



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DE COMPONENTES DE RESISTENCIA GENÉTICA DE PAPA
(*Solanum tuberosum*) AL TIZÓN TARDÍO (*Phytophthora infestans*) EN
CONDICIONES CONTROLADAS

Autora

Andrea Sevilla Rivadeneira

Año
2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DE COMPONENTES DE RESISTENCIA GENÉTICA DE PAPA
(*Solanum tuberosum*) AL TIZÓN TARDÍO (*Phytophthora infestans*) EN
CONDICIONES CONTROLADAS

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera Agroindustrial y de Alimentos

Profesor Guía

Ph.D. Wilson Arturo Vásquez Castillo

Autora

Andrea Sevilla Rivadeneira

Año

2018

DECLARACIÓN DEL DOCENTE GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, EVALUACIÓN DE COMPONENTES DE RESISTENCIA GENÉTICA DE PAPA (*Solanum tuberosum*) AL TIZÓN TARDÍO (*Phytophthora infestans*) EN CONDICIONES CONTROLADAS a través de reuniones periódicas con la estudiante Andrea Sevilla Rivadeneira, en el semestre 2018-2, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Wilson Arturo Vásquez Castillo

Doctor en Fisiología de Plantas

CI:1001186210

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, EVALUACIÓN DE COMPONENTES DE RESISTENCIA GENÉTICA DE PAPA (*Solanum tuberosum*) AL TIZÓN TARDÍO (*Phytophthora infestans*) EN CONDICIONES CONTROLADAS, de la estudiante Andrea Sevilla Rivadeneira, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Pablo Santiago Moncayo Moncayo

Máster en Dirección de Operaciones y Seguridad Industrial

CI: 171236750-5

DECLARACIÓN DEL ASESOR CIENTÍFICO

"Declaro haber dirigido el trabajo, EVALUACIÓN DE COMPONENTES DE RESISTENCIA GENÉTICA DE PAPA (*Solanum tuberosum*) AL TIZÓN TARDÍO (*Phytophthora infestans*) EN CONDICIONES CONTROLADAS a través de reuniones periódicas con la estudiante Andrea Sevilla Rivadeneira, en el semestre 2018-2, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Jorge Esteban Rivadeneira Ruales

Maestro en Ciencias en Recursos Genéticos y Productividad -Genética

CI: 1704746468

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se ha citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Andrea Sevilla Rivadeneira

CI: 1718651951

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Gonzalo y Patricia y a mi hermana Belén, por todo el tiempo, compañía, ánimo y amor que me brindan siempre.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, por todos los conocimientos y facilidades que me proporcionaron para poder cumplir con este trabajo de titulación. Especialmente al Ing. Jorge Rivadeneira y a la Ing. Cristina Tello, por todo su apoyo, paciencia y guía.

Al Dr. Wilson Vásquez por haberme acompañado en esta etapa y compartido sus conocimientos conmigo.

DEDICATORIA

Gonzalo, Patricia y Belén, ustedes son mi pilar y guía, mi fuente de motivación para superarme cada día. Sus palabras, acciones y compañía hacen que me sienta fuerte.

A mi abuelo César, por ser mi motivador personal y mi consejero y a toda mi familia, por sentir conmigo cada alegría y tristeza.

Le dedico este trabajo también a mis amigas. Gracias por hacer que estos cinco años fueran memorables. Son las mejores cómplices en el estudio, el trabajo y la vida.

Gracias Dios por cada experiencia y persona que has puesto en mi vida. Este trabajo no hubiese sido posible sin ti.

A ti, gracias por todo Ro.

RESUMEN

El tizón tardío, cuyo agente causal es el oomicete *Phytophthora infestans*, es la enfermedad de mayor importancia económica para el cultivo de papa a nivel nacional y mundial. Actualmente, el control de esta enfermedad se basa en la aplicación de agroquímicos, lo que representa un problema económico, social y medioambiental. Una de las alternativas para el control de esta enfermedad es el mejoramiento genético enfocado a la obtención de variedades con mayor resistencia a la enfermedad. El objetivo con el que fue realizado este estudio fue evaluar el nivel de resistencia de cinco variedades comerciales de papa y veintitrés clones seleccionados del Programa Nacional de Raíces y Tubérculos - Rubro papa del INIAP en condiciones de laboratorio, y seleccionar a aquellos que sean más resistentes. Para esto se inocularon folíolos de los 28 genotipos de papa con un aislamiento de una raza compleja de *P. infestans* tomado de campo. Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) con 6 observaciones y un análisis funcional con Tukey (Prueba de separación de medias) al 5%. Las variables que se evaluaron fueron el período de incubación (PI), tamaño de lesión al día 8 (TL), rango de crecimiento de la lesión (RCL), período de latencia (PL) e intensidad de esporulación (IE). Los materiales con un mayor PI, menor TL, menor RCL y mayor PL fueron 12-4-173, 12-2-6 y 12-4-72, por lo que se consideraron como los más resistentes. Por otro lado, el material que presentó el PI más corto, el mayor TL (después del testigo susceptible), el menor PL y la IE más alta fue el clon 12-6-29, considerándose como el más susceptible. Otros genotipos (14-9-56, 11-9-112, 11-9-133 y 11-9-106) son considerados de resistencia indefinida al no haber presentado síntomas de la enfermedad en el tiempo de evaluación. INIAP- Libertad, INIAP-Josefina, INIAP- Raymipapa, 11-9-108, 12-4-145 presentaron una reacción de hipersensitividad al inóculo de *P. infestans*.

Palabras claves: Resistencia, *Phytophthora infestans*, latencia, incubación, esporulación, tamaño de lesión, crecimiento de lesión.

ABSTRACT

Late blight, a potato disease caused by the oomycete *Phytophthora infestans*, is the most economically important disease for this cultivation nationally and worldwide. At present, the control of this disease is based on the use of agrochemicals, which represents an economic, social and environmental problem. One of the alternatives for the control of this disease is genetic improvement focused on obtaining varieties that are more resistant to the disease. The objective with which this study was carried out was evaluating the resistance level of five commercial varieties of potato and twenty-three selected clones of the Programa Nacional de Raíces y Tubérculos - Rubro papa del INIAP under laboratory conditions, and to select those that are more resistant. For this, leaflets of the 28 potato genotypes were inoculated with an isolation of a complex breed of *P. infestans* taken from the field. A randomized design (DCA) with 6 observations and a functional analysis with the Tukey media separation test (5%) were used. The variables evaluated were the incubation period (PI), lesion size at day 8 (TL), lesion growth range (RCL), latency period (PL) and intensity of sporulation (IE). Materials with higher PI, lower TL and RCL and higher PL were 12-4-173, 12-2-6 and 12-4-72, so they were considered as resistant. On the other hand, the material that had the shortest PI, the highest TL (after the susceptible control), the lowest PL and the highest IE, was clone 12-6-29, considered the most susceptible. Other genotypes (14-9-56, 11-9-112, 11-9-133 and 11-9-106) are considered of indeterminate resistance because they did not present symptoms of the disease at the time of evaluation. INIAP-Libertad, INIAP-Josefina, INIAP-Raymipapa, 11-9-108, 12-4-145 presented a hypersensitivity reaction to the inoculum of *P. infestans*.

Key words: Resistance, *Phytophthora infestans*, latency, incubation, sporulation, lesion size, lesion growth.

ÍNDICE

1.	Introducción	1
1.1.	Antecedentes	1
1.2.	Justificación	3
1.3.	Objetivos	4
1.3.1.	Objetivo general.....	4
1.3.2.	Objetivos específicos.....	4
1.4.	Hipótesis.....	4
2.	Revisión de Literatura	4
2.1.	El cultivo de papa.....	4
2.1.1.	Importancia del cultivo en Ecuador.....	5
2.1.2.	Descripción botánica	6
2.1.3.	Factores abióticos que inciden en el crecimiento y desarrollo del cultivo.....	6
2.1.4.	Factores bióticos que afectan al cultivo de papa	8
2.2.	El tizón tardío (<i>Phytophthora infestans</i>).....	9
2.2.1.	Importancia económica de la enfermedad.....	11
2.2.2.	Descripción del patógeno	11
2.2.3.	Ciclo sexual de <i>P. infestans</i>	12
2.2.4.	Ciclo asexual de <i>P. infestans</i>	13
2.2.5.	Variación genética de <i>P. infestans</i>	14
2.2.6.	Síntomas de la enfermedad en papa.....	15
2.2.7.	Manejo Integrado del Tizón tardío en papa: componentes.....	16
2.2.8.	Estrategias de Defensa Natural al patógeno	17
2.2.9.	Tipos de resistencia hospedante	17
2.3.	Mejoramiento genético de papa para la resistencia a <i>P. infestans</i>	21

3.	Materiales y Métodos	24
3.1.	Materiales.....	24
3.1.1.	Material Biológico	24
3.1.2.	Material de Invernadero	24
3.1.3.	Material de Laboratorio	24
3.1.4.	Material de Oficina.....	2
3.2.	Métodos.....	2
3.2.1.	Ubicación del Experimento	2
3.2.2.	Análisis Estadístico.....	25
3.2.3.	Variables.....	26
3.3.	Manejo del Experimento.....	29
3.3.1.	En invernadero.	29
3.3.2.	En laboratorio	30
4.	Resultados.....	33
5.	Discusión.....	46
6.	Conclusiones y Recomendaciones	51
6.1.	Conclusiones.....	51
6.2.	Recomendaciones	52
	Referencias.....	53
	Anexos.....	60

1. Introducción

1.1. Antecedentes

La papa (*Solanum tuberosum*) tiene origen Sudamericano, se considera que fue domesticada por las poblaciones del altiplano andino (Perú, Bolivia y Ecuador) (Ministerio de Agroindustria, 2017). Las papas que fueron cultivadas por primera vez y todo el gran número de variantes posteriores, son el resultado de procesos de selección de los primeros cultivadores y procesos espontáneos en la naturaleza. A nivel global, tanto el estudio del origen, como la evolución y clasificación de la papa, son temas de mucha relevancia (Rodríguez, 2010).

La papa ocupa el tercer lugar entre los cultivos de mayor importancia para el consumo humano, luego del arroz y el trigo, con una producción mayor a 374 millones de toneladas métricas por año (Plinch, Tatarowska, Milczarek, Zimnoch y Flis, 2016). China, India, Rusia, Ucrania y Estados Unidos son los mayores productores de papa internacionalmente y a nivel continental, Asia y Europa tienen la mayor producción, con 50.6% y 31.2% del total global respectivamente (FAO, 2016).

El cultivo de papa tiene gran importancia en Ecuador, tanto a nivel de consumo humano como de representatividad económica. En el año 2017, la producción total fue de 377,243 Tm. (INEC, 2017). La papa es una base de alimentación de gran parte de los habitantes especialmente de la sierra, siendo una fuente importante de carbohidratos, llegando a representar el 7% dentro de la canasta familiar (Monteros, 2016). Según la FAO (2016), el número de hectáreas destinadas a la producción de papa fue de 29 635 ha en Ecuador. Carchi, Pichincha, Chimborazo, Tungurahua y Cotopaxi son las zonas productoras principales.

Las enfermedades y plagas son el principal problema de este cultivo. El control de éstas se dificulta por la falta de acceso a protección química y semilla certificada, llegando a causar pérdidas económicas significativas, considerando que alrededor del 15% de los costos de producción del cultivo corresponde al control fitosanitario (Monteros, 2016). En países en vías de

desarrollo , se estima que causan un 20% de pérdidas en poscosecha y un 30% cuando aún está en campo (Gabriel, Veramendi, Pinto, Pariente y Angulo, 2016).

La lancha de la papa o tizón tardío, cuyo agente causal es *Phytophthora infestans*, tiene la mayor importancia económica para el cultivo de papa a nivel mundial dentro de las enfermedades (Baldelomar, Gabriel, Veramendi, Terán y Plata, 2015). Ésta es la enfermedad que más afecta a los productores en Ecuador, reportándose su presencia en la totalidad de los cultivos de Bolívar, Azuay y Cañar (Monteros, 2016).

La gran capacidad de adaptación del oomicete *P. infestans* se basa en sus características genéticas y su capacidad reproductiva. Posee efectores de los genes de resistencia que evolucionan rápidamente. Además, ostenta una densidad de esporulación alta de 100 a 500 esporangios en cada milímetro cuadrado de hoja infectada de papa (Haverkort et al., 2016).

El tizón tardío puede llevar a pérdidas totales del cultivo, y el control de la enfermedad está basado tradicionalmente en agroquímicos. La aplicación de fungicidas influye directamente en costos de producción y trae consecuencias ambientales (Escallón, Ramírez y Núñez, 2005). La suma de los costos de protección química del cultivo y del valor monetario de la producción mundial que se pierde (10-15%), llega a los 6 mil millones de dólares anuales a nivel mundial. (Román et al., 2015).

El uso de variedades resistentes es una de las estrategias alternativas para controlar la enfermedad. La resistencia puede ser hipersensitividad o de tipo parcial (Escallón et al., 2005). La hipersensitividad se basa en la localización rápida del patógeno y la posterior muerte celular, para contener la propagación en el tejido. La resistencia parcial se considera más duradera y se basa en la conjugación de genes mayores y menores. Aunque la resistencia parcial no provee una protección completa conduce a la significativa del daño (severidad) y detiene el ritmo al que avanza la enfermedad (Plinch et al., 2016).

Se considera que existen componentes de resistencia el rango o tasa de crecimiento, el tamaño de la lesión y la intensidad de esporulación que permiten obtener información valiosa sobre la resistencia genética de un material. Éstos componentes se evalúan en distintos tipos de estudio para la identificación de genotipos resistentes (Gabriel, Fernández, Plata y Siles, 2011).

1.2. Justificación

El cultivo de papa es importante por razones sociales, económicas, culturales y alimenticias en Ecuador. La enfermedad tizón tardío (*P. infestans*) es la que afecta con mayor impacto al cultivo de papa, ocasionando pérdidas económicas altamente representativas a nivel nacional y mundial. (Gabriel et al., 2016).

Este proyecto se inserta en el programa de mejoramiento genético de papa del INIAP, mismo que ha identificado la necesidad de los productores de tener acceso a variedades que aporten con un mayor beneficio económico, mayor rendimiento y menor costo de producción, pero que al mismo tiempo tengan resistencia a enfermedades, para así poder reducir el uso de fungicidas.

Los clones evaluados son parte de la colección de materiales del INIAP que han sido seleccionados desde el 2007, con el objetivo de recopilar información sobre la resistencia al tizón tardío que presentan en laboratorio. Se busca encontrar materiales con resistencia genética porque permitiría reducir la dependencia al control químico, que representa un importe relevante dentro del costo de producción, beneficiando así a pequeños y medianos productores del país, es decir, a más del 88% de los cultivadores de papa en Ecuador.

Los resultados obtenidos aportarán información para futuros ensayos de validación del programa.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar los componentes de resistencia genética en variedades y clones de papa (*S. tuberosum* L.) al tizón tardío (*Phytophthora infestans*).

1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar el grado de resistencia genética de 28 genotipos de papa en condiciones de laboratorio.
- Seleccionar los clones de papa que presenten mayor resistencia al tizón tardío.

1.4. Hipótesis

Ha: Los materiales de papa presentan diferentes niveles de resistencia al tizón tardío.

2. Revisión de Literatura

2.1. El cultivo de papa

La papa (*Solanum tuberosum*) es originaria de la zona de los Andes comprendida entre Perú, Bolivia y Ecuador. Ha sido cultivada por los habitantes andinos desde hace más de 7000 años (Román et al., 2015). Esta solanácea posee más especies silvestres relacionadas que cualquier otra, lo que resulta en una gran variabilidad genética, que engloba a más de 2.000 especies del género *Solanum* y ocho especies cultivadas. Estas especies afines se distribuyen a lo largo del continente, desde el suroeste de América del Norte, hasta América del Sur. El origen de esta gran diversidad se debe, entre otros a la evolución fitogenética, la migración, la mutación, hibridación, poliploidización e introgresión por cruzamientos (Alor, 2015).

La papa ocupa el tercer lugar entre los cultivos de mayor importancia para el consumo humano, luego del arroz y el trigo. La producción supera las 374 millones de toneladas métricas por año (Plinch, Tatarowska, Milczarek, Zimnoch y Flis, 2016). El rendimiento es muy variable por los factores bióticos y abióticos del cultivo, se calcula en promedio de 20 t/ha a nivel mundial. El mayor productor es China, seguido de Rusia, India, Ucrania y Estados Unidos (Ministerio de Agroindustria, 2017).

2.1.1. Importancia del cultivo en Ecuador

La papa como cultivo, tiene importancia social y económica en Ecuador. Es el séptimo cultivo de mayor producción a nivel nacional con 377,243 toneladas métricas (INEC, 2017). De acuerdo al informe de rendimiento de papa en el Ecuador en el 2016, el rendimiento promedio fue de 16.49 t/ha, con un uso mayoritario de la variedad súper chola (Monteros, 2016).

La superficie sembrada es de 32,188 ha, que se encuentran distribuidas en nueve provincias de la sierra y una provincia del Oriente ecuatoriano. Las principales provincias productoras son Pichincha, Carchi, Tungurahua y Chimborazo (INEC, 2017).

En la región andina (Bolivia, Perú y Ecuador) más del 90% de la papa que se produce se consume en fresco. El consumo per cápita en fresco entre 2002-2006 fue de 31.8 kg/año en Ecuador, 43.3 kg/año en Bolivia y 68.4 kg/año en Perú. En estos países, menos del 10% de la producción de papa se procesa en forma de papas fritas, hojuelas, en puré, entre otros. Desde la década de los noventa, se observa un consumo creciente de papa frita por la multiplicación de negocios de comida rápida. Las papas nativas han empezado a posicionarse en ciertos nichos de mercado, en forma de snacks o como ingrediente de preparaciones culinarias especiales en el auge de la gastronomía andina (Devaux, Ordinola, Hibon, & Flores, 2010).

2.1.2. Descripción botánica

Las papas son miembros de la familia de las solanáceas, siendo las especies cultivadas *Solanum tuberosum* y *Solanum andigenum*, tetraploides ($2n=48$).

Es una planta dicotiledónea herbácea de tallo erecto o semierecto, cuyo tamaño va desde los 0.60 m hasta 1.50 m de alto (Pumisacho y Sherwood, 2002). Sus hojas son compuestas, con 7 a 9 folíolos. La flor es pentámera tetracíclica, regularmente ubicada en la parte terminal con cinco estambres (parte masculina) de color amarillo o anaranjado y un solo pistilo (parte femenina). El color puede variar de blanco, rosa, lila, morado o en mezcla de dos colores, dependiendo del cultivar. Las flores generalmente se autopolinizan, dando origen a una baya de 2.5 cm de diámetro, verde, de forma esférica que contiene las semillas sexuales (200 por baya aproximadamente) (Román y Hurtado, 2002).

Los tubérculos son tallos modificados que constituyen los órganos de almacenamiento principales. Éstos se forman a partir de los estolones y se desarrollan cuando la planta inicia la floración, generalmente entre 35 a 45 días después de la siembra. La madurez fisiológica de los tubérculos se alcanza a los 120 días en variedades tardías, 90 en variedades intermedias y 75 en variedades precoces.

2.1.3. Factores abióticos que inciden en el crecimiento y desarrollo del cultivo

Existen diversos factores físicos que intervienen en el crecimiento y desarrollo de los cultivos. Entre éstos, podemos encontrar a los factores climáticos, como la luz, temperatura, humedad relativa, vientos, heladas, precipitaciones. La temperatura es la variable meteorológica que más interviene en el desarrollo de

la planta, ya que influye en las funciones fisiológicas como la fotosíntesis, transpiración, respiración, etc. (Bravo, 2011).

A lo largo del crecimiento y desarrollo del cultivo las plantas pueden sufrir estrés por condiciones abióticas desfavorables, como la sequía, inundaciones, salinidad del suelo, heladas, temperaturas muy altas o muy bajas, toxicidad por metales pesados, pH, radiación ultravioleta, entre otras (Tapan, Tufail, Abeer y Elsayed, 2017).

Para cada factor abiótico existe un nivel máximo y mínimo de tolerancia de la especie, fuera de los cuales, ésta no puede sobrevivir. Entre ambos límites existe también un punto óptimo en el cual la especie crece y se desarrolla mejor (Gliessman, 2002).

El cultivo de papa es sensible ante factores abióticos extremos (humedad, temperatura), así como a desbalances nutricionales, que dificultan el normal desarrollo de la planta y restringen su producción (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Condiciones climáticas

La papa para su crecimiento, desarrollo y tuberización requiere temperaturas entre 15 y 20 °C, sin embargo, es considerada como una planta termoperiódica, ya que necesita una variación entre la temperatura del día y de la noche de mínimo 10 °C para favorecer la tuberización. Temperaturas mayores pueden atrasar fuertemente la tuberización y llenado (Román y Hurtado, 2002).

La altura para el desarrollo ideal del cultivo de papa se considera entre los 1.500 a 2.500 msnm (Román y Hurtado, 2002). La altura máxima del cultivo está determinada por la temperatura nocturna mínima y la frecuencia con el que ocurren heladas.

En la sierra ecuatoriana la papa se cultiva tradicionalmente entre los 2.000 y los 3.600 msnm, con un rango de temperatura entre 6 y 18°C, pero en la zona papera del norte del país, la producción se centra principalmente en un rango de 2.800 hasta 3.200 msnm (Pumisacho y Sherwood, 2002).

La cantidad óptima de agua requerida por el cultivo es de 600 mm, distribuida a lo largo de todo el ciclo vegetativo (6 a 9 meses), con una mayor demanda en los periodos de germinación y crecimiento de los tubérculos. La insuficiencia hídrica se presenta como amarillamiento y marchitamiento del follaje, retraso en el crecimiento y maduración precoz (Román y Hurtado, 2002).

Condiciones de suelos

El suelo es el medio físico del que la planta toma agua y los elementos minerales necesarios. Las características de textura y estructura están relacionadas con la capacidad del suelo para almacenar agua y ponerla a disposición de la planta, los flujos de agua, la aireación y la composición edáfica. Otras características del suelo como la fertilidad, el pH y la salinidad, condicionan el crecimiento de la planta al favorecer o limitar la absorción de los elementos minerales (Bravo, 2011).

El cultivo de papa requiere de suelos francos, con buen drenaje, textura liviana y una profundidad mayor a los 50 cm, para permitir el crecimiento libre de los tubérculos.

En Ecuador, los suelos desinados al cultivo de papa tienen en su mayoría un origen volcánico (80% de los suelos), son negros, muy capaces de fijar fósforo y con contenido alto de materia orgánica, generalmente francos, franco-arenosos, franco-arcillosos o franco-limosos. Además, poseen un buen drenaje por su textura y topografía (Pumisacho y Sherwood, 2002).

2.1.4. Factores bióticos que afectan al cultivo de papa

Los factores bióticos deben ser entendidos como organismos que interactúan positiva, neutra o negativamente, e impactan con el cultivo y su ambiente, al remover sustancias, alterarlas o añadirlas (Gliessman, 2002).

La papa es afectada por enfermedades causadas por nemátodos, bacterias, virus y hongos. Entre las enfermedades causadas por bacterias, el pie negro

(*Erwinia spp.*) es la única de amplia distribución en las zonas paperas, afectando a los tubérculos durante el almacenamiento. En cuanto a los virus, se conocen 24 y un viroide que afectan a la papa, pero no todos se encuentran en Ecuador. Entre los síntomas de las enfermedades virales se presentan mosaicos, clorosis, arrugamientos, enanismo y necrosis en el follaje (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Existen enfermedades de papa que son causadas por hongos presentes en el suelo y que ocasionan síntomas como necrosis en la raíz, marchitez en el follaje, deformaciones en el tubérculo y acame por lesiones en el tallo. En Ecuador la de mayor importancia es la costra negra (*Rhizoctonia solani*) que afecta a los tubérculos, la roña (*Spongospora subterranea*) que se desarrolla en zonas altas y afecta a los tubérculos, el pie negro (*Pectobacterium spp.*) y la sarna común (*Streptomyces scabies*) (Mora, Llerena y Reinoso, 2010).

Entre las enfermedades foliares causadas por hongos tenemos al tizón tardío, (*Phytophthora infestans*), tizón temprano (*Alternaria solani*), oidium o mildiu polvoroso (*Erysiphe chichoracearum*), roya (*Puccinia pittieriana*), septoriosis (*Septoria lycopersici*) y moho gris (*Botrytis cinerae*) como lo indican Pumisacho y Sherwood (2002).

2.2. El tizón tardío (*Phytophthora infestans*)

Phytophthora infestans pertenece al orden de los oomycetes, parte de los eucariotas caracterizados por no ser fotosintéticos, están íntimamente relacionados con las diatomeas y las algas pardas. Las paredes celulares de los oomycetes contienen celulosa y B-glucanos, y carecen de capacidad de sintetizar esteroides; estas características hacen suponer que han evolucionado a partir de hongos superiores como ascomicetos y basidiomicetos (Pérez y Forbes, 2008)

El oomycete *P. infestans* es un patógeno vegetal filamentoso causante del tizón tardío a nivel mundial en los cultivos de papa y tomate principalmente,

pudiendo afectar también a otras solanáceas. Observaciones de su patogenicidad en estos cultivos fueron reportados por primera vez a mediados del siglo XX, en los cultivos de mejoramiento enfocados a encontrar resistencia genética (Michalska, Sobkowiak, Flis y Zimnoch-Guzowska, 2016). Su descubrimiento en el siglo XIX contribuyó a establecer la patología vegetal como una disciplina de estudio (Whisson, Boevink, Wang y Birch, 2016). El nombre de *P. infestans* proviene de las palabras griegas Phyto=planta y phthora= destructor.

Existen más de 120 especies conocidas de *Phytophthora* a nivel mundial y todas son patogénicas de las plantas. Ellas colonizan diferentes hospederos como raíces, tubérculos, follaje, frutos, tallos herbáceos y leñosos. Durante el ciclo de infección este patógeno desarrolla etapas celulares distintas. Los esporangios multi-nucleados y las zoosporas móviles uninucleadas actúan en las etapas de dispersión primarias (Whisson et al, 2016).

Su genoma fue secuenciado en 2009 en el Laboratorio Sainsbury de Norwich, revelando que es extraordinariamente largo, más del doble que el de especies oomicetes cercanas. Su gran tamaño es el resultado de la formidable cantidad de secuencias que se repiten una y otra vez que contiene. Los autores del estudio relacionan la estructura del genoma con la capacidad de evolucionar más rápido, haciendo que el patógeno se pueda adaptar a las variedades que son resistentes a la enfermedad (Alor, 2015).

La mayor parte de las especies de oomicetes tiene la capacidad de reproducirse sexual o asexualmente. La reproducción asexual es la principal forma de propagación y ha conducido al desarrollo de algunos linajes clonales dominantes. La población de *P. infestans* está cambiando constantemente, con la emergencia de nuevas y más agresivas variantes, perpetuando el estatus de esta enfermedad como una amenaza a la seguridad alimentaria mundial (Whisson et al., 2016). La diversificación de la población e incidencia de la enfermedad han ido en aumento debido a la pérdida de sensibilidad de las razas de *P. infestans* a los fungicidas sistémicos y por el transporte

intercontinental del agente causal, a través de tubérculos infectados y plántulas de tomate (Hwang et al., 2014).

2.2.1. Importancia económica de la enfermedad.

En las regiones donde la papa es cultivada, *P. infestans* es el patógeno causante de grandes pérdidas económicas, llegando a 3.5 billones de dólares anuales en países en vías de desarrollo. En países desarrollados se han empleado fungicidas y semilla certificada como estrategia de control, sin embargo, los costos de producción por el uso de productos de síntesis y la emergencia de nuevos aislamientos con resistencia a éstos, demuestran que esta estrategia por sí sola no es sostenible (Kim et al., 2012). Si se suman los costos por las pérdidas del cultivo y los costos de la protección química, la suma asciende a más de 5 billones de dólares anuales (Plinch et al., 2016).

2.2.2. Descripción del patógeno

El micelio que forma *P. infestans* es cenocítico, lo que significa que no presenta septas que separen al micelio. Los esporangios son limoniformes, ovoides y ahusados en la base. Su tamaño varía de 36 x 22 μm a 29 x 19 μm (Pérez y Forbes, 2008).

Una lesión típica de tizón tardío tiene normalmente un centro necrótico con alta esporulación rodeado por una zona de apariencia aguachenta. Fuera de estas lesiones, el patógeno continúa con su crecimiento invadiendo células sanas y expandiendo la zona lesionada (Schoina y Govers, 2015).

Se considera a *Phytophthora* como un patógeno aéreo ya que se reproduce sobre la parte aérea del hospedante principalmente, y sus esporangios son dehiscentes, al madurar caen con facilidad y pueden viajar varios kilómetros por el aire (Alor, 2015).

2.2.3. Ciclo sexual de *P. infestans*

P. infestans tiene dos tipos de apareamiento A1 y A2, por lo que se lo denomina heterotálico. La diferencia entre los dos tipos no se basa en un dimorfismo sexual, ya que ambos poseen órganos reproductores femeninos y masculinos en el mismo individuo, sino en la autoincompatibilidad y la necesidad de la presencia del grupo opuesto para generar una respuesta hormonal y formar oosporas (Alor, 2015).

Para que la reproducción sexual ocurra es imprescindible que ambos tipos de apareamiento coexistan espacio-temporalmente. Aunque los aislamientos de cada tipo son bisexuales, se han reportado diferentes grados de femineidad y masculinidad, existiendo aislamientos fuertemente masculinos que forman más anteridios, y fuertemente femeninos, que forman más oogonios que anteridios. Otros aislamientos muestran tendencias equilibradas (Pérez y Forbes, 2008).

La unión de los gametos sucede al atravesar el oogonio al anteridio, dando paso a una plasmogamia o cariogamia, seguida de la fertilización y el desarrollo de una oospora con paredes celulares gruesas (Silva et al., 2009). Estas oosporas son estructuras de resistencia que pueden sobrevivir condiciones desfavorables, y que germinan a través de un tubo a partir del cual se forman esporangios similares a los de la reproducción de tipo asexual, los cuales germinan, liberan zoosporas e inician un ciclo de vida nuevo, como se detalla en la figura 1. (Alor, 2015).

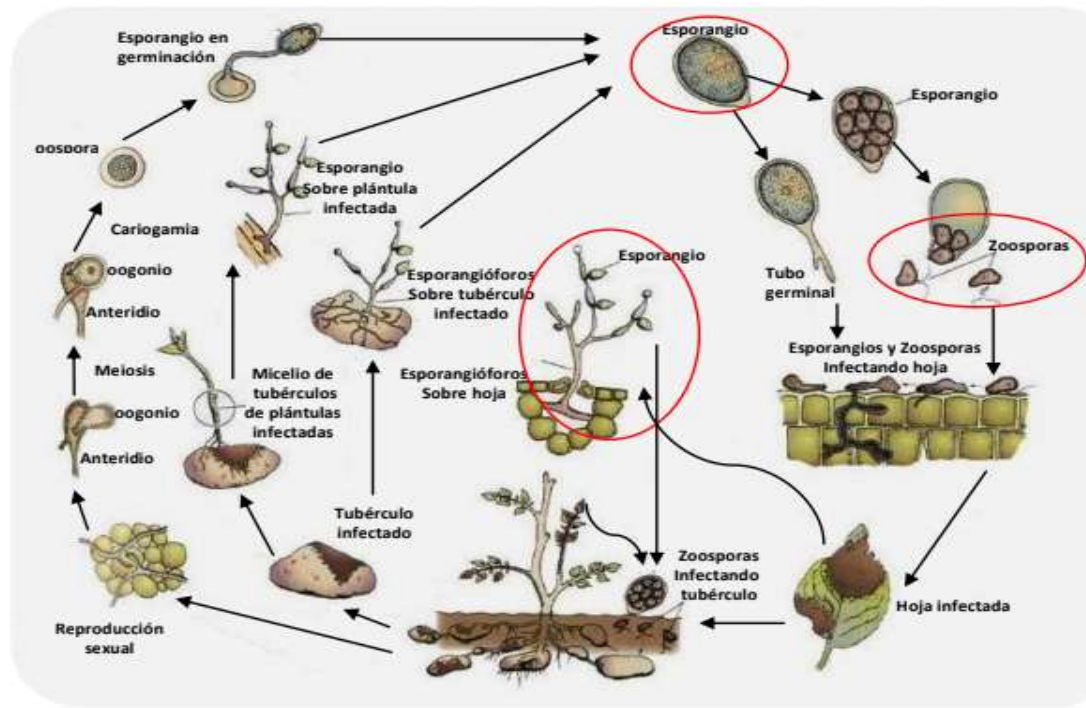


Figura 1. Esquema de la reproducción sexual y asexual de *P. infestans*.

Tomado de (Alor, 2015)

2.2.4. Ciclo asexual de *P. infestans*

Los esporangios germinan indirectamente en agua libre y con bajas temperaturas, liberando de 8-12 zoosporas uninucleadas y biflageladas. En condiciones de humedad, las zoosporas desarrollan un tubo germinativo y penetran a la hoja por medio de estomas; aunque también puede formar un apresorio, así, a través de la cutícula ingresa la hifa de penetración. Una vez que ingresa al tejido, el micelio forma haustorios en el interior de las células (Pérez y Forbes, 2008).

Los esporangios que se forman en el ciclo asexual se dispersan fácilmente a través del viento y la lluvia. El patógeno además puede sobrevivir de una temporada a otra en residuos vegetales y tubérculos infectados (Hwang et al., 2014). La temperatura de esporulación óptima va de 12-18°C con alta humedad

relativa, y la producción de zoosporas es favorecida por debajo de los 15°C (Fry y Niklaus , 2010).

El ciclo asexual de proliferación de los esporangios se completa en cinco días. En campo, este ciclo de repite en múltiples ocasiones durante la temporada de crecimiento del cultivo, lo que resulta en miles de millones de esporas y un aumento continuo de la presión de la enfermedad (Schoina y Govers, 2015). Dependiendo de las condiciones ambientales, un cultivo de papa de una variedad susceptible y sin protección, puede ser devastado en diez días (Sun, Wolters, Vossen, Rouwet, & Loonen, 2016).

2.2.5. Variación genética de *P. infestans*

Las posibles fuentes de variación de este patógeno son la reproducción sexual, mutación, migración, selección y recombinación mitótica. La virulencia, tipo de apareamiento, haplotipos mitocondriales, polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y las repeticiones secuenciales microsatélites (Ssr) han sido los marcadores más utilizados para la caracterización de poblaciones.

La virulencia es la habilidad genética de una raza de *P. infestans* para vencer la resistencia del hospedante. Se basa en la identificación específica de los genes de resistencia (genes R del hospedante) y los genes de avirulencia del patógeno, que al perderse o cambiarse permiten la compatibilidad. Las razas agrupan aislamientos basados en su virulencia frente a un grupo de genotipos diferenciales de papa. La agresividad es el daño que causa el patógeno en el hospedante.

La resistencia a fungicidas se determina por la disminución en la sensibilidad a estos agroquímicos como resultado de mutaciones estables y heredables del oomycete. A nivel mundial ha sido reportada la resistencia al metalaxyl y a otras fenilamidas dentro de poblaciones de *P. infestans* (Pérez y Forbes, 2008).

La aparición de nuevas razas más agresivas y el alto potencial del patógeno para recombinarse, han orientado la investigación hacia nuevas fuentes de resistencia en especies silvestres de *Solanum* (Barquero, Gómez y Brenes, 2005).

2.2.6. Síntomas de la enfermedad en papa

En las hojas de un cultivo afectado se pueden observar síntomas del tizón tardío como manchas necróticas marrones con apariencia húmeda, no limitadas por nervaduras e irregulares. Las manchas inicialmente se aprecian en el borde y punta del foliolo. Con alta humedad, se forma en el envés el micelio como una vellosidad blanca, que contiene los esporangióforos, y éstos a su vez a los esporangios. La muerte del tejido ocurre por la rapidez con la que las lesiones se expanden y necrosan. En el campo se puede percibir un aroma característico por la rápida descomposición del tejido (Pérez y Forbes, 2008).

La tasa de crecimiento de las lesiones es óptima entre los 20 y 24°C, aunque los síntomas pueden no ser evidentes los 2-3 primeros días (Fry y Niklaus , 2010).

Los síntomas también se manifiestan en tallos y pecíolos como lesiones necróticas alargadas, oscuras, marrones y ubicadas generalmente en el tercio superior de la planta. Si la lesión alcanza la totalidad del diámetro del tallo, éste se quiebra con facilidad con el paso de personas, maquinaria o vientos fuertes. Aunque también puede existir esporulación, ésta no es tan abundante como en las hojas (Pérez y Forbes, 2008).

En los tubérculos se presenta una decoloración superficial con aspecto rojizo y depresiones necróticas irregulares. El tejido interno sufre una pudrición granular seca y en estados avanzados da lugar a la infección de patógenos secundarios como bacterias y hongos (Alor, 2015).

2.2.7. Manejo Integrado del Tizón tardío en papa: componentes

Al enfrentar una enfermedad el principal objetivo es manejarla y no combatirla, para esto es necesario implementar un conjunto de métodos de control y actividades que vayan más allá del ciclo de cultivo (Pumisacho y Sherwood, 2002). Existen tres estrategias generales para el manejo integrado de plagas (MIP):

- Excluir o evadir al patógeno, evitando el contacto entre el organismo-plaga y el cultivo. Las medidas de exclusión y el uso de semillas certificadas evitan la introducción del patógeno. Precauciones sanitarias como la limpieza de maquinaria, desinfección de semillas, períodos de cuarentena y la selección y uso de terrenos no contaminados sirven para este fin.

- Limitar el nivel inicial del patógeno, considerando la rotación de cultivos, fumigar los suelos, cultivos intercalados, remoción de sitios de sobrevivencia, arado profundo, entre otros.

- Minimizar el desarrollo de la enfermedad, con estrategias de control químico, adopción de variedades resistentes y prácticas de manejo de fertilidad y riego.

- El manejo tradicional del tizón tardío de papa involucra el uso de agroquímicos en los diferentes estadios de la planta. De acuerdo al Manual del cultivo de papa para pequeños productores del INIAP (2013), se sugiere fumigar al cultivo con fungicidas protectantes antes del apareamiento de la enfermedad, como medida preventiva. Si se observan las primeras lesiones, entre las etapas de emergencia y desarrollo, se aplican fungicidas de contacto (cada 6 -8 días) o fungicidas sistémicos (cada 10-15 días). Si la lluvia es abundante, el período entre aplicaciones será menor. Para evitar que el patógeno se vuelva resistente es importante asegurar la rotación de los productos.

Los fungicidas para el control del tizón tardío más recomendados en Ecuador son: De contacto o protectantes: Polyram (metiram), Daconil (clorotalonil), Dithane (mancozeb), Revus (mandipropamida), Kocide (hidróxido cúprico), Cobox (oxicloruro de cobre), Antracob (propineb), entre otros. Sistémicos: Rodax (fosetil-Aluminio 35% + mancozeb 35%), Curzate (cymoxanil 8% + mancozeb 64%), Fitoraz (cymoxanil 8% + propineb 70%), Ridomil (metalaxyl 7,5% + mancozeb 56%), entre otros (INIAP, 2013).

2.2.8. Estrategias de Defensa Natural al patógeno

En fitopatología se reconocen tres tipos de defensa: evasión, tolerancia y resistencia.

Evasión se da cuando la probabilidad de contacto entre el hospedante y el patógeno se reduce. Entre los mecanismos de evasión se encuentran la imitación, el camuflaje, olores repelentes, vellosidades, espinas o la secreción de químicos, que actúan antes de un contacto íntimo entre ambos individuos.

La tolerancia se refiere a la reducción en la cantidad de síntomas o del daño por unidad de parásito presente. La presencia del patógeno en una planta tolerante se expresa como una menor reducción del rendimiento o permite síntomas más ligeros que en una planta con sensibilidad.

Resistencia es la capacidad que tiene la planta para disminuir el crecimiento y desarrollo del patógeno luego de que se ha establecido efectivamente un contacto íntimo. Ésta se mide comparando la cantidad del patógeno por planta o parte susceptible con la cantidad en una planta susceptible (Niks y Lindhout, 2004).

2.2.9. Tipos de resistencia hospedante

No todos los genotipos de una especie hospedante son igualmente susceptibles a la misma especie de patógenos. Al exponer una colección de

genotipos a un mismo enemigo natural se observan plantas que parecen no ser infectadas, otras en diferentes grados de severidad.

2.2.9.1. Resistencia de hipersensitividad

Este es un tipo de defensa activo, en el que las reacciones se producen tan pronto como el patógeno intenta invadir al hospedante. Esta reacción consiste en una necrosis de las células alrededor del punto de penetración, desviando, deteniendo o aniquilando al patógeno. En el sitio de infección se puede observar una pequeña mancha necrótica, salvo que la reacción se presentara muy temprano en el proceso de infección y que la lesión se restrinja a una o unas pocas células (Niks y Lindhout, 2004).

La resistencia de hipersensitividad, conocida también como resistencia vertical, se caracteriza por su alta especificidad. Para esto debe haber genes simples de resistencia (genes R) en el hospedante y genes simples de habilidad parasítica en el patógeno. Esta relación gen a gen fue descubierta por el estadounidense H.H.Flor (1940), quien demostró que por cada gen de resistencia existía su gen de acople en el parásito, como una equivalencia aproximada a la del sistema de los humanos de antígenos y anticuerpos (Robinson, 2000).

Los procesos básicos de la resistencia de hipersensitividad son la percepción del ataque del patógeno y su respuesta para limitar la enfermedad. El gran repertorio de genes de resistencia que se encuentran dentro del genoma, son los encargados de decodificar los receptores específicos de las cepas patogénicas. Los genes R expresan diferentes proteínas, de las cuales, la mayoría son ricas en leucina y tienen un papel importante en la especificidad (Mosquera, Fernández, Martínez, Acuña y Cuéllar, 2008).

La generación de genes mayores de resistencia vertical comprende procesos de duplicación de genes, divergencia de secuencia genética por delección, mutación puntual y duplicación ADN intragénico. Estos procesos genéticos

aseguran variabilidad y generan diversidad en la secuencia del genoma. En papa, 20 genes de resistencia a nematodos, virus, hongos y oomicetes se han mapeado con marcadores moleculares y fueron introducidos en su mayoría, de especies silvestres (Mosquera et al., 2008).

Especificidad genética a la raza del patógeno

El aislado del patógeno se mantiene almacenado en forma pura *in vivo* o *in vitro*. Al ser varios genotipos de una especie hospedante inoculados con el mismo aislado se puede evidenciar un espectro de virulencia (dado por la evaluación de los componentes de resistencia) para cada aislado. Los aislados con el mismo espectro de virulencia son llamados raza fisiológica del patógeno. Una raza compleja es aquella que presenta un amplio espectro de virulencia (Niks y Lindhout, 2004).

Dependiendo de la combinación de genes del hospedante y del aislado del patógeno, la interacción puede resultar como una compatibilidad (presentan síntomas en la planta) o incompatibilidad (no presentan síntomas). En el caso de la planta se emplean los términos resistencia y susceptibilidad y desde el punto de vista del patógeno, avirulencia o virulencia (Niks y Lindhout, 2004).

Durabilidad

El principal problema con la resistencia vertical basada en los genes R es que las variedades liberadas se volvían susceptibles en muy poco tiempo (Covarrubias, Hinojosa y López, 2016). Esto se debe a mutaciones que el patógeno presenta por diversidad natural en su composición genética y que evitan el reconocimiento de los genes de avirulencia de *P. infestans*. La ruptura de la resistencia es principalmente la consecuencia de una mutación o delección del locus de avirulencia del patógeno.

Para poder prolongar la resistencia es necesario transferir varios genes R, siendo un proceso recomendable con variedades de alta demanda en el mercado (Haverkort et al., 2016).

La resistencia de un cultivar parece disminuir a lo largo del tiempo. Este fenómeno se conoce como ruptura, pérdida o erosión genética. Esta pérdida de

resistencia se evidencia comparando el nivel de resistencia de los cultivares a través de varios años. El patógeno se expone a una presión de selección cuando un cultivar resistente se siembra a gran escala, permitiendo que genotipos raros del patógeno con mejor habilidad para vencer la resistencia sean favorecidos y su frecuencia relativa aumenta. De esta forma, la durabilidad de la resistencia puede únicamente ser determinada si ha permanecido efectiva por un largo período de tiempo, con un uso a gran escala y en un ambiente que favorezca el crecimiento del patógeno (Niks y Lindhout, 2004).

2.2.9.2. Resistencia parcial

Es el tipo de resistencia que resulta en una reducción del desarrollo de la enfermedad a pesar de un tipo de infección susceptible. Este tipo de resistencia se debe a varios componentes que deben ser evaluados dependiendo del patosistema (combinación de la especie hospedante y una de las especies de enemigos naturales). Los componentes se pueden medir por medio de pruebas monocíclicas (invernadero), o policíclicas en campo (Niks y Lindhout, 2004).

El nivel de resistencia parcial sólo se puede determinar en pruebas de campo, convirtiéndose en una tarea muy laboriosa, por lo que uno o más de los componentes se suelen evaluar con pruebas monocíclicas. Los resultados de ambas pruebas se deben correlacionar (Niks y Lindhout, 2004).

Respuesta genética de la resistencia parcial

La resistencia parcial es de tipo cuantitativo debido a genes con pequeños efectos. Estos genes están localizados en loci de carácter cuantitativo o QTLs por sus siglas en inglés. Cuando se evalúa la progenie del cruzamiento de parentales con diferentes niveles de resistencia parcial se observa una segregación de la distribución continua de los niveles de infección, lo que implica que la herencia de estos genes no siempre es poligénica (Niks y Lindhout, 2004).

Duración de la resistencia parcial

Se considera como una resistencia duradera ya que funciona contra las razas del patógeno que ya acoplaron la resistencia vertical del hospedante. Ocurre en todas las plantas y funciona contra todas las razas de *P. infestans*, sin depender de los genes R que pueda contener (Robinson, 2000).

La resistencia parcial se caracteriza por tener más o menos la misma efectividad contra todas las variantes del patógeno (Niks y Lindhout, 2004). Los niveles de resistencia parcial pueden ser mejorados con fitomejoramiento y, teóricamente, pueden aumentarse hasta que el patógeno esté completamente controlado (Robinson, 2000).

2.3. Mejoramiento genético de papa para la resistencia a *P. infestans*

El mejoramiento genético consiste en el desarrollo de variedades con características agronómicas deseables, de resistencia tanto a factores bióticos como abióticos y calidad. Los primeros fitomejoradores centraron sus esfuerzos en la selección para rendimiento y resistencia a enfermedades, a lo que se han sumado criterios de calidad de tubérculo (contenido de materia seca, azúcares, vitaminas, etc.) Este es un proceso que, por las características de reproducción del cultivo, su naturaleza tetraploide, y los métodos de fitomejoramiento (cruzamientos y pedigrí), puede tomar hasta 12 años para dar como resultado a una variedad mejorada (Cuesta, Rivadeneira y Monteros, 2015).

El fitomejoramiento convencional para resistencia a plagas consiste en la identificación de fuentes de resistencia, que se encuentran en especies emparentadas y silvestres de papa. Muchos de los genes de resistencia de estas especies se han introducido por retrocruzamiento en clones de *Solanum tuberosum*, generando en los últimos 50 años un gran número de genotipos y clones resistentes (Gabriel et al., 2016).

Los genes mayores fueron usados como fuente de resistencia por programas de fitomejoramiento a nivel mundial, pero las variedades obtenidas y cuya resistencia residía en genes mayores perdieron resistencia al poco tiempo (Rubio, Cadena y Flores, 2016). Esto ha estimulado el interés por la resistencia parcial, sin embargo, existen aspectos que desaniman a los mejoradores de su aplicación, como la dificultad para reconocer plantas con un nivel sustancial de resistencia parcial, la herencia poligénica que es más complicada y el hecho de que la resistencia parcial puede no proteger al cultivo en forma suficiente (Niks y Lindhout, 2004).

En el caso de *P. infestans* no existe una diferencia cualitativa entre la resistencia parcial y la de hipersensitividad, ya que con ambas existe la inducción a la necrosis del tejido en la planta. Las diferencias entre los dos tipos de resistencia no se pueden identificar con facilidad en papa al ser fenotípicamente afines (Plinch et al., 2016). Estudios de mapeo genético han revelado que los genes menores y mayores pueden encontrarse en locaciones similares dentro del cromosoma e incluso ser alelos del mismo gen (Abou-Taleb, Aboshosha, El-Sherif y El-Komy, 2010).

Actualmente se conoce que los genes mayores están implicados en cualquier resistencia, así que se está procurando que las nuevas variedades se generen con una mezcla de genes mayores y menores, a lo que se denomina como construcción de pirámides de genes (Covarrubias et al., 2016).

Para poder diferenciar ambos tipos de resistencia se han evaluado parámetros como la curva de infección, la etapa fenológica en la que ocurre la enfermedad, la presencia de esporangios y los síntomas de hipersensitividad. De éstas, las dos primeras variables han servido para clasificar muchos genotipos de papa por su resistencia (Covarrubias et al., 2016).

Evaluación de la resistencia

Las plantas pueden evaluarse en campo, invernadero o laboratorio. Así, factores como luz, agua, temperatura y la identidad del patógeno se pueden controlar. Las pruebas en campo son relativamente simples y su costo es

menor, además permiten la evaluación de otras características agronómicas. Sus condiciones son bastante representativas y permiten la obtención de resultados fiables. Sin embargo, presentan desventajas, ya que la distribución del patógeno es heterogénea, pudiendo darse escapes o que el patógeno no se encuentre en la cantidad necesaria. Además, la población de razas de *P. infestans* en campo puede variar.

En las pruebas de invernadero las inoculaciones se controlan mejor que en campo y se puede brindar al patógeno las condiciones óptimas de humedad relativa y temperatura, para su proceso de infección. La evaluación es simple y la posibilidad de escapes es pequeña, aunque presentan las desventajas de no siempre ser representativas de lo que se espera que suceda en campo, ya que las condiciones para el patógeno son mejores y las plantas pueden parecer más susceptibles en el invernadero que en campo.

Las pruebas en el laboratorio pueden hacerse con semillas germinadas, discos de hojas, hojas sueltas o cultivos *in vitro*, con ventajas y desventajas similares a las de invernadero, pero más pronunciadas (Niks y Lindhout, 2004).

El estadio en el que se encuentra la planta también afecta su nivel de resistencia, ya que por lo general las plantas jóvenes son más susceptibles y aumentan su resistencia al madurar. Cuando la planta deja de crecer y empieza el proceso de senescencia, la susceptibilidad incrementa nuevamente (Plinch et al., 2016). Así que el estadio de la planta también se debe tomar en cuenta al realizar las pruebas de resistencia.

Componentes para evaluar la resistencia a *P. infestans*

Los primeros síntomas de infección pueden ser visibles pocos días después de la inoculación, sin embargo, se debe tomar en cuenta que las plantas inoculadas pueden variar en la severidad de la expresión de los síntomas (Niks y Lindhout, 2004).

Al trabajar con patógenos como *P. infestans* se evalúan componentes como el período de latencia, la frecuencia de infección y el número de esporas. Estudios realizados han demostrado que componentes de resistencia como el

rango de crecimiento de la lesión (RCL), tamaño de lesión (TL) e intensidad de esporulación (IE), pueden ser una fuente valiosa de información sobre la resistencia de genotipos evaluados (Gabriel et al., 2011).

Existen factores que pueden conducir a conclusiones erróneas sobre la resistencia del material evaluado, sobreestimando o subestimando la misma. Entre estos factores está la precocidad de los materiales, interferencia entre parcelas, dosis de inóculo y tiempo de evaluación (Niks y Lindhout, 2004).

3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Material Biológico

- Aislamiento de una raza compleja de *P. infestans* obtenido en la Estación Experimental Santa Catalina y conservado en el laboratorio de Protección Vegetal de INIAP.
- Cinco variedades mejoradas comerciales de papa y veintitrés clones seleccionados del Programa Nacional de Raíces y Tubérculos - Rubro papa del INIAP.

3.1.2. Material de Invernadero

- | | |
|--------------------------------|-------------------------|
| • Macetas plásticas | • Cinta plástica |
| • Guías metálicas para tutoreo | • Sustrato desinfectado |

3.1.3. Material de Laboratorio

- | | |
|-----------------------------|--------------------------|
| • Termómetro | • Probetas |
| • Baño María | • Piceta |
| • Cámara de Neubauer | • Licuadora |
| • Calibrador electrónico | • Vasos de precipitación |
| • Microscopio óptico | • Agar microbiológico |
| • Cajas Petri plásticas | • Alcohol al 96% |
| • Cuarto de incubación | • Balanza de precisión |
| • Matraz Erlenmeyer 1000 ml | • Parafilm |

- Agar-agar
- Micropipeta automática
- Papel absorbente
- Agua destilada estéril

3.1.4. Material de Oficina

- Computadora
- Registros de evaluación
- Cámara fotográfica

3.2. Métodos

3.2.1. Ubicación del Experimento

La preparación de los materiales se llevó a cabo en los invernaderos del Programa Nacional de Raíces y Tubérculos- Rubro Papa.

El ensayo con los folíolos desprendidos fue realizado en el laboratorio del Departamento Nacional de Protección Vegetal y en el cuarto de incubación del Centro Internacional de la papa, instalaciones de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP.



Característica	Descripción
Ubicación	Provincia de Pichincha, cantón Mejía, parroquia Cutuglagua.
Coordenadas	78°33'6.19"O ; 00°22'02.91"S
Altura	3065 msnm

Figura 2. Estación Experimental Santa Catalina

Tomado de (Google Earth, 2018).

3.2.2. Análisis Estadístico

3.2.2.1. Diseño Experimental

En la presente investigación se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con 6 observaciones.

3.2.2.2. Unidad Experimental y Tratamientos

La unidad experimental está conformada por un foliolo de papa de aproximadamente 4 centímetros de longitud, tomado del tercio superior de las plantas de 8 semanas de edad sembradas en el invernadero, e inoculada con el aislamiento de *P. infestans*. Los tratamientos son los 28 genotipos evaluados, descritos en la tabla 1.

Tabla 1

Descripción de los genotipos de papa evaluados en el ensayo.

Genotipo	Pedigrí	Resistencia tizón tardío
INIAP-Libertad **	380479.15 x Bk Precoz-84	Resistente
INIAP-Josefina	Bolonax <i>S.phureja</i> x <i>S.pausissectum</i>	Moderadamente susceptible
INIAP-Estela	Súpercholax <i>S.phurejaxS.pausissectum</i>	Resistente
INIAP-Raymipapa	378979.461 x BULK SEEDL. 79/80 Mex	Resistente
Chiwuila Roja**	Variedad nativa <i>Solanum tuberosum</i>	Susceptible
11-9-106	98-11-6 x 99-11-6	} Por determinar
11-9-172	98-11-6 x 99-11-6	
11-9-44.	98-11-6 x 99-11-6	
11-9-133	98-11-6 x 99-11-6	
11-9-101	98-11-6 x 99-11-6	
11-9-9.	98-11-6 x 99-11-6	
11-9-64.	98-11-6 x 99-11-6	
11-9-66.	98-11-6 x 99-11-6	
11-9-28.	98-11-6 x 99-11-6	
11-9-27.	98-11-6 x 99-11-6	
11-9-77.	98-11-6 x 99-11-6	
11-9-108	98-11-6 x 99-11-6	
11-9-112	98-11-6 x 99-11-6	
12-4-173	HSO 198 x LEONA NEGRA	
12-4-45.	HSO 198 x LEONA NEGRA	
12-4-175	HSO 198 x LEONA NEGRA	

12-4-145	HSO 198 x LEONA NEGRA	} Por determinar
12-4-72.	HSO 198 x LEONA NEGRA	
12-6-29.	BOM 532 x LEONA NEGRA	
12-2-6.	BOM 540 x LEONA NEGRA	
07-32-15.	BOM 532 x HSO 213	
14-9-56.	0-50 x VICTORIA	
11-8-6.	BOM 540 x HSO 198	

Cuadro del ADEVA (Esquema)

Tabla 2

Esquema del análisis de varianza de las variables del presente estudio.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad
Total	167
Tratamientos	27
Error Experimental	140

CV(%)

Análisis funcional

Si se presentan diferencias estadísticas entre los tratamientos para las diferentes variables evaluadas, se realizará la prueba de separación de medias de Tukey (<5%).

Se realizó la prueba de Shapiro Wilks para determinar si las variables presentaron una distribución normal. Las variables que no presentan una distribución normal se efectuó la transformación a los datos.

3.2.3. Variables

Período de Incubación (PI) (días)

Se registró el número de días que transcurren desde la inoculación hasta el apareamiento del primer signo de infección, una mancha necrótica, como un punto, en el sitio de inoculación.

Los datos de esta variable fueron transformados para el ADEVA, con la fórmula $\sqrt{x + 3.8}$.

Rango de crecimiento de la lesión-RCL (mm²)

Se tomaron datos en los días 5, 6 y 7 después de la inoculación, de la longitud (paralela a la nervadura central) y del ancho de la lesión, con un calibrador electrónico (Figura 3). Con la fórmula $A = \frac{1}{4} \times \pi \times \text{longitud} (l) \times \text{ancho} (a)$ se obtiene el tamaño del área infectada. El rango de crecimiento se calculó como la diferencia de la sumatoria de la lesión actual menos el tamaño de la lesión anterior dividido entre $n-1$, siendo n el número de lecturas. Así , $RCL = \sum \left(\frac{TL_n - TL_{n-1}}{n-1} \right)$ (Gabriel, Fernández, Plata, & Siles, 2011).

Los datos de esta variable se transformaron para el ADEVA con la fórmula $\sqrt{x + 280}$.



Figura 3. Toma de las medidas de ancho y largo de las lesiones por medio de un calibrador electrónico.

Período de latencia- PL (días)

Se registró el número de días que transcurren entre la inoculación y la esporulación del patógeno. Las observaciones se realizaron una vez por día, en la mañana.

Para en ADEVA de esta variable se realizó una transformación de datos con la fórmula $\sqrt{x + 910}$.

Tamaño de lesión-TL (mm²)

Al octavo día desde la inoculación fotografía de cada uno de los folíolos infectados. Luego, con el programa Image J se calcula el área (mm²) de cada lesión.

Para el ADEVA de esta variable se transformaron los datos con la fórmula $\sqrt{x + 8.5}$.

Intensidad de Esporulación-IE (escala hedónica)

Con estimaciones visuales se evalúa en la mañana de cada día la intensidad de la esporulación, de acuerdo a los siguientes valores: 0= ausencia de esporulación, 1= esporulación baja, 2= esporulación media y 3=esporulación abundante (Tabla 3). El dato se toma al segundo día, luego de iniciada la esporulación (PL). Para esta variable, los datos registrados serán analizados a través de estadística descriptiva.

Tabla 3

Guía para valoración visual de la intensidad de esporulación de P. infestans, con fotografías tomadas al octavo día luego de la inoculación.

Escala de valoración visual de la intensidad de esporulación.

Valor 0 : Ausencia de esporulación



No se aprecia crecimiento del micelio del patógeno en toda la extensión de la

Valor 1: Esporulación baja



Se observa micelio en algunas zonas de la lesión. La apariencia del micelio es blanquecina, casi transparente.

Valor 2: Esporulación media

El micelio se encuentra en el 70% de la lesión y tiene una apariencia más blanquecina. La longitud del micelio se visualiza como 2 mm sobre la hoja.

**Valor 3: Esporulación abundante**

El micelio se observa en toda la lesión, con un color más blanco y una longitud de más de 3mm sobre la superficie de la

3.3. Manejo del Experimento**3.3.1. En invernadero.**

Los genotipos de este estudio fueron sembrados en macetas con sustrato desinfectado previamente. Se sembraron dos macetas por genotipo, con un solo tubérculo por maceta. Cada maceta fue identificada con el nombre del genotipo en la parte delantera y distribuidas las dos macetas del mismo genotipo de manera contigua para evitar la mezcla de material, como se muestra en la figura 4. A lo largo de este estudio se realizaron tres siembras de los genotipos, a fin de tener suficientes folíolos para evaluar con distintos aislamientos hasta encontrar el aislamiento con mayor virulencia.

Se llevaron a cabo las labores culturales pertinentes para el control de malezas, enfermedades y plagas. Entre éstas se incluye la aplicación de Fosfitol (fertilizante foliar) en la quinta semana del cultivo, para favorecer el desarrollo foliar de las plantas.

A lo largo del manejo de las plantas en invernadero se restringió el uso de fungicidas sistémicos o de contacto, ya que pueden interferir con los resultados finales del estudio.



Figura 4. Materiales sembrados en macetas en el invernadero 10 días luego de la siembra.

3.3.2. En laboratorio

Para el análisis de los componentes de resistencia en laboratorio se siguió el protocolo tomado de Manual for Laboratory Work on *Phytophthora infestans* de CIP (1997).

3.3.2.1. Aislamiento de *P. infestans*

Los aislamientos para este ensayo fueron obtenidos de un ensayo de campo en la estación. Para esto, se identificó la enfermedad en el cultivo de papa a través de una evaluación visual y se tomaron muestras de las hojas infectadas. Las muestras que se tomaron en campo tenían una sola lesión por hoja, para evitar una mezcla de razas al momento de aislar el hongo.

Estas hojas se colocaron en cajas plásticas con tapa, en condiciones de alta humedad relativa, para lo cual se colocó en la base de la caja un papel absorbente humedecido con agua destilada, las hojas se colocaron sobre una malla plástica para evitar el contacto directo con el papel. La humedad favoreció la esporulación del oomycete.

Cuando el micelio fue visible, se aisló el patógeno y se lo sembró en cajas Petri con medio de cultivo agar-centeno. Se observó el crecimiento de *P. infestans* hasta el desarrollo del micelio en la caja Petri con el aislamiento inicial, a partir del cual se realizaron multiplicaciones en nuevas cajas Petri.

El aislamiento fue purificado y se mantuvo en incubación hasta que el micelio estaba claramente desarrollado y tenía una apariencia blanca y homogénea, como se observa en la figura 5.



Figura 5. Aislamiento de *P. infestans* sembrado en cajas Petri con medio agar-centeno.

3.3.2.2. Activación y preparación del inóculo

Para la activación del patógeno se realizó un lavado del micelio del aislamiento con agua destilada. Con esta solución se inocularon hojas sanas de papa de la variedad Súper chola (susceptible), que se colocaron en cajas plásticas con alta humedad, como fue descrito en el apartado anterior (Figura 6).

Al cuarto día, con el micelio crecido y esporulado en las hojas, se hace un lavado con agua destilada utilizando una piseta, para obtener los esporangios. Esta suspensión se filtró a través de una malla de 20 μm para eliminar impurezas (bacterias, restos de materia orgánica de las hojas). Se realizó luego el conteo de los esporangios en la cámara de Neubauer (hematocitómetro) para ajustar la concentración a 40 000 esporangios/ ml en dilución con agua destilada. La solución ya ajustada se conservó en un vaso de precipitación

tapado con papel aluminio, a una temperatura de 5°C, por un período de tres horas para obtener zoosporas

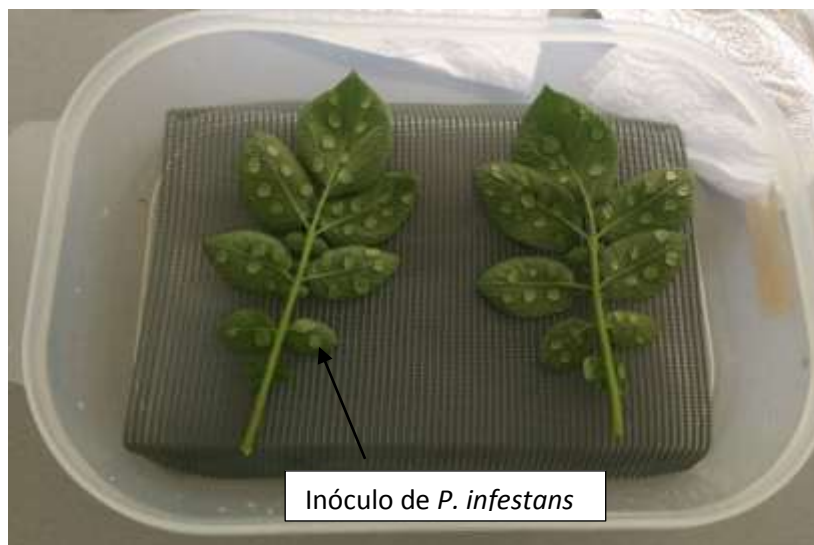


Figura 6. Hojas de la variedad Súper chola inoculadas con el aislamiento de *P. infestans* para la reactivación del oomycete.

3.3.2.3. Inoculación e incubación

Mientras el inóculo se mantenía en refrigeración, las muestras de los folíolos fueron colectadas en el invernadero, destinando una funda membretada para cada genotipo. Los folíolos que se utilizaron fueron los completamente desarrollados del tercio superior de la planta.

Tres folíolos se colocan en cada caja Petri con el envés para arriba. Las cajas contienen agar-agua al 10%, preparado con anterioridad (mantener HR dentro de la caja). Se inoculó con 35 μ l de la suspensión de esporangios a cada uno de los folíolos, junto a la nervadura central (Figura 7). Para cada genotipo de papa se utilizaron seis folíolos (observaciones).



Figura 7. Inoculación de folíolos de papa con el aislamiento de *P. infestans*.

Las cajas Petri con los folíolos se conservaron en un cuarto de incubación a 18°C(+/- 1), y con un fotoperíodo de 14 horas luz (16:30 a 6:30).

4. Resultados

A continuación, se presentan los resultados de cada una de las variables evaluadas, en caso de existir diferencias estadísticas entre los genotipos se presenta el análisis funcional a través de la prueba de separación de medias de Tukey al 5%.

Período de incubación (días)

En la tabla 4 se presenta el análisis de varianza del período de incubación, encontrándose diferencias altamente significativas entre genotipos de papa, lo que permite aceptar la hipótesis alternativa, en otras palabras, existen diferencias entre el tiempo de inoculación y el apareamiento de la lesión de *P. infestans* de los diferentes materiales de papa evaluados.

Tabla 4

Análisis de varianza del período de incubación (días) in vitro de P. infestans con transformación de datos, en 28 genotipos de papa.

F. de V.	GL	SC	CM
Total	167	23.86	
Genotipos	27	16.38	0.61**
E.E.	140	7.49	0.05
CV%			9.91
\bar{x}			2.33

**Diferencias altamente significativas

Los promedios de incubación in vitro de *P. infestans* de los 28 genotipos de papa se presentan en la tabla 5. Los genotipos 14-9-56, 11-9-108, 12-4-145, 11-9-112, 11-9-133, 11-9-106, INIAP-Libertad, INIAP-Josefina y INIAP-Raymipapa los que presentan mayor resistencia a *P. infestans*, considerado que no se presentó la enfermedad durante el período de evaluación (8 días). Por su parte los materiales 12-4-173, 12-2-6 y 12-4-72 tuvieron el período de incubación más largo ya que inició la enfermedad a los 4 días, mientras que el genotipo 11-9-64 tuvo el período de incubación más corto, presentándose la primera lesión de la enfermedad al primer día. Los demás materiales presentaron los síntomas de la enfermedad entre 2 y 3 días después de la inoculación.

Tabla 5

Promedios del período de incubación (días) in vitro de P. infestans en 28 genotipos de papa.

Genotipo	Media
14-9-56	0±0 a
11-9-108	0±0 a
12-4-145	0±0 a
11-9-112	0±0 a

11-9-133	0±0 a
11-9-106	0±0 a
Libertad	0±0 a
Josefina	0±0 a
Raymipapa	0±0 a
11-9-64	1±1.1 ab
11-9-28	1.50±1.64 abc
11-8-6	1.50±1.64 abc
11-9-66	1.50±1.64 abc
12-4-175	1.67±1.86 abc
11-9-44	1.67±1.86 abc
11-9-27	2±1.55 abcd
11-9-9	2.33±0.52 abcd
11-9-77	2.50±0.55 bcd
11-9-172	2.50±1.22 bcd
Chiwuilla Roja	2.670±0.82 bcd
07-32-15	3±0.63 bcd
Estela	3±0.89 bcd
11-9-101	3.33±0.52 bcd
12-6-29	3.50±0.55 cd
12-4-45	3.50±0.55 cd
12-4-173	4.17±2.14 d
12-2-6	4.33±0.52 d
12-4-72	4.33±2.42 d

0= indica que los materiales no presentaron lesión en el tiempo de evaluación (8 días)

Las variedades INIAP-Libertad, INIAP-Raymipapa se comportaron como resistentes, mientras que Josefina tiene un comportamiento moderadamente susceptible, por lo que los resultados coinciden con el comportamiento esperado de estas variedades a la enfermedad.

Tamaño de la Lesión (mm²)

El análisis de varianza para el tamaño de la lesión medido en el día 8 luego de la inoculación con el inóculo de *P. infestans* (Tabla 6), permitió detectar diferencias altamente significativas entre genotipos de papa.

Tabla 6

Análisis de varianza del tamaño de lesión in vitro al día 8 (mm²) de P. infestans con transformación de datos, en 28 genotipos de papa.

F. de V.	gl	SC	CM
Total	167	4792.64	
Genotipos	27	3077.24	113.97**
E.E.	140	1715.39	12.25
CV%			9.99
\bar{x}			35.04

**Diferencias altamente significativas

En la tabla 7 se puede observar que los genotipos 12-4-173 y 11-8-6 son los que menor tamaño de lesión presentaron al día 8, con 154.3mm² y 196.8 mm² respectivamente, mientras que la variedad nativa Chiuwila roja tuvo el mayor tamaño de lesión (1111.50 mm²), que es el comportamiento esperado, ya que de acuerdo a la información del INIAP, esta es una variedad nativa susceptible.

Tabla 7

Promedios del tamaño de lesión in vitro del día 8 (mm²) de P. infestans en 28 genotipos de papa.

Genotipo	Media
11-9-112	0±0 a
12-4-145	0±0 a
Raymipapa	0±0 a
11-9-108	0±0 a
Josefina	0±0 a
11-9-133	0±0 a
Libertad	0±0 a
14-9-56	0±0 a
11-9-106	0±0 a
12-4-173	154.28±135.47 ab
11-8-6	196.75±216.14 ab
12-4-72	272.39±261.83 abc
12-2-6	297.39±140.93 abc
11-9-44	314.11±362.05 abcd
12-4-175	369.60±408.04 abcde

11-9-28	407.17±470.63 abcde
11-9-64	431.30±483.04 abcde
12-4-45	434.78±128.72 abcde
07-32-15	439.71±165.36 abcde
11-9-66	492.80±570.59 abcde
11-9-77	494.09±69.69 abcde
11-9-172	513.27±442.26 abcde
11-9-27	595.72±488.61 bcdef
11-9-101	641.36±112.02 bcdef
11-9-9	805.45±143.67 cdef
Estela	859.09±22.85 def
12-6-29	876.23±119.71 ef
Chiwuila Roja	1111.50±215.45 f

0= indica que los materiales no presentaron lesión en el tiempo de evaluación (8 días)

Rango de crecimiento de la lesión (mm²)

El análisis de varianza de la tabla 8, muestra el rango de crecimiento de la lesión detectándose diferencias altamente significativas entre los genotipos para esta variable. De esta manera, existen genotipos con un mayor incremento del tamaño de lesión por día que otros genotipos, considerando que las medidas del área de la lesión fueron tomadas al quinto, sexto y séptimo día desde la inoculación.

Tabla 8

Análisis de varianza del rango de crecimiento de la lesión (mm²) in vitro de P. infestans con transformación de datos, en 28 genotipos de papa.

F. de V.	gl	SC	CM
Total	167	1532.67	
Genotipos	27	1010.24	37.42**
E.E.	140	522.43	3.73
CV%			9.99
\bar{x}			35.04

**Diferencias altamente significativas

En la tabla 9, de los promedios de la RCL se puede observar que los genotipos 12-4-173 y 11-8-6 fueron los que presentaron el menor rango de crecimiento de la lesión, y pertenecen al rango ab y abc respectivamente, mientras que los 12-6-29 y Chiwila roja fueron los del mayor rango de crecimiento, llegando a incrementar su tamaño en 293 y 350 mm² por día.

Tabla 9

Promedios del rango de crecimiento de la lesión (mm²) in vitro de P. infestans en 28 genotipos de papa.

Genotipo	Media
14-9-56	0±0 a
12-4-145	0±0 a
Raymipapa	0±0 a
Libertad	0±0 a
11-9-112	0±0 a
11-9-106	0±0 a
Josefina	0±0 a
11-9-108	0±0 a
11-9-133	0±0 a
12-4-173	24.18±25.9 ab
11-8-6	28.90±32.67 abc
12-2-6	52.77±42.65 abcd
12-4-72	66.83±90 abcd
11-9-44	83.12±100.38 abcd
11-9-28	94.18±108.11 abcd
12-4-175	118.02±132.84 abcde
12-4-45	132.37±50.61 abcdef
11-9-172	137.63±102.86 abcdef
11-9-64	149.30±163.68 abcdef
11-9-77	151.50±43.48 abcdef
11-9-66	165.14±188.21 abcdef
07-32-15	166.44±81.32 abcdef
11-9-27	184.62±154.41 bcdefg
11-9-101	197.55±21.27 cdefg
11-9-9	213.44±63.26 defg

Estela	267.06±89.26 efg
12-6-29	293.99±54.67 fg
Chiwuila Roja	350.44±49.52 g

0= indica que los materiales no presentaron lesión en el tiempo de evaluación (8 días)

Período de latencia (días)

El análisis de varianza del período de latencia que se muestra en la tabla 10, refleja diferencias altamente significativas entre los genotipos para esta variable, lo que permite aceptar la hipótesis alternativa.

Tabla 10

Análisis de varianza del período de latencia (días) in vitro de P. infestans con transformación de datos, en 28 genotipos de papa.

F. de V.	gl	SC	CM
Total	167	43.46	
Genotipos	27	27.24	1.01**
E.E.	140	16.22	0.12
CV%			9.91
\bar{x}			3.43

**Diferencias altamente significativas

Los promedios del período de latencia que se muestran en la tabla 11, permiten identificar que los genotipos 11-9-28, 11-8-6, 11-9-44, 11-9-64, 07-32-15, 11-9-66, 12-4-175, 11-9-27 y 12-6-29 tuvieron los períodos de latencia más cortos, es decir, fueron los primeros genotipos en presentar signos visibles de esporulación (micelio), al tercer, cuarto y quinto día luego de la inoculación. Un período de latencia más corto se relaciona con una mayor susceptibilidad a la enfermedad. Por otro lado, los genotipos 11-9-172, 11-9-77, 11-9-9, Chiwuila roja, 12-4-173, 12-4-45, 12-4-72, 11-9-101, Estela y 12-2-6 fueron los que tuvieron un mayor período de latencia, al presentar signos visibles de esporulación a partir del sexto día hasta el octavo día.

Tabla 11

Promedios del período de latencia (días) de P. infestans in vitro en 28 genotipos de papa.

Genotipo	Media
14-9-56	0±0 a
11-9-108	0±0 a
12-4-145	0±0 a
11-9-112	0±0 a
Josefina	0±0 a
Libertad	0±0 a
Raymipapa	0±0 a
11-9-133	0±0 a
11-9-106	0±0 a
11-9-28	2.67±2.94 ab
11-8-6	3.17±3.49 ab
11-9-44	3.17±3.49 ab
11-9-64	3.33±3.67 ab
07-32-15	3.33±5.16 ab
11-9-66	3.50±3.89 ab
12-4-175	4.33±4.97 ab
11-9-27	4.67±3.61 ab
12-6-29	5.00±0 ab
11-9-172	5.67±2.88 b
11-9-77	6.00±0 b
11-9-9	6.17±0.41 b
Chiwuila Roja	6.17±0.41 b
12-4-173	6.33±3.14 b
12-4-45	6.67±0.52 b
12-4-72	6.83±3.49 b
11-9-101	7.00±1.10 b
Estela	7.50±0.55 b
12-2-6	7.67±0.82 b

0= indica que los materiales no presentaron lesión en el tiempo de evaluación (8 días).

Intensidad de esporulación (Escala hedónica)

La Tabla 12 resume la estadística descriptiva que fue aplicada para la evaluación de esta variable. Los criterios de evaluación de la escala hedónica son los que se mencionan en la Tabla 3 (Literal 3.2.3 Variables). De esta manera los genotipos fueron clasificados así:

Los genotipos que no presentaron esporulación (valor 0), fueron los mismos genotipos que no presentaron lesión en el tiempo de evaluación, siendo éstos: INIAP-Libertad, INIAP-Josefina, INIAP-Raymipapa, 11-9-106, 11-9-133, 11-9-108, 11-9-112, 12-4-145 y 14-9-56.

Los genotipos con baja esporulación están considerados con el promedio entre 0.5 y 1.4, que corresponde a los de esporulación baja, y son 07-32-15, 12-4-175, 11-9-44, 11-9-64, 11-9-172, 11-9-66 12-4-72 y 11-9-27.

Entre los genotipos con esporulación media, con valores entre 1.5 y 2.4, se encuentran Estela, Chiuwila roja, 11-8-6, 12-4-45, 11-9-28, 11-9-101, 11-9-77, 12-2-6, 11-9-9 y 12-4-173.

El único genotipo que presentó esporulación abundante fue el 12-6-29, con un valor promedio de 2.5.

Tabla 12

Análisis de los datos de la intensidad de esporulación de P. infestans en 28 genotipos de papa.

Genotipo	Media	Mediana	Moda	Desviación estándar	Varianza	Rango	Nivel de confianza (95.0%)
<i>Libertad</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Josefina</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Raymipapa</i>	0	0	0	0	0	0	0

11-9-106	0	0	0	0	0	0	0
11-9-133	0	0	0	0	0	0	0
11-9-108	0	0	0	0	0	0	0
11-9-112	0	0	0	0	0	0	0
12-4-145	0	0	0	0	0	0	0
14-9-56.	0	0	0	0	0	0	0
07-32-15.	0.5	0	0	0.84	0.70	2	0.88
12-4-175	0.83	0.5	0	1.17	1.37	3	1.23
11-9-44.	1.00	1	2	1.10	1.20	2	1.15
11-9-64.	1.00	1	2	1.10	1.20	2	1.15
11-9-172	1.17	1	1	0.75	0.57	2	0.79
11-9-66.	1.17	1	0	1.33	1.77	3	1.39
12-4-72.	1.17	1	1	0.75	0.57	2	0.79
11-9-27.	1.33	1.5	2	1.21	1.47	3	1.27
<i>Estela</i>	1.5	1.5	1	0.55	0.3	1	0.57
<i>Chiwuila Roja</i>	1.5	1.5	1	0.55	0.3	1	0.57
11-8-6.	1.5	1.5	3	1.64	2.70	3	1.72
12-4-45.	1.5	1.5	1	0.55	0.30	1	0.57
11-9-28.	1.5	1.5	3	1.64	2.70	3	1.72
11-9-101	1.67	2	2	0.52	0.27	1	0.54
11-9-77.	1.83	2	2	0.75	0.57	2	0.79
12-2-6.	2.00	2	2	0.89	0.80	2	0.94
11-9-9.	2.17	2	2	0.75	0.57	2	0.79
12-4-173	2.17	3	3	1.33	1.77	3	1.39
12-6-29.	2.5	2.5	2	0.55	0.30	1	0.57

Reacción de hipersensitividad

Durante la evaluación se pudo identificar que algunos genotipos de papa presentaron una reacción de hipersensitividad ante el patógeno, ya que generaron una mancha necrótica puntual en el sitio de la hoja donde se inóculo el patógeno, mismo que no varió ni en tamaño ni en forma a lo largo del período de la evaluación (8 días) Los genotipos que presentaron hipersensitividad fueron INIAP-Raymipapa, INIAP-Josefina, 12-4-145, 11-9-108 e INIAP-Libertad.

Tabla 13

*Genotipos de papa que presentaron hipersensitividad (ausencia de síntomas del hongo) a *P. infestans*.*

T	Observaciones											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Libertad	-	-	-	-	-	-	hs	hs	-	-	-	-
Josefina	hs	-	hs	-	-	-	-	-	-	hs	-	hs
Raymipapa	-	-	-	hs	-	hs	hs	-	-	hs	-	hs
11-9-108	-	-	-	-	hs	-	-	hs	-	-	hs	-
12-4-145	hs	-	-	hs	hs	-	-	-	hs	-	-	-

hs: Se refiere a la lesión necrótica puntual que se encuentra en el sitio de inoculación y que no creció en el tiempo de evaluación (8 días).

-: Se refiere a la ausencia de reacción de hipersensitividad y de cualquier otro síntoma.

Los resultados de las variedades utilizadas como testigos concuerdan con lo esperado, siendo las variedades mejoradas INIAP-Libertad e INIAP-Josefina resistentes y la variedad nativa Chiuwila roja la de mayor susceptibilidad.

5. Discusión

De acuerdo con los resultados de Zúñiga, Molina, Cadena y Rivera (2000) los materiales con períodos de incubación largos pueden ser calificados como resistentes, mientras que los de períodos cortos pueden ser considerados como susceptibles. Los resultados del período de incubación (PI) de los genotipos evaluados en este estudio son variables, aunque el PI de *P. infestans* se mantiene dentro del promedio, ya que como lo indican Fry y Niklaus (2010), se espera que los primeros signos de infección aparezcan a partir de los 2 o 3 días de la infección. Por lo tanto, se considera que esta variable por sí sola no provee la suficiente información como para clasificar a un genotipo como resistente o susceptible.

Algunas condiciones como la temperatura y humedad del ambiente, desarrollo y precocidad de las plantas, dosis del inóculo, regulan la expresión de los genes tanto de la resistencia horizontal (genes menores/recesivos) como vertical (genes mayores/dominantes), manifestándose como un crecimiento lento o un apareamiento tardío de los signos de infección (Tinjacá, 2010). Como ocurrió en este en el caso de los materiales 12-4-173, 12-2-6 y 12-4-72 que fueron los de mayor período de incubación y un menor rango de crecimiento de la lesión.

La respuesta epidemiológica de un material con resistencia horizontal presenta un menor tamaño de la lesión, el aumento del período de incubación y una menor producción de esporas como lo señala Tinjacá (2010). De esta manera, para poder identificar a los genotipos resistentes es necesario evaluar su comportamiento con las cinco variables (PI, TL, RCL, PL e IE). En este experimento los materiales con un período de incubación (PI) largo fueron 12-4-173, 12-2-6 y 12-4-72, mismos que presentaron lesiones de menor tamaño (TL) que aparecieron a los 8 días, con tamaños de 154 mm², 297 mm² y 272 mm² respectivamente. De la misma manera, éstos materiales tuvieron el menor rango de crecimiento de lesión (RCL) con 24.18 mm²/d, 52.77 mm²/d y 66.83 mm²/d respectivamente, y los períodos de latencia (PL) más largos (6 -7 días). En cuanto a la intensidad de esporulación, los genotipos 12-2-6 y 12-4-72 fueron valorados como de esporulación baja, mientras que 12-4-173 fue considerado como de esporulación media. De la misma manera, el material que presentó el período de incubación más corto, el mayor tamaño de lesión

(después de Chiuila. roja), el menor período de latencia y la esporulación más alta fue el clon 12-6-29 por lo que se le considera susceptible.

De acuerdo con Vleeshouwer et.al., (1999) el tamaño de la lesión (TL) está correlacionado con el rango de crecimiento de la lesión (RCL), por lo que se esperaría que los materiales que tuvieron menor TL tengan también menor RCL. Los resultados de las tablas 5 y 7, permiten inferir que los genotipos 12-4-173 y 11-8-6 que tuvieron la menor RCL fueron los mismos que tuvieron un menor TL, mientras que los que tuvieron la mayor RCL, tuvieron el mayor TL (Chiuila Roja, 12-2-6 y Estela).

En este estudio (Tabla 7 y Tabla 12), se puede observar que los genotipos 12-4-173 y 11-8-6 que tuvieron el menor tamaño de lesión al día 8, presentaron intensidad media de esporulación (2 en la escala), superando a otros materiales, que es diferente a lo reportado por Barquero et al. (2005) quienes indican que existe una alta relación entre el tamaño del área necrosada y la intensidad de esporulación, con esta base clasifican a los materiales como resistentes o susceptibles. Esto posiblemente se deba a que en el anteriormente mencionado estudio se utilizó un aislamiento identificado que contenía 11 factores de virulencia, mientras que en esta evaluación se empleó un aislamiento tomado directamente de campo, lo que pudo afectar la expresión fenotípica de la enfermedad.

Los genotipos provenientes de los cruzamientos, 11-9 (98-11-6 x 99-11-6), 12-2 (BOM 540 x Leona negra), 12-4 (HSO 198 x Leona negra), 12-6 (BOM 532 x Leona negra) al ser evaluados presentaron una respuesta muy variable a la

enfermedad (desde altamente resistentes hasta altamente susceptibles), como se observa en las tablas 5,7,9,11 y 12. Estos resultados son similares a los descritos por (Barquero, Gómez, y Brenes, 2005). Éstas diferencias posiblemente se deban a una resistencia específica de los genotipos, la cual se puede determinar a través de un mapeo genético y considerando la especificidad de la raza de *P. infestans* que se use para la evaluación. Como lo mencionan Niks y Lindhout (2004) ,cuando se evalúa la progenie del cruzamiento de parentales con diferentes niveles de resistencia parcial, observándose una segregación de la distribución continua de los niveles de infección, lo que implica que la herencia de los genes de resistencia no siempre es poligénica.

Los genotipos INIAP-Libertad, INIAP-Josefina, INIAP- Raymipapa, 11-9-108, 12-4-145 presentaron una reacción de hipersensitividad al inóculo de *P. infestans* (Tabla 13). Aunque esta reacción se considera como resistencia vertical, estudios realizados por Mosquera et al. (2008), indican que la resistencia genética no está dada únicamente por los genes mayores, sino por regiones dentro del genoma que están involucradas en ambos tipos de resistencia, por lo que establecer que un genotipo posee resistencia horizontal o vertical necesita estudios genéticos más avanzados.

En las evaluaciones se pudo observar que los materiales 11-9-106, 11-9-133,11-9-112 y 14-9 -56 no presentaron síntomas de la enfermedad durante el tiempo de evaluación, pudiendo llevar a inferir que los materiales son resistentes. Sin embargo, y de acuerdo a lo planteado por Sharma, Forbes, Manandhar, Shrestha y Thapa (2013), estos materiales deberían ser

considerados como materiales de resistencia indeterminada, hasta que puedan ser evaluados con aislados compatibles, considerando que el aislado con el que estos genotipos fueron evaluados no está identificado genéticamente.

6. Conclusiones y Recomendaciones

6.1. Conclusiones

De los 28 genotipos de papa estudiados, existieron distintos niveles de resistencia entre ellos.

Los genotipos 14-9-56, 11-9-112, 11-9-133 y 11-9-106 pueden ser considerados de resistencia indeterminada al no haber presentado síntomas de la enfermedad en el tiempo de evaluación, con este aislamiento.

Los genotipos INIAP-Libertad, INIAP-Josefina, INIAP-Raymipapa, 11-9-108, 12-4-145 presentaron una reacción de hipersensitividad al inóculo de *P. infestans*, por lo que pueden ser considerados resistentes.

Los genotipos 12-4-173, 12-2-6 y 12-4-72 tuvieron el período de incubación más largo, el menor tamaño de lesión, menor rango de crecimiento de la lesión y el período de latencia más largo, por lo que se los puede categorizar como resistentes, mientras que el genotipo 12-6-29 fue el que tuvo mayor tamaño de lesión, mayor rango de crecimiento de la lesión y mayor intensidad de esporulación, por lo que se le considera como el material más susceptible a la enfermedad.

El comportamiento de las variedades INIAP-Libertad (resistente) y Chiwuilá roja (susceptible) fue el esperado.

Si el inóculo de la enfermedad se toma directamente de campo es importante considerar que el aislamiento sea realizado a partir de una sola lesión de la planta y sea purificado en el laboratorio para evitar una mezcla de razas de *P. infestans* y la contaminación con otros patógenos que pueden estar presentes en campo y que interferirán con los resultados.

6.2. Recomendaciones

Los materiales que presentaron resistencia en el laboratorio deberán ser evaluados en campo, para verificar la respuesta a la enfermedad.

Con los resultados de los ensayos en campo se debería realizar una correlación entre variables a fin de conocer si existe una alta correlación de respuesta con los resultados de laboratorio.

Los programas de mejoramiento genético de papa deberían evaluar a los genotipos en laboratorio con una sola raza compleja de *P. infestans* identificada genéticamente.

REFERENCIAS

- Abou-Taleb, E., Aboshosha, S., El-Sherif, E., & El-Komy, M. (2010). Genetic diversity among late blight resistant and susceptible potato genotypes. *Saudi Journal of Biological Sciences* , 17 (1) :133-138. doi:10.1016/j.sjbs.2010.02.006.
- Alor, N. (2015). Caracterización de *Phytophthora infestans* y mejora genética para la resistencia en patata.(Tesis doctoral). *Universitat de Lleida*.
- Baldelomar, M., Gabriel, J., Veramendi, S., Terán, A., & Plata, G. (2015). Correlación fenotípica y genotípica-molecular de la resistencia a enfermedades en variedades mejoradas de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of the Selva Andina Research Society* , 6 (2): 36-50 . Recuperado el 6 de abril de 2018 de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2072-92942015000200002.
- Barquero, M., Gómez, L., & Brenes, A. (2005). Resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en clones promisorios de papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 29 (3):31-45 ISSN:0377-9424 / 2005.
- Bravo, J. (2011). Programación y Planificación de las Operaciones de Cultivo en Horticultura. *Foro de Agroecología y Biodiversidad en Canarias* (págs. 1-22). Canarias: Gobierno de Canarias.
- Covarrubias, O., Hinojosa, M., & López, R. (2016). Comparación de la resistencia horizontal y vertical contra el tizón tardío de la papa en

Toluca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(4): 755-766

URL:<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263146721003>.

Cuesta, X., Rivadeneira, J., & Monteros, C. (2015). *Mejoramiento Genético de papa: conceptos, procedimientos, metodologías y protocolos*. Quito: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.

Escallón, R., Ramírez, M., & Núñez, C. (2005). Evaluación del potencial de rendimiento y de la resistencia a *Phytophthora infestans* (Mont. de Bary) en la colección de papas redondas amarillas de la especie *Solanum phureja* (Juz. et Buk.). *Agronomía Colombiana*, 23 (1): 35-41.

FAO. (2014). *FAOSTAT*. Datos sobre alimentación y agricultura. Recuperado el 2 de agosto de 2018 de <http://www.fao.org/faostat/es/?#data/QC>

Forbes, G. (1997). Manual for Laboratory Work on *Phytophthora infestans*. En *CIP Training Manual*. Quito: International Potato Center CIP.

Fry, W., & Niklaus, G. (2010). Introducción a los Oomicetes. *The Plant Health Instructor*, DOI:10.1094/PHI-I-2012-0220-01.

Gabriel, J., Fernández, S., Plata, G., & Siles, M. (2011). Niveles de resistencia al tizón tardío en clones de papa del Centro Internacional de la Papa (CIP) evaluados en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la Papa*, Vol 16.No 1 127-141.

Gabriel, J., Veramendi, S., Pinto, L., Pariente, L., & Angulo, A. (2016). Asociaciones de marcadores moleculares con la resistencia a

enfermedades, caracteres morfológicos y agronómicos en familias diploides de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18 (1): 17-32. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57712>.

Gliessman, S. (2002). *Las Plantas y los Factores Ambientales*. Turrialba: CATIE.

Haverkort , A., Boonekamp, P., Hutten, R., Jacobsen , E., Lotz, L., Kessel, G., . . . Visser, R. (2016). Durable Late Blight Resistance in Potato Through Dynamic Varieties Obtained by Cisgenesis: Scientific and Societal Advances in the DuRPh Project. *Potato Research*, 59 (1) :35-66 DOI:10.1007/s11540-015-9312-6.

Hwang, Y., Wijekoon, C., Kalischuk, M., Johnson, D., Howard, R., Prüfer, D., & Kawchuk, L. (2014). Evolution and Management of the Irish Potato Famine Pathogen *Phytophthora infestans* in Canada and the United States. *American Journal of Potato Research*, 91 (1):579-593 DOI 10.1007/s12230-014-9401-0.

INIAP- Programa Nacional de Raíces y Tubérculos, rubro papa. (2013). *Manual del cultivo de papa para pequeños productores*. Quito: INIAP.

Kim, H., Lee, H., Jo, K., Mortazavian , M., Huigen, D., Evenhuis, B., . . . Vossen, J. (2012). Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and MaR9 is conferred by multiple stacked R genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 124 (1) :923-935 Doi: <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1757-7>.

- Michalska, A., Sobkowiak, S., Flis, B., & Zimnoch-Guzowska, E. (2016). Virulence and aggressiveness of *Phytophthora infestans* isolates collected in Poland from potato and tomato plants identified no strong specificity. *Plant Pathology*, 144:325 Doi:<https://doi-org.bibliotecavirtual.udla.edu.ec/10.1007/s10658-015-0769-6>.
- Ministerio de Agroindustria. (2017). *Mercado Externo de la Papa*. Buenos Aires. Argentina: Presidencia de la Nación Argentina.
- Monteros, A. (2016). *Rendimientos de Papa en el Ecuador. Primer Ciclo 2016*. . Quito, Ecuador: Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca.
- Mora, E., Llerena, G., & Reinoso, I. (2010). *Conozca las enfermedades del cultivo de la papa que se encuentran en el suelo y sus formas de control*. Quito: INIAP Estación Experimental Santa Catalina.
- Mosquera, T., Fernández, C., Martínez, L., Acuña, A., & Cuéllar, D. (2008). Genética de la resistencia de la papa (*Solanum tuberosum*) a patógenos. Estado de arte. *Agronomía Colombiana*, 26(1):7-15 URL:<https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/13911/14626>.
- Niks, R., & Lindhout, W. (2004). *Curso sobre Mejoramiento para Resistencia a Enfermedades y Plagas*. The Netherlands: Wageningen University.
- Pérez, W., & Forbes, G. (2008). *Manual Técnico El Tizón Tardío de la Papa*. Lima: Centro Internacional de la Papa (CIP).

- Plinch, J., Tatarowska, B., Milczarek, D., Zimnoch-Guzowska, E., & Flis, B. (2016). Relationships between race-specific and race-non-specific resistance to potato late blight and length of potato vegetation period in various sources of resistance. *Field Crops Research*, 196(1):311-324 Doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2016.04.0330378-4290/>.
- Pumisacho, M., & Sherwood, S. (2002). La Papa en Ecuador. En *El Cultivo de la Papa en Ecuador* (págs. 21-31). Quito: INIAP-CIP.
- Robinson, R. (2000). *Retorno a la Resistencia Fitomejoramiento para Dependier Menos de los Plaguicidas*. Montecillo : Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados SAGAR.
- Rodríguez, L. E. (2010). Origen y Evolución de la papa cultivada. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 28, (1), 9-17 Recuperado el 27 de marzo de 2018 de <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v28n1/v28n1a02.pdf>.
- Román et al. (2015). Resistencia a Phytophthora infestans linaje clonal EC-1 en Solanum tuberosum mediante la introducción del gen RB. *Revista peruana de biología*, 22(1) : 063-070 DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v22i1.11122>.
- Román, M., & Hurtado, G. (2002). Guía Técnica Cultivo de La Papa. San Salvador: CENTA.
- Rubio, O., Cadena, M., & Flores, R. (2016). Comparación de la resistencia horizontal y vertical contra el tizón tardío de la papa en Toluca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* , 7,(4),755-766.

Recuperado el 30 de marzo de 2018 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263146721003>.

- Schoina, C., & Govers, F. (2015). The Oomycete *Phytophthora infestans*, the Irish Potato Famine Pathogen. En B. Lugtenberg, *Principles of Plant-Microbe Interactions* (págs. 371-378). Springer, Cham.
- Sharma, B., Forbes, G., Manandhar, H., Shrestha, S., & Thapa, R. (2013). Determination of resistance to *Phytophthora infestans* on Potato Plants in field, laboratory and greenhouse conditions. *Journal of Agricultural Science* , 5 (5): 148-157 doi:10.5539/jas.v5n5p148 .
- Silva, B., Jaramillo, S., & Marín, M. (2009). Caracterización Genética de Aislamientos de *Phytophthora Infestans* en las Zonas Productoras de papa de los Departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y el Norte de Santander (Colombia). *Actualidades Biológicas*, 31 (90):5-20. Recuperado de el 15 de mayo de 2018 de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-35842009000100001&lng=en&tlng=es.
- Sun, K., Wolters, A., Vossen, J., Rouwet, M., & Loonen, A. (2016). Silencing of six susceptibility genes results in potato late blight resistance. *Transgenic Res*, 25:731-742 DOI:10.1007/s11248-016-9964-2.
- Tapan, M., Tufail, B., Abeer, H., & Elsayed, A. (2017). Systems biology approach in plant abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* , 121 (2017) 58-73
Doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.10.019>.

- Tinjacá, S. (2010). *Estudios de la heredabilidad de la resistencia horizontal a phytophthora infestans (Mont.) de Bary causante de la "gota" en la especie diploide de papa Solanum phureja Juz. et Buk.* Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Vleeshouwers, V., Van Dooijeweert, W., Keizer, P., Sijpkens, L., Govers, F., & Colon, L. (1999). A laboratory assay for Phytophthora infestans resistance in various Solanum species reflects the field situation. *European Journal of Plant Pathology*, 105:241-250.
- Whisson, S., Boevink, P., Wang, S., & Birch, P. (2016). The cell biology of late blight disease. *Current Opinion in Microbiology*, 34:127-135
Doi:<https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.09.002>.
- Zúñiga, L., Molina, J., Cadena, A., & Rivera, A. (2000). Resistencia al Tizón Tardío de la Papa (Phytophthora infestans) en Cruzamientos de Cultivares y Clones de Papa (Solanum tuberosum L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18 (1): 1-9
doi:<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61218101>.

ANEXOS



Anexo 1. Lesiones como la que se muestran en la imagen son las que se tomaron de un ensayo enfermo con tizón tardío en campo, en Santa Catalina- INIAP. Al tener una sola lesión, se puede asegurar que el aislamiento tenga una menor mezcla de razas de *P. infestans*.

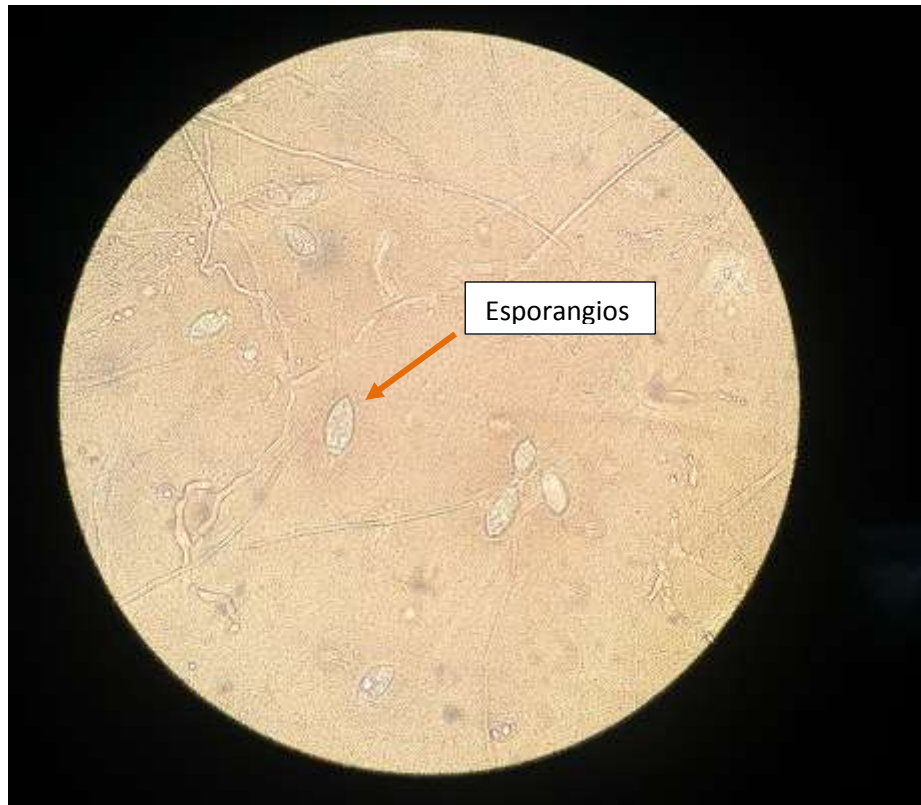


Anexo 2. Cajas Petri con los folíolos inoculados en el cuarto de incubación. Se puede observar que los folíolos presentan diferencias en los síntomas de la enfermedad.



Anexo 3. Cámara húmeda para reactivación del aislamiento. Se inocula con el aislamiento que estuvo almacenado en cajas Petri a hojas de Superchola. Las lesiones empiezan a tornarse negras en los puntos de inoculación por la necrosis del tejido, posteriormente esporulan. Cuando las lesiones están esporuladas se realiza el lavado, el conteo de esporangios y el ajuste del

inoculo a la cantidad prevista para el ensayo. (Laboratorio de protección vegetal).



Anexo 4. Es necesario comprobar la presencia de esporangios con el microscopio. En la imagen se observan los esporangios, limoniformes y ovalados.



Anexo 5. Genotipo12-6-29, más susceptible. (Día 8)



Anexo 6. Variedad nativa Chiwuala roja, testigo susceptible a la enfermedad. (Día 8)



Anexo 7. Genotipo 12-4-173, resistente. (Día 8)



Anexo 8. Variedad mejorada INIAP-Libertad, testigo resistente. (Día 8)

