando con ello que los períodos de almacenamiento no influyeron significativamente en la respuesta que tuvieron los cultivares en los diferentes medios nutritivos y la diferencia significativa para cultivares, indica que si hubo efecto de los genotipos.

Cuadro 4.3. Análisis de varianza ajustado por covarianza para formación de callo de los cultivares (Factor A) de papa en los medios nutritivos (Factor B)

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Cuadrados medios		
		Peso fresco De callo	P. seco de callo	Diferencia p.f.c.-p.s.c.
Factor A	3	11.076**	0.022**	10.122**
Factor B	3	8.977**	0.020**	8.163**
Interac.AxB	9	1.401**	0.001NS	1.339**
Covarianza	1	0.063NS	0.00001NS	0.061NS
Error	63	0.146	0.0007	0.130
Total	79			
c.v.		27.20%	21.51%	28.19%

La respuesta promedio que tuvieron los cultivares considerando su periodo de almacenamiento se muestra graficamente en la Figura 4.1. para lo cual se promedió el peso de los callos de los cultivares Norteña y Mondial debido a que estos tenían el mismo periodo de almacenamiento (24 meses).



Por lo que se refiere al Factor B (medios nutritivos), la prueba de Tukey ( $P < 0.01$ ) que se presenta en el Cuadro 4.4. detecta que M1 (Engvild 1973) generó los callos con mayores pesos; tanto fresco como seco, así como el que dió la mayor diferencia entre p.f. y p.s. de callo. El resto de los medios fueron similares entre sí y diferentes estadísticamente al M1.

Cuadro 4.4. Prueba de Tukey ( $P < 0.01$ ) para peso fresco de callo (p.f.c.), peso seco de callo (p.s.c.) y diferencia peso fresco menos peso seco de callo (p.f.c.-p.s.c.) en los medios nutritivos

Medios Nutritivos	Peso fresco de callo	Peso seco de callo	Diferencia p. fresco-p. seco
M1	2.365 A	0.168 A	2.197 A
M2	1.212 B	0.127 B	1.085 B
M3	0.805 B	0.093 B	0.712 B
M4	1.237 B	0.107 B	1.130 B

Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales Tukey ( $P > 0.01$ ).

De los cuatro medios nutritivos utilizados, al parecer el M1 incluyó la proporción más adecuada de auxinas y citocininas: 8 mg/l de Ac. Naftalenacético y 0.5 mg/l de kinetina. El Ac. Naftalenacético contenido en este medio nutritivo corresponde a la más alta concentración de auxinas, además de contar con la acción de la citocinina. Lo anterior se apega a lo afirmado por Po-je Wang y Ching-yeh Hu (1985), quienes mencionan que para la inducción de callo se requiere de una alta concentración de auxinas y una

citocinina, aunque ésta última en baja concentración; también coincide con Devlin (1980), quien señala que la inducción y proliferación de callo requiere la adición de auxinas al medio, teniendo en cuenta que la producción de callo está íntimamente relacionada con la concentración y tipo de auxina, ya que las auxinas en altas concentraciones suprimen la morfogénesis y dan por resultado la rápida proliferación de células tipo callo en concentraciones que generalmente oscilan de 0.1 mg/l a 10 mg/l.

En cuanto a las combinaciones cultivar-medio nutritivo (Cuadro 4.5.), la prueba de Tukey ( $P < 0.01$ ), detecta que para las variables peso fresco de callo y diferencia entre peso fresco de callo y peso seco de callo, la combinación del cultivar AN-1 - M1 es estadísticamente superior al resto de los tratamientos, le siguen las combinaciones Norteña - M1, AN-1 - M2, AN-1 - M4 y Norteña - M4, las cuales son estadísticamente similares entre sí. Por su parte, el cultivar Alpha respondió estadísticamente igual en los medios M1, M2, y M4, mientras que el comportamiento del cultivar Mondial fue semejante estadísticamente en los cuatro medios nutritivos; aunque el mayor peso fresco de callo se logró en M1.

También se puede observar en el Cuadro 4.5 que el comportamiento de los tratamientos superiores mantiene casi el mismo orden tanto en peso fresco de callo como de peso seco, lo cual coincide con lo expresado por Dodds y Roberts (1990), en el sentido de que la relación de peso fresco y peso seco es aproximadamente lineal.

De acuerdo con lo anterior, los cuatro cultivares respondieron mejor en M1, pero fue la combinación AN-1 - M1 donde se logró el mayor peso fresco de callo, mayor peso seco y la mayor diferencia entre peso fresco de callo y peso seco de callo, indicando con ello que con la combinación de reguladores endógenos (auxinas-citocininas) contenidos en los tubérculos de este genotipo y los reguladores exógenos adicionados al medio nutritivo M1, se logró producir los mayores pesos de callo; lo anterior coincide en cierta forma por lo reportado por Devlin (1980), ya que señala que las auxinas en altas concentraciones suprimen la morfogénesis y dan como resultado la rápida proliferación de células tipo callo, y que aunque la adición de auxina es suficiente para la formación de callo, debe agregarse kinetina, aunque en bajas concentraciones para apoyar la proliferación de callos sanos.

Cuadro 4.5. Prueba de Tukey ( $P < 0.01$ ) para peso fresco de callo, peso seco de callo y diferencia peso fresco menos peso seco de callo en las diferentes combinaciones.

Tratamientos	Peso fresco de callo	Peso seco De callo	Diferencia entre p.f.c - p.s.c.
AN-1 - M1	4.284 A	0.230 A	4.053 A
Norteña - M1	2.461 B	0.169 ABC	2.292 B
AN-1 - M2	2.223 BC	0.182 AB	2.041 B
AN-1 - M4	2.052 BCD	0.144 BCDE	1.908 BC
Norteña - M4	1.585 BCDE	0.106 CDE	1.480 BCD
Alpha - M1	1.485 CDEF	0.153 BCD	1.131 CDE
Alpha - M2	1.255 DEFG	0.126 BCDE	1.129 CDE
Mondial - M1	1.229 DEFG	0.118 BCDE	1.111 CDE
AN-1 - M3	1.092 EFG	0.125 BCDE	0.967 DE
Norteña - M3	1.069 EFG	0.101 CDE	0.969 DE
Norteña - M2	0.824 EFG	0.103 CDE	0.722 DE
Alpha - M4	0.769 EFG	0.096 DE	0.673 DE
Mondial - M2	0.545 EFG	0.097 DE	0.448 E
Alpha - M3	0.540 EFG	0.075 E	0.465 E
Mondial - M4	0.539 G	0.081 DE	0.458 E
Mondial - M3	0.519 G	0.072 E	0.447 E

Cifras con al misma letra son estadísticamente iguales Tukey ( $P < 0.01$ )

En las Figuras 4.2. 4.3. y 4.4. se pueden apreciar algunas interacciones entre los factores en estudio, aunque para el caso de la variable peso seco de callo el análisis de varianza no reporta significancia. En estas tres figuras se observa que los cuatro cultivares respondieron mejor en M1 en el siguiente orden: AN-1, Norteña, Alpha y Mondial, pero en M2 este orden es alterado ya que la respuesta del cultivar Alpha es superior a la de Norteña. En M3, sobre todo en las variables peso fresco de callo y diferencia p.f.c. menos p.s.c los cultivares AN-1 y Norteña se



comportaron en forma semejante pero superiores al cultivar Alpha y Mondial, que fueron a su vez también semejantes entre sí. En cuanto a la respuesta de los cultivares en M4, el comportamiento de los cultivares vuelve de nuevo a mostrar en forma clara el orden inicial observado en M1.

Finalmente en el cuadro 4.5. se muestra el total de las variables evaluadas y se puede apreciar que el tratamiento AN-1 - M1 reúne las características de un buen callo friable ya que su coloración es cristalina, consistencia suave y buen tamaño, lo cual se refleja en el peso fresco del callo y peso seco. Los cuatro cultivares respondieron mejor al medio M1, ya que en este medio los callos presentaron el mayor tamaño con características de friabilidad. Excepto el cultivar Norteña, el resto de los cultivares presentó una consistencia dura en M3. En la mayoría de los casos esta característica se observa asociada con tamaño chico y color café, excepto en la combinación Mondial - M2 cuya coloración es gris.

En el Cuadro 4.5. se observa además que los cuatro tratamientos que dieron lugar a consistencia dura (Alpha - M3, AN-1 - M3, Mondial - M2 y Mondial - M3), se encuentran entre los siete tratamientos con las menores diferencias

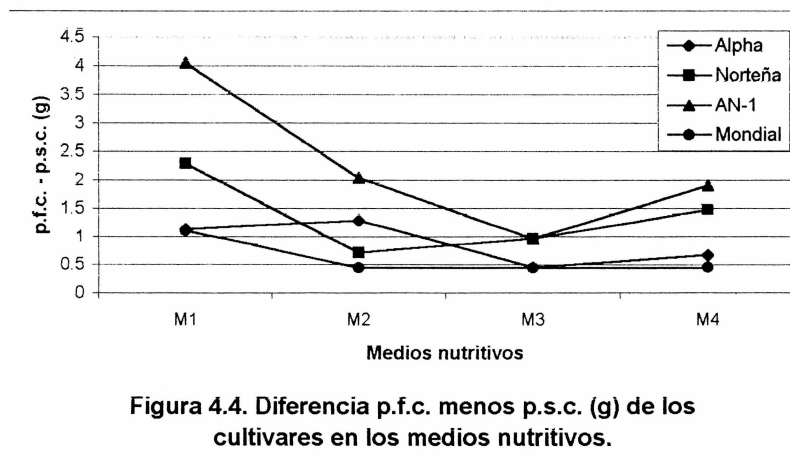
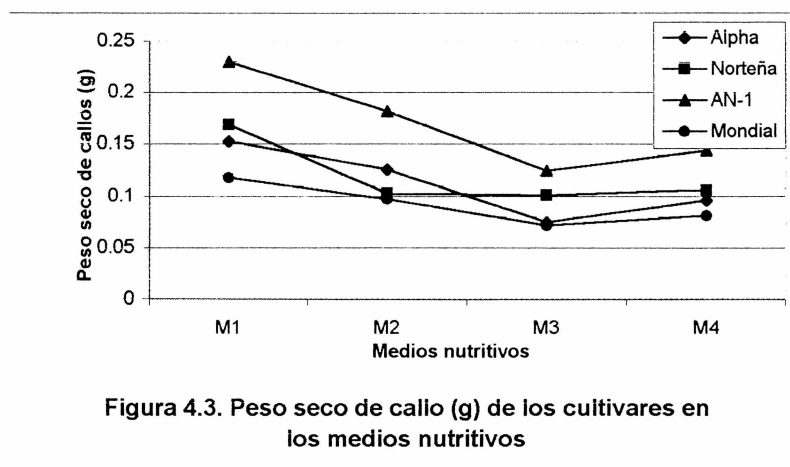
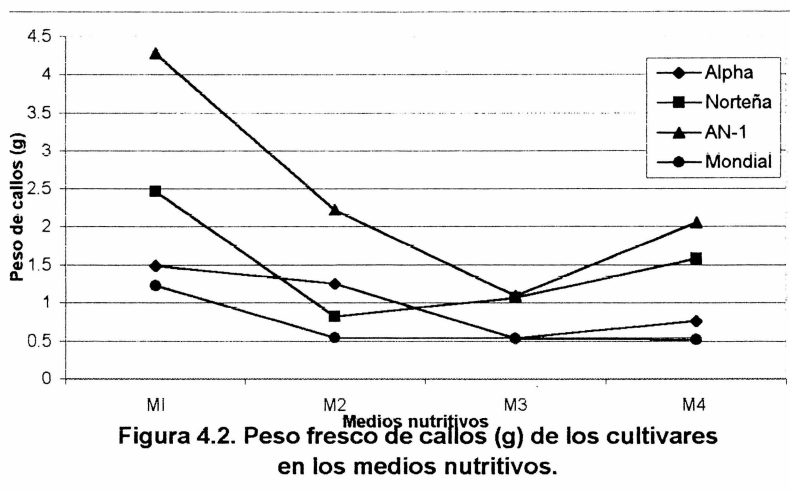
(p.f.c - p.s.c), pudiéndose inferir que los callos que acumularon menor cantidad de agua fueron poco friables.

Cuadro 4.6. Variables de tipo cuantitativo y cualitativo evaluadas en los diferentes tratamientos.

Tratamientos	P.fresco de callo	P.seco de callo	Diferencia p.f.-p.s.	Color callo	Tamaño Callo	Consistencia callo
AN-1 - M1	4.284	0.230	4.053	Cristalino	M.grane	Suave
Norteña - M1	2.461	0.169	2.292	Cristalino	Grande	Suave
AN-1 - M2	2.2:3	0.182	2.041	Cristalino	Grande	Suave
AN-1 - M4	2.052	0.144	1.908	Cristalino	Mediano	Suave
Norteña - M4	1.585	0.106	1.480	Cristalino	Mediano	Suave
Alpha - M1	1.485	0.153	1.131	Blanco	Grande	Suave
Alpha - M2	1.234	0.126	1.129	Cristalino	Grande	Suave
Mondial - M1	1.229	0.118	1.111	Blanco	Grande	Suave
AN-1 - M3	1.092	0.125	0.967	Café	Chico	Duro
Norteña - M3	1.069	0.101	0.969	Cristalino	Chico	Suave
Norteña - M2	0.824	0.103	0.722	Cristalino	Mediano	Suave
Alpha - M4	0.769	0.096	0.673	Cristalino	Chico	Suave
Mondial - M2	0.545	0.097	0.448	Gris	Chico	Duro
Alpha - M3	0.540	0.075	0.465	Café	Chico	Duro
Mondial - M4	0.539	0.081	0.458	Cristalino	Chico	Suave
Mondial - M3	0.519	0.072	0.447	Café	Chico	Duro

De acuerdo con la descripción que hacen Linsey y Jones (1990) para un callo friable, en la mayoría de los tratamientos se obtuvieron callos con las características de friabilidad (consistencia suave y coloración cristalina), excepto en los cultivares AN-1 y Alpha cuando crecieron en M3 y Mondial cuando creció en M2 y M3.

La diferente respuesta de los cultivares en los diferentes medios nutritivos se atribuye principalmente, (como ya se mencionó), a la constitución genética de cada uno de ellos, así como a la concentración de reguladores de



crecimiento adicionados a los medios nutritivos utilizados; aunque debe considerarse también el período de almacenamiento de los tubérculos utilizados en ésta prueba ya que de alguna manera influyen en la concentración de reguladores de crecimiento endógenos.

### **Respuesta de Callos de Papa *in vitro* a Diferentes Concentraciones del Filtrado Tóxico de *P. infestans***

En el Cuadro 4.7. se presenta la respuesta que tuvieron los callos a los 27 días de su primera transferencia al medio tóxico. La respuesta se expresa en diámetro promedio y color de los callos en las diferentes concentraciones en las que fueron probados. En esta primera transferencia el diámetro inicial promedio de las porciones de callo transferidas fue de 1.0 cm aproximadamente y se transfirieron 16 porciones de callo en cada concentración con medio tóxico. En ésta primera transferencia se aprecia que los callos respondieron de acuerdo a lo esperado, ya que su crecimiento fue menor conforme aumentó la concentración del filtrado, a excepción de los callos que crecieron en la concentración del 10 por ciento, ya que su respuesta fue muy similar a la del testigo (0 por ciento),

nto en crecimiento expresado en diámetro promedio del llo como en la coloración del mismo. Se observa además e el crecimiento que tuvieron en la concentración 10 por ento fue notoriamente mayor que el crecimiento que estos vieron en las concentraciones 20, 30 y 40 por ciento. emás de la diferencia en crecimiento, también fue notorio cambio en la coloración que adquirieron los callos en la ncentración del 20 por ciento y concentraciones periores al 20 por ciento ya que en estas concentraciones s callo adquirieron una coloración un poco oscura pero n llegar a morir.

adro 4.7. Primera transferencia. Diámetro promedio (cm) y color de callos del cultivar AN-1 como respuesta a la aplicación del filtrado tóxico de *P. infestans*.

Características del callo	Concentración del filtrado tóxico				
	0%	10%	20%	30%	40%
Diámetro del callo	2.33	2.31	1.26	1.20	1.18
Color del callo	Blanco	Blanco	Ligeramente Café	Ligeramente Café	Ligeramente Café

Debido a que los callos tuvieron crecimiento aún en s concentraciones más altas y con objeto de continuar aluando su respuesta, se realizó una segunda ansferencia (Cuadro 4.8.) en los medios nutritivos con la ncentración correspondiente. Para evaluar su respuesta en ta segunda transferencia se tomó en cuenta el diámetro

inicial promedio y se determinó su crecimiento a los 23 y 34 días de la transferencia.

Cuadro 4.8. Segunda transferencia. Diámetro promedio (cm) de callos del cultivar AN-1 como respuesta a la aplicación del filtrado tóxico de *P. infestans*.

Concentración Inicial	Diámetro		Diferencia	
	23 Días	34 Días	23 Días	34 Días
0%	1.24 (b)	2.33 b	1.09	1.43
10%	1.23(b.c)	1.92 b.c	0.69	1.12
20%	1.06(l.c)	1.12 l.c	0.06	0.33
30%	1.01 l.c	1.07 l.c	0.06	0.12
40%	0.92 l.c	0.98 l.c	0.06	0.09

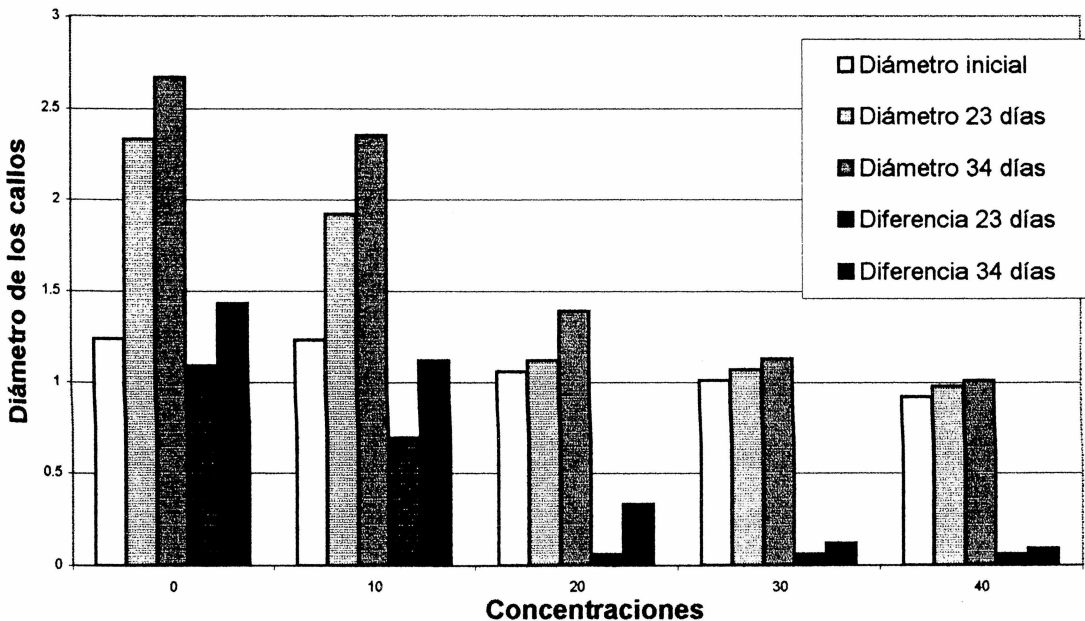
b. Color: blanco, b.c. Color: blanco-crema, l.c. Color: ligeramente café

En la segunda transferencia y en el caso de callos provenientes de medios con filtrados tóxico en concentraciones superiores al 10 por ciento, se sembraron porciones de callo con un diámetro promedio ligeramente inferior al utilizado en la concentración del 10 por ciento y el testigo. Esto se debió a que se disponía de poca cantidad de callo de la primera transferencia en las concentraciones 20 por ciento, 30 por ciento y 40 por ciento. Al igual que en la primera transferencia, los callos del testigo (0 por ciento) y la concentración 10 por ciento tuvieron un comportamiento muy semejante tanto en tamaño como en coloración; además su crecimiento fue notablemente mayor al del resto de los callos que crecieron en concentraciones superiores al 10 por ciento. En ésta segunda transferencia se observó además, que los callos crecieron aún después de haber realizado la primera lectura a los 23 días, razón por la cual

se realizó una segunda lectura a los 34 días. En ésta segunda lectura se detectó que los callos colocados en la concentración del 10 por ciento tuvieron un crecimiento mayor que el testigo, en el período comprendido de una lectura a otra (11 días), ya que en la concentración del 10 por ciento crecieron 0.43 cm por 0.34 cm del testigo. Por lo que se refiere a la concentración del 20 por ciento se observó que crecieron más en esos 11 días (0.27 cm) que en los 23 días iniciales (0.06 cm). El diámetro del callo en los otros dos medios restantes (30 por ciento y 40 por ciento) también se incrementó en ese mismo período, aunque en menor proporción que en las concentraciones 10 por ciento y 20 por ciento. La información descrita anteriormente se representa graficamente en la Figura 4.5.

En el Cuadro 4.9. se muestra la tasa de crecimiento (obtenida al dividir el diámetro alcanzado por los callos entre el número de días transcurridos al momento de hacer las lecturas) que tuvieron los callos en la primera lectura (primeros 23 días) y segunda lectura (11 días después de la primera). En dicho cuadro se aprecia que la tasa de crecimiento a los 23 días iniciales fue mayor en el testigo, seguido por la concentración del 10 por ciento. En el resto de las concentraciones la tasa de crecimiento fue la misma.

Por lo que respecta a la segunda lectura realizada 11 días después de la primera (34 días de iniciada la transferencia), la mayor tasa de crecimiento se obtuvo en la concentración del 10 por ciento, seguida por el testigo. En el caso del testigo, la tasa de crecimiento en la segunda lectura fue ligeramente menor que en la primera y en el caso de la concentración del 10 por ciento sucedió lo contrario. Por lo que respecta a la concentración del 20 por ciento, la tasa de crecimiento fue menor que la del testigo y que la concentración del 10 por ciento, pero notablemente mayor que la concentración del 30 y 40 por ciento. También fue notablemente mayor que la tasa de crecimiento que se tuvo en ésta misma concentración en la primera lectura.



**Figura 4.5. Segunda transferencia. Diámetro promedio (cm) de los callos en la primera lectura (23 días) y segunda lectura (34 días)**



En el Cuadro 4.9. también se puede apreciar que después de los 23 días iniciales los callos crecieron en forma un poco más acelerada, principalmente en la concentración del 20 por ciento y en menor proporción en la concentración del 10 y 30 por ciento. Por lo que respecta a la concentración del 40 por ciento, la tasa de crecimiento permaneció casi constante tanto a los 23 días iniciales como a los 11 días posteriores a la primera lectura.

En ninguna de las concentraciones probadas se observó muerte de callos, esto puede ser debido a que el tamaño de los callos utilizados fue muy grande (1.0 cm aproximadamente), ya que de acuerdo con Behnke (1979) el crecimiento de los callos en el medio tóxico depende del tamaño del callo, debido probablemente a que las toxinas son transportadas pobremente en los callos. Esto puede ser debido también a que entre mayor sea el tamaño del callo, las toxinas incluidas en el medio llegan disminuidas en su concentración a las células del callo.

Cuadro 4.9. Diámetro de callos a los 23 y 34 días y tasa de crecimiento de los callos a los 23 días iniciales y en 11 días posteriores a la primera lectura.

Concentración	Diámetro			Tasa de crecimiento	
	Inicial	23 días	34 días	23 días inic.	11 días post.
0%	1.24	2.33	2.67	0.0474	0.0310
10%	1.23	1.92	2.35	0.0300	0.0400
20%	1.06	1.12	1.39	0.0026	0.0240
30%	1.01	1.07	1.13	0.0026	0.0054
40%	0.92	0.98	1.01	0.0026	0.0027

La tasa de crecimiento mayor que tuvieron los callos en la segunda lectura en los medios que incluían los filtrados tóxicos, indica que los callos tuvieron un período de habituación en el medio que les permitió sobrevivir a los filtrados. Lo anterior coincide en cierta forma por lo mencionado por Meins (1983), quien señala que la habituación es un proceso gradual y progresivo diferente a la mutación, y que está fuertemente influenciado por la fisiología y estado de desarrollo de las células. Cabe considerar también la posibilidad de que las células que conforman los callos metabolizaron las toxinas contenidas en el filtrado tóxico o las combinaron con otras sustancias para formar compuestos no tóxicos como lo señala Agrios (1989), ya que en algunas enfermedades en las que el patógeno produce toxinas, la resistencia a la enfermedad es la misma que la resistencia a las toxinas; aunque aún no se ha dado una explicación satisfactoria acerca de la resistencia a las toxinas. Otra posible explicación sería la que señala Behnke (1980), en el sentido de que las células sobreviven gracias a las posibles mutaciones inducidas por el filtrado tóxico del medio, sin embargo ésta posibilidad es poco probable debido a que Behnke (1980a) utilizó porciones de callo de 1 mm, siendo estos muy pequeños y por lo tanto más expuestos al efecto del filtrado que los callos utilizados en este trabajo.

Lo anterior se relaciona también de alguna manera con lo reportado por Behnke (1979), en el sentido de que cuando ellos utilizaron porciones de callos con un diámetro inferior a 1 mm los callos no obtuvieron crecimiento, aún en medio sin filtrados tóxicos. Esto puede ser debido a lo que menciona Pierik (1990), en el sentido de que existe un contacto limitado con el medio sólido y por lo tanto se dificulta la absorción de compuestos del medio.

En cuanto a la herencia de la resistencia de los callos a *Phytophthora infestans*, Behnke (1980a) menciona que ésta se preserva aún después de la regeneración y segunda inducción de callos, indicando con ello que la resistencia en el cultivo de callo no es causada por una selección de células con actividad cambiada de los genes. Además señala que debido a que la papa es propagada vegetativamente, las mutaciones espontáneas se acumularán durante el tiempo de cultivo.

Estas ventajas combinadas aceleran la producción de nuevas variedades. Sin embargo, las técnicas no convencionales nunca pueden remplazar totalmente o ser usadas independientemente del mejoramiento clásico, pero

pueden ser usadas en forma complementaria en los procesos de mejoramiento (Wenzel et al. 1985).

En el último caso, las variedades resistentes metabolizan con gran rapidez las toxinas de los hongos o las combinan con otras sustancias para formar compuestos no tóxicos. Se sabe que la destoxificación de algunas toxinas, como es el caso del ácido fusárico, la piricularina, etc., es un fenómeno bastante común en las plantas y que tiene una importante función en la resistencia a las enfermedades. Con frecuencia la cantidad de estos compuestos es proporcional a la resistencia de la variedad vegetal a la enfermedad. Se puede citar como ejemplo de ello a las plantas resistentes y las no hospederas que no se ven afectadas por las toxinas específicas que producen *Helminthosporium*, *Periconia* y *Alternaria*, pero aún no se sabe si la acción selectiva de esas toxinas depende de la presencia de sitios receptores en las variedades susceptibles (pero no en las resistentes), o de la destoxificación de esas toxinas en las plantas resistentes (Agris, 1989).

## Respuesta de Cultivares de Papa a Diferentes Concentraciones de Filtrados Tóxicos de *P. infestans*

El análisis de varianza para la variable grado de marchitez que se presenta en el Cuadro 4.10. detecta diferencia altamente significativa para las fuentes de variación: cultivares (Factor A), concentraciones de filtrado tóxico (Factor B) y para la interacción: cultivares x concentraciones (AXB); lo cual muestra que los cultivares difieren en su respuesta promedio a los niveles de concentración probados, que las concentraciones evaluadas tuvieron diferente efecto entre sí y que en algunas combinaciones hubo cultivares que sobresalieron por su alto grado de tolerancia al filtrado.

Cuadro 4.10. Análisis de varianza para la variable grado de daño causado por el filtrado tóxico de *P. infestans* (Factor A cultivares, Factor B = concentraciones)

Fuentes De variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F.Calculada	Probabilidad
Factor A	6	22459.914	3743.319	42.2014 **	0.00
Factor B	4	70757.834	17689.458	199.4271 **	0.00
A x B	24	7293.576	303.899	3.4261 **	0.00
Error	70	6209.096	88.701		
Total	104	106720.422			

S.V. 20.40%

Por lo que respecta al comportamiento promedio de los cultivares en las diferentes concentraciones de filtrado tóxico, en el Cuadro 4.11. se observa que el cultivar Gigant fue estadísticamente superior al resto de

los genotipos y que estos a su vez fueron estadísticamente iguales entre sí.

Cuadro 4.11. Respuesta promedio de los cultivares a Distintas concentraciones del filtrado tóxico de *P.infestans*

Cultivar	Grado de daño Promedio (%)
Gigant	11.3 A
Alpha	46.5 B
Atlantic	48.8 B
AN-1	51.0 B
Excel	52.8 B
Norteña	55.5 B
Mondial	57.0 B

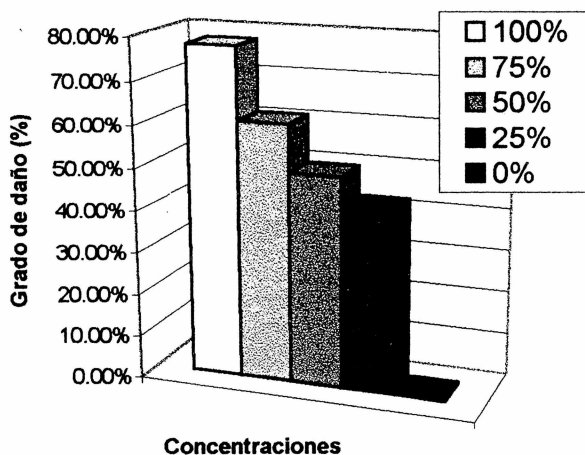
Cultivares con la misma letra son iguales estadísticamente, Tukey ( $P < 0.01$ ).

Cuadro 4.12. Efecto promedio de las concentraciones del filtrado tóxico en los cultivares

Concentración	% de daño
100 %	77.84 A
75 %	60.67 AB
50 %	49.60 B
25 %	42.68 B
0 %	0.00 C

Con relación al efecto promedio de las concentraciones del filtrado tóxico en los distintos cultivares, en el Cuadro 4.12. se aprecia que los mayores daños en los cultivares fueron causados por los niveles de concentración 100 y 75 por ciento, siendo iguales entre sí estadísticamente, pero a su vez la concentración del 100 por ciento es diferente al resto de las concentraciones. En

la Figura 4.6 se observa en forma más clara el efecto de los niveles de concentración del filtrado.



**Figura 4.6. Efecto promedio de las concentraciones del filtrado tóxico en los cultivos**

Por lo que respecta al comportamiento de cada uno de los cultivos en las diferentes concentraciones del filtrado tóxico, en el Cuadro 4.13. se observa que todos los cultivos tuvieron el máximo grado de daño en la concentración del 100 por ciento. De todos los cultivos evaluados, el cultivo Gigant fue el menos afectado, seguido por Alpha y Atlantic. Los cultivos más dañados en esta concentración fueron Mondial, AN-1 y Norteña; el cultivo

Excel tuvo un comportamiento intermedio. En la concentración del 75 por ciento, de nueva cuenta el cultivar Gigant se muestra como el menos dañado, seguido nuevamente por Alpha y Atlantic. Los cultivares con mayor grado de daño fueron los cuatro restantes. En la concentración del 50 por ciento el cultivar Gigant no mostró daño alguno, a diferencia del resto de los cultivares donde el grado de daño fue ligeramente superior al 50 por ciento. En ésta concentración el cultivar Mondial y el cultivar AN-1 fueron los más afectados. En la concentración del 25 por ciento el cultivar Gigant tampoco muestra daño, y en el resto de los cultivares el grado de daño varió de casi 34 por ciento a 59 por ciento, resultando de entre ellos con un grado menor de daño el cultivar AN-1 seguido de Alpha, Atlantic, Excel, Mondial, y finalmente Norteña con un grado de daño ligeramente mayor al de la variedad Mondial.

Cuadro 4.13. Grado de daño del filtrado tóxico en hojas de siete cultivares de papa.

Cultivares	Concentración de filtrados tóxicos				
	0%	25%	50%	75%	100%
Alpha	0.000	46.977	51.147	59.677	75.000
Mondial	0.000	56.970	66.607	71.560	90.000
Excel	0.000	53.123	55.830	71.560	83.853
Norteña	0.000	58.947	56.970	71.560	90.000
Atlantic	0.000	48.900	56.970	63.440	75.000
AN-1	0.000	33.847	59.677	71.560	90.000
Gigant	0.000	0.000	0.000	15.377	41.070



De acuerdo con los resultados anteriores, el cultivar Gigant se comportó como un genotipo tolerante al filtrado tóxico del aislado 97104 utilizado en ésta prueba, ya que aún en la concentración del 100 por ciento su grado de marchitez fue inferior, inclusive al grado de marchitez mostrado por el resto de los cultivares en la concentración del 25 por ciento (a excepción de AN-1). Por otra parte, los demás cultivares tuvieron una respuesta estadísticamente igual, aunque Alpha y Atlantic fueron ligeramente menos susceptibles que Excel, Mondial Norteña y AN-1. En primera instancia, la resistencia del cultivar Gigant puede atribuirse a su habilidad para destoxificar las toxinas del patógeno, metabolizarlas o combinarlas con otras sustancias para formar compuestos no tóxicos (Agrios, 1989).

Con objeto de confirmar el comportamiento que tuvieron los cultivares en el filtrado tóxico, los resultados fueron comparados con el comportamiento que estos han tenido en pruebas de campo en la región y en su país de origen.

Al hacer la comparación de los resultados obtenidos con los filtrados tóxicos, con el comportamiento de los cultivares en condiciones de campo en la región; se detecta que no hay coincidencia en la respuesta, sobre todo en los

casos de los cultivares Gigant, Alpha, Norteña y AN-1, ya que en condiciones naturales el cultivar Gigant (tolerante al filtrado tóxico), se comporta como un material susceptible al ataque de tizón tardío, junto con Alpha, Atlantic y Mondial; por otra parte, los cultivares Norteña y AN-1 (susceptibles al filtrado tóxico), se reportan en la región como cultivares con mayor grado de resistencia al daño del hongo que los cultivares mencionados anteriormente (Parga, 1994).

Sin embargo, al hacer la comparación de la respuesta de los cultivares al filtrado tóxico con su respuesta en condiciones de campo en Holanda, se observa que el comportamiento de los cultivares en los filtrados (sobre todo Gigant), coincide con el comportamiento que estos han tenido en condiciones de campo en Europa ya que los cultivares Gigant y Alpha se reportan como tolerantes al daño de *P.infestans*. y Mondial se reporta como susceptible. Del resto de los cultivares no se tienen reportes.

Con relación a lo anterior; cuando se hace la comparación del comportamiento de los cultivares en condiciones de campo en Europa y del comportamiento que

tienen en la región de Arteaga, tampoco hay coincidencia en el caso de los cultivares Gigant y Alpha (reportados en Europa como tolerantes a *P. infestans*) ya que en condiciones de campo en nuestro país son reportados como susceptibles a dicho patógeno. Solo hay coincidencia en la respuesta del cultivar Mondial y Atlantic ya que en ambas condiciones se reportan como susceptibles. De los otros cultivares no se tienen reportes de su comportamiento en Europa. La susceptibilidad de los cultivares que en Europa se reportan como resistentes (Gigant y Alpha) se atribuye a que en nuestro país se tienen días más cortos y temperaturas mayores que en Europa, lo cual acelera la madurez de los genotipos mencionados, haciéndolos más vulnerables al ataque del hongo en cuestión. A esto se agrega la mayor diversidad y agresividad de las cepas que están presentes en México ( $A_1$  y  $A_2$ ). Estas situaciones favorecen que los daños causados por este patógeno sean más severos en los cultivares europeos introducidos (Hoogan, 1989).

Sin embargo se puede observar que los cultivares reportados en Europa con resistencia horizontal y tolerantes a *P. infestans* (Gigant y Alpha), resultaron ser los cultivares con mayor grado de tolerancia al filtrado tóxico.

En este mismo aspecto, los resultados obtenidos en la presente prueba, coinciden de alguna manera con lo señalado por Bermúdez (1998), ya que en su trabajo con filtrados tóxicos donde incluyó a los cultivares Alpha y Norteña, reporta a Alpha como tolerante al filtrado tóxico, y a Norteña como susceptible. Señala además que al inocular con zoosporas, la velocidad de crecimiento del hongo y por lo tanto el grado de resistencia del genotipo al parásito, parece depender de la capacidad de la planta de resistir a la acción de la toxina y que tal vez la reacción de genotipos de papa a los filtrados tóxicos del hongo equivaldría a medir la resistencia a la colonización de los tejidos de la planta por el hongo, es decir se mediría el grado de resistencia horizontal.

En la comparación que se hace de los resultados obtenidos con los filtrados tóxicos con las pruebas de campo en la región, también es importante considerar que los mecanismos de defensa que muestran las plantas para contrarrestar el daño de los patógenos bajo condiciones controladas difiere a los que estas presentan en condiciones naturales, ya que bajo condiciones de campo las plantas activan otros mecanismos de defensa tales como la producción de fitoalexinas, sustancias que son producidas

por la planta cuando es estimulada por un patógeno y que son tóxicas para este último. Desde luego debe considerarse también el efecto del medio ambiente tanto en la planta como en el patógeno; además de la constitución genética de estos, así como la amplia variación patogénica del hongo.

En esta discrepancia en resultados también se debe considerar que tal vez las toxinas producidas *in vitro* por el aislado 97104 no corresponden a las toxinas producidas bajo condiciones naturales por las cepas del hongo *P. infestans* que prevalecen en la región., y que la resistencia a *P. infestans* puede estar dada por diferentes mecanismos que actúan en forma independiente y por lo tanto la prueba con filtrado tóxico por sí sola no es suficiente para seleccionar genotipos tolerantes al hongo mencionado pues no son el único factor determinante de la enfermedad. De acuerdo con estos resultados la prueba con filtrados tóxicos puede ser útil en la selección de genotipos con resistencia horizontal.

Los señalamientos anteriores, indican que la amplia variación de *P. infestans*, conjuntamente con las condiciones ambientales, influyen en forma determinante en la inestabilidad del comportamiento de los cultivares bajo

condiciones de campo en cuanto a su respuesta a la infección del patógeno y se coincide con Wenzel *et al.* (1984) en el sentido de que las técnicas no convencionales deben ser usadas en forma complementaria en los procesos de mejoramiento genético para resistencia a *P. infestans*.

## CONCLUSIONES

Aunque se logró inducir la formación de callo en los cuatro cultivares utilizados, el cultivar AN-1 produjo los callos de mayor peso y con las características de friabilidad, considerándose por lo tanto un cultivar con buena capacidad para formar callo en papa.

Se determinó además que el medio Engvild (1973) N&N es el más adecuado para la producción de callos con las características ya señaladas, y que la combinación del cultivar AN-1 con el medio nutritivo Engvild (1973) N&N, fue notoriamente superior al resto de las combinaciones para la producción de callos friables y de mayor peso.

En la prueba con filtrado tóxico se determinó que el mayor crecimiento de los callos del cultivar AN-1 se obtuvo en el testigo (0 por ciento) y en el medio con la concentración del 10 por ciento de filtrado, y que el diámetro de los callos en estas concentraciones fue muy semejante entre sí tanto en la primera como en la segunda transferencia.

Se observó además, que en la concentración del 20 por ciento de la segunda transferencia, los callos crecieron en forma más acelerada (10 veces más) en los últimos 11 días que en los 23 días iniciales.

En la prueba con filtrado tóxico, se identificó a Gigant como un cultivar con un alto grado de tolerancia al filtrado, pues aún en la concentración del 100 por ciento su daño fue notoriamente inferior inclusive al grado de daño mostrado por el resto de los cultivares en la concentración del 25 por ciento (a excepción de AN-1).

Al comparar la respuesta de algunos cultivares al filtrado con la que estos han tenido en condiciones de campo tanto en la región como en su país de origen (en el caso de los cultivares europeos), se concluye que la prueba con filtrado tóxico puede ser útil en la selección de genotipos con resistencia horizontal al hongo *P. infestans*, pero es claro que de ningún modo es suficiente por sí sola para seleccionar genotipos resistentes al hongo mencionado, pues la resistencia a las toxinas no es el único factor determinante de la incidencia de la enfermedad.



Finalmente se concluye que las pruebas con filtrado tóxico deben considerarse como una forma complementaria en los procesos de mejoramiento genético, pues tanto la variación del hongo como las condiciones ambientales, influyen de manera determinante en la inestabilidad de la respuesta de los cultivares a la infección del hongo bajo condiciones de campo.

## RESUMEN

El mejoramiento genético que tradicionalmente se aplica en la generación de variedades de mayor productividad, generalmente requiere de elevadas cantidades de insumos, principalmente pesticidas y fertilizantes químicos. En este aspecto el empleo de técnicas biotecnológicas pueden ser de gran utilidad para obtener germoplasma diseñado para producir bajo ciertas condiciones adversas tales como sequía, salinidad, bajas temperaturas, enfermedades y otras. Esto indudablemente sería de gran beneficio en la producción agrícola ya que puede ampliarse la superficie de siembra y se puede reducir significativamente la aplicación de agroquímicos que en muchos casos representan una participación importante en el problema de la contaminación ambiental, además de elevar los costos de producción en forma considerable.

En la producción de papa la principal limitante es atribuida a la enfermedad conocida como tizón tardío,

causada por el hongo *Phytophthora infestans*, ya que en algunos casos se realizan hasta 30 aplicaciones de fungicidas para su control. El daño que ocasiona este parásito puede ser mayor al 80 por ciento cuando no se toman las medidas adecuadas. Según la FAO, en 1994 se gastaron alrededor de 4,000 millones de dólares para su control.

En los programas de mejoramiento genético es importante considerar el uso de metodologías complementarias que puedan ser aplicadas en condiciones de laboratorio y que contribuyan a que la selección de genotipos tolerantes se realice en forma más eficiente y económica. Un método relativamente reciente que se aplica en la selección de germoplasma resistente a enfermedades *in vitro* e *in vivo* a nivel laboratorio es el uso de las toxinas o filtrado tóxico del patógeno como agente selectivo. Esta técnica proporciona condiciones ideales para controlar las condiciones ambientales y de manejo, además de ahorro de tiempo y espacio. La selección se puede realizar en planta, callos, células en suspensión y protoplastos.

El presente estudio se realizó con los objetivos siguientes: 1) determinar el medio nutritivo en el cual los cultivares de papa: Alpha, AN-1, Norteña y produzcan callos de mayor peso y con características de friabilidad, 2) evaluar la respuesta de callos derivados del clon AN-1 a diferentes concentraciones del filtrado tóxico procedente de la línea clonal 97104 del hongo *Phytophthora infestans*, y 3) determinar la respuesta de siete cultivares de papa a la aplicación de diferentes concentraciones de la línea clonal mencionada.

En la evaluación de los diferentes medios nutritivos para la formación de callo en los cuatro cultivares de papa (Alpha, Norteña, AN-1 y Mondial), se logró producir callo con los cuatro medios utilizados (Engvild 1973 N & N, Murashige & Skoog 1962, Stantz & Steward 1959 B y Lam 1975) aunque los callos variaron en cuanto a sus características cuantitativas y cualitativas. El análisis de la varianza detectó diferencia altamente significativa en las fuentes de variación: cultivares, medios nutritivos y en la interacción cultivares/medios nutritivos para las variables peso fresco y diferencia peso fresco menos peso seco, pero no para la variable peso seco en la interacción cultivares/medios nutritivos. La prueba

de Tukey, reporta que el cultivar AN-1 fue estadísticamente superior al resto de los cultivares en las variables peso fresco y diferencia peso fresco menos peso seco. Por lo que respecta a los medios nutritivos para las variables de tipo cuantitativo evaluadas, sobresaliendo el medio Engvild 1973 N&N, el cual fue estadísticamente superior al resto de los medios evaluados. En cuanto a la interacción: cultivar/medio nutritivo, la prueba de Tukey detecta que la combinación AN-1-Engvild 1973 N&N fue superior estadísticamente al resto de los tratamientos evaluados en las tres variables cuantitativas. Los callos producidos con este tratamiento también reunieron las características de friabilidad.

Para evaluar el comportamiento de los callos en el filtrado tóxico se realizaron dos transferencias. En esta evaluación se consideró el crecimiento de diámetro y coloración de callo en las diferentes concentraciones del filtrado. En la primera transferencia se hizo solo una lectura a los 27 días y se detectó que el crecimiento de los callos fue muy similar en el testigo y en el medio con el 10 por ciento del filtrado, pero en ambos medios el diámetro de los callos fue notoriamente superior al crecido en el resto de las concentraciones, y a su vez, el diámetro

de los callos desarrollados en el medio con el 20 por ciento de filtrado fue ligeramente superior a los medios con el 30 y 40 por ciento de filtrado. Para evaluar la respuesta de los callos en la segunda transferencia se realizaron dos lecturas. La primera lectura se realizó a los 23 días y la segunda a los 34 días. También se determinó la tasa de crecimiento de los callos en los primeros 23 días y a los 11 días posteriores. En general el comportamiento que tuvieron los callos tanto en la primera como en la segunda transferencia fue muy semejante, aunque considerando la tasa de crecimiento que tuvieron en los primeros 23 días y en los 11 últimos días; se observa que los callos tuvieron un crecimiento mayor en los últimos 11 días ya que a excepción del testigo (0 por ciento), la tasa de crecimiento del resto de las concentraciones fue superior en la segunda lectura que en la primera, sobre todo en la concentración del 20 por ciento ya que los callos crecieron casi 10 veces más en un lapso de 11 días que lo que crecieron en los 23 días iniciales en esa misma concentración

Por lo que respecta a la respuesta de los cultivares de papa a los diferentes niveles de concentración del filtrado tóxico, el análisis de varianza

detecta diferencia altamente significativa en las fuentes de variación cultivares, concentraciones de filtrado tóxico, y para la interacción cultivares/concentraciones de filtrado. De acuerdo con la prueba de Tukey el cultivar Gigant es estadísticamente superior al resto de los genotipos y estos a su vez son iguales entre sí. Con relación al comportamiento promedio de los niveles de filtrado en los distintos cultivares, se determinó que los mayores daños en los cultivares fueron causados por el nivel más alto del filtrado (100 por ciento) y que el daño se incrementó conforme se aumento el nivel de concentración. El cultivar Gigant se comportó como un genotipo tolerante al filtrado del aislado 97104, ya que aún en la concentración del 100 por ciento su grado de marchitez fue notoriamente inferior, inclusive al grado de marchitez mostrado por el resto de los cultivares (a excepción AN-1) en la concentración del 25 por ciento.

El comportamiento que tuvieron los cultivares en el filtrado tóxico se comparó con el que han tenido en pruebas de campo en la región y en su país de origen (en el caso de los cultivares europeos). En el primer caso se observa que no hay coincidencia la respuesta ya que en condiciones

naturales el cultivar Gigant (tolerante al filtrado tóxico), se comporta como un material susceptible al ataque del tizón tardío, junto con Alpha, Atlantic y Mondial. Por otra parte, los cultivares Norteña y AN-1 (susceptibles al filtrado tóxico), se reportan en la región como cultivares con mayor grado de resistencia que los mencionado anteriormente. Sin embargo, si hay coincidencia cuando se hace la comparación con la respuesta que tuvieron los cultivares en su país de origen ya que Gigant y Alpha se reportan como tolerantes al daño de *P. infestans* y son considerados como cultivares que poseen resistencia horizontal; Mondial por su parte se reporta como susceptible.

De acuerdo con estos señalamientos y otros resultados donde se indica que tal vez la reacción de los genotipos de papa a los filtrados tóxicos del hongo equivale a medir la resistencia a la colonización de los tejidos de la planta por el hongo, se puede interpretar que con los filtrados tóxicos es posible identificar cultivares que poseen resistencia a *P. infestans*

De cualquier modo, es importante señalar que los mecanismos de defensa que presentan las plantas para



contrarrestar el daño de los patógenos bajo condiciones controladas difiere a los que estas presentan en condiciones naturales, ya que bajo condiciones de campo las plantas activan otros mecanismos de defensa tales como la producción de fitoalexinas, sustancias que son producidas por la planta cuando es estimulada por un patógeno y que son tóxicas para este último y que la discrepancia en resultados tal vez se deba a que las toxinas producidas *in vitro* del aislado utilizado no correspondan a las producidas bajo condiciones naturales por las cepas que prevalecen en la región o que la resistencia a *P. infestans* puede ser conferida por diferentes mecanismos que actúan en forma independiente y que la prueba por sí sola no es suficiente para seleccionar genotipos tolerantes al hongo mencionado. De acuerdo a estos resultados y a lo mencionado por Wenzel et al. (1984), las técnicas no convencionales deben ser usadas en forma complementaria en los programas de mejoramiento y nunca deben reemplazar totalmente o ser usadas independientemente del mejoramiento clásico.

## LITERATURA CITADA

- Agrios, G.N. 1989. Fitopatología. Limusa. México. p.20- 75
- Alexopoulos, C.J. y C.W. Mims. 1985. Introducción a la micología. Omega. España. p.638.
- Alicchino, R., C. Antonioli, and D. Palenzona. 1984. Karyotypic variability in plants of *Solanum melongena* regenerated from callus grown in presence of culture filtrate of *Verticillium dahliae*. Theor. Appl. Genet. 67:267-271. USA.
- Aloni, R. 1980. Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. Planta. 150:255-263. USA.
- Andrus, C.F. 1953. Evaluation and use of disease resistance by vegetable breeders. Hort. Sci. 61:434-446. USA.
- Arcioni, S., M. Pezzotti, and F. Damiani. 1987. *In vitro* selection of alfalfa plants resistant to *Fusarium oxysporum* F. sp. *Medicaginis*. Theor. Appl. Genet. 74:700-705. USA.
- Baillie, A.M.R., B.G. Rossnagel, and K.K. Kartha. 1983. *In Vitro* selection for improved chlorsulfuron tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). Euphytica. 67:151-154. Netherlands.
- Bajaj, Y.P.S. and A.W. Saettler. 1970. Effect of holo toxin containing filtrates of *Pseudomonas phaseolicola* on the growth of bean callus tissue. Phytopathology 60:1065-1067.USA.
- Barba, A.A. 1994. Cultivo de callos. En Cultivo de tejidos vegetales. (ed). Hurtado, M. D y Merino, E. M. Trillas. México. p. 93.
- 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. USA.

- Behnke. M. 1980a. General resistance to blight of *Solanum Tuberosum* Plants regenerated from callus resistant To culture filtrates of *Phytophthora infestans*. Theor Appl. Genet. 56:151-152. USA.
- Behnke M. 1980b. Selection of Dihaploid Potato Callus for Resistance to the Culture Filtrate of *Fusarium oxysporum*. Z. Pflanzenzücht. 85:254 -258. Germany.
- Bermúdez, D. C.T. 1998. Selección de genotipos de papa (*Solanum tuberosum*) resistentes a tizón tardío (*Phytophthora infestans*). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. P. 58-59.
- Beukema, H.P. and V.d. Zaag. 1990. Introduction to potato production. Centre for Agricultural Publishing and Documentation (Pudoc), Wagening, Netherlands.
- Bhojwani, S.S., P.K. Evans. and E.C. Cocking. 1977. Protoplast technology in relation to crop plants: Progress and problems. Euphytica. 26:343-360. Netherlands.
- Binarova, P., J. Nedelnski., M. Fullner & B. Nedbalkova. 1990 Selection for resistance to filtrates of *Fusarium spp.* in embryogenic cell suspension to culture of *Medicago sativa* L. Plant Cell Culture and Organ Culture. 22:191-196.
- Black, W. 1954. Late blight resistance work in Scotland. Amer. Potato. J. 31:93-100. USA.
- Black, W., C. Mastenbroeck., W.R. Mills and L.C. Peterson. 1953. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. Euphytica 2:173-178. Netherlands.
- Brasier, C.M. 1992. Evolutionary biology of *Phytophthora* Part I: Genetic system, sexuality and the generation of variation. Annual Review Phytopathology. 30:153-171. USA.

- Browning, J.A., M.D. Simons, and E. Torres. 1979. Managing host genes: epidemiology and genetic concepts. Pathology, an advanced treatise. J. G. Horsfall and A.E. Diamond, Eds. 3:191-212.
- Buiatti, M., A. Scala., P. Bettini., G. Nascari., R. Morpurgo., R. Bogani., G. Pellegrini., F. Gimelli. and R. Venture. 1985. Correlations between *in vivo* resistance to *Fusarium* and *in vitro* response to fungal elicitor and toxic substances in carnation. Theor. Appl. Genet.. 70:42-47. USA:
- Byther, R. S., and G. W. Steiner. 1972. Use of Helminthosporoicide to select sugarcane seedlings resistant to eye spot disease. Phytopathology. 62:466-476. USA.
- Carlson, P.S. 1973. Methionine sulfoximine resistant mutants of tobacco. Science. 180:1366-1368. USA.
- Carlson, P.S., H.H.Smith and R.D. Dearing. 1972. Parasexual interspecific plant hibridization. Proc. Natl-Acad- Sci.. 69:2292-2294. USA.
- CIP. 1996. Informe Anual del Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú.
- Chaleff, R.S., and T.B. Ray. 1984. Herbicide resistant mutants from tobacco cell cultures. Science. 223:1148-1158. USA.
- Cocking, E.C. 1972. Plant cell protoplasts isolation and development. Ann. Rev. Plant Physiol. 23: 29-50. USA.
- Daub, M.E. 1986. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. Annual Review Phytopathology. 24:159-186. USA.
- De la Garza, G.J.L. 1996. Fitopatología General. Primera Edición. U.A.N.C. México. p.185.
- Devlin, M.R. 1980. Fisiología. Vegetal. Ed. Omega. Barcelona, España. p.376
- Dickinson, C.H. 1987. Patología vegetal y patógenos de plantas. Limusa. México p. 312.

- Dix, P.J., and H.E. Street. 1975. Sodium chloride resistant cultured cell lines from *Nicotiana glauca* and *Capsicum annuum*. Plant Sci. Lett. 5:231-237.
- Dodds, J.H. and L.W. Roberts. 1990. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press. Cambridge. USA. p. 190.
- Dutrecq, A.J.E. 1977. *In-vitro* selection of plants resistant or tolerant to pathogenic fungi. In: Proc Symp. Induced Mutat Against Plant Dis. Int At Energy Ag, Vienna. p 471-478
- Elgin J.H. 1981. Use of strain crosses in breeding multiple pest resistance alfalfa. Report, 27<sup>th</sup> Alfalfa Improvement Conference. 8-10 July. 1980. University of Wisconsin, Madison, p.58.
- Erwin, D.C., G. A. Zentmyer., J. Galindo and J. S. Niederhauser. 1963. Variation in the genus *Phytophthora*. Annual Review Phytopathology. 1:375-396.
- Evans, D.A., W. R. Sharp, and H. P. Medima-Filho. 1984. Somaclonal and gametoclonal variation. Am. J. Bot. 7:759-774.
- Fernandez, P.S.P. 1985. Caracterización de la resistencia de diversos clones de papita güera (*Solanum cardiophyllum* y *ehrenbergii* (Bitt) al ataque de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Tesis de Maestro en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- Flores, G. F.X. y Cadena, H. M. A. 1997. Evaluation of Horizontal Resistance and Effects of R-Genes in Ten Mexican Cultivares Against potato late blight (*Phytophthora infestans*) Under Natural Conditions in The Central Plateau of Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología. 14:97-102. México.
- Foroughi-Wehr, B., W. Friedt., R. Schuchmann., Kohler, R., Wenzel, G. 1986. *In vitro* selection for resistance. In: Semal J. (ed) Somaclonal variation and crop improvement.

- Fry, W. E., P.W. Tooley and L.J. Spielman. 1989. The importance of the perfect stage of *Phytophthora infestans* from the standpoint of epidemiology and adaptation. In: Fungal Diseases of the Potato Report of the Planning Conference on Fungal Diseases of the Potato. Held at CIP, Lima, September 21-25, 1987.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller., K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exper. Cell. Res.* 50:151-158
- Galindo A.J. y S. Romero C. 1958. Sexualidad en *Phytophthora infestans*. II Grupos de compatibilidad, grados sexuales y determinación del sexo. Memorias del primer congreso nacional de entomología y fitopatología. Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, México.
- Gallegly, M. E. 1968. Genetics of pathogenicity of *Phytophthora infestans*. *Innual Review of Phytopathology* 6:375-396. USA.
- Gallegly, M.E. and J. Galindo. 1957. The sexual stage of *Phytophthora infestans* in México. *American Potato Journal.* 34:58. USA.
- Gallegly, M.E., and J. Galindo. 1958a. Mating types and Oosporas of *Phytophthora infestans*. *American Potato Journal.* 58:257-260. USA.
- \_\_\_\_\_. 1958b. Mating types and oosporas of *Phytophthora infestans* in nature in México. *Phytopathology.* 48:274-277. USA.
- Gallegly; M.E. and J.J. Eichenmuller. 1959. The spontaneous appearance of the potato race 4 character in cultures of *Phytophthora infestans*. *American Potato Journal.* 36:45-51. USA.
- Gengenbach, B.G., C.E. Green., C.M. Donovan. 1978. Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5113-5117. USA
- George, E.F., D. J. M. Puttock and H. J. George. 1987. Plant

Culture media. Formulations and uses. Exegetics Limited. England. p.184-187

- Giddings, M.E. and A. Berg. 1919. A comparison of late blights of tomato and potato. A preliminary report. *Phytopatology* 9:209-210. St. Paul, Min. USA.
- Goodwin, S.B. 1996. Origin and Ecology of *Phytophthora infestans*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 14:143-147. México.
- Graham. K.M. 1962. Inheritance of partial resistance to *Phytophthora infestans* in *Solanum verrucosum*. *Ame. Potato J.* 36:196-203. USA.
- Graham, K., y S. Romero. 1958. Sexualidad en *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. III. Homotalismo y su discusión. *Memorias del Primer Congreso Nacional de Entomología y Fitopatología, Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, México.*
- Graham, K.L., Niederhauser, J.S., and S. Romero. 1959. Observations on races of *Phytophthora infestans* in México during 1956-1957. *American Potato Journal*. 36:196-203. USA.
- Graham, J.H., F.I. Frosheiser., D.L. Stuteville., D.C. Erwin. 1979. Fusarium wilt. In: A compendium of alfalfa diseases. *Am. Phytopatol.* p.36. USA.
- Graniti, A. 1972. The evolution of the toxin concept in plant pathology. In: *Phytotoxine in plant disease* (ed). Wood, R.K.S., A.B. Balio and A. Graniti Academic Press. p.15. USA.
- Griesbach, R.J., P. Semeniuk., M. Roh, and R.H. Lawson. 1988. Tissue culture in the improvement of *Eustoma*. *Hort science*. 23:791. USA.
- Haberlach, G.T., A.D. Buddle., L. Sequeira and J. P. Helgeson. 1978. Modification of disease resistance of tobacco callus tissue by cytokinins. *Plant Physiol.* 62:522-525. USA.
- Hall, H.K., D. Cohen, and R.M. Skirvin. 1986. Inheritance of thornlessness from tissue culture derived

Thorlen Evergreen blackberry. *Euphytica* 35:891-898. Netherlands.

Hanson, K., P. Huel, and R.J. Baker. 1994. Comparative field performance of tissue culture derived lines and breeder lines of HY320 spring wheat. *Plant Breeding* 112(3):189-191. USA.

Hartman, C.; T.R. Mitchell., T.J. Knous., and T.J. McCoy. 1983. Toxic components produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Medicaginis* and their use in alfalfa cell culture selection techniques. *Phytopathology*. 73:829. USA.

Hartman, C.L., T.J. McCoy, and T.J. Knous. 1984. Selection of alfalfa (*Medicago sativa*) celllines and regeneration of plants resistant to the toxin produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Medicaginis*. *Plant Sci. Lett.* 34:183-194

Heath-Pagliuso, S., J. Pullman, and L. Rappaport. 1989. VC-T3. Somaclone: Celery germplasm resistant to *Fusarium oxysporum* F.sp. *apii*, race 2. *Hortscience* 24:711-712. USA.

Heinz, D. J., and G. W. P. Mee. 1971. Morphologic cytogenetic, and enzymatic variation in *Sacharum* species hybrid clones derived from callus tissue. *Am. J. Bot.* 58:257-262. USA.

Helgeson, P.J. 1983. Studies of host-patogen interactions *in vitro*. In: Use of tissue culture and protoplasts in Plant Pathology. Academic Press, Sydney. p 9-38

Henfling, J.W. 1987. Late blight of potato: *Phytophthora infestans*. Technical information Bulletin 4. International Potato Center. Peru. P. 25

Hodgson, W.H. 1961. Laboratory testing on the potato for partial resistance to *Phytophthora infestans*. *Am. Potato J.* 38:259-264. USA.

Hodgson, W.A. 1962. Studies of the nature of partial resistance in the potato to *Phytophthora infestans*



in México. Amer. Pot. J. 39:8-13. USA.

- Hoogan. v.J.J. 1989. Catálogo Holandés de variedades de patata 1989. Oosterbaan & Le Cointre B. V, Goes La Haya. Netherlands.
- Ingram, D.S and P.H. Williams. 1991. *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Advances in Plant pathology. Academic Press. USA.
- Jellis, G.J. 1992. Multiple resistance to disease and pest in potato. In: Breeding for disease resistance. R. Johnson and G.J. Jellis, Eds. Euphytica. 65:51-58. Netherlands.
- Keen, N.T. and R. Horsch. 1972. Hydroxy - phaseollin Production by various soybean tissues: A warning against the use of unnatural host-parasite systems. Phytopathology 65:91-92. USA.
- King, P.J., I. Potrykus and E. Thomas 1978. In vitro genetics of cereals: Problems and perspectives. Physiol. Veg. 16: 381-399.
- Larkin, P.J., and W.R. Scrowcroft. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell culture. Theor. Appl. Genet. 60:197-214. USA.
- Laughnan, J.R. and S.J. Gabay. 1973. Reaction of germinating maize pollen to *Helminthosporium maydis* pathotoxins. Crop Sci.13:681-684. USA.
- Lindsey, K. Y M.G.K. Jones. 1989. Biotecnología Vegetal Agrícola. Editorial Acribia, España.
- Ling, D.H., D. Vidhyaseharam., E.S. Borromeo., F.J. Zapata and T.W. Mew. 1985. In vitro screening of rice germplasm for resistance to brown spot disease using phytotoxin. Theor. Appl. Genet. 71:133-135. USA.
- Linsmaier, E.M., and F. Skoog 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 18:100-127. USA.
- López, P.C. 1995. Potencialidades de la tecnología del

cultivo de tejidos vegetales en el mejoramiento genético de plantas y su vinculación con el sector productivo. Horticultura Mexicana. 3 (2): 137-146. México.

- Lozoya, S. H. 1996. Phytophthora 150: La Experiencia Irlandesa. Revista Mexicana de Fitopatología. 14:140-142. México.
- Manka, M. and J. Chelkowski. 1985. Phytotoxicity and Pathogenicity of *Fusarium nivale* towards cereal seedling. Phytopathol. Z. 144: 1-5.
- Marton, L., and P. Maliga. 1975. Control of resistance in tobacco cells to 5-bromodeoxyuridine by a simple mendelian factor. Plant Sci. Letters. 5: 77-81.
- Matern, U., Strobel, G., J. Shepard. 1978. Reaction to phytotoxin in a potato population derived from mesophyl protoplasts. Proc. Nat. Acad. Sci. 75:4935-4939. USA.
- Meins, F.J. 1983. Heritable variation in plant cell culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 34:327 - 346. USA.
- McDonald, B.A. 1989. The population biology of host-pathogen interactions. Annual Review Phytopathology. 27:77-94. USA.
- Mendoza, Z.C. y C.B. Pinto. 1985. Principios de Fitopatología y enfermedades causadas por hongos. U.A. de Chapingo. México. p.311.
- Mills, W.R. and L.C. Peterson. 1952. The development of races of *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary on Potato hybrids. (Abstr.) Phytopathology. 42:26. USA.
- Muñiz, J.A. 1998. Identificación de compatibilidad sexual y genes de virulencia de *Phytophthora infestans* (Mont) By y evaluación de resistencia en 18 materiales a los tizones tardío y temprano de papa en la región de Coahuila y Nuevo León. Tesis de Maestría en Ciencias. Programa de Graduados. UAAAN. Buenavista, Saltillo, México.
- Murashige, T. and R. Nakano. 1965. Morphogenetic behaviour of tobacco tissue cultures and implication of plant senescence. Am. j. Bot. 52:819-827. USA.

- Murashige, T. and R. Nakano. 1967. Chromosome complement as a determinant of the morphogenetic potential of tobacco cells. *Am. J. Bot.* 54:963-970 USA.
- Niederhauser, J.L. 1986. Tizón tardío de la papa en México, su lugar de origen y de la solución. *Revista mexicana de Fitopatología.* 4:31-36. México.
- Niederhauser, J.L., J. Cervantes and L. Servin. 1954 Late blight in Mexico. *American Potato Journal.* 31:233-237. USA.
- Niederhauser, J.L. And J. Cervantes. 1956. Maintenance of field resistance to *Phytophthora infestans* in potato selections. *Phytopathology.* 42:22. USA.
- Payne, G.A., Yoder, O.C. (1978). Effect of nuclear genome of corne on sensitivity to *Helminthosporium maydis* race T. *Phytopathology.* 68:331-337. USA.
- Parga, T.V. 1994. Sostenibilidad de producción de papa con variedades mexicanas. Tercera reunión científica y tecnológica forestal y agropecuaria. Coahuila. p.13 México.
- Pelcher, L.E., K.N. Kao., O.L. Gamborg., O.C. Yodder and V.E. Gracen. 1975. Effects of *Helminthosporium maydis* race T toxin on protoplasts of resistant and susceptible corn (*Zea mays*). *Can. J. Bot.* 53:427-431. Canada.
- PICTIPAPA. 1995. Programa internacional cooperativo del tizón tardío de la papa. Folleto Divulgativo. Perú.
- Pierik, R.L.M. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ediciones Mundiprensa. España. p. 287.
- Pius, J., L. George., S. Eapen, and P. S. Rao. 1994. Evaluation of somaclonal and mutagen induced Variation in finger millet.. *Plant breeding* 112(3) 239-243. USA.
- Po-jen Wang and Ching yeh Hu. 1985. Potato Tissue culture and its applications in agriculture. In: *Potato physiology.* Paul H. Li. (Ed). P. 503-524. Academic Press. USA.

- Pringle, R.B., and P. Scheffer. 1967. Host-specific plant toxins. *Ann. Rev. Phytopathology*. 2:133-152. USA.
- Pristou, R., and M.E. Gallegly. 1954. Leaf penetration by *Phytophthora infestans*. *Phytopatology*. 44:81-86. USA.
- Quraishi, A., I. John., L. Rossignol and R. Nozeran. 1987. Effect of the origin of exlant on callus initiation and differentiation in potato. In: *Biotechnology in Agriculture and forestry*. Bajaj, Y.P.S. (Ed). Springer-Verlag. Germany. P. 243-255.
- Ramírez, V.J. y C.S. Romero, 1980. Supervivencia de *Phytophthora capsici* Leo; agente causal de la marchitez del chile. *Agrociencia*. 39:9-18. México.
- Reddick, D. 1932. Some diseases of wild potatoes in Mexico. *Phytopatology*. 22:609-612. USA.
- Robert, L.M. 1985. El potencial del cultivo in vitro de células vegetales en el mejoramiento genético de las plantas. (Ed) Robert, M.L. y Loyola, M.V. *El cultivo de tejidos vegetales en México*. CONACYT. México. p.92-93.
- Robert, L.M., Arce, M. M. y Amarella Eastmond. 1993. *Biotecnología vegetal*. Capitulo 3. *Biotecnología alimentaria*. Compiladores: Mariano Gracia Garibay, Rodolfo Quintero Ramírez y Agustín López Munguía Limusa. México.
- Robertson, N.F. 1991. The challenge of *Phytophthora infestans*. In *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Eds. D.S. Ingram and P.H. Williams. *Advances in Plant Pathology*, Vol. 7. Academic Press. USA. p.1-30.
- Sacristan, M.D. 1982. Resistance responses to *Phoma lingam* of plants regenerated from selected cell and embryogenic cultures of haploid *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* 61:193-200. USA.
- Sakai, R. And K. Toriyama. 1964. Relations between factors related to phenols and varietal resistance of potato plant to late blight. I. Field observation. *Ann. Phytopathol.* 29:33-38 USA.

- Stolle; K., and B. Schöber. 1985. Nachweis eines Toxins mi Kartoffelknollengewebe nach Inokulation mit *Phytophthora infestans*. Potato Research. 28:193-201
- Strange, R.N., D.J. Pippard and G.A. Strobel. 1982. A protoplast assay for phytotoxic metabolites produced by *Phytophthora drechleri* in culture. Physiological Plant Pathology. 20:359-364. USA.
- Strobel, G.A. 1973. Biochemical basis of the resistance of sugarcane to eye spot disease. Proc. Nat. Acad. Sci. 70:1693-1696. USA.
- Strobel, G.A. 1974. Phytotoxins produced by plants parasites. Annual Review Microbiology. 25:541-566. USA.
- Sumaryati, S., I. Negrutiu, and M. Jacobs. 1992. Characterization and regeneration of salt and water-stress mutants from protoplasts culture of *Nicotiana plumbaginifolia* (Viriani). Theor. Appl. Genet. 83:613-619. USA.
- Swanson, E.B. and D.T. Tomas. 1983. Evaluation of birdsfoot trefoil regenerated plants and their progeny after *in vitro* selection for 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid tolerance. Plant Sci. Lett. 29:19-24.
- Tal, M. 1990. Somaclonal variation for salt resistance. In: Y.P.S. Bajaj (ed.) biotechnology in agriculture and forestry. Vol. II Somaclonal variation in crop improvement. Springer-Verlag Berling, Heidelberg. p 236-257.
- Thurston, H.D. 1971. Relationship of general resistance: late blight of potato. Phytopathology. 61:620-626. USA.
- Torrey, J.G 1967. Morphogenesis in relation to chromosomal constitution in long-term plant tissue cultures. Plant Physiology. 20:265-275. USA.
- Trapaga, A. J.A. 1980. Selección de material germoplásmico de trigo (*Triticum aestivium* L.) mediante el uso de fitotoxina del agente causal *Fusarium calmorum* bajo

condiciones de laboratorio e invernadero. Tesis profesional ITESM. México.

- Trolinder, N.L. and X. Shang. 1991. *In vitro* selection and regeneration of cotton resistant to high temperature stress. *Plant Cell Rep.* 10: 448-452.
- Umaerus, V. 1969. Studies on field resistance to *Phytophthora infestans*. 2. A method of screening young potato seedling for field resistance to *Phytophthora infestans*. *Z. Planzenzücht.* 61: 167-194. Germany.
- Umaerus, V., M. Umaerus., L. Erjefalt and B. A. Nilsson. 1983. Control of *Phytophthora* by host resistance: Problems and progress. In: *Phytophthora its biology, taxonomy, ecology and pathology.* (Ed). Erwin, D.C., S. Bartnicki-García y P.H. Tsao. The American Phytopathology Society. St. Paul, Minnesota. p.317. USA.
- Van der Plank, J.E. 1966. Horizontal (poligenic) and vertical (oligogenic) resistance against blight. *Am. Potato J.* 43: 43-51. USA.
- Van der Plank, J.E. 1968. Disease resistance in plants. Academic Press, New York, U.S.A.
- Van der Plank, J.E. 1978. Genetic and molecular basis of plant pathogenesis. Springer-Verlag. Berlin y New York
- Van der Plank, 1982. Disease resistance in plants. Academic Press Florida, U.S.A.
- Van Hoogan, J.J. 1989. Catálogo Holandés de variedades de patata. Printed in the Netherlands.
- Van Swaij, A.C., E. Jacobsen., J.A. Kiel, and W.J. Freenstra. 1986. Selection characterization and regeneration of Hidroxiprolina-resistant cell lines of *Solanum tuberosum* tolerance to NaCl and freezing stress. *Physiol. Plant.* 68:359-366.
- Villalobos, A.V. 1985. Morfogenética y micropropagación de especies perennes. En: Robert, M.L.y Loyola, V.M. El cultivo de tejidos vegetales en México. Consejo

Nacional de Ciencia y Tecnología. p.55-63.

- Watad, A.A., D. Swartzberg., R.A. Bressan., S. Izhar, and P.M. Hasegawa. 1991. Stability of salt tolerance at the cell level after regeneration of plants from salt tolerant tobacco cell lines. *Physiol. Plant.* 83:307-313. USA.
- Wheeler, H.E., and H.H Luke. 1955. Mass screening for disease resistant mutants in oats. *Science.* 122, 1229. USA.
- Wenzel, G., F. Kohler., R. Schuchmann., B. Foroughi-Wehr. 1984. Efficiency in plant breeding. Proceedings of the 10<sup>th</sup> Congress of the European Association for Research on Plant Breeding. EUCARPIA, Wageningen, the Netherlands. p. 224-227.
- Westie, R.L. 1991. Breeding for resistance. In *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Eds. D.S. Ingram and Williams. *Advances in Plant Pathology* pp. 193-224. USA.