

## MÉTODO PARA EVALUAR LA RESPUESTA DE GENOTIPOS DE TOMATE INOCULADOS CON *Passalora fulva* (COOKE) U. BRAUN Y CROUS EN INVERNADERO

A. Bernal\*, B. Martínez\*\* y Danay Infante\*\*

\* Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, \*\* Grupo de Fitopatología. Dirección de Protección de Plantas. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Correo electrónico: alexanderbc@uclv.edu.cu

**RESUMEN:** Se describen los métodos para la evaluación de la resistencia al moho de las hojas en genotipos de *Solanum* mediante el uso de suspensiones de conidios de *Passalora fulva*. Para la prueba de inoculación en el invernadero se utilizaron el cultivar Moneymaker y cuatro líneas isogénicas cercanas del propio cultivar: Cf-Ecp1, Cf-Ecp2, Cf-Ecp4 y Cf-Ecp5. La concentración del inóculo fue ajustada a  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> y las hojas inferiores fueron inoculadas por el envés. Las plantas se evaluaron diariamente hasta los 21 días después de la inoculación. Para la evaluación de las hojas se utilizó una escala que permitió evitar la confusión del evaluador y describir el desarrollo de los síntomas de forma satisfactoria. Con excepción de las líneas isogénicas cercanas Cf-Ecp2, Cf-Ecp4 y Cf-Ecp5, los genotipos mostraron una respuesta similar contra el agente fitopatógeno en condiciones naturales. La resistencia expresada por estos se caracterizó por una respuesta hipersensible. La inoculación artificial de las plantas resultó ser un método fácil, rápido y factible para conocer la expresión de la resistencia de las plantas contra *P. fulva*. La utilización del inóculo con una concentración ajustable permitió obtener síntomas homogéneos y uniformes en la hoja inoculada. Este método representa una herramienta útil para la evaluación de las plantas en los programas de mejoramiento genético.

(Palabras clave: escala; síntomas; tomate; *Passalora fulva*; invernadero)

---

## METHOD FOR THE EVALUATION OF THE RESPONSE OF TOMATO GENOTYPES INOCULATED WITH *Passalora fulva* (COOKE) U. BRAUN AND CROUS IN A GREENHOUSE

**ABSTRACT:** A method for evaluating the resistance to leaf mold on *Solanum* plants was developed using conidial suspensions of *Passalora fulva*. Moneymaker cultivar and four Near Isogenic Lines (NILs), Cf-Ecp1, Cf-Ecp2, Cf-Ecp4 and Cf-Ecp5 were tested in a greenhouse. The inoculum was adjusted to  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> and applied to the lower leaves. The plants were daily evaluated after inoculation up to 21 days. A standardized scale of leaf symptoms ensured consistency between evaluators. The genotypes, except Cf-Ecp1, Cf-Ecp2, Cf-Ecp4 and Cf-Ecp5 NILs, showed a similar response to *P. fulva* in natural conditions. The resistance expressed in its NILs was characterized by a hypersensible reaction. Artificial inoculation of plants was an easy, rapid and practicable method to determine resistance to *P. fulva*. An inoculum adjusted to an appropriate concentration gave uniform symptoms on the inoculated leaves. The method used proved to be a promissory tool for the evaluation of tomato genotype response in breeding programmes.

(Key words: scale; symptoms; tomato; *Passalora fulva*; greenhouse)

---

## INTRODUCCIÓN

El moho de las hojas, causado por el hongo fitopatógeno *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun y Crous, es la enfermedad más común y destructiva en el cultivo del tomate creciendo bajo condiciones de invernadero en el mundo (1,2,3). En Cuba, constituye el principal problema fúngico que incide en las instalaciones de cultivo protegido, sobre todo en la época de primavera-verano; donde se presentan condiciones favorables para la diseminación de la enfermedad (4).

El desarrollo de métodos de inoculación artificial bajo condiciones controladas ha sido una de las principales prioridades en las investigaciones con hongos fitopatógenos, pues permite valorar cualitativa y cuantitativamente la expresión de la resistencia sobre un determinado hospedante; así como mejorar y simplificar los procedimientos de selección en los programas de mejoramiento genético.

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue estandarizar un método para la evaluación rápida de genotipos de tomate inoculados artificialmente con *P. fulva* para su aplicación en los programas de mejoramiento genético del cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal:** Las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) del cultivar susceptible Moneymaker (Cf0) y las líneas isogénicas (Cf-Ecp1, Cf-Ecp2, Cf-Ecp4 y Cf-Ecp5) cercanas del propio cultivar, que portan genes individuales de resistencia al moho de las hojas, se sembraron en bandejas metálicas (59 x 35 x 14 cm) sobre un sustrato compuesto por compost (100%) húmedo durante dos semanas. Pasado este tiempo, las posturas se trasplantaron a macetas plásticas de 1 kg de capacidad con un sustrato compuesto por suelo Ferralítico rojo + compost (1:1, v/v) durante cuatro semanas. Las plantas fueron mantenidas en casas de cristal con temperatura diurna media de 27,2°C y la humedad relativa diurna media de 61,9%, con un fotoperíodo natural.

**Preparación de la suspensión conidial:** Se empleó un aislamiento monoconidial virulento de *P. fulva* (Quivicán), determinado como raza 2.4, perteneciente al cepario del Laboratorio de Fitopatología, del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). El inóculo se obtuvo en tubos de ensayo (150 x 22 mm) con 15 mL de medio de cultivo PDA inclinados, que se inocularon con 200 µL de una suspensión de 10<sup>4</sup> conidios.mL<sup>-1</sup> del hongo fitopatógeno y se incubaron a 25±1°C durante 14 días. Transcurrido ese tiempo a

cada tubo de ensayo se le adicionaron 5 mL de agua desionizada estéril más Tween 80 al 0,05%. Estos se removieron en agitador Vortex (Vortex Genie-1) para obtener la suspensión de conidios. La suspensión conidial se filtró a través de gasa. Finalmente, se determinó la concentración de conidios en cámara de Thomas por observación al microscopio óptico Zeiss (400x).

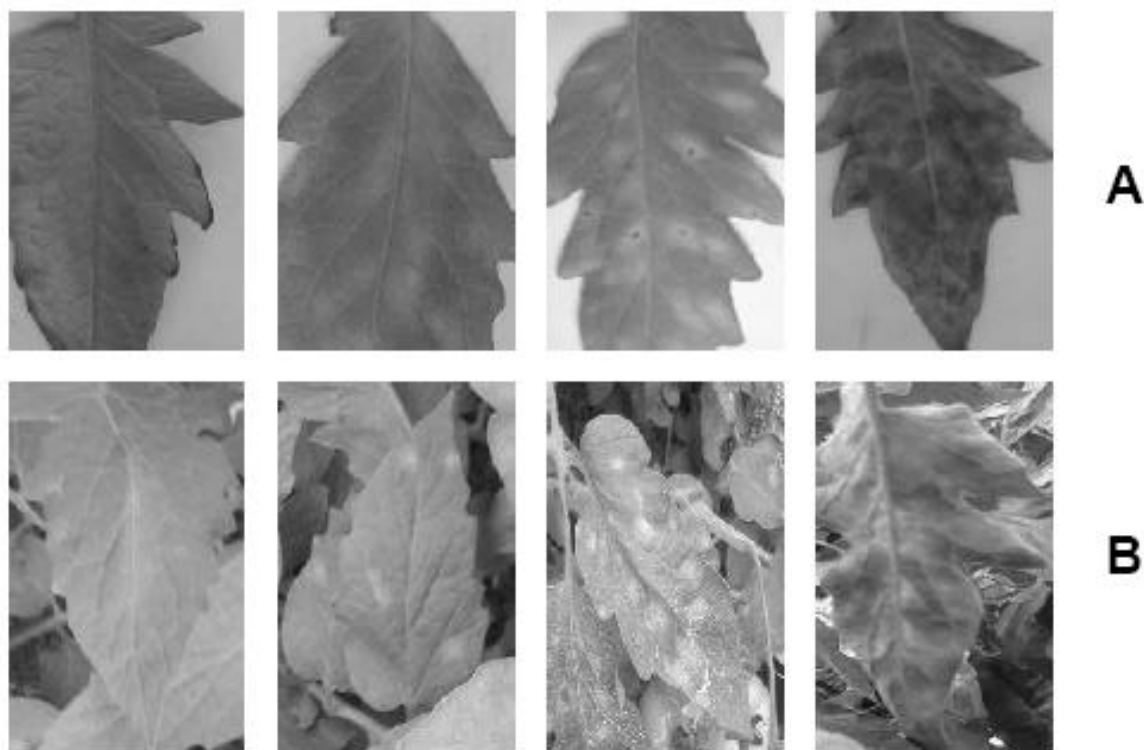
**Inoculación:** Las hojas inferiores de los genotipos de tomate antes mencionados, con cinco semanas de edad, se inocularon por el envés con una suspensión de 1x10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, mediante aspersión uniforme de 10 mL por planta con un atomizador manual. Las plantas inoculadas se cubrieron individualmente con un nylon de polietileno transparente por 48 horas para asegurar las condiciones de alta humedad (cercanas al 100%) que favoreciera la germinación y penetración de las hifas infectivas. El material vegetal se mantuvo en casa de cristal en condiciones semicontroladas (temperatura media de 26,2°C y humedad relativa media de 85,4%), garantizada con riegos a la instalación varias veces al día. Se utilizaron 10 plantas por genotipos, y se dejó igual cantidad de plantas sin inocular, como controles. El experimento se evaluó diariamente durante 21 días y se repitió tres veces. Se describieron los síntomas ocasionados por *P. fulva* y se compararon con los referidos por Thomma (3). Se confeccionó una escala para la evaluación cualitativa del material vegetal inoculado, basada en la descripción de los estados de desarrollo de los síntomas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presencia de síntomas de la enfermedad moho de las hojas en el cultivar Moneymaker y línea isogénica Cf-Ecp1 fueron similares a los observados en condiciones naturales (5,6). Estos comenzaron como pequeñas lesiones cloróticas por el haz que evolucionaron hasta llegar a manchas definidas y esporulación por el envés a los 21 días de inoculación (Fig. 1).

Los resultados encontrados en el cultivar Moneymaker, se corresponde con la respuesta esperada de susceptibilidad que ha sido descrita por varios autores (7,8,9) a diferencia de la línea (Cf-Ecp1) que manifestó una respuesta resistente al hongo patógeno.

En la literatura científica se notifica que las líneas que portan los genes de resistencia Cf-Ecp, manifiestan una resistencia más perdurable a *P. fulva* (10). Sin embargo, la raza 2.4 de *P. fulva* utilizada en el presente trabajo, fue capaz de vencer la resistencia



**FIGURA 1.** Síntomas producidos en plantas de tomate del cultivar MoneyMaker con una suspensión conidial de *P. fulva*. (A) Casa de cristal, (B) Casas de cultivo protegido./ *Symptoms produced on MoneyMaker tomato cultivar by conidial suspensions of P. fulva. (A) Greenhouse, (B) Under protected cultivation conditions.*

**TABLA 1.** Escala para la evaluación cualitativa del desarrollo de los síntomas en hojas de *Solanum* spp. inoculadas con *P. fulva* en invernadero./ *Qualitative evaluation scale of the symptoms development on Solanum spp. leaves inoculated with P. fulva in greenhouse*

Tipo de reacción	Estado	Categoría	Síntoma
Incompatible	1	Reacción inmune	
	2	Reacción hipersensible resistente sin esporulación por el envés	
Compatible	3	Reacción susceptible (esporulación por el envés)	

del hospedante. Este fenómeno pudiera estar relacionado con el surgimiento de combinaciones de razas específicas del hongo desde algunos linajes clonales por la acumulación consecutiva de mutaciones en los diferentes genes *Avr* (11,12); aspecto que pudiera encontrarse presente en esta raza detectada en Cuba.

En el resto de las líneas isogénicas (Cf-Ecp 2, Cf-Ecp4 y Cf-Ecp5) los síntomas estuvieron caracterizados por una respuesta hipersensible (resistente). Un resultado similar a este encontró Kruijt (13) al inocular cepas virulentas del hongo fitopatógeno sobre estas líneas. A partir de la evolución de los síntomas ocasionados por *P. fulva* se elaboró una escala cualitativa para facilitar la evaluación de genotipos de *Solanum* spp. (Tabla 1).

La inoculación artificial con suspensiones conidiales de *P. fulva* es un método fácil, rápido y reproducible para determinar la expresión de la resistencia de genotipos de tomate a este agente patógeno. Su uso en los programas de mejoramiento genético pudiera reducir tiempo y trabajo. La escala de evaluación utilizada es fácil de aplicar y puede ser empleada por diferentes evaluadores, ya que predomina el estado 3 (compatible) en el cual los síntomas se distribuyen uniformemente. El método pudiera también ser aplicado en otros estudios de interacción planta-patógeno.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la cooperación de la Dra. Monica Höfte de la Universidad de Gent y el Dr. Bart Thomma de la Universidad de Wageningen por suministrarnos las semillas de los genotipos de tomate probados en este trabajo.

### REFERENCIAS

1. Crous PW, Braun U. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. CBS Biodiversity Series 2003;1:453
2. Jarvis WR. Control de enfermedades en cultivos de invernaderos. Madrid: Ed. Mundi Prensas; 1998.
3. Thomma BPHJ, van Esse HP, Crous PW, Wit PJGM. *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. Mol Plant Pathol. 2005;43:452-485.
4. Bernal B, Rivero L, Fernández E, Pérez W. Manejo de plagas en híbridos de tomate bajo condiciones de cultivo protegido. Fitosanidad. 2001;5(1):57-61.
5. Blancard D. Enfermedades del tomate. Madrid: Editorial Mundi Prensas; 1992.
6. Jones JB, Jones JP, Stall RE, Zitter TA. Compendium of tomato diseases. APS Press, USA; 1997.
7. Wit PJGM. Light and scanning-electron microscopic study of infection of tomato plants by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. Neth J Plant Pathol. 1977;83:109-122.
8. Lindhout P, Korta W, Cislík M, Vos I, Gerlagh T. Further identification of races of *Cladosporium fulvum* (*Fulvia fulva*) on tomato originating from the Netherlands, France and Poland. Neth J Plant Pathol. 1989;95:143-148.
9. Satou M, Shinozaki T, Nishi MK. Leaf mold of tomato by races 4 and 4.11 of *Passalora fulva* in Japan. J Gen Plant Pathol. 2005;71:436-437.
10. Kruijt M. Molecular evolution of *Cladosporium fulvum* disease resistance genes in wild tomato. Thesis. Wageningen University, The Netherlands; 2004.
11. Joosten MHAJ, Wit PJGM. The tomato-*Cladosporium fulvum* interaction: A versatile experimental system to study plant-pathogen interactions. Ann Rev Phytopathol. 1999;37:335-367.
12. Westerink N, Brandwagt BF, Wit PJGM, Joosten MHAJ. *Cladosporium fulvum* circumvents the second functional resistance gene homologue at the *Cf-4* locus (*Hcr9-4E*) by secretion of a stable *Avr4E* isoform. Molecular Microbiology, 2004;54:533-545.
13. Kruijt M, de Kock MJDG, Wit PJGM. Receptor-like proteins involved in plant disease resistance. Mol Plant Pathol. 2005;6(1):85-97.

(Recibido 24-10-2008; Aceptado 27-4-2009)