

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN SIMON
FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS, PECUARIAS,
FORESTALES Y VETERINARIAS
“DR. MARTIN CARDENAS”



CARACTERIZACION FENOTIPICA DE AISLAMIENTOS DE *Phytophthora infestans* DE LAS PRINCIPALES ZONAS PRODUCTORAS DE SEMILLA DE PAPA DEL DEPARTAMENTO DE COCHABAMBA

**TESIS DE GRADO PARA OBTENER EL
TITULO DE INGENIERO AGRONOMO**

CARMEN GANDARILLAS SALAZAR

COCHABAMBA – BOLIVIA 2012

C445

Índice

i.	Lista de Cuadros.....	vi
ii.	Lista de Figuras.....	vii
I.	INTRODUCCION.....	1
1.2.	Objetivo General	4
1.2.1	Objetivos Específicos.....	4
II.	REVISION BIBLIOGRAFICA	5
2.1.	La papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	5
2.1.1.	Historia de la papa	5
2.1.2.	Origen de la papa.....	5
2.1.3.	Taxonomía de la papa	6
2.1.4.	Zonas de Producción	7
2.1.5.	Factores limitantes para la producción de papa	8
2.2.	Generalidades	8
2.2.1.	El tizón tardío (<i>Phytophthora infestans</i>).....	8
2.2.2.	Distribución Geográfica de <i>Phytophthora infestans</i>	8
2.2.3.	Importancia Económica de la Enfermedad	10
2.3.	Origen del Patógeno <i>Phytophthora infestans</i>	11
2.4.	Migraciones del Patógeno	12
2.4.1.	Implicancias de la Migración	14
2.5.	Nivel de Complejidad	15
2.6.	Organismo Causal	18
2.7.	Características Generales de (<i>Phytophthora infestans</i>).....	18
2.8.	Ciclo de la enfermedad.....	21
2.9.	Reproducción	23
2.9.1.	Reproducción Asexual.....	23
2.9.2.	Reproducción Sexual.....	24
2.10.	Sintomatología.....	25

2.10.1. Síntomas en hojas	25
2.10.2. Síntomas en tallo	26
2.10.3. Síntomas en tubérculos.....	27
2.10.4. Condiciones de clima para la enfermedad.....	27
2.11. Interacción hospedero patógeno	28
2.12. Formas de Control.....	29
2.12.1. Control Agronómico	30
2.12.2. Control Químico	30
2.13. Resistencia a Fungicidas	31
2.14. Control por Resistencia	32
2.15. Resistencia.....	32
2.16. Expresión de Resistencia.....	33
2.17. Componentes de la Resistencia	34
2.18. Mecanismos de Resistencia	34
2.18.1. Resistencia Morfológica	35
2.18.2. Resistencia Funcional.....	35
2.18.3. Resistencia Fisiológica	35
2.18.3.1. Fitoalexinas	36
2.19. Tipos de Resistencia.....	37
2.19.1. Resistencia Vertical.....	37
2.19.1.1. Relación de gen a gen.....	39
2.19.1.2. Virulencia	39
2.19.1.3. Avirulencia.....	40
2.19.2. Resistencia Horizontal.....	41
2.19.2.1. Mecanismos de Resistencia Horizontal.....	43
2.20. Niveles de Resistencia.....	43
2.20.1. Susceptibilidad.....	43
2.20.2. Resistencia	44
2.20.3. Inmunidad.....	44

2.21. Evaluación de la Resistencia	46
2.22. Origen de la variación genética en hongos.....	46
2.23. Variabilidad genética	47
2.23.1. Variación genética en poblaciones de patógenos.....	48
2.24. Estructura de poblaciones en patógenos.....	48
2.24.1. Métodos de detección de variabilidad genética en poblaciones de hongos.....	50
2.25. Análisis de virulencia	50
2.26. Razas fisiológicas.....	52
2.27. Variedades Diferenciales.....	53
III. MATERIALES Y METODOS.....	55
3.1. Localización	55
3.1.1 Laboratorio	57
3.2. Materiales	57
3.2.1. Material vegetal	57
3.2.2. Material de laboratorio	57
3.2.3. Otros Materiales.....	58
3.3. Materiales de invernadero	59
3.3.1. Insumos químicos	59
3.4. Material de escritorio	59
3.5. Metodología.....	60
3.5.1. Zonas de recolección de Tizón tardío	60
3.5.2. Recolección de aislamientos.....	61
3.6. Procesamiento de los aislamientos	62
3.6.1. Propagación de aislamientos	62
3.6.2. Aislamiento y purificación en medios de cultivo	65
3.7. Caracterización fenotípica.....	66
3.7.1. Estructura de razas.....	66
3.7.1.1 Propagación in vitro	67
3.7.1.2. Aclimatación de plantas in vitro	68

3.7.1.3. Siembra de diferenciales.....	68
3.7.1.4. Preparación del inóculo	69
3.7.1.5. Obtención de folíolos	69
3.7.1.6. Inoculación	70
3.7.1.7. Evaluación	70
3.7.1.8. Estimación de la diversidad genética	71
3.7.2. Prueba de resistencia al metalaxyl	72
3.7.2.1. Preparación del ingrediente activo	72
3.7.2.2. Evaluación.....	73
IV. RESULTADOS	75
4.1. Colección de aislamientos de <i>P. infestans</i>	75
4.2. Caracterización fenotípica	77
4.2.1. Estructura de razas	77
4.2.2. Resistencia al metalaxyl	81
V. CONCLUSIONES	86
VI. RECOMENDACIONES	87
VII. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	88

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Producción, superficie y rendimientos de papa por departamento 2008-2012	7
Cuadro 2. Número de genes de virulencia por aislamiento	16
Cuadro 3. Número de genes de virulencia por aislamiento (nivel de complejidad).....	17
Cuadro 4. Clasificación de resistencia horizontal	43
Cuadro 5. Diferencias entre la resistencia vertical y la horizontal	45
Cuadro 6. Características fundamentales de las zonas de recolección.....	55
Cuadro 7 Municipios, Localidades de recolección de aislamientos	60
Cuadro 8. Lista de los diferenciales de raza para <i>P. infestans</i>	67
Cuadro 9. Descripción de los tratamientos para resistencia al metalaxyl.....	73
Cuadro 10. Colección de aislamientos de <i>P. infestans</i>	76
Cuadro 11. Estructura de razas de aislamientos de <i>P. infestans</i>	79
Cuadro 12. Frecuencia e índice de diversidad genética.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micelio sin septas (m) y esporangios limoniformes y elipsoidales	20
Figura 2. Ciclo de la enfermedad de tizón tardío	22
Figura 3. Síntomas de <i>P. infestans</i> en una hoja.....	26
Figura 4. Mapa de recolección de <i>P. infestans</i>	56
Figura 5. Cajas petri traídas de campo	62
Figura 6. Procedimiento para multiplicación de <i>P. infestans</i>	63
Figura 7. Esporangios de <i>P. infestans</i> visto al microscopio.....	64
Figura 8. Multiplicación de <i>Phytophthora infestans</i> en rodajas de papa.....	65
Figura 9. Colonias puras establecidas en medio de cultivo jugo V8.....	66
Figura 10. Diferenciales en invernadero de aclimatación.....	68
Figura 11. Forma de evaluación en cajas petri.....	74
Figura 12. Comparación de las dos evaluaciones en resistencia al metalaxyl de la localidad de Lope Mendoza	74
Figura 13. Comparación de las dos evaluaciones en resistencia al metalaxyl de la localidad de Independencia-Morochata.....	81
Figura 14. Comparación de las dos evaluaciones en resistencia al metalaxyl de la localidad de Vacas- Mizque	82
Figura 15. Comparación de las dos evaluaciones en resistencia al metalaxyl de la localidad de Colomi.....	82
Figura 16. Cajas petri con los tratamientos.....	82

I. INTRODUCCION

El cultivo de papa es uno de los cultivos más importantes y difundidos a nivel mundial. En Bolivia ocupa el primer lugar entre los tubérculos cultivados con una superficie aproximadamente de 150.000 ha de cultivo e involucra aproximadamente a 265.000 agricultores en la producción de papa, lo que representa el 50% de las unidades agrícolas del país (Gabriel y Carrasco, 1998b).

Una de las enfermedades más importantes en papa es el tizón tardío causado por *Phytophthora infestans*, a nivel mundial. De acuerdo a los datos históricos, entre los años 1845 - 1846, ocurrió en Irlanda una gran epifitía de tizón causada por el Oomycetes (*P. infestans*), quien produjo una destrucción de los cultivos, que provocó hambruna en este país, por la crisis económica desatada como consecuencia. Desde allí se produjo una primera emigración de *P. infestans* hacia el resto de Europa (Montaldo 1984).

P. infestans es un patógeno heterotálico con dos tipos de apareamiento, A1 y A2. De la interacción o apareamiento de las hifas de ambos tipos puede resultar la formación de la estructura de reproducción sexual, que se denomina oospora (Alexopoulos, 1979, Erwin 1996, Gallegly 1958).

Hasta 1980 se consideraba que los dos grupos de compatibilidad sexual se encontraba restringidos a la región Central de México, ya que en la generalidad de las regiones del mundo, había sido detectado solamente el grupo de compatibilidad sexual A1, y por lo tanto, se asumía una condición clonal de las poblaciones de *P. infestans* del mundo, debido a su forma de reproducción asexual (Gallegly and J. Galindo 1958).

Sin embargo a partir de 1984 con el primer reporte en Europa (Suiza) del grupo de compatibilidad sexual A2 de *P. infestans* y la formación de oosporas, en diferentes países productores de papa en el mundo se realizan investigaciones sobre poblaciones de *P. infestans*. Casi cada década después, mediante varios reportes se demuestra que el grupo de

apareamiento sexual A2 de *P. infestans*, se encuentran diseminado en diferentes países de Europa, Asia, Norte América y Sud América. Las nuevas poblaciones caracterizadas por la presencia de nuevos genotipos, mayor agresividad y resistencia al metalaxyl son cada vez más dominantes en diferentes partes del mundo (Cohen 1997, Dreth 1993, Dreth 1994, Fry 1992, Goodwin 1994, Hohl 1984, Koh 1994).

Esta nueva situación mundial de *P. infestans*, que implica mayor complejidad en el manejo de la enfermedad es considerada como una nueva amenaza para el cultivo de la papa en el mundo, debido a que la presencia de ambos grupos de compatibilidad sexual, A1 y A2, implican la reproducción sexual del hongo, y por tanto, la formación de nuevos individuos y poblaciones con amplia variabilidad genética. De este modo, se explica la ocurrencia de nuevas poblaciones más virulentas, que rompen la resistencia de variedades con resistencia de genes R y son resistentes a fungicidas, como el metalaxyl (Dreth, 1993, CIP, 1996, Fry 1997, Georgopoulos 1986, Gisi 1996, Matuszak 1994, Masayasu 1997).

La diseminación de los aislamientos de ambos y tipos de compatibilidad (A1 y A2) y su consecuente unión para formar estructuras sexuales, han dado lugar a la aparición de aislamientos más agresivos tanto del grupo A1 como del A2, (Torres, 2008) lo cual favorece el desarrollo de nuevas poblaciones de *P. infestans*. Como consecuencia de la gran variabilidad se han desarrollado también aislamientos que presentan mayor resistencia a fungicidas (Filer and Turkensteen, 1999; Gavino et al., 2000; Goodwin et al., 1995 b). Dificultándose el control de la enfermedad y haciéndolo más costoso (Matuszak et al., Fernandez-Pavia et Al., 2005; Garay-Serrano, 2005).

De acuerdo con Dreth y Govers (1994), los marcadores usados para caracterizar la diversidad genética de poblaciones de *P. infestans* son: marcadores biológicos (tipo de compatibilidad y sensibilidad a fungicidas), marcadores neutrales y marcadores citoplasmáticos. Estos marcadores han permitido la identificación de aislamientos distintos en una población, producto de un organismo que tiene la posibilidad de reproducirse sexual y asexualmente, produciendo cambios poblacionales que pueden ser introducidos a otras regiones por procesos de migración.

Según (Oyarzun 1997), los países vecinos de Bolivia tienen el tipo de apareamiento A1 y A2, así como Perú con el A1, México con el A1 y A2, en Colombia el A2, Ecuador A2, Argentina se encuentra el A2, Brasil el A1 y A2 pero en nuestro país solo está registrado el A2. (Fry 1992, French 1994, Goodwin 1994, Plata 1990).

En los últimos años se ha registrado que el fungicida Ridomil, no tiene ningún efecto de control en algunas zonas productoras de semilla de papa. Por ejemplo Escalante (Lope Mendoza, provincia Carrasco, Cochabamba). (Comunicación Coca Morante 2011).

Debido a la importancia del manejo del tizón, la caracterización fenotípica, razas y resistencia al metalaxyl, pueden proporcionar información científica sobre el estado del patógeno en Bolivia y considerando la importancia de conocer los cambios de la estructura genética de la población de *P. infestans* en Cochabamba, que tiene relación con la epidemiología y manejo de la enfermedad se plantearon los siguientes objetivos:

1.2. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la caracterización fenotípica de aislamientos de (*Phytophthora infestans*) de las principales zonas productoras de papa del Departamento de Cochabamba.

1.2.1. Objetivos específicos

- Determinar la estructura de razas de *P. infestans* de las zonas productoras de papa del departamento de Cochabamba utilizando diferenciales.
- Evaluar la resistencia al metalaxyl, en aislamientos de *P. infestans* del departamento de Cochabamba.

1.3. Hipótesis

Ho: La caracterización fenotípica de los aislamientos de *P. infestans* es la misma en todas las zonas productoras de semilla de papa del departamento de Cochabamba.

0435

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 La papa (*Solanum tuberosum*)

2.1.1. Historia de la papa

La papa era conocida en América desde hace 10500 años (Engel, F. 1970); su domesticación y cultivo han ocurrido en fecha posterior.

Junto al cultivo de la papa surgió en Perú la primera agroindustria americana: la fabricación de la papa seca o chuño, que es una manera de conservar el tubérculo, aun en uso de esas regiones.

De acuerdo a Aguado (1946) el conquistador español Jiménez conoció la papa en 1537, en los lindes de la confederación muisca, Colombia.

2.1.2. Origen de la papa

De Candolle, al referirse al origen de la domesticación de la papa, le asignó una antigüedad desconocida. Sin embargo tanto él como Vavilov, no duraron sobre la enorme antigüedad del comienzo de su cultivo. La papa ya cultivada, fue encontrada por los españoles en Colombia, Ecuador, Perú, Chile, en el capítulo XXXII de la crónica del Perú.

Otra referencia más detallada sobre la papa data de la Cordillera Oriental de Colombia, es la de Juan Castellanos, citado por Salaman y Hawkes y autor de la historia del nuevo Reino de Granada publicado en 1886. Castellanos describe la papa en los siguientes términos “Redondillas raíces que se siembran y producen un tallo con sus ramas y hojas, unas flores aunque raras de purpureo color amortiguado más o menos unas redondas y otras perlongadas son blancas y moradas harinosas raíces de buen gusto regalos de los indios”.

Las referencias anteriores, demuestran que la papa estuvo ya cultivada en muchas variedades en los países Andinos a la llegada de los españoles posiblemente en los años 1300-1400 de la era cristiana. El doctor Hawkes establece el origen de la papa en las orillas del Lago Titicaca, en un estudio denominado "La evolución de las papas cultivadas de Bolivia" Salaman y Hawkes creen en las regiones montañosas situadas entre el lago Titicaca y Cuzco tuvo como centro de origen la papa porque allí alcanza un alto índice de variación específica y varietal. Para estos mismos autores, esa región habría sido además las cunas de la agricultura Peruana basada en la papa y los tubérculos menores altas andinos o de tierra fría.

Las diferentes especies de variedades de papas que se cultiva hoy en los Andes de Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia han debido originarse de las domesticación de varias especies silvestres porque presentan diferentes morfológicas y citogenéticas notables.

Se ha especulado mucho en últimos años sobre el origen de la papa, que comprende varias especies de constitución genética y probablemente también de origen diferente, se conoce varias especies diploides, una triploide, un tetraploide y otra pentaploide entre nuestras papas cultivas. (Cárdenas)

2.1.3. Taxonomía de la papa

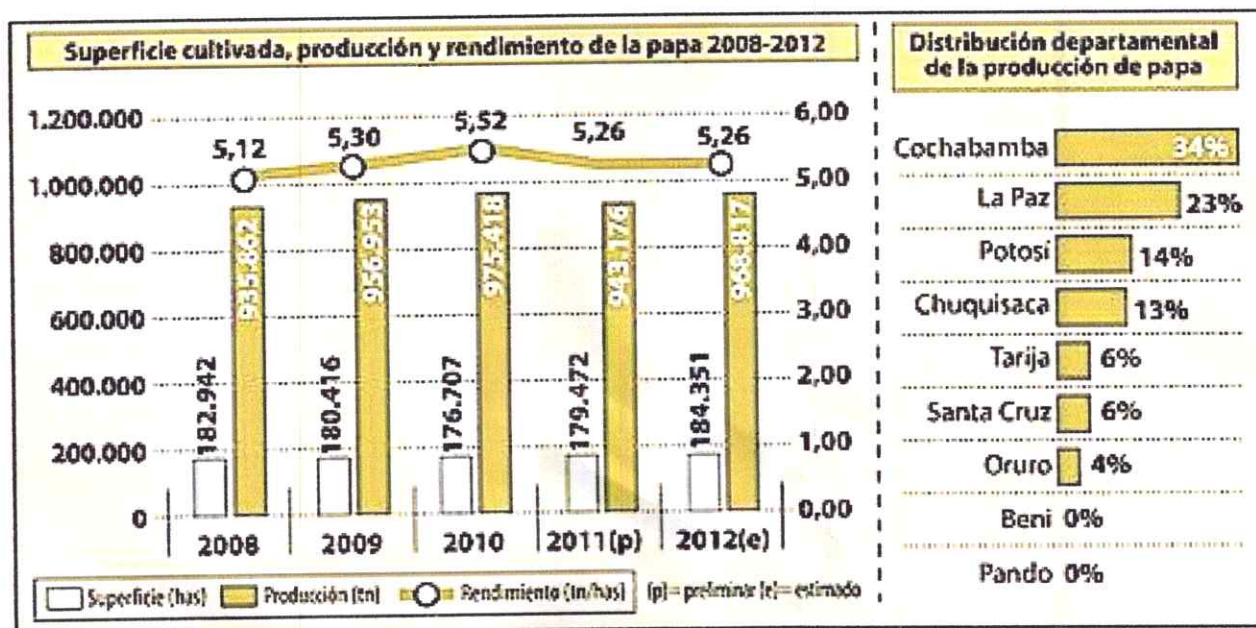
Reino: Vegetal
División: Fanerogama
Clase: Dicotiledoneas
Orden: Tubiflorineas
Familia: Solanaceae
Género: Solanum L.
Sección: Petota Dumortier
Especie: *Solanum tuberosum*

433

2.1.4. Zonas de producción:

La producción de papa en Bolivia se localiza principalmente en el Altiplano y los Valles cuyas altitudes fluctúan entre 2000-4000 msnm. (PROINPA y PROSEMPA, 1990). Se cultivan diversas variedades de las ocho especies nativas que cubren cerca del 97 % del área total, el 3% corresponde a los Valles meso térmicos y llanos donde se cultivan variedades de la subespecie *tuberosum*. En años normales el 60 % de la producción anual proviene de siembras de verano sin riego de auxilio, el 40 % proviene de los cultivos en zonas húmedas sin heladas y de siembras invernales con riego de los Valles y llanos. Cerca del 70 % de la producción se consume en estado fresco, el 10 % en forma de chuño y el restante 20 % se destina para semilla. (Lujan, 1987).

Cuadro 1. Producción, superficie y rendimientos de papa por departamento 2008-2012.



Fuente: Ministerio de desarrollo y tierras

0432

2.1.5. Factores limitantes para la producción de papa

El cultivo de la papa tiene una serie de problemas, particularmente los cultivares comerciales tienen que ser protegidos necesariamente contra muchos tipos de plagas y enfermedades (Fuentes y Watson, 1995). La incidencia de las enfermedades en la producción puede alcanzar hasta un 100%, tal el caso de la enfermedad causada por (*Phytophthora infestans*) en Morochata (Cochabamba - Bolivia), en la campaña agrícola 1990 - 1991 (Trujillo Lujan 1992).

2.2. Generalidades

2.2.1. El tizón tardío (*Phytophthora infestans*)

De acuerdo a los datos históricos, entre los años 1845 - 1846, ocurrió en Irlanda una gran epifitía de tizón causada por el Oomycetes (*P. infestans*), quien produjo una destrucción de los cultivos, que provocó hambruna en este país, por la crisis económica desatada como consecuencia. Desde allí se produjo una primera emigración de (*Phytophthora infestans*) hacia el resto de Europa (Montaldo 1984).

2.2.2. Distribución geográfica de *Phytophthora infestans*

La enfermedad se presenta en casi todas las zonas donde se produce papa, barca una amplia distribución en la mayoría de los países de los cinco continentes donde se cultiva papa provocando grandes daños (Henfling, 1987; Junchaya, 1983).

Se tienen reportes de la migración de *P. infestans* de México a E.E.U.U. y de E.E.U.U. a Europa en los años 1840 introducido y diseminado en tubérculos- semilla. La dispersión del patógeno se dio en primer lugar desde Europa, por una primera migración. Se presume que existió una segunda migración del patógeno en los años 1970s desde México a Europa (Fry et al., 1993; Forbes, 1994; García, 1997).

Según Niederhauser (1991), en la Argentina fue reportada por primera vez en 1887 y los reportes para los siguientes 70 años indican ataques esporádicos en ciertas regiones, separados por intervalos de 5 a 15 años. En Brasil, se observó el tizón en 1898, presentando ataques esporádicos por lo que no se consideró como un serio problema. Sin embargo, 50 años después se observaron, severas pérdidas debidas al tizón en campos de papa no protegidos.

En Chile la presencia de la enfermedad fue verificada por primera vez en 1949 en Mallarauco, un valle al Sudoeste de Santiago (Montaldo 1984).

En Colombia la enfermedad se presenta todos los años en el cultivo con mayor o menor intensidad de acuerdo a las condiciones mayores o menores lluvias. (Ñustez, 1990).

El tizón en Bolivia, se encuentra en los departamentos de La Paz, Cochabamba, Santa Cruz, Oruro, Potosí. Chuquisaca y Tarija (PROINPA, 1996).

En Bolivia se indica que el primer reporte de tizón fue en 1943 cerca de Cochabamba y que los cultivos sobre los 3000 msnm fueron atacados algunas veces en años subsecuentes, pero que el tizón fue de poca importancia o concentrada en las tierras altas (Morales, 1994).

El tizón es endémico en Bolivia apareciendo regularmente en los valles altos entre 2800 y 3500 msnm, los que tienen alta humedad relativa. (Ellis y Aviles, 1977)

En Bolivia las zonas de mayor incidencia del tizón son: Morochata, Monte Punku, Epizana, Candelaria, Valle de Cochabamba, Escalante y Capinota (Cochabamba); Comarapa, San Isidro y Valle Grande (Santa Cruz); y las zonas bajas de los departamentos de Tarija, La Paz, Potosí, y Chuquisaca (Otazu et al., 1982).

2.2.3. Importancia económica de la enfermedad

El CIP (1992), indica que el tizón es la enfermedad económicamente más importante de la papa en Latinoamérica.

Mont Koc (1993), menciona que el ataque puede ocurrir en cualquier etapa vegetativa. Además de atacar en la parte aérea, también ataca a los tubérculos, ocasionando pérdidas en el almacén. Como consecuencia del ataque, las pérdidas, las pérdidas totales, dependiendo del estado de madurez del cultivo en el momento de registrarse el ataque, sin embargo, se ha encontrado que la mayor incidencia ocurre en la etapa de floración o cuando la planta ha tuberizado sin alcanzar su máximo desarrollo. Cuando se presenta antes de la floración la pérdida puede ser total, y de ser posterior, el resultado es una drástica disminución en el rendimiento.

Por su parte Large (1952), explica que cuando el 75% del follaje es afectado por la enfermedad, el desarrollo de tubérculos se paraliza debido a que disminuye la translocación de fotosíntesis hacia los órganos subterráneos, la razón de ello es que la función de fotosíntesis es esencial para la formación de tubérculos.

No obstante, las pérdidas varían de un área a otra y de un año a otro, dependiendo de la temperatura y humedad predominantes, así como también la virulencia y la agresividad del hongo y la susceptibilidad del hospedante. Señala además que aun cuando las pérdidas en el campo son insignificantes, los tubérculos pueden ser infectados y podrirse cuando son almacenados, transportados o vendidos en el mercado (Morales, 1994).

El tizón ocasiona pérdidas anuales estimadas en 5.3 billones de dólares en países de desarrollo (Landeo et al., 1998).

Según Estrada, et al. (1994), en Bolivia se cultivan aproximadamente 150.000 ha de papa e involucran en su cultivo a unas 40.000 familias. De ellas 20.000 ha son afectadas, por el tizón (*P. infestans*), gran parte de esas hectáreas afectadas, está destinada a la producción de semilla de los cultivares Waycha, Sani Imilla, Alpha y Desiree (Fernández -Northcote et al., 1999).

En las 20.000 ha de papa afectadas por el tizón la enfermedad ocasiona una pérdida directa de unos 30 millones de dólares/año y de 100 millones de dólares/año en rendimiento potencial. La mayor parte del área afectada se encuentra en zonas productoras de semilla, esta pérdida indirecta magnifica la importancia del tizón en Bolivia, (Fernández – Northcote et al., 1999).

2.3. Origen del patógeno *Phytophthora infestans*

Berkeley y De Bary consideran como centro de origen de *P. infestans* a los Andes de Sudamérica por ser el centro de origen primario de las papas nativas, según estos dos investigadores la enfermedad fue importada de los andes a Europa, esta teoría es respaldada por algunos investigadores. Pero surgió una segunda corriente postulando a México como centro de origen de este hongo basándose en otras evidencias más propias del patógeno que del hospedante. (Reddick, 1939).

Se considera que *P. infestans* se originó en coevolución con las papas silvestres de México, subcentro de origen de las *Solanum tuberosas*, opinión fuertemente respaldada por el hecho de haberse encontrado allí a los dos grupos de compatibilidad sexual, denominados A1 y A2, y la mayor variabilidad genética en relación a razas. Niederhauser (1992), manifiesta que *P. infestans*, se reportó en Europa y Norte América en la década de

1840 aproximadamente 300 años después de que la papa fue introducida en Europa desde Sudamérica. Por otro lado las grandes extensiones paperas andinas estuvieron en zonas muy elevadas donde *Phytophthora infestans* usualmente no prospera por ser el clima demasiado frío (French et al., 1994).

Phytophthora significa “destructor de plantas” y la especie *infestans*, es el agente que causa el tizón tardío (gota) de la papa, el cual tiene varios sinónimos. Erwin y Ribeiro (1996), hacen una amplia discusión sobre la historia de este patógeno y la enfermedad que afecta la papa.

Calderoni (1978), considera que el tizón es de origen americano (México) y que de allí se extendió al resto del mundo; el mismo autor menciona que fue Spegazzini en 1902, el que identificó la enfermedad por primera vez en Argentina.

En Chile según el INIA (1980), el tizón tardío hizo su aparición en 1950 y a partir de ese año, es la enfermedad más importante y se halla en las principales zonas productoras de papa.

2.4. Migraciones del patógeno

La primera ola migratoria de *P. infestans* consistió de uno o pocos variantes del grupo de compatibilidad sexual A1 que apareció primero en el noreste de estados Unidos en 1843. De allí continuó seguramente a través de rutas comerciales a Europa, siendo detectado en Bélgica, en Junio 1845. Cuatro meses más tarde ya se había diseminado a través de esporangios (estructuras asexuales) cientos de kilómetros en todas las direcciones. Llegó así a Irlanda causando la hambruna y la migración de sus habitantes (French et al., 1993).

No se tiene evidencias de migraciones durante el intervalo de 1840 a 1970, los reportes de poblaciones presentes en el mundo correspondían al tipo de apareamiento A1. En 1958 en

México se reportó el tipo de apareamiento A2 localizado en el valle de Toluca (Gallegly y Galindo, 1958).

La actual segunda migración del tizón aparentemente tuvo su inicio como consecuencia de dos años consecutivos de sequía en Europa, lo cual indujo a la importación de papa de varios países en otros continentes incluyendo 25000 toneladas desde México en 1976. En esta ocasión no solo llegó a Europa Occidental una variante del grupo de compatibilidad A1 de *Phytophthora infestans*, sino variantes de A2 que por ser algunos de mayor agresividad y adaptabilidad se han diseminado y han constituido una población nueva que está desplazando a la antigua población A1. En pocos años esta nueva población cruzó Europa y Asia llegando hasta Japón. Desde Europa también ha sido diseminada, probablemente a través del comercio de tubérculos – semilla al Medio Oriente, Africa, Norteamérica y Sudamérica (French et al., 1994).

Keyser (1994), indica que la reciente aparición del grupo de apareamiento A2 de laguna manera está asociada con el incremento de la resistencia a fungicidas.

A su vez Spielman et al. (1991), menciona que varias son las hipótesis que tratan de explicar la aparición del tipo de apareamiento A2:

- a. Razas A2 podrían haber emergido de laguna región donde sólo existía A2.
- b. Aislamientos A1 podrían haber mutado dando origen a aislamientos A2 luego emigraron del lugar de origen.
- c. Aislamientos A2 podrían haber estado presentes en bajas concentraciones en lugares como Europa, y fueron aumentado poco a poco a frecuencias detectables a fines de los años 70.

La nueva población del hongo es mucho más agresiva en tomate, teniendo entonces ahora *P. infestans* un hospedante alternativo efectivo (French et al., 1994).

A partir de las observaciones de los tipos de apareamiento y de los polimorfismos aloenzimáticos, Sielman et al. (1991), postularon que los dos tipos diferentes de apareamientos en poblaciones de *P. infestans* ocurridos en Europa son: pre-A2 o poblaciones "viejas" (con solo el tipo de apareamiento A1), y post-A2 o la "nueva" población (con ambos tipos de apareamiento A1 y A2). Sus datos indican que las colecciones de diferentes países contienen nuevos genotipos, están estrechamente correlacionados entre ellos, y están sustancialmente relacionados con los viejos genotipos.

También reportaron evidencias de que los patrones de distribución de genotipos en Europa no son muestras típicas de los de México Central (el cual contiene ambos tipos de apareamiento y también en igual proporción). La diversidad es mucho más alta en México Central, tal parece ser que los mayores cambios en las frecuencias genotípicas están ocurriendo o recientemente están ocurriendo en Europa, no solo en el tipo de apareamiento sino también en los patrones de aloenzimas, frecuencias de virulencia y en la resistencia a fungicidas.

2.4.1. Implicancias de la migración

Según French et al. (1994), la presencia simultánea de los dos tipos de compatibilidad sexual (A1 y A2), es prácticamente todo el mundo ya no sólo en México, permitirá la formación de oosporas. Estas oosporas difieren mucho de los esporangios asexuales los cuales tienen pocas horas de viabilidad y solo sobreviven en condiciones óptimas. Las oosporas son própagulos que sobreviven hasta campañas agrícolas posteriores (alrededor de dos años), en follaje incorporado al suelo. Su presencia tiene dos significados para la epidemiología del tizón:

1. Inicio de la infección más temprano que cuando la fuente de inóculo son los esporangios diseminados a través del aire, ya que los brotes emergentes llevarían sobre su superficie oosporas del suelo, las cuales germinarían e infectarían los tallos y hojas jóvenes.
2. Desarrollo de nuevas combinaciones genéticas producto de la recombinación sexual que da origen a las oosporas. Estos potencialmente innumerables nuevos individuos pueden dar lugar a una selección natural de variantes A1 o A2 con una mejor adaptabilidad y agresividad.

Por otro lado Fry et al. (1993), mencionan que una implicancia práctica de la migración es la sensibilidad/ resistencia al fungicida metalaxil. La resistencia al metalaxil no estaba diseminada en aislamientos que pertenecían a las “viejas” poblaciones. Actualmente es un problema como consecuencia de la migración y la selección de individuos resistentes en adición a o en lugar de la nueva mutación y selección.

2.5. Nivel de complejidad

El nivel de complejidad es el promedio de genes de virulencia por aislamiento. Hasta 1958 año en el que se reportó la presencia del tipo de apareamiento A2 en México localizado en el valle de Toluca (Gallegly y Galindo, 1958), el nivel de complejidad conocido en estos países de Europa y de América era bajo (Cuadro). El tipo de apareamiento presente en estos países era A1. Si se compara el nivel de complejidad detectado en México con el de los otros países es también bajo a pesar de haberse reportado ambos tipos de apareamiento (Fry et al., 1989).

C424

Cuadro 2. Número de genes de virulencia por aislamiento (nivel de complejidad) de *P. infestans* reportado antes de 1980 en algunos países de Europa y de América.

País	Año	Nivel de complejidad	Población	Hospedante
Europa				
Alemania Este	1981	5.0	A1	Papa
Alemania Oeste	< 1980	3.0	A1	Papa
Dinamarca	1954	3.0	A1	Papa
	1980-1981	4.0	A1	Papa
Europa	< 1969	2.0	A1	Papa
Holanda	< 1980	2.2	A1	Papa
Inglaterra, gales	1967 -1969	4.0	A1	Papa
	1970 – 1973	4.0	A1	Papa
Nueva Zelandia	<1969	2.0	A1	Papa
Polonia	1978	4.0	A1	Papa
América				
Canadá	1952-1953	1.1	A1	Papa, Tomate
	< 1969	2.0	A1	Papa
	1979 – 1991	2.0	A1	Papa
USA	1979-1991	2.0	A1 (US-1)	Papa
Perú	1983	4.0	A1	Papa
	1984-1986	1.0	A1	Papa
México	1976	4.0	A1 + A2 (Sexual)	Papa

Fuente: Plata

Después de los años 80 los reportes indican que el tipo de apareamiento A2 se ha diseminado a otras partes del mundo (Drenth, 1994; Fry et al., 1993). Con el movimiento de esta nueva población el nivel de complejidad en estos países ha aumentado (Tooley et

0423

al., 1986). Por lo tanto se tiene que en aquellos países donde se hallan presentes A1+A2 el nivel de complejidad es alto.

Cuadro 3. Número de genes de virulencia por aislamiento (nivel de complejidad) de *P. infestans*

País	Año	Nivel de complejidad	Población	Hospedante
Europa				
Alemania Este	1985	7.1	A1 +A2 Algunos A2	Papa
Alemania Oeste	1985-1990	5.0	A1 +A2 (3:1)	Papa
Francia	1991-1993	4.5-5.8	A1	Papa (tomate)
Holanda	1988	4.7	A1+A2 (7:1)	Papa
Polonia	1980 - 1990	5.5 6.5	A1 A1 + A2 (Algunos A2)	Papa
América				
México	1985-1986	6.2	A1 + A2? (sexual)	<i>Solanum spp.</i>
USA México	>1987 – 1991	7.1	A1 (US-6) (sexual)	Papa, Tomate
USA México	>1990	6.3	A2 (US-7) (sexual)	Papa, Tomate
USA México	>1990	7.4	A2 (US-8) (sexual)	Papa

Fuente Plata

2.6. Organismo causal

De acuerdo con Walker (19659; Ulloa y Hanlin (1978); Hooker (1980) y Turkensteen (1988), el tizón tardío es causado por el hongo *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary (1876), cuya ubicación taxonómica es la siguiente:

Reino:	Cromista
Clase	Oomycetes
Orden	Peronosporales
Familia	Pythiaceae
Genero	<i>Phytophthora</i> .
Especie	<i>infestans</i>

2.7. Características Generales de (*Phytophthora infestans*)

Los Oomycetes se caracterizan por formar oosporas, tienen micelio cenocítico diploide. Su ciclo de vida es mayormente diploide, la pared celular contiene predominantemente celulosa antes quitina y no tienen capacidad de sintetizar esteroides. Estas características, en combinación con la existencia de típicos cristales tubulares en los mitocondrios y por estudios filogenéticos basados en secuencias de rADN (ADN ribosomal), sugieren que los Oomycetes han coevolucionado a partir de líneas diferentes de los verdaderos hongos, por lo que se encuentran más estrechamente relacionados a los Chrysophytos (algas) que a los hongos superiores como los Ascomycetes y Basidiomycetes. (Coca Morante 1998).

Phytophthora infestans es heterotálico con dos grupos de apareamiento A1 y A2, sin embargo, la mayoría de los Oomycetes heterotálicos son bisexuales variando solamente en grados, forma esporangios en la parte terminal de las hifas o esporangioforos. Los esporangioforos pueden germinar directamente por la formación de un tubo germinativo o diferenciarse por la formación de ocho o más zoosporas biflageladas. Los flagelos permiten a las zoosporas moverse activamente en agua en cortas distancias antes de que enquisten y

germinen para iniciar la infección. Las zoosporas contribuyen a la diseminación local de la enfermedad. (Alexopoulos C.J. and Mims C. W. 1979, Erwin and Ribeiro 1996).

La mayoría de las especies de *phytophthora* son favorecidas por temperaturas bajas y alta humedad en el suelo y en la atmosfera. Estos patógenos viven y se reproducen primariamente en el suelo y atacan hospedantes susceptibles desde la parte baja o próxima al suelo. *P. infestans*, por otra parte, es algo diferente de la mayoría de las otras especies.

Es típicamente foliar con esporangios aéreos. Sin embargo, también es capaz de infectar y descomponer tubérculos en el suelo. Aunque *P. infestans* es más conocido como causante del tizón tardío de la papa (*solanum tuberosum L.*) y tomate (*Lycopersicum esculentum L.*) también infecta a un número reducido de otras solanáceas. (Alexopoulos C.J. and Mims C. W. 1979, Erwin and Ribeiro 1996).

A producción y sobrevivencia de oosporas de *P. infestans*, en condiciones naturales se ha convertido en objeto de estudio a partir de la presencia generalizada en el mundo del tipo de apareamiento A2. Las oosporas de *P. infestans*, fueron observadas en tallos, pero rara vez en hojas de papa y plantas de tomate desarrolladas en invernadero e inoculadas con mezclas de los tipos de apareamiento A1 y A2 de *P. infestans*. En Europa la formación de oosporas en hojas de papa en el campo fue reportada en Alemania y en los países bajos (Holanda e Islandia) (Cohen 1997, Drenth 1993, Drenth 1994, Shattock 1990).

Las oosporas de los hongos oomycetes en general son de dormancia endógena, tolerantes a condiciones adversas y capaces de sobrevivir por largos periodos. Las oosporas de *phytophthora fragariae*, el agente causal de la pudrición roja de la raíz de *frataria sp.*, puede sobrevivir por lo menos 3 años en el suelo. Las oosporas de *Peronospora destructor*, el agente causal de mildiú veloso de la cebolla (*Allium cepa L.*), permanece infeccioso hasta 25 años en el suelo. Las oosporas de *phytophthora cactorum*, pueden sobrevivir al menos un año en el suelo. (Drenth 1993, Erwin 1996).

0420

La sobrevivencia e infectividad de las oosporas de *P. infestans* aún no han sido estudiados en detalle. En 1969, se demostró que el suelo colectado de un campo después de dos años con un cultivo severamente afectado por *P. infestans* aun estuvo infeccioso. En experimentos de invernadero se ha demostrado que papas sembradas en estos suelos fueron infectadas en la parte baja de los tallos y en las hojas cercanas o próximas al suelo. *P. infestans* podría ser aislado de este suelo utilizando medio selectivo, lo que sugiere que las oosporas fueron responsables de la infección. (Drenth 1994).

Las oosporas de *P. infestans* son más insensibles a los fungicidas, pero completamente sensibles a tratamientos de calor (45°C). De esta manera algunas especies de *Phytophthora* (*P. cambivora*, *P. cryptogea*, *P. cinnamomi*) pueden ser controladas por solarización del suelo. La germinación asincrónica es típica de las oosporas y es más probable que incremente la sobrevivencia para asegurar una continua producción de propagulos en el suelo. A pesar de muchos estudios, los factores que afectan la germinación de las oosporas aún no son completamente conocidos (Drenth 1993, Drenth 1994, Erwin 1996).

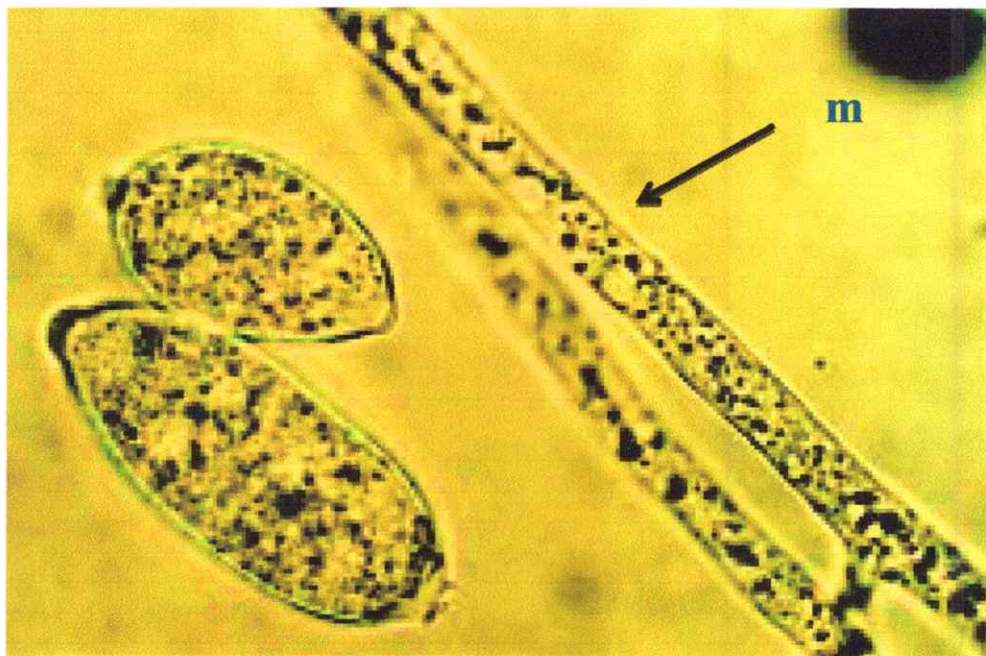


Figura 1: Micelio sin septas (m) y esporangios limoniformes y elipsoidales (Fotografía de W. Pérez)

2.8. Ciclo de la enfermedad

El ciclo de la enfermedad es una fina armonía de eficiencia en reproducción, infección, parasitismo y sobrevivencia (Colque, 1996). El hongo inverna en forma de micelio en los tubérculos de papa infectados. Este micelio se propaga en los tejidos de los tubérculos o en los retoños que se formaron a partir de los tubérculos infectados, de igual manera de las plantas voluntarias (remanentes), desarrolladas a partir de tubérculos enfermos abandonados en el campo, el micelio se propaga e invade el tallo, dando como resultado la decoloración y el colapso de las células de esa zona. Cuando el micelio alcanza las partes aéreas de la planta, forma esporangios formados sobre los esporangióforos que emergen a través de los estomas de las hojas y tallo. Los esporangios formados sobre los esporangióforos se desprenden y son diseminados por la lluvia o por el aire, cuando han llegado a la madurez.

Al depositarse sobre las hojas o tallos húmedos de nuevas plantas, los esporangios germinan y producen nuevas infecciones y al cabo de unos días después, emergen nuevos esporangióforos a través de los estomas siendo diseminados a otras plantas. En una sola estación se producen numerosas generaciones asexuales del hongo (Agrios, 1995).

C418

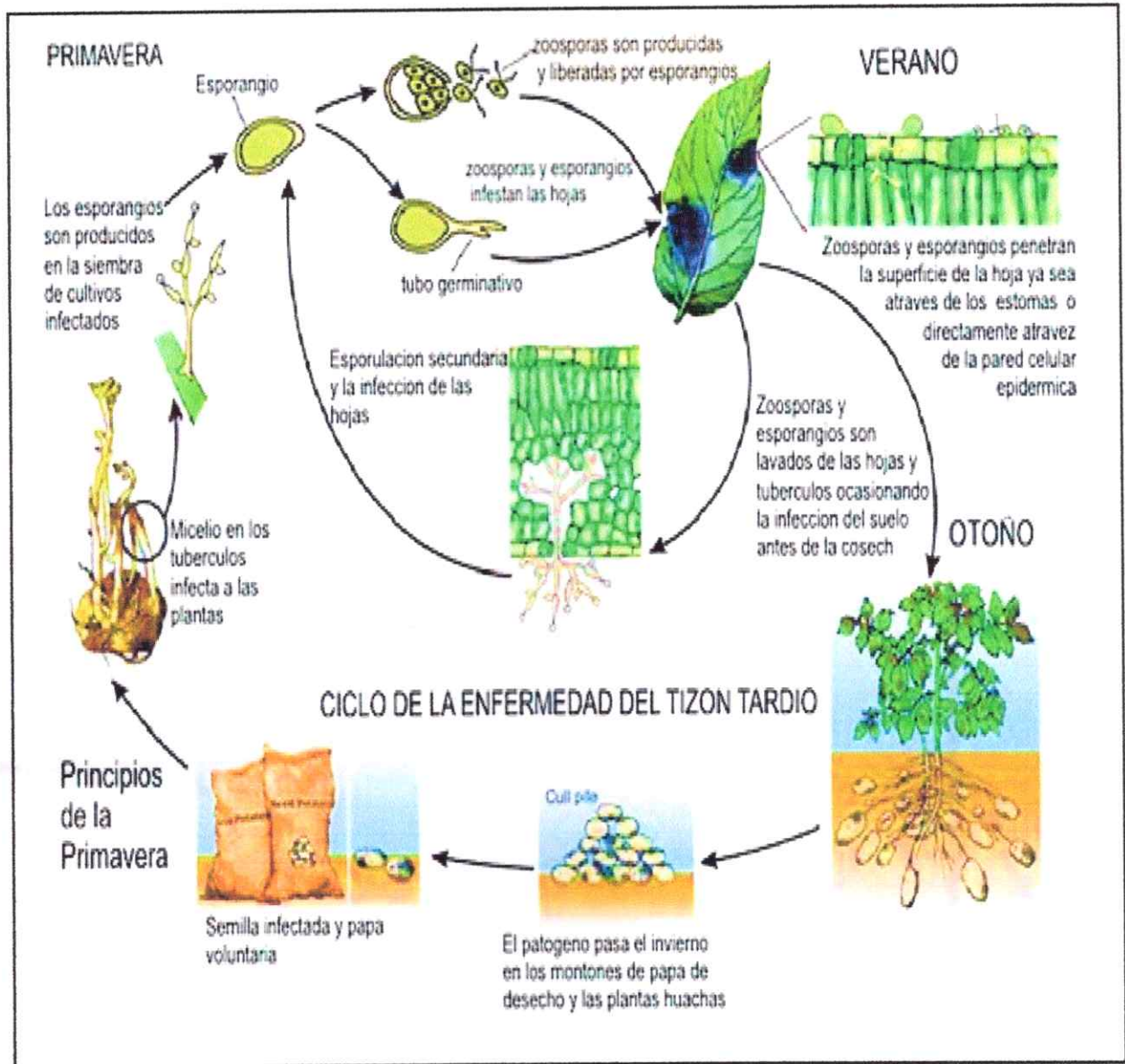


Figura 2: Ciclo de la enfermedad de tizón tardío reproducido por Agrios 2001

C4:7

2.9. Reproducción

2.9.1. Reproducción Asexual

Entre tres días después de la infección, según las condiciones ambientales, los órganos portadores de esporas (esporangioforos) emergen a través de estomas en la superficie de las hojas, como los estomas son más frecuentes en el envés que en el haz de la hoja, la esporulación en el envés es más abundante que en la superior (Henfling, 1987).

Los zoosporangios (esporangios o conidias), se desarrollan en el extremo de los esporangioforos; cuando están maduros, estos se desprenden fácilmente y son diseminados por el viento. La mayoría de las esporas caen a los pocos metros, sin embargo pueden llegar a recorrer distancias de más de 30 Km. El tamaño de los zoosporangios se encuentra justo debajo del límite de detección del ojo humano. Su forma se parece a la de un limón (Henfling, 1987).

Los zoosporangios puede germinar directa e indirectamente a temperaturas por encima de 20°C (la óptima es 24 °C). Un zoosporangio se comporta como una simple spora; forma un tubo germinativo que puede entrar en el tejido de una planta. Los zoosporangios germinan directa e indirectamente a temperaturas de 12-16°C cada esporangio desprende 10-20 esporas móviles (zoosporas). Activadas por dos flagelos las zoosporas permanecen móviles durante un tiempo que varía de algunos minutos a varias horas. Bajo ciertas condiciones pierden los flagelos, forman una pared celular y a continuación un tubo germinativo (Henfling, 1987).

En las hojas y en los tallos los tubos germinativos pueden penetrar directamente en la epidermis de la planta (no se requieren estomas). En los tubérculos, los tubos germinativos penetran a través de lenticelas o de lesiones. Como el hongo no puede sobrevivir un tiempo prolongado fuera del tejido hospedante, los zoosporangios o zoosporas mueren si no encuentran un tejido hospedante apropiado (Henfling, 1987).

2.9.2. Reproducción sexual

Hasta 1984, el estado sexual de *P. infestans* solo había sido señalado en México y partes de Centro América. Publicaciones más recientes informan sobre su ocurrencia en otras partes del mundo, especialmente en el este de Europa (Fry et al., 1993).

Cuando los micelios de diferentes tipos de hongo, llamados tipos de apareamiento A1 y A2 crecen junto. Uno de ellos puede formar células masculinas (anteridios) y las otras células femeninas (oogonios). El oogonio crece a través del anteridio, permitiendo la fertilización. El oogonio fertilizado se convierte en una espora de descanso de paredes gruesas (oospora). Las oosporas a diferencia de los zoosporangios y las zoosporas, pueden resistir a condiciones desfavorables, como sequías y bajas temperaturas (Henfling, 1987).

La formación de oosporas ayuda a *P. infestans* y las especies afines a sobrevivir en condiciones adversas como invierno. Periodos secos y ausencia de hospederos. Las oosporas de *P. infestans* germinan mediante la formación de un esporangio que es similar a los descritos en la reproducción asexual. Después de reproducirse la infección en un hospedero, las zoosporas resultantes pueden iniciar un nuevo ciclo de vida (Henfling, 1987).

Según Milgroom, 1996, en general, las poblaciones sexuales tienden a ser genéticamente más diversas que las poblaciones asexuales de la misma especie. En poblaciones asexuales se producen generaciones de individuos genéticamente idénticos, dando como resultados una estructura de la población clonal. Las características de las poblaciones asexuales son: la ocurrencia generalizada de genotipos idénticos, ausencia de genotipos recombinantes y correlación independiente entre marcadores genéticos. Sin embargo, cuando se habla de variación genética en las poblaciones, es esencial distinguir entre diversidad de genes y diversidad genotípica.

1415

2.10. Sintomatología

El tizón ataca a las plantas en cualquier edad, pudiendo presentarse en cualquier parte de la planta (hojas, tallos, flores, frutos y tubérculos) manifestándose a través de lesiones de formas muy variadas que dependen de la temperatura, humedad, intensidad de luz, resistencia del hospedante, y tiempo transcurrido después de la infección (Herbas, 1981; Abab, 1983).

Según Henfling (1987), en una etapa avanzada, los síntomas de la enfermedad, los síntomas tienen parecido con los causados por las heladas. Las plantas severamente afectadas por el tizón producen un olor que las distingue y que resulta del colapso del tejido vegetal. Inicialmente las hojas de lagunas plantas presentan áreas irregulares muertas especialmente en las puntas y bordes. En pocos días la enfermedad puede abarcar todo el cultivo y atacar totalmente el follaje de las plantas, quedando al final solamente los tallos en el campo. La última consecuencia es la sequedad de la planta.

2.10.1. Síntomas en las Hojas

Los primeros síntomas se inician frecuentemente en las puntas y en los bordes de los folíolos y consisten en pequeñas manchas de color verde claro en oscuro que se convierten en lesiones marrón negruzcas de aspecto humedecido, y ocurre rápido avance si las condiciones son favorables. Algunas veces se presenta un halo de color verde claro a amarillo alrededor de la lesión. No se presenta anillos concéntricos observables con una lupa como en los casos de la mancha foliar por *Alternaria* siendo por el contrario de forma irregular y de mayor tamaño, pudiendo afectar toda la hoja (Navia y Fernández-Northcote, 1996).

041A

En condiciones de alta humedad, se hace visible la esporulación (vellocidad blanquecina), especialmente en el envés de las hojas. Estos son esporangióforos, esporangios (esporas) del hongo. En poco tiempo, la enfermedad puede propagarse desde los primeros folíolos infectados en unas pocas plantas, hasta casi todas las plantas de un campo. La muerte de las plantas puede presentarse en pocos días (Navia y Fernández-Northcote, 1996).



Figura 3: Síntomas de *P. infestans* en una hoja, presenta esporulación en el envés.

2.10.2. Síntomas en tallo

Las lesiones pueden desarrollarse por infección directa o por extensión a partir de las hojas en los peciolo y los tallos, donde se expanden longitudinalmente. Presentan manchas necróticas largas de color marrón oscuro, tomando las partes afectadas una consistencia vítrea. Los tallos infectados se debilitan, pueden tener un colapso y morir con la lesión hacia arriba; los tallos pueden quebrarse por acción del viento (Henfling, 1987), por lo que en algunas zonas se conoce como p'aquí p'aquí (Navia y Fernández Northcothe, 1996).

2.10.3. Síntomas en tubérculos

Los tubérculos son infectados por las esporas que la lluvia lava de las hojas y del tallo y penetran en el suelo hasta llegar a los tubérculos. La parte externa de los tubérculos afectados, presenta áreas irregulares y ligeramente hundidas de color marrón y de apariencia húmeda. Partiendo el tubérculo, se observa una pudrición corchosa de color pardo claro a oscuro debajo de la piel y hacia el interior del tubérculo. El síntoma en el tubérculo es conocido por los agricultores como k'anura (Navia y Fernández-Northcote, 1996).

Después de la infección de *Phytophthora infestans* puede ocurrir una invasión de organismos secundarios (hongos y bacterias) que provocan una completa desintegración del tubérculo, haciéndose de este modo difícil la diagnosis (Hooker, 1980).

Henfling (1987), menciona que los tubérculos infectados presentan una decoloración superficial e irregular. Las lesiones necróticas, secas y de color marrón penetran desde la superficie. Los patógenos secundarios (principalmente las bacterias) pueden convertir la casi inodora (solo tiene un tenue olor a vinagre) pudrición seca, típica de *Phytophthora infestans*, en una pudrición blanda mal oliente. El tizón no se propaga normalmente durante el almacenamiento; sin embargo, las infecciones secundarias pueden contaminar los demás tubérculos.

2.10.4. Condiciones de clima favorables para la enfermedad

Normalmente las condiciones se presentan cuando la humedad relativa del ambiente es alta y ocurre frío moderado durante varias horas consecutivas (Stakman y Harra, 1968; ICA, 1978; Henfling 1987).

Según Henflig (1987), el hongo desarrolla favorablemente a una alta humedad (90-100%), propiciada por lluvias frecuentes o rocío abundante y a temperaturas de 9-22°C. el desarrollo del hongo en la hoja es poco afectado por la humedad del ambiente es superior a 95% la enfermedad se desarrolla y propaga con mayor rapidez en temperaturas bajas y alta humedad, puede sobrevivir en el hospedante a temperaturas de 0-28 °C.

Las condiciones favorables se presentan cuando en un término de 10 días el total de lluvias alcanzan a 27 mm o más y la producción de esporangios ocurre en un rango de temperatura entre 15 – 18 °C, o si durante 7 días el promedio de temperatura es de 25 °C o menos. Así mismo se requiere que la humedad relativa oscile entre 91 – 100 % para la aparición de esporangios sobre los tejidos infectados y bajo condiciones ideales las esporas son producidas en 14 horas (ROHM AND HASS COMPANY, 1979).

A temperaturas sobre 20°C los esporangios pierden su viabilidad muy rápido en aire seco, y regularmente rápido en aire húmedo. La temperatura de 12°C es la más favorable para la germinación indirecta de los zoosporangios. (Montaldo 1984).

2.11. Interacción hospedero patógeno

Una enfermedad biótica es el producto de la interacción entre un hospedero susceptible y un patógeno virulento, cada uno de ellos bajo la influencia del medio ambiente, herencia e interacción genotipo-ambiente (Mont Koc, 1993).

El hospedero interviene con su naturaleza hereditaria, su reacción de defensa y su respuesta al medio ambiente; el patógeno interviene con su variabilidad genética, su ciclo de vida y su respuesta al medio ambiente; el medio ambiente predispone tanto al hospedero en el tipo de respuesta como al patógeno en su patogenicidad (virulencia). A

mayor susceptibilidad del hospedero y mayor virulencia del patógeno bajo condiciones ambientales favorables para la enfermedad, habrá un incremento de la enfermedad (Mont Koc, 1993).

La resistencia o susceptibilidad de una variedad a una raza fisiológica depende de su genotipo para resistencia y del genotipo para avirulencia o virulencia de la raza en cuestión. Por lo tanto, la reacción patogénica involucra la interacción de genes condicionales de resistencia en el hospedero con aquellos condicionantes de patogenicidad en el patógeno (Niks y Lindhout, 1999).

El carácter de la interacción está definida por el tipo de infección, la reacción y la patogenicidad. El tipo de infección es el resultado de la interacción hospedero-patógeno. La reacción y la patogenicidad designan la expresión genotípica del hospedero y patógeno respectivamente. El tipo de infección es por lo tanto una medida de estos dos caracteres (Mont Koc, 1993).

2.12. Formas de control

Mont Koc (1993), menciona que el control de una enfermedad puede conseguirse por procedimientos simples, pero en el caso de un control satisfactorio de la mayoría de las enfermedades, se requiere la aplicación de medidas y estas involucran generalmente un programa integrado en el que se considera una atención al medio ambiente, los factores biológicos en la interacción hospedante- patógeno y el empleo de productos químicos.

C410

2.12.1. Control agronómico

Mont Koc (1993), considera al control agronómico como la manipulación deliberada del medio ambiente a fin de hacerlo menos favorable para los patógenos desorganizando sus ciclos reproductivos, eliminando sus fuentes de inóculo o haciéndolo más favorable para la presencia de organismos antagonistas. A su vez afirma que las prácticas culturales son preventivas.

Según Henfling (1987) las medidas agronómicas a considerar son: uso de semilla libre de enfermedades, época de siembra, cualquier tratamiento que acelere el secado del follaje y reduzca la humedad dentro del cultivo (distancia de plantación y procedimientos apropiados de riego), aporte alto y el uso de cultivares resistentes y/o precoces.

2.12.2. Control químico

La inmensa mayoría de los compuestos químicos, solo protegen a las plantas o sus órganos de las infecciones subsecuentes, pero no pueden impedir o sanar la planta de una enfermedad una vez que se ha iniciado (Agrios 1988).

Experimentos realizados por PROINPA durante varias campañas agrícolas en zonas tizones del país sobre estrategias de control químico, han permitido determinar y confirmar estrategias eficientes y económicas para el control químico del tizón. Estas estrategias están basadas en la aplicación preventiva, antes de que se presente la enfermedad, frecuencias de aplicación de 7-14 días según las condiciones climáticas.

04.9

2.13. Resistencia a fungicidas

En 1980, fue confirmada la resistencia a fenilamidas en poblaciones de *Phytophthora infestans* (Dowley y O'Sullivan, 1981). La variabilidad del hongo ha permitido la selección de individuos resistentes, ha incrementado la dependencia al uso de fungicidas y ha aumentado el número de aplicaciones considerablemente.

La resistencia en el patógeno se determina por una menor sensibilidad que la normal a dichos productos. Esta resistencia es el resultado de mutaciones estables y heredables. La resistencia al ingrediente activo metalaxyl y a otras fenilamidas ha sido reportada dentro de poblaciones de *P. infestans* a nivel mundial, constituyéndose en un factor limitante en el uso de este clase de fungicidas. La disminución temporal de la sensibilidad a un fungicida vendría a ser una adaptación del patógeno, sin embargo por no ser heredable puede ser revertida por cambios en las estrategias de control químico.

Con la nueva migración se ha observado estas variantes resistentes a los fungicidas sistémicos, lo cual hace al control químico menos efectivo. Si a este factor se agrega que en muchos países se han establecido leyes que obligan a la reducción del uso de pesticidas, es posible que algunos fungicidas se dejen de fabricar por que no será económico hacerlo (French et al., 1994), por lo tanto se tendrá que buscar alternativas que minimicen el uso de fungicidas pero que controlen a estas nuevas variantes.

Durante la transformación de la relación hospedante-patógeno, *Phytophthora infestans* cambia a nuevas razas fisiológicas por proceso que no involucran estructuras sexuales, siendo el hospedante la influencia selectiva más importante (Brasier y Hansen, 1992). Aunque las fluctuaciones ambientales también intervienen (Sujkowski, 1986).

(4-8

2.14. Control por resistencia

Las plantas en general son resistentes a ciertos patógenos ya sean por que pertenecen a grupos taxonómicos que son inmunes a estos patógenos o por que las plantas poseen genes de resistencia dirigidos contra los genes de virulencia del patógeno (Agris, 1998).

Dickson y Lucas citados por Moscoso (1993), manifiestan que como todas las demás características biológicas, la resistencia del hospedante y la virulencia del patógeno están determinadas genéticamente. Flor demostró que para cada gen del hospedante que confiere resistencia, existe un gen complementario en el patógeno que determina su virulencia. Este conocimiento es conocido como la teoría de Gene por Gene de las interacciones del hospedante-patógeno.

2.15. Resistencia

Robinson citado por Moscoso (1993), indica que la resistencia es la habilidad del hospedante para impedir el crecimiento y/o desarrollo del patógeno, la misma que se expresa en varios niveles. Resistencia completa es cuando la multiplicación del patógeno está totalmente impedida, esto es, cuando la producción de esporas es cero, resistencia incompleta es cuando la producción de esporas es reducida, a pesar de que las plantas hospedantes son susceptibles a la infección.

Sardiña también citado por Moscoso (1993), menciona que existe resistencia aparente cuando, a pesar de los focos de infección, la planta “escapa” al patógeno en el tiempo o en el espacio o ya también por que la planta está protegida exteriormente por tejidos cuya constitución impide la penetración del patógeno.

0407

2.16. Expresión de resistencia.

Los genes son las unidades hereditarias, que se encuentran en moléculas de ADN (ácido dexoxirribonucleico), formado nucleoproteínas que se organizan en estructuras, denominadas cromosomas, se encuentran en el núcleo de las células. Cada gen ocupa una posición específica en un cromosoma, denominado locus genético (loci en plural). Por lo tanto todas las formas alélicas de un gen se encuentran en cromosomas genéticamente similares (homólogos). Los alelos son genes que tienen la misma función, pero distintos efectos, y que ocupan el mismo lugar en dos cromosomas homólogos.

Los genes permiten que se manifieste o no la resistencia de un hospedante hacia un patógeno. Algunos genes proporcionan una resistencia débil e incompleta, otros proporcionan resistencia completa si interactúan con los respectivos genes de avirulencia del patógeno (Hipersensibilidad).

Según Niks y Lindhout (1999), la expresión fenotípica de la resistencia puede diferir considerablemente entre alelos, porque es una característica predominante del alelo en sí; la base genética en la cual ocurre el alelo tiene algunos efectos modificadores sobre la expresión. Esto es importante porque el alelo de resistencia actúa solamente como un activador de la reacción de resistencia. La reacción de resistencia en si mismo depende de una serie grande de genes de la planta.

Los factores que pueden determinar o modificar el grado (severidad) de la expresión fenotípica de la resistencia son:

1. El alelo de resistencia
2. La base genética
3. El genotipo del patógeno, especialmente si estos son homocigóticos o heterocigóticos para la avirulencia.
4. El estado de desarrollo de la planta
5. Los factores ambientales como la temperatura y luminosidad.

2.17. Componentes de la resistencia

Los componentes de resistencia representan los diferentes estadios y eventos del ciclo de vida del patógeno en los cuales el hospedero puede interferir (Parlevliet, 1979; Ordoñez, 1993).

Parlevliet (1979), indica, que son seis los componentes de resistencia al “tizón” de la papa en los cuales el hospedante puede interferir: eficiencia a la infección, periodo de latencia, tasa de crecimiento de la lesión, tamaño de lesión, periodo de infección e intensidad de esporulación.

El hospedante interviene con su naturaleza hereditaria, su reacción de defensa y su respuesta al medio ambiente; el patógeno interviene con su variabilidad genética, su ciclo de vida y su respuesta al medio ambiente; el medio ambiente predispone tanto al hospedante en el tipo de respuesta como al agente causal de la patogenicidad. A mayor susceptibilidad del hospedante y mayor virulencia del patógeno bajo condiciones ambientales favorables para la enfermedad, habrá un incremento de esta última (Mont Koc, 1993).

Existen varios factores que pudieran interferir en la expresión de la resistencia Van Oijen (1991), menciona que el nivel aparente de resistencia parcial de plantas de la papa ha *Phytophthora infestans* depende de la raza del patógeno, el cultivar de la planta hospedante, de su edad y la de las hojas, de las condiciones anteriores de crecimiento de la planta y del medio ambiente.

2.18. Mecanismos de resistencia

Es posible distinguir algunos tipos de resistencia entre si por la forma en que reaccionan ante la penetración y desarrollo del patógeno. Estos tipos de resistencia son morfológicos, funcionales y fisiológicos.

2.18.1. Resistencia morfológica

Es el resultado de barreras mecánicas en la anatomía del hospedero que actúan impidiendo la penetración o el desarrollo del patógeno. Existe evidencia efectiva de este fenómeno solo en muy pocos casos por ejemplo, la variedad de trigo Webster con resistencia morfológica a *Puccinia graminis* f. sp. *Tritici* (Mont Koc, 1993).

2.18.2. Resistencia funcional

Resulta de la exclusión de los patógenos invasores mediante el cierre de estomas, que es el lugar de ingreso de muchos microorganismos. Este mecanismo está determinado por condiciones del medio ambiente, especialmente la luminosidad, que la estimula. Una apertura de estomas mucho más lento y tardío es un factor determinante para la infección de royas en trigo, porque el periodo crítico para penetración es por las mañanas, después de la salida del sol, mientras las plantas estén con el rocío.

Por el cierre de estomas los tubos germinativos de las oredosporas mueren por desecación antes de penetrar a la planta.

2.18.3. Resistencia fisiológica

Resulta de la reacción de hipersensibilidad de las células del hospedero al patógeno invasor, es altamente específico. Algunos hospederos resistentes producen sustancias con toxicidad específica al patógeno (fitoalexinas), el patógeno llega a los tejidos de la planta, pero encuentra condiciones químicas desfavorables para su desarrollo del patógeno. Se conoce que ciertos mutantes de *Venturia inaequalis* (sarna del manzano), pierden patogenicidad en ausencia de nutrientes esenciales y la recuperan cuando los nutrientes son restablecidos. (Mon Koc, 1993).

0404

2.18.3.1. Fitoalexinas

Son sustancias con actividad antimicrobiana, producidas como mecanismos de defensa por las plantas para resistir el ataque de patógenos y plagas. Cada especie produce sus propias fitoalexinas (Parlevliet, 1994). El hongo infectante o cualquier agente causante de estrés determinan la proporción de síntesis por la planta. Por ejemplo, la concentración de una isocumarina en zanahoria varía de 5-342 ug/g dependiendo del organismo usado para la inoculación (Mont Koc, 1993).

Muller y colaboradores inoculan tubérculos de *S. tuberosum* con zoosporas de una raza del hongo de *P. infestans* a la cual fueron resistentes, un tiempo después, los mismos tubérculos y otros sin inocular fueron infectados con otra raza a la cual están altamente susceptibles. La última raza empleada desarrolla libremente en la superficie de los tubérculos que no habían sido inoculados inicialmente, pero lo hacía muy pobremente en aquellos tubérculos previamente inoculados con la raza avirulenta. Basándose en ello Muller postulo que cuando tejidos de plantas de papa son inoculados con una raza de *P. infestans* a la cual son resistentes, las células de los tejidos afectados por el parasito producen sustancias toxicas al hongo y por esta razón el variante avirulento no se desarrolla en las plantas resistentes, dichas sustancias también son activas contra otros tipos de parásitos, siendo por lo tanto no específicas (Mont Koc, 1993).

La síntesis o acumulación de las fitoalexinas no es inducida en forma específica solo por patógenos; también por estimulaciones abióticas por diferentes agentes causantes de estreses químicos, físicos o mecánicos. Proveen la diferenciación entre plantas resistentes y susceptibles; se encuentran presentes en las plantas resistentes y ausentes o en pequeña cantidad en las plantas susceptibles.

En el caso de resistencia de *Solanum ssp.* A *Streptomyces scabies*, las variedades resistentes poseen altas concentraciones de ácido clorogénico.

0403

Las fitoalexinas resultantes de la combinación incompatible hospedante-patógeno: papa, *Solanum tuberosum*- *Phytophthora infestans* son: terpenoides, esteroides y varios compuestos derivados del fenol.

2.19. Tipos de resistencia.

Generalmente se distinguen dos tipos de resistencia de la papa al tizón (Hooker, 1980):

- La resistencia vertical, también llamada resistencia de genes R, resistencia específica a las diferentes razas, oligogénica o monogénica resistencia por genes mayores, y
- La resistencia horizontal también llamada resistencia general o del campo, poligénica o multigénica de genes menores, no está controlada por genes dominantes específicos de resistencia.

2.19.1. Resistencia vertical

Conocida también como resistencia específica a las diferentes razas; resistencia completa; resistencia de genes mayores R, oligogénica o monogénica. En ella los genes R confieren inmunidad al hospedante frente a razas específicas del patógeno, inducen a una reacción de hipersensibilidad (pequeña necrosis) en el tejido de la planta enferma y por consiguiente, el micelio fungoso invasor muere antes que el patógeno sea capaz de reproducirse. Este tipo de resistencia opera mayormente cuando el patógeno ha penetrado (Henfling, 1987; Mont Koc, 1993; Parlevliet, 1994; Ochoa y Danial, 1999).

Eskes (1983), explica que muchos genes R dan una protección incompleta frente a razas incompatibles del patógeno, lo cual se expresa con una baja infección y con poca esporulación del hongo, el ambiente genético del hospedante puede afectar el nivel de resistencia otorgada por genes R.

C402

Este tipo de resistencia implica existencia de interacciones diferenciales, es decir que el número de razas es limitado por el número de genes resistentes. Está íntimamente asociada con la hipersensibilidad, pero no solo está restringida a este tipo de reacción, también está relacionada con la producción de sustancias químicas inhibitoras que el hospedero produce como respuesta a la infección, fitoalexinas y/o proteínas relacionadas con la patogénesis (Mont Koc, 1993; Niks y Lindhout, 1999).

La resistencia de hipersensibilidad se debe frecuentemente a un gen o genes dominantes (genes mayores R) en el hospedero y genes de avirulencia en el patógeno, que son dominantes sobre la virulencia. La resistencia de la planta hospedante por lo tanto es efectiva solamente a ciertos tipos del patógeno (específica a la raza). Esto significa que la infección del tejido de la planta depende tanto de los genes presentes en la planta como también de los genes presentes en el patógeno (Niks y Lindhout, 1999).

La resistencia vertical puede ser amplia o estrecha, dependiendo del número de razas a la cual ella es expresada. La herencia de este tipo de resistencia está gobernada por genes específicos que generalmente resultan fáciles de manipular en programas de mejoramiento, pero que tienen la desventaja de ser demasiados específicos y por tanto inefectivos contra otras razas (Niks y Lindhout, 1999).

El gen en la resistencia monogenica puede ser estudiado en detalle e identificado individualmente por letras, números o por ambos, por ejemplo los genes R1, R2, R3.....R11 en *Solanum demissum* para resistencia a *P. infestans*; los genes Sr6, Sr11, Sr40 que confieren resistencia en trigo a la roya del tallo (Mont Koc, 1993).

El gen de resistencia vertical tiene efectos mayores (genes R); son específicos a la raza; se representan en grandes números; con frecuencia son dominantes; a menudo están ligados en el mismo brazo cromosómico, se agrupan en loci complejos u ocurren en series alélicas múltiples; se presentan en una relación gen por gen con los genes avirulentos del patógeno y por lo general son de tipo no duradero (Parlevliet, 1994).

Howard (1970), indica que la mayor de genes de hipersensibilidad para resistencia al tizón, está en las especies silvestres mexicanas.

2.19.1.1. Relación de gen a gen

Flor en 1956, postula que “para cada gen que condiciona resistencia en el hospedante, existe un gen específico que condiciona patogenicidad en el parásito” (Mont Koc, 1993).

El postulado de flor hace énfasis en la virulencia (patogenicidad), sin embargo hoy en día se enfatiza en la avirulencia porque se asume que la resistencia de hipersensibilidad es activada por el producto del gen de avirulencia correspondiente (Niks y Lindhout, 1999).

La resistencia ocurre cuando los genes complementarios en el hospedero y patógeno son dominantes. Si uno o ambos pares de genes complementarios en el hospedero y el patógeno son recesivos, se presentará susceptibilidad ((Niks y Lindhout, 1999).

Se asume que los alelos dominantes para resistencia y los alelos dominantes para avirulencia producen proteínas que se reconocen la una a la otra en forma específica. La reacción de hipersensibilidad se inicia cuando una molécula receptora (el producto del gen de resistencia) reconoce otro signo molecular específico (el producto del gen de avirulencia). Lo que lleva a una reacción de hipersensibilidad ((Niks y Lindhout, 1999)

2.19.1.2. Virulencia

Se refiere a la habilidad genética de una raza de *P. infestans* para vencer la resistencia del hospedante causando una reacción de compatibilidad, es decir se produce la enfermedad. Los genes de resistencia (genes R) codifican productos que identifican en forma específica a otros productos codificados por genes de avirulencia del patógeno. La pérdida o cambio del gen de avirulencia permite la compatibilidad. El término **raza** agrupa a los aislamientos

en base a su virulencia sobre los genes R de un grupo de genotipos diferenciales de papa. El uso de los fenotipos de virulencia para inferir variación genética en la población del patógeno tiene algunas limitaciones. Por ejemplo, pueden usarse diferentes grupos de genotipos diferenciales de papa haciendo difícil la comparación de datos entre investigadores, además que el desarrollo de estos genotipos están sujetos a variaciones medio ambientales. Pero la limitación más importante es que la virulencia es un factor fenotípico antes que genotípico.

2.19.1.3. Avirulencia

Es la propiedad del patógeno mediante la cual no puede infectar al hospedante debido a la efectividad de uno o más genes de resistencia, esta interacción es muy específica, puesto que el gen de resistencia y el gen de avirulencia se reconocen uno al otro específicamente ((Niks y Lindhout, 1999).

Suponiendo que una planta posee dos loci para resistencia de hipersensibilidad R1 y R2, ambos loci pueden tener, tanto el alelo para resistencia (dominante R1 y R2) como el alelo de susceptibilidad (r1 y r2) los genes de resistencia solo son efectivos cuando el patógeno posee los correspondientes genes de avirulencia, que en este caso, para R1 sería Avr1, para R2 sería Avr2. Por otra parte los alelos alternativos (recesivos) que el patógeno puede tener en estos loci de avirulencia para virulencia son avr1 y avr2, los cuales no activan resistencia en el hospedante ((Niks y Lindhout, 1999).

Dependiendo de la combinación de genes en el hospedante y en el aislado del patógeno la interacción resulta en compatibilidad (infección exitosa) o incompatibilidad (reacción de resistencia), si se enfatiza la reacción de la planta, se deberán emplear los términos avirulencia y virulencia (Gabriel y Carrasco 1999).

0339

2.19.2. Resistencia horizontal

Llamada también resistencia parcial (RP), cualitativa, lateral, no específica, resistencia de campo, de planta adulta, resistencia generalizada, poligenica o multigenica y de genes menores r , consiste en la reducción del desarrollo de la epidemia a pesar de un tipo de infección susceptible ((Niks y Lindhout, 1999).

A los genes que determinan la resistencia horizontal se los ha denominado genes menores, debido a que el efecto de cada uno de estos genes es pequeño y aditivo, cada uno de los cuales puede contribuir en mayor grado a la resistencia (Henfling, 1987; Ordoñez, 1993).

En la resistencia horizontal no hay interacción diferencial entre hospedante y las razas del patógeno. Estos cultivares poseen un tipo de resistencia intermedia a todas las razas del patógeno (Vanderplank, 1963).

La resistencia horizontal es capaz de conferir resistencia parcial a la planta frente a cualquier raza del hongo, es decir, es inespecífica. Determina una resistencia incompleta al hospedante. Este tipo de resistencia es capaz de reducir la tasa de infección de la enfermedad, y por lo tanto demora el avance de la enfermedad y de la epidemia (Parlevliet, 1979).

La estabilidad de la resistencia de campo se debe al carácter poligénico, el cual hace difícil la mutación del hongo (Henfling 1987). Este tipo de resistencia es incompleta, durante fuertes epifitias, las plantas permanecen verdes un mayor tiempo, el daño es menor y la diseminación de propagulos del hongo es lenta, capaz de reducir la tasa de infección aparente de la enfermedad y por lo tanto demora el avance de la enfermedad y de la epifitia (Parlevliet, 1979).

El mismo autor, indica que un cultivar con resistencia horizontal es susceptible, pero es el menos susceptible que un cultivar con una menor resistencia horizontal. El porcentaje de

0338

infección nunca es tan alto en un cultivar con resistencia horizontal comparado con uno que lo posee, aunque el tipo de reacción sea esencialmente el mismo. Durante fuertes epifitias permanecen verdes por mayor tiempo, el daño es menor y la diseminación de propágulos es lenta.

Se presume que muchos factores contribuyen a la resistencia horizontal, como la resistencia de las células de la cutícula y la epidermis a la fuerza mecánica o a las enzimas, la actividad de las sustancias de las hojas para inhibir la germinación y la penetración de las esporas, el número de estomas y muchos otros factores ambientales locales incluyendo las condiciones de crecimiento (Henfling, 1987).

Según Mont Koc (1993), las pautas para reconocer una resistencia de campo son:

- Menor número y tamaño de lesiones
- Mayor tiempo requerido para la formación de las lesiones
- Menor esporulación
- Menor vigor de las esporas.

En las dos primeras influye el tiempo requerido para que el patógeno penetre y se manifieste los síntomas y una reducción en la penetración por factores inherentes a la planta misma.

Hooker (1980), menciona que algunos cultivares comerciales, tienen un nivel moderado de resistencia general, requiriéndose para protegerlos, menores cantidades de fungicida que las necesarias en otros cultivares. Los esfuerzos en varios continentes están dirigidos hacia la obtención de cultivares con niveles altos de resistencia generalizada, los cuales pueden usarse con cantidades reducidas de fungicida y aún sin fungicida en las áreas menos húmedas.

0397

2.19.2.1. Mecanismos de resistencia horizontal

Los mecanismos de resistencia generalmente interfieren con procesos como la penetración de la pared celular, el crecimiento y la reproducción del patógeno, los cuales son menos exitosos en una planta resistente que en una planta susceptible. Con patógenos como royas y oidios RH, está asociada con la formación de papillae, que parece detener la formación de haustorios ((Niks y Lindhout, 1999).

Cuadro 4: Según Black (1970) la resistencia horizontal se clasifica en:

Grupo	Tipo de lesión	Área estimada %	Descripción
1	Restringida	3	Altamente resistente
2	Parcial	10	Medianamente resistente
3	Retardada	30	Moderadamente resistente
4	Normalmente progresiva	60	Normalmente susceptible
5	Rápido progreso	100	Muy susceptible

Fuente: Black (1970).

2.20. Niveles de resistencia

2.20.1. Susceptibilidad

Es la incapacidad de una planta para producir el crecimiento, desarrollo y reproducción del enemigo, una planta susceptible= a una planta menos resistente (Niks y Lindhout, 2004).

0396

2.20.2. Resistencia

Es la capacidad de una planta para producir o detener el crecimiento, desarrollo y reproducción del enemigo natural después de establecimiento o de un contacto íntimo (Ninks y Lindhout, 2004).

La resistencia es la habilidad del hospedante para impedir el crecimiento y/o desarrollo del patógeno, la misma que se expresa en varios niveles. Resistencia completa es cuando la multiplicación del patógeno está totalmente impedida, esto es cuando la producción, a pesar de que las plantas hospedantes son susceptibles a la infección. (Mosco, 1993).

2.20.3. Inmunidad

Es cuando la planta no expresa ningún signo de infección visible macroscópicamente después de ser expuesto al patógeno (Ninks y Lindhout, 2004), cuando hay total inhibición de la infección y del crecimiento del patógeno se tiene completa inmunidad, se debe a la imposibilidad del paracito para entrar al huésped, aun cuando se presenten condiciones favorables para la enfermedad (Sevilla y Holle, 2004).

En general el término “inmunidad” se refiere al estado fisiológico de tener suficientes defensas biológicas para evitar una infección, una enfermedad o cualquier invasión biológica no deseada. Como esta definición se aplica a todos los sistemas eucarióticos multicelulares, es apropiado describir la habilidad de las plantas para enfrentar infecciones microbianas como respuesta “inmune” (Castro y Garcia, 2009).

0395

Cuadro 5: Moscoso (1993), indica las principales diferencias entre la resistencia vertical y la horizontal:

	OLIGOGENICA vertical	POLIGENICA horizontal
Control genético	Participan pocos genes	Participan en general muchos genes
Descripción	Generalmente bien definida, funciona durante toda la vida de la planta o bien solo puede expresarse en plantas maduras	Variable; las plántulas son en general menos resistentes, pero la resistencia aumenta conforme la planta madura.
Mecanismos	Generalmente una reacción de hipersensibilidad del hospedante	Tasa y grado de infección desarrollo y/o reproducción del patógeno reducidos.
Eficiencia	Bastante eficiencia, pero con frecuencia confiere una resistencia bastante baja a otras razas.	Variable, eficaz contra todas las razas del patógeno.
Estabilidad	Sujeta a interrumpirse repentinamente debido al desarrollo de nuevas razas fisiológicas del patógeno.	O afecta por cambios en los genes de virulencia del patógeno.
Sinónimos	Vertical Gen principal Específica	Horizontal Gen menor No específica De campo

Fuente: Moscoso, 1993

Nelson (1975), argumenta que la resistencia vertical la resistencia horizontal no son indicadores de la acción de diferentes genes, sino son expresiones de diferentes acciones de los mismos genes bajo circunstancias distintas. El afirma que no existen genes mayores ni menores, sino únicamente genes para resistencia a enfermedades, cuya expresión puede estar influenciada o modificada por otros genes, en diferentes ambientes genéticos.

033

2.21. Evaluación de la resistencia

De acuerdo a Niks y Lindhout (1999), un criterio a evaluar es la calidad de infección. Se puede determinar el porcentaje de plantas individuales infectadas, o discos de hojas (incidencia). En pruebas de campo la cantidad de infección causada por patógenos foliares policíclicos, generalmente se evalúa mediante la estimación del porcentaje de tejido foliar cubierto con lesiones, micelio o pústulas (severidad). Efectuando observaciones repetidas varias veces en la estación del cultivo en las mismas plantas o parcelas, se puede seguir el incremento de la infección en el tiempo.

2.22. Origen de la variación genética en hongos.

Como es común en la mayoría de los organismos, los hongos fitopatógenos cuentan con mecanismos de mutación y recombinación como fuente fundamental de variación genética. Dentro de una especie, el flujo de genes entre poblaciones complementa estos procesos con mecanismos como la dispersión de patógenos de propágulos a partir de un área epidemiológica a otra y de aquí a otra siguiente, y así sucesivamente. (Coca Morante 1998).

Estudios en una amplia variedad de patógenos fungos han revelado la importancia de algunos de los mecanismos que sirven como fuente de diversidad. Sin embargo, dado el enorme rango de estilos de vida, formas de crecimiento, organización celular y patrones citológicos que están presentes entre los hongos fitopatógenos, el patrón de fuente de variación de un patógeno no es suficiente como modelo de variación para otros patógenos. (Coca Morante 1998).

2.23. Variabilidad genética

La genética poblacional describe y cuantifica la variación genética en determinadas poblaciones del patógeno. Esta variación se usa para hacer inferencias acerca de los procesos de evolución que las afectan. Las posibles fuentes de variación de *P. infestans* son

reproducción sexual, mutación, recombinación mitótica, parasexualidad, migración y selección. Los marcadores más utilizados para caracterizar las poblaciones de este patógeno han sido la virulencia, tipo de apareamiento, isoenzimas, haplotipos mitocondriales, polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) y repeticiones de secuencias simples o microsatélites (SSr por sus siglas en inglés). Además, a la fecha se han desarrollado numerosos estudios basados en la secuenciación de varios genes nucleares o de organelas.

P. infestans posee una gran capacidad de especialización originado de razas simples otras más especializadas y complejas, o al contrario. También puede provocar susceptibilidad con esporulación de ciertas variedades o especies originalmente resistentes. Este fenómeno se denomina como “Especialización Fisiológica”, “Diferenciación patogénica o Variación patogénica”. Este aspecto se evidencio al encontrar que aislamientos de papa atacan ligeramente al tomate, pero los aislamientos de tomate atacaban severamente ambos patógenos (Junchaya, 1983; Gabriel, 1994).

Normalmente se atribuye la aparición de razas de *P. infestans* a la variación asexual por medio de mutaciones aleatorias. Sin embargo existen evidencias de que existe apareamiento asexual, que puede llevar a recombinaciones y posiblemente a nuevas razas (CIP 1973). Según Gallegly (1975), en lugares donde solo existe un tipo de apareamiento, la variabilidad ha sido atribuida a:

- a. Factores hereditarios
- b. Factores fisiológicos, metabólicos y nutricionales
- c. Mutaciones
- d. Anastomosis y parasexualidad

302

2.23.1. Variación genética en poblaciones de patógenos

Casi cada población tiene algún grado de diversidad genética; las pocas excepciones usualmente son aquellas poblaciones donde nuevas áreas han sido colonizadas por un solo clon. (Según Milgroom y Fry 1992) hay dos tipos básicos de variación genética:

- a) La variación ecológicamente importante, que se refiere a los caracteres que afectan la aptitud (*fitness*) y por lo tanto pueden estar bajo el efecto de la selección.
- b) La variación selectivamente neutral, que se refiere a la variación en los caracteres que no afectan la aptitud y no están bajo el efecto de la selección. Estos cambios son afectados por las fuerzas evolucionarias, tales como la mutación, “*genetic drift*” y flujo de genes (migraciones) (aunque pueden ser afectados indirectamente por la selección de genes no relacionados). (Coca Morante 1998)

La importancia de los cambios en una población de patógenos, sirve para conocer como cada tipo de variación genética se relaciona a la epidemiología y manejo de la enfermedad. (Coca Morante 1998)

2.24. Estructura de poblaciones en Patógenos

La estructura de las poblaciones generalmente se refiere a modelos de variación genética dentro y entre las poblaciones y permite describir la diferenciación genética entre poblaciones.

Las fuerzas evolutivas como la migración, recombinación y selección rara vez trabajan aisladas. Cualquier estructura de población de patógenos lo más probable es que sea una

391

consecuencia de la interacción de un número de fuerzas evolutivas. Un cambio importante en una población de patógenos de plantas requiere de un análisis lo más exacto posible, del rol relativo de cada una de estas fuerzas en la determinación de la estructura de la población. Por consiguiente, la razón principal para el estudio de la estructura de poblaciones de patógenos, son las inferencias que se pueden hacer acerca de los procesos evolutivos que operan en la población de patógenos. (Coca Morante 1998).

Los procesos más relevantes en estos estudios son la recombinación y la migración. La recombinación es importante debido al significado potencial en la rápida formación de nuevos genotipos en poblaciones sexuales que en poblaciones asexuales. La migración también es de importancia debido a que varias enfermedades de importancia económica han sido diseminadas vía diferentes mecanismos de migración, por ejemplo en (*Phytophthora infestans*), *Rhynchosporium secalis*, *Puccinia graminis f. sp.*, etc. (Coca Morante Mario 1998).

Por otra parte, el análisis de la estructura de poblaciones de patógenos también es importante para el manejo de las enfermedades, debido a que nos muestra con bastante claridad la constitución de una población. Así por ejemplo, en subpoblaciones que son altamente diferenciadas, debido a restricciones en las migraciones, estas teóricamente, pueden ser manejados independientemente. Por ejemplo, si la migración es restringida entre dos áreas, la presencia de patotipos que rompan la resistencia no representa una amenaza inmediata para la resistencia en otras áreas. Por lo tanto, el manejo de los genes de resistencia puede realizarse independientemente. En cambio, si no hay una subdivisión en la población, puede ser debido a que el patógeno puede migrar libremente a través de una área bastante amplia. En este caso, es necesario un manejo regional de las poblaciones de patógenos. (Coca Morante Mario 1998).

2.24.1. Métodos para la detección de variabilidad genética en poblaciones de hongos

En estudios de variabilidad genética de poblaciones de patógenos, el uso de marcadores genéticos es de mucha importancia porque a partir de ellos se realizara inferencias sobre su estructura, por lo tanto, se adoptaran medidas de manejo. Por esta razón es necesario evitar las tendencias y limitaciones potenciales que cada uno de los marcadores puede contener.

Para evitar estas desviaciones las inferencias deben realizarse a partir de una variedad de marcadores neutrales distribuidos completamente en el genoma. Se deben experimentar con un número mayor de loci del genoma de modo que las diferencias genéticas detectadas reflejen la variabilidad del genoma como un todo.

Existen diferentes marcadores, utilizados para la detección de la variabilidad genética en poblaciones de hongos:

- a. Morfología de colonia
- b. Tipo de apareamiento.
- c. Análisis de virulencia
- d. Sensibilidad al Metalaxyl
- e. Análisis bioquímico de isoenzimas
- f. Análisis moleculares en el poliformismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). (Coca Morante 1998).

2.25. Análisis de virulencia

Esta técnica es ampliamente utilizada para caracterizar la virulencia de poblaciones de patógenos sobre un conjunto de variedades diferenciales portadores de diferentes genes de resistencia. Esta medida de variabilidad genética proporciona información sobre la estructura de patotipos de la población y por lo tanto es de interés para mejoradores patólogos.

Sin embargo, el análisis de patotipos tiene varias limitaciones. Aunque técnicamente es simple, es un proceso laborioso y toma bastante tiempo. La cantidad de patotipos de los patógenos está influenciada por la variación medioambiental y el criterio subjetivo de los investigadores (evaluadores). Frecuentemente los diferenciales usados poseen más de un gen de resistencia o factores de resistencia desconocidos. Se requieren intensos esfuerzos para desarrollar diferenciales genéticamente definidos, tales como líneas isogénicas (grupo de individuos que poseen el mismo, con independencia de ser homocigóticos o heterocigóticos) con únicos genes de resistencia. Incluso en diferenciales bien caracterizados, no pueden ser detectados inmediatamente nuevas virulencias en la población de patógenos, simplemente porque las variedades disponibles (diferenciales) no pueden diferenciar los nuevos factores de virulencia (Leung 1993, Schober 1992).

Otra desventaja, quizás la más importante y está relacionada con la confiabilidad de los datos de virulencia para inferir sobre la estructura de una población, es que los genes involucrados en la especificidad del hospedante representan a una pequeña proporción de genes en el patógeno que pueden someterlo a una fuerte selección. De este modo, una estructura deducida a partir de datos de virulencia pueden no reflejar la diversidad genética e historia evolucionaria de los aislamientos.

Otra dificultad del uso de la virulencia/ avirulencia de los fenotipos como marcador en estudios genéticos ha sido la falta de un método universal de evaluación de la virulencia.

Los variados métodos usados en diferentes laboratorios para detectar estos fenotipos llevan a conclusiones aparentemente inconsistentes. Por ejemplo, Sujkowski et al (1996) encontró que la detección de ciertos factores de virulencia fue dependiente de la concentración de inóculo. Adicionalmente, fue considerado que la raza de un aislamiento individual podría cambiar durante el cultivo o almacenamiento. De esta manera, las dificultades de la identificación de la virulencia de fenotipos crean problemas en la diversidad de inferencias a cerca de las poblaciones. (Milgroom 1996).

0308

2.26. Razas fisiológicas

Son biotipos o grupos de una especie o variedad (subespecie). La población de individuos que conforman una raza fisiológica posee el mismo genotipo para virulencia o avirulencia. Es una unidad taxonómica intra específica, se le distingue por características fisiológicas (por ejemplo virulencia) pero no por diferencias morfológicas. Pueden ser distinguidos de otros fenotipos, por diferencias en sus patrones de virulencia en una serie de diferenciales seleccionados (Mont Koc, 1993; Niks y Lindhout, 1999).

El número de razas fisiológicas que pueden ser reconocidos por sus efectos patogénicos depende del número de factores de resistencia presentes en un conjunto de hospederos diferenciales que se pueden distinguir por sus caracteres fisiológicos, entre los que se incluye la patogenicidad y en algunos hongos las características de crecimiento en los medios nutritivos de cultivo (Mont Koc, 1993; Niks y Lindhout, 1999).

Regularmente las razas más frecuentes son las más complejas; al menos la mitad de los aislamientos son virulentos para la mitad de genes en la población huésped. El número, la frecuencia, el grado de dominancia y la diversidad individual de una población de razas es muy sensible al tipo de muestreo y puede variar de un año a otro. Una nueva combinación de virulencias puede generarse en una población individual del patógeno a través de mutaciones espontáneas, recombinación sexual y por hibridación somática (parasexual). También pueden ocurrir migraciones de otras poblaciones (Ochoa y Danial, 1999).

Black y sus colegas, en 1953 lograron completar una serie de materiales de papa con los que se logró la diferenciación de razas fisiológicas de *P. infestans*. La serie fue derivada a partir de cruces entre *Solanum demissum* y variedades comerciales. Encontraron que en algunos clones de *S. demissum* existen cuatro genes mayores de resistencia al tizón, que segregan en forma independiente, a los cuales numeraron en orden cronológico de su descubrimiento, así R2, R2, R3 y R4 (Junchaya, 1983; Gabriel, 1994).

1880

Con la serie de diferenciales del Dr. Black, se completó en México, el reconocimiento de 16 razas fisiológicas de *P. infestans* (Junchaya, 1983).

En 1953, Maestenbroek, Mills y Peterson proporcionan la nomenclatura internacional para la designación de razas de *P. infestans*. Y genes para la inmunidad del hospedante en la progenie de *P. demissum*; cuatro hospedantes diferenciales fueron como R1, R2, R3 y R4. En años posteriores al establecimiento del sistema de Black, se detectaron nuevos genes R: Eide et al. En 1959, 1960 reportan los genes R5, R6; posteriormente Malcolmsom y Black establecieron la presencia de los genes R7, R8, y R9. Malcolmsom en 1969, identificó los genes R10 y R11 (Junchaya, 1983).

Actualmente se cuenta con un total de 11 diferenciales derivados de *S. demissum* para la identificación de razas de *P. infestans*. Con este número de genes de resistencia y con los grados de reacción (resistencia o susceptible), existe un número de 2,048 combinaciones posibles. La gran capacidad del hongo para variar puede hacer posible la formación de razas con nuevos genes de virulencia, lo que dificulta grandemente los trabajos de resistencia (Junchaya, 1983).

En México existe alta complejidad con un factor de virulencia de 7.4 (Plata 1998). De igual manera bautista et al. (1997), reportan alta complejidad en 19 aislamientos en Colombia, con un factor de virulencia de 6.6. En Bolivia (Plata 1998), determino que el nivel de complejidad de tizón era de 6.9 en 80 aislamientos.

2.27. Variedades diferenciales

Según Nicks y Lindhout (1999), las variedades diferenciales están compuestas por un grupo selecto de linajes del hospedero que responden con un patrón propio de infección, cuando son inoculados con un cultivo del patógeno en estudio. Los hospederos diferenciales que se usen para la identificación de razas fisiológicas determinan la utilidad de los datos que se obtengan.

C326

Las variedades diferenciales de trigo, originales, fueron aquellos que tuvieron un patrón de respuesta diferente cuando se las inoculo con un número limitado (disponible) de cultivos del hongo. A la fecha se dispone de material con resistencia gobernada por un solo gen (monogenico), es muy conveniente su incorporación como hospederos diferenciales, porque ello hace que se pueda determinar el fenotipo del patógeno en forma clara; lo que no sucede cuando se emplean diferenciales con genes múltiples, porque se enmascaran algunas interacciones debido a las epistásis y los tipos de infección baja pueden ser difíciles de distinguir debido al gran número que resulta de las muchas interacciones de gen por gen. Una línea monogenica tiene un menor rango de tipos de baja infección y por ello los efectos ambientales son de menor importancia. El uso de diferenciales mongénicos permite a menudo predecir el tipo de infección de linajes del hospedero con un genotipo conocido (Nicks y Lindhout, 1999).

Para determinar el número de razas se emplea la siguiente fórmula: número de razas fisiológicas = X^n , donde X representa los niveles de infección o reacción y n el número de hospederos diferenciales. Por ejemplo; para *P. graminis f. sp. Tritici* con tres tipos de reacción y 12 diferenciales tendremos $3^{12} = 531\ 441$ (Mon Koc, 1993).

0335

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización

El presente trabajo constó de dos fases, una en campo y otra de laboratorio e invernadero, la primera fase fue la recolección de aislamientos de 5 municipios productoras de semilla de papa del Departamento de Cochabamba.

Las zonas de recolección fueron seleccionadas por ser importantes en producción de semilla de papa, ser sectores endémicos en *P. infestans* del departamento de Cochabamba. Las mismas son 4 zonas cuadro (6).

1. El municipio de Independencia-Morochata tiene una humedad de 69-88% con una temperatura de 10-18°C.
2. Lope Mendoza por sus características geográficas, las temperaturas son templadas y oscilan entre los 12 – 18°C. con una humedad de 70-85%.
3. Vacas se caracteriza por tener un clima frío con una temperatura promedio de 12-13°C, la precipitación pluvial anual es de 550 mm.
4. Colomi tiene una temperatura que oscila entre 10-15°C y una precipitación anual de 5850 mm.

Cuadro 6: Características fundamentales de las zonas de recolección.

Provincia	Municipio	Latitud	Longitud	Altitud
Ayopaya	Independencia	-17,05	-66,49	
	Morochata	-17.28	-66,48	2633-2700
Carrasco	Lope Mendoza	-17,5	-65,36	2900-3200
Arani	Vacas	-17,53	-65,58	3470
Chapare	Colomi	-17,35	-65,87	3400

Fuente: <http://www.amdeco.org.bo/municipios/municipio.php/bo>

0394

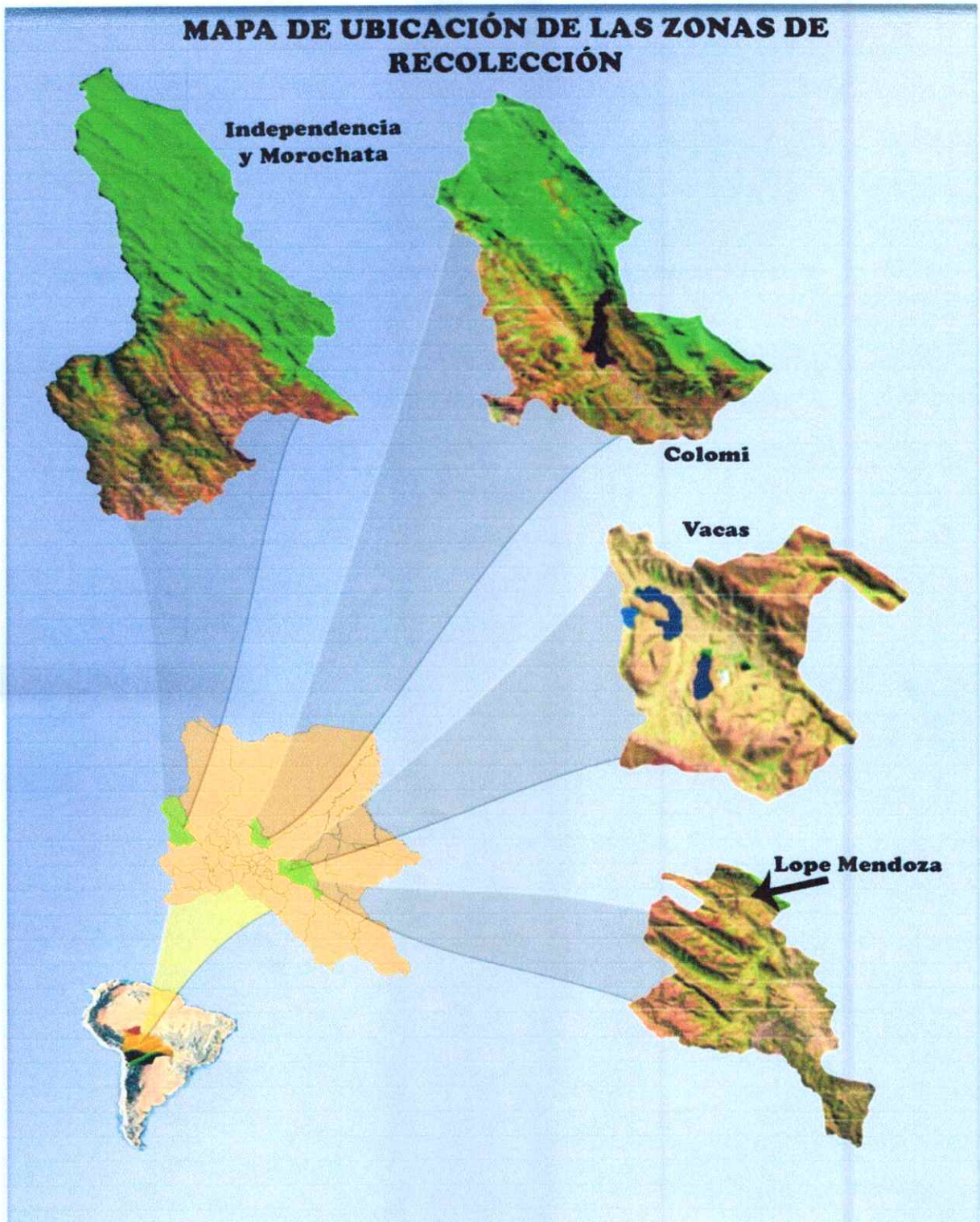


Figura 4. Mapa de recolección de *Phytophthora infestans* de las principales zonas productoras de semilla de papa del departamento de Cochabamba.

3.1.1. Laboratorio:

La parte de procesamiento de datos se realizó en la Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias “Dr. Martín Cárdenas” de la Universidad Mayor de San Simón, propiamente en el laboratorio de Fitopatología, situada en la zona La Tamborada, en el Km. 5 de la avenida Petrolera del Departamento de Cochabamba.

Esta zona se encuentra ubicada a 17°23'20" de latitud sud 66°09'35" longitud oeste del meridiano de Greenwich, a una altura de 2.600 metros sobre el nivel del mar. El clima se considera como templado, la temperatura media anual es de 18°C con una precipitación media anual de 850 mm. La humedad relativa del 65%.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Material vegetal

- Folíolos de papa (*Solanum tuberosum*)
- Aislamientos de tizón tardío (*Phytophthora infestans*).
- Tubérculos de papa (Waycha)
- Plantas diferenciales

3.2.2. Material de Laboratorio

a. Equipos

- Microscopio
- Estereoscopio
- Estufas
- Incubadora
- Autoclave
- Refrigeradora
- Cámaras de aislamiento y repique

0382

- Desecador
- Balanza
- Conservadora

b. Medios de cultivo

- Medio de cultivo (agar + agua al 2%)
- Medio de cultivo (Centeno A y B)
- Medio de cultivo jugo V8
- Agua destilada esterilizada

c. Antibióticos

- Vancomycina
- Ampicilina

3.2.3. Otros Materiales

- Porta y cubre objetos
- Cajas Petri de plástico
- Cajas Petri
- Matraz erlemeyer
- Probeta
- Vaso de precipitado
- Aguja enmangada
- Piceta
- Mechero
- Sacabocados
- Gotero
- Mortero
- Micropipetor

1381

- Tips
- Pinzas
- Bisturí
- Papel toalla
- Papel parafilms
- Papel estañado
- Tapers de plástico
- Guantes
- Alcohol
- Tijeras
- Detergente.

3.3. Material de invernadero

- Mesa
- Macetas
- Sustrato esterilizado
- Tubérculos diferenciales de raza
- Termómetro
- Malla anti-helada
- Malla semi-sombra
- Agua

3.3.1. Insumos químicos

- Tamarón
- Cascade
- Ridomil

3.4. Material de escritorio

- Cámara
- Bolígrafo
- Cuadernillo
- Marcador

0380

3.5. METODOLOGIA

3.5.1. Zonas de recolección de tizón tardío

Se recolectaron de diferentes comunidades de las zonas de producción de semilla de papa del Departamento de Cochabamba (cuadro 7).

Cuadro 7: Municipios, Localidades de recolección de aislamientos de *Phytophthora infestans*

Municipio	Localidad / comunidad
Independencia	Ulupicana, Sinsey Parte libre, Palermo, Quirucillani, Chuñawi grande.
Morochata	Rodeo, Yallani, Piusilla, Lachiralla
Lope Mendoza	Pila Pata, Escalante, Phuyuhuasi, Monte Puncu, Collpana, Laime Toro, Rodeo Chico.
Vacas Mizque	Vacas Cañada, Sacha Sacha, Rodeo, Quiwiña Kasa, Puca Pila, Tipa Tipa, Tin Tin, Raqaypampa.
Colomi	Corani Pampa, Maica Monte, Alto Colomi

0379

3.5.2. Recolección de aislamientos

La recolección de aislamientos de *P. infestans* de los diferentes sectores se realizaron en marzo 2011 hasta abril 2012 en el marco del proyecto tizón tardío de ASDI-UMSS. Y equipo de investigadores, debido a que esta época los factores ambientales son favorables para el desarrollo de la enfermedad, conocido en el lugar como el t'octo de la papa.

La recolección se realizó en cada localidad identificando entre 1-3 parcelas que presentaban la enfermedad, dependiendo del crecimiento vegetativo de la papa, el número de muestras fueron de 5-10 aislamientos y la altitud fue determinada con ayuda del proyecto CISTEL.

La técnica de muestreo se describe de la siguiente manera:

- Se tomaron 1-2 foliolos/planta al azar que presentaban síntomas de *P. infestans*.
- Estos foliolos fueron colocados a una caja petri de plástico que contiene Agar + agua al 2 %.
- Posteriormente las placas fueron selladas con papel parafilm e identificadas con datos del sector que corresponde, finalmente fueron colocadas a una conservadora y llevadas al laboratorio.

0378



Figura 5: Cajas petri traídas de campo conteniendo hojas con síntomas de *P. infestans*

3.6. Procesamiento de los aislamientos

Las muestras recolectadas fueron procesadas para obtención del patógeno, de acuerdo a la metodología descrita por el laboratorio de micología del CIP y consiste en:

3.6.1. Propagación de los aislamientos

- A partir de cada caja petri conteniendo los folíolos de (*Phytophthora infestans*), se hizo un lavado, de las estructuras del hongo con agua estéril, con ayuda de una piceta y dentro un vaso de precipitación.
- La suspensión de micelios y esporangios, fue filtrada primero a través de un filtro de 15 micras (para retención del micelio y restos vegetales), luego, por otro

filtro de 10 micras (para la retención de esporangios). Este filtro conteniendo los esporangios fue lavado con una piceta (con poco agua estéril) y depositado en un vaso de precipitación de 5 ml.

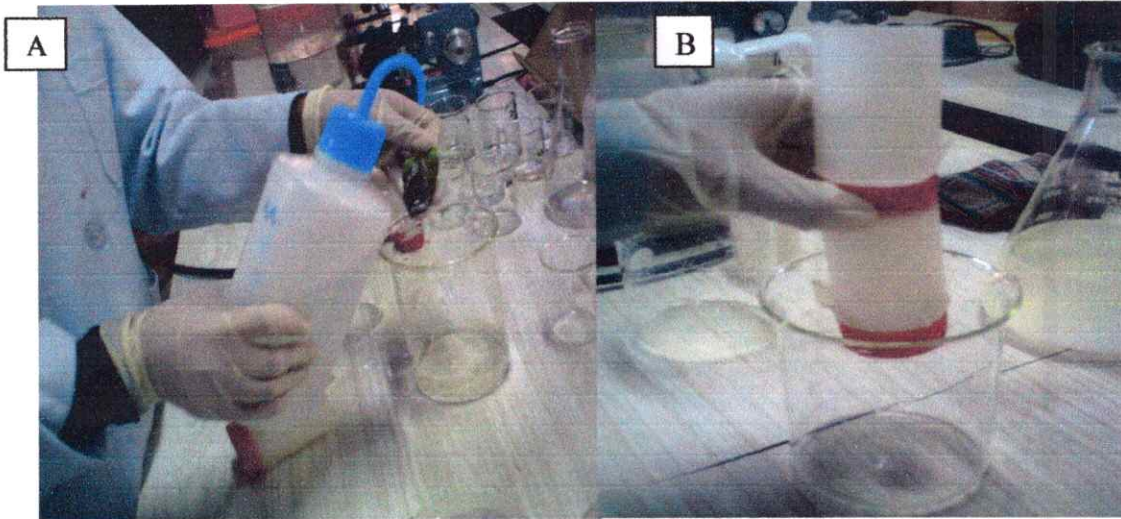


Figura 6: Procedimiento para multiplicación de *P. infestans* A) Lavado de micelio en hojas, B) Filtrado de suspensión de micelio para la obtención de esporangios de *P. infestans*

- De esta suspensión de esporangios, se toma una alícuota y se observa en el microscopio para verificar la cantidad de esporangios presentes en la suspensión. Luego, en el vaso de precipitación conteniendo la suspensión de esporangios se cubre con papel aluminio y se coloca a 4 °C por 40 -60 min, para inducir la producción y liberación de zoosporas.

C377



Figura 7: Esporangios de *P. infestans* visto al microscopio

- Luego de este tiempo, se toma alícuotas de cada asilamiento y se depositan de 2 - 3 gotas de suspensión de zoosporas por rodaja (3 rodajas por /placa/3 repeticiones) de tubérculos de papa de un cultivar susceptible (Waycha), previamente lavados y desinfectados superficialmente. Cada caja de plástico o tapers es dispuesto con papel toalla humedecido con agua estéril, con el propósito de mantener la humedad para el desarrollo de hongo.
- Finalmente estas cajas de plástico, son depositadas en cámaras de incubación de 18 °C y 80 % de humedad relativa, aproximadamente por 7 días. Tiempo promedio para un buen desarrollo de *P. infestans*.

0376

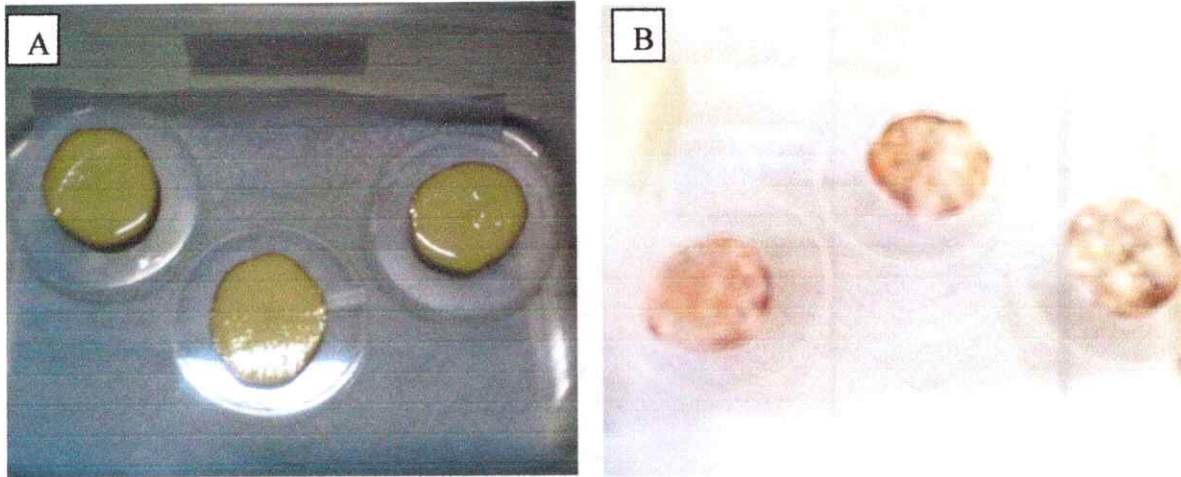


Figura 8: Multiplicación de *P. infestans* en rodajas de papa. A) Inoculación con esporangios de *P. infestans*, en rodajas de papa, B) Colonias del oomycete ya establecidas.

3.6.2. Aislamiento y purificación en medios de cultivo

- Luego del crecimiento del hongo en las rodajas de papa, se transfieren pequeñas porciones de micelio a placas petri conteniendo el medio de cultivo jugo V8. Este medio de cultivo específico para aislamientos de *P. infestans*. Contiene fungicidas y antibióticos, para evitar el crecimiento de contaminantes.
- Las cajas petri son depositados en cámara de incubación a 18 -20 °C por 7 – 10 días.
- Una vez alcanzado el establecimiento de la colonia, los aislamientos, son trasferidos a medio de cultivo Centeno A, con el propósito de conservar el aislamiento y posteriormente transferido a tubos inclinados conteniendo el medio de cultivo Centeno A, para su conservación definitiva.

375

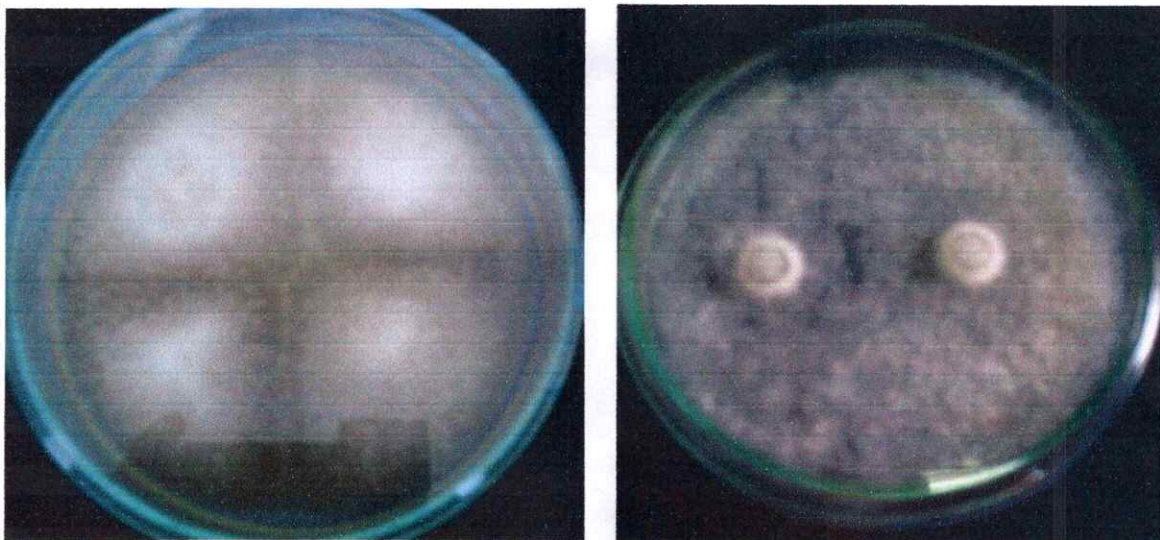


Figura 9: Colonias puras establecidas en medio de cultivo jugo V8

3.7. Caracterización fenotípica

3.7.1. Estructura de razas

El análisis de virulencia fue realizado de acuerdo con la metodología descrita por el CIP, realizada en los invernaderos de la Facultad de Agronomía ubicada en la Tamborada. Para este ensayo se utilizó un conjunto de plantas diferenciales con genes R de resistencia a *P. infestans* para razas simples. Proporcionadas por el Dr. Julio Gabriel (PROINPA).

0374

Cuadro 8: Lista de los diferenciales de raza para *P. infestans* utilizados en ensayo de campo y pruebas de foliolos sueltos.

Código CIP	No CIP	Genes mayores	Observaciones
702514	80	r	Chata Blanca (testigo de susceptibilidad)
800986	428	R1	
800987	429	R2	
800988	430	R3	
800989	431	R4	
800990	432	R5	
800991	433	R6	
800992	434	R7	
800993	435	R8	
800994	453	R9	
800995	561	R10	
800996	543	R11	

Fuente Plata 1998

3.7.1.1. Propagación in vitro de diferenciales

La propagación in vitro se realizó en el laboratorio de Biotecnología, la multiplicación fue realizada por brote, cada diferencial con tres repeticiones, posteriormente fueron llevados a una cámara de crecimiento por 30 días.

0373

3.7.1.2. Aclimatación de plantas in vitro

Transcurrido los 30 días en la cámara de incubación, los plantines fueron trasplantados en vasos desechables previamente esterilizados y llevados al invernadero de aclimatación donde permanecieron por 30 días.



Figura 10: Diferenciales en invernadero de aclimatación

Luego de su aclimatación fueron trasplantadas a macetas y transferidas al invernadero para su producción de tuberculillos. A su madurez se realizó el corte de la parte vegetativa para su posterior cosecha. Una vez cosechado los tuberculillos fueron llevados a una cámara oscura y se esperó su germinación para su próxima siembra.

3.7.1.3. Siembra de diferenciales

Cuando los tuberculillos estaban con brotación se procedió a la siembra en macetas de 1 kgr. Donde contenían un sustrato de 1 de limo y 2 tierra vegetal todo el material debidamente esterilizado para evitar contaminación. En cada maceta se colocaron 2 tuberculillos para asegurar su germinación, fueron identificadas con su código de

procedencia y se taparon con una malla anti-helada y otra semi-sombra. A los 30 días después de la siembra se empezó a realizar la inoculación.

3.7.1.4.Preparación del inoculo

El inoculo utilizado fue preparado de la siguiente manera.

- Los diferentes aislamientos fueron trasferidos a rodajas de papa e incubados en tapers de plástico por 6 – 8 días a 18 -20 °C y 80 a 90% de HR.
- Después de la incubación, las rodajas de papa fueron lavadas cuidadosamente con agua destilada estéril para obtener una suspensión de esporangios y micelio.
- Esta suspensión de esporangios y micelio fueron filtrados a través de filtros de 15 micras (retención de micelio) y 10 (retención de esporangios) para obtener la suspensión de esporangios, y diluir hasta alcanzar una concentración estándar de 5×10^3 esporangios/ml (hematocimetro Hutch and Rosenthal).

3.7.1.5.Obtención de foliolos

- Se tomaron foliolos del tercio medio de las plantas en crecimiento (aproximadamente 30 días después de la siembra).
- Los foliolos fueron cortados en horas de la mañana, con ayuda de un bisturí desinfectando en agua de jabón en cada corte. Estos foliolos fueron lavados en recipiente con agua destilada y antes de ser colocadas en cajas petri, previamente fueron secados con papel toalla.

- Los foliolos fueron colocados en el interior y sobre la tapa superior, exhibiendo el envés del foliolo, y luego, cubriendo con la tapa inferior conteniendo Agar Agua 2%. En cada caja petri se colocó un foliolo (dependiendo del tamaño), con 3 repeticiones por aislamiento y diferencial.

3.7.1.6. Inoculación

- La inoculación se realizó depositando en el envés de cada foliolo una gota de 20 ul de la suspensión de esporangios (5000 esporangios/ml).
- Luego, estas placas petri adecuadamente identificadas fueron llevadas a la cámara de incubación a 18°C y 80 a 90% de HR. Por 6 días.
- La inoculación se realizó en partidas de 3 -5 aislamientos a la vez, cada aislamiento con 3 repeticiones. Algunos aislamientos fueron inoculados en dos oportunidades para su confirmación.

3.7.1.7. Evaluación

La virulencia de los diferentes aislamientos fue evaluada de acuerdo al siguiente criterio:

- Un aislamiento es considerado *virulento* sobre un circular diferencial, cuando se observa una lesión con esporulación desarrollada en el tiempo de incubación (interacción y susceptible).

0280

- Cuando presenta una lesión sin esporulación y menor a 1 cm de diámetro, el aislamiento es considerado *avirulento* y se registra como reacción de hipersensibilidad (HR) (interacción incompatible).
- La evaluación se tomó en cuenta si hay lesión con esporulación es positivo (1) y si es negativo (0).

3.7.1.8. Estimación de la diversidad genética

Para realizar la estimación de la diversidad genética de la estructura racial de los aislamientos se utilizó el índice de Shanon. Este índice fue calculado de acuerdo a las siguiente formula.

$$\text{Índice de Shanon} \quad H_s = - \sum (p_i \cdot \ln p_i)$$

Dónde: $i = 1 \dots N_p$

P_i = proporción de frecuencia de la raza i

N_p = número de las diferentes razas en la muestra

0369

3.7.2. Prueba de Resistencia al Metalaxyl

Para la prueba de resistencia se utilizó el metalaxyl golf (Metalaxyl + mancozeb), porque no se alcanzó a obtener el metalaxyl puro, para realizar la resistencia a este fungicida se realizó dos pruebas, con dos repeticiones para ver su comparación de crecimiento micelial, con el fin de identificar al patógeno si corresponde a una población nueva o antigua.

Para este trabajo se tomó los mismos aislamientos considerados en estructura racial de los 5 municipios, estos fueron sometidos a tres diferentes tratamientos (T0, T1, T2) que contenían metalaxyl+ solubilizante (diluyente del metalaxyl). En medio de cultivo centeno B.

Se considera de suma importancia aclarar que no se pudo obtener el metalaxyl puro, y el medio de cultivo debería ser jugo V8, pero por razones de falta de este medio se tuvo que utilizar el centeno B.

3.7.2.1.Preparación del ingrediente activo

1. Pesar 5 gr. de metalaxyl
2. La muestra debe ser diluida en 19.5 ml de solubilizante (solución stock).
3. Añadir el metalaxyl cuando el medio de cultivo este a una temperatura de 50 °C.
4. Proseguir con el plaqueo.

Después de las 24 horas de plaqueo se procedió a realizar el repique de cada uno los aislamientos frescos (aislamientos con solo 48 horas de incubación). De cada localidad posteriormente llevar a la cámara de incubación por 7 días.

Cuadro 9: Descripción de los tratamientos para resistencia al metalaxyl de cada localidad.

Localidad	Aislamiento	Solución Stock (ml)			Medio de cultivo Centeno B (lts.)			Solubilizante (ml)		
		T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
Lope Mendoza	Escalante	0	0.05	1	1	1	1	1	0.95	0
	Monte Puncu A	0	0.05	1	1	1	1	1	0.95	0
	Laimé Toro	0	0.05	1	1	1	1	1	0.95	0
Independencia	Palermo	0	0.05	1	1	1	1	1	0.95	0
	Sinsey Palermo	0	0.05	1	1	1	1	1	0.95	0
Morochata	Piusilla	0	0.05	1	1	1	1	1	0.95	0
Vacas Mizque	Rodeo –vacas	0	0.05	1	1	1	1	1	0.95	0
	Tipa Tipa	0	0.05	1	1	1	1	1	0.95	0
Colomi	Alto Colomi	0	0.05	1	1	1	1	1	0.95	0
	Maica Monte	0	0.05	1	1	1	1	1	0.95	0
	Corani Pampa	0	0.05	1	1	1	1	1	0.95	0

3.7.2.2. Evaluación

Las evaluaciones se realizaron cada 24 horas después del repique, el objetivo es medir el crecimiento en mm/día de la colonia trazándose dos líneas rectas con coordenadas de (X, Y), desde el centro de la caja petri, para obtener la curva de progreso de la enfermedad.

Las evaluaciones deben realizarse cada día hasta que la colonia del testigo ocupe toda la placa. En ese momento se podrá caracterizar los aislamientos.

367

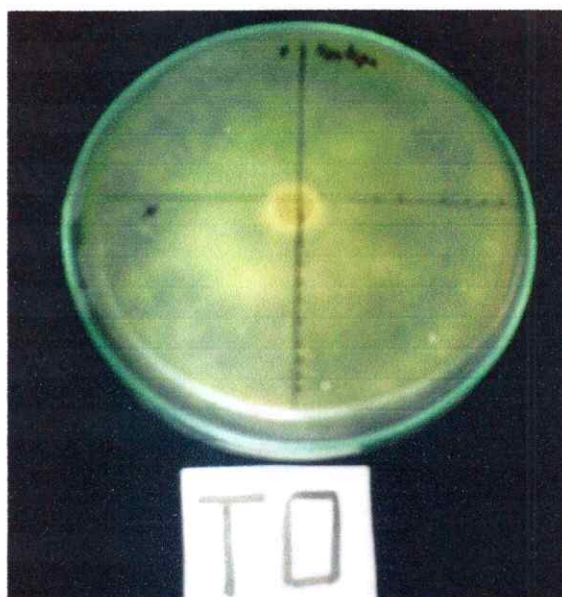


Figura 11: Forma de evaluación en cajas petri (trazando dos líneas X yY)

Para clasificar los aislamientos se siguió los siguientes pasos, con referencia al testigo.

1. Resistente: Crecimiento $>40\%$ en las concentraciones de 5 y 100 $\mu\text{g/ml}$
2. Intermedio: Crecimiento $>40\%$ en las concentraciones de 5 $\mu\text{g/ml}$ $<40\%$ en 100 $\mu\text{g/ml}$.
3. Sensible: Entre 5 y 100 $\mu\text{g/ml}$ $< 40\%$ de crecimiento Oug/ml .

0366

IV. RESULTADOS

4.1. Colección de aislamientos de *P. infestans*

Se estableció una colección de 210 aislamientos de 5 provincias y 30 localidades con un total de 64 parcelas muestreadas (cuadro 10). Los aislamientos fueron identificados con su código respectivo. Actualmente se encuentran en conservación en el laboratorio de Fitopatología. Las condiciones de clima y humedad del agro ecosistema fueron aptos para el establecimiento de la colección la altitud vario entre 2300- 3300 msnm.

Para establecimiento de la colección las parcelas muestreadas fueron conducidas por los agricultores de la localidad, las variedades muestreadas fueron, Waycha, Desiree, Rosita, Phureja roja, Yuraj toralapa, Robusta, doble HH, Rosalía, Puca toralapa. Estas variedades se presentaron en casi todas las parcelas muestreadas.

0365

Cuadro 10: Colección de aislamientos de *P infestans*

Municipio	Localidad	Nº de parcelas	Nº de aislamientos
Independencia	Ulupicana	1	7
	Chuñawi grande	2	5
	Palermo	3	8
	Sinsey	4	12
	Quirucillani	1	7
Morochata	Rodeo	1	6
	Lachiralla	1	7
	Yallani	1	6
	Piusila	3	13
Colomi	Corani Pampa	6	24
	Maica Monte	3	11
	Chulumani	5	9
	Alto Colomi	2	5
Vacas	Vacas Cañada	1	3
Mizque	Sacha Sacha	2	4
	Rodeo	2	5
	Quiwiña Kasa	3	6
	Puca Pila	2	7
	Tipa Tipa	3	6
	Tin Tin	1	5
	Raqaypampa	3	7
	Lope Mendoza	Pila Pata	1
Cueva Puncu		1	4
Chunchungani		1	3
Laimo toro		1	3
Rodeo Chico		2	7
Phuyuhuasi		2	4
Escalante		1	7
Monte Puncu		3	8
Collpana – Totoro		2	6
Total		64	210

4.2. Caracterización Fenotípica

4.2.1. Estructura de Razas

En el cuadro 11. Se muestra los resultados de los complejos de razas obtenidas con los diferentes aislamientos de *P. infestans* de la zonas productoras de papa.

Se evaluaron 11 aislamientos de *P. infestans* procedentes de las diferentes zonas del departamento de Cochabamba. Utilizando 11 diferenciales con genes R.

Se obtuvieron 3 complejos de razas de *P. infestans* donde el primer complejo de raza contiene los genes R1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y se encuentra en las zonas de Monte Puncu, Laime Toro, Rodeo, Colomi y Corani Pampa, el segundo complejo que tiene los genes R1,2,3,4,6,7,8,9,10,11, se encuentra en las zonas de Escalante, Palermo, Sinsey Palermo y Tipa Tipa. Y el tercer complejo de raza tiene los genes R1,2,3,4,6,7,9,10,11. Se encuentra en las zonas de Piusilla y Maica Monte. Según Plata (1998) en Morochata con 80 aislamientos caracterizados de 5 comunidades, se registraron 20 fenotipos diferentes los que están conformados por tres-diez genes. Los genes de virulencia más frecuentes son el 1-2-3-4-7-10-11. Los genes 6 y 8 no fueron detectados. El mismo autor menciona que en Piusilla los genes de virulencia que se encontraron con más frecuencia son el 1-2-3-6-7-10-11, menciona que en esta población las razas son menos complejas.

Comparando los resultados del presente trabajo con Plata(1998) se evidencia que hay una adición de 2 genes el R4 y R9, esta adición sugiere que la estructura racial muestra una tendencia a la complejidad.

Según Coca Méndez (2001) en Lope Mendoza en la zona de Chullchunq'ani nos dice que en 10 aislamientos evaluados los genes de virulencia más frecuentes fueron 1-2-3-4-5-6-7-8-10-11 exceptuando el gen 9 que no se detectó. Comparando resultados nos muestra que

en la actualidad se registró la adición del gen R9 que nos lleva a demostrar que la estructura racial en esta comunidad es más compleja con el transcurso del tiempo.

En el municipio de Mizque el complejo de razas es la misma que en Lope Mendoza, por lo tanto comparando con los datos de Coca Méndez (2001) hay una adición del gen R9. De igual manera se evidencia una tendencia a la complejización.

En Colomi se encuentra dos complejos de razas, un complejo igual que en Lope Mendoza y el otro complejo igual que en la zona de independencia –Morochata, nos muestra que en este sector la variabilidad se puede atribuir a la adición de los genes R4, R9 debido al uso de semilla proveniente de otras zonas por ejemplo Lope Mendoza. Lo resultante es la diseminación de nuevas poblaciones de *P. infestans*.

Cuadro 11: Estructura de razas de aislamientos de *P. infestans* de diferentes localidades del departamento de Cochabamba.

Provincia	Municipio	Localidad	Aislamiento	Virulencia											Raza
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Carrasco	Lope Mendoza	Escalante Monte Puncu A Laima toro	E-0138 M-001 L-003	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R1,2,3,4,6,7,8,9,10,11
				S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11
				S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Independencia	Independencia	Palermo Sinsey Palermo Piusilla	P-002 P-005 P-007	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R1,2,3,4,6,7,8,9,10,11
				S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R1,2,3,4,6,7,8,9,10,11
				S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S
Mizque	Mizque	Tupa Tupa	T-073	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R1,2,3,4,6,7,8,9,10,11
				S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11
				S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Chapare	Colomi	Rodeo Colomi Corani Pampa Maica Monte	R-029 C-009 Cp-015 Ma-008	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11
				S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11
				S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S: Reacción susceptible
R: Hipersensibilidad

Cuadro 12: Frecuencia e índice de diversidad genética de razas de aislamientos de *P. infestans* del Departamento de Cochabamba.

Raza	Frecuencia	Proporción Pi	Pi Ln Pi
R1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	5	0.454	- 0.358
R1,2,3,4,6,7,8,9,10,11	4	0.363	- 0.367
R1,2,3,4,6,7,9,10,11	2	0.181	- 0.309

Numero de aislamientos 11

Numero de diferenciales 11

Índice de Shanon ($H_s = -\sum p_i \ln p_i$)

1,034

Por otra parte, en la complejidad de factores de virulencia en las 3 razas obtenidas, están formadas por 9-11 genes, el fenotipo más predominante tiene 11 genes, la misma que presenta una frecuencia alta siendo las razas R1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 ($f_r = 0.454$). Pero, no obstante el índice de diversidad de razas de Shanon es $H_s = 1,034$ los cuales comparados con otras poblaciones asexuales en otros países es muy bajo.

Con estos resultados podemos describir que su diversidad de razas es baja, similar a la de otras poblaciones asexuales registradas como es la de Colombia donde los índices de diversidad genética son de $H_s = 1.3$, en México su índice es $H_s = 3.45$ (Fry y Spielman 1991). En el cusco (Perú) se registran como índice de razas $H_s = 1,69$ (Coca Morante 1998).

El índice racial encontrado, nos demuestra que no hay una amplia variación genética en Cochabamba, por lo tanto podemos mencionar que no hubo migración del patógeno de otros sectores, por ende todavía no se registra que haya el tipo de reproducción sexual en nuestro departamento.

0362

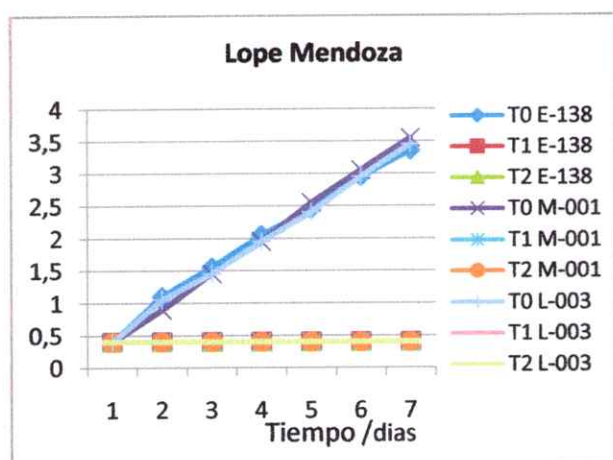
4.2.2. Resistencia al metalaxil.

Se utilizaron los mismos aislamientos para esta prueba, al someter a estos, a los 3 tratamientos con 2 repeticiones se obtuvo los siguientes resultados:

En la primera evaluación se registró un crecimiento micelial solo en el tratamiento (T0), y en los tratamientos T1 y T2 el crecimiento micelial fue cero. En la segunda repetición se obtuvo resultados iguales.

Las curvas de progreso de la enfermedad de ambas pruebas se muestran a continuación.

Primera evaluación.



Segunda evaluación

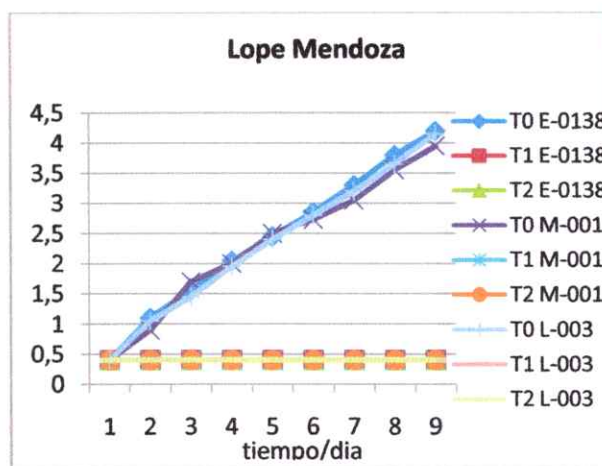


Figura 12: Comparación de las dos evaluaciones en resistencia al metalaxyl de la localidad de Lope Mendoza.

0361

Primera evaluación.

Segunda evaluación

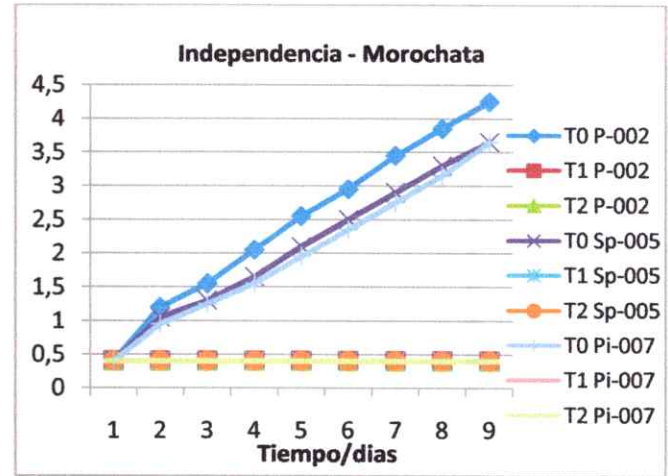
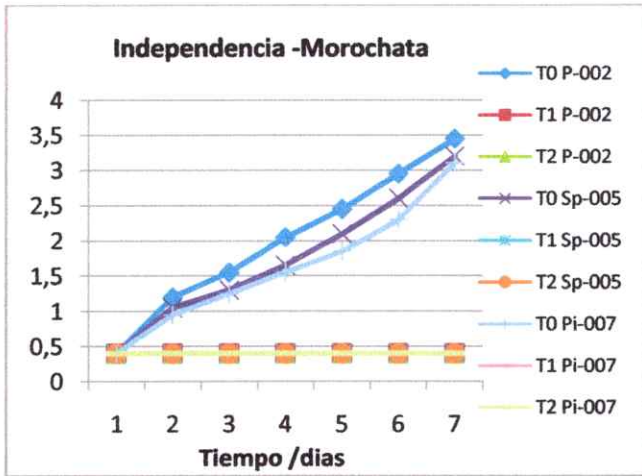


Figura 13: Comparación de las dos evaluaciones en resistencia al metalaxyl de la localidad de Independencia –Morochata.

Primera evaluación.

Segunda evaluación

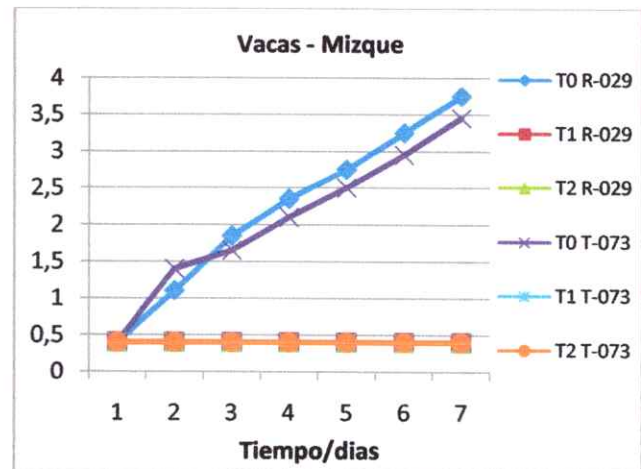
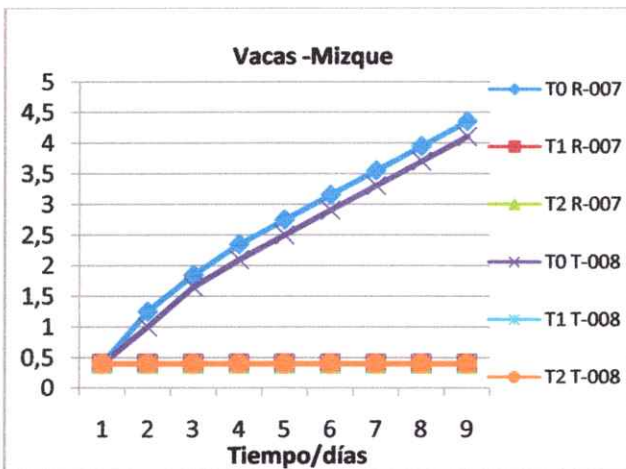


Figura 14: Comparación de las dos evaluaciones en resistencia al metalaxyl de la localidad de Vacas-Mizque.

369

Primera evaluación.

Segunda evaluación

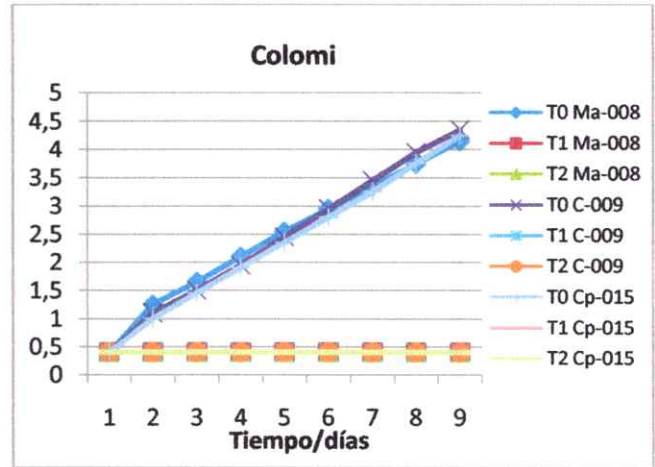
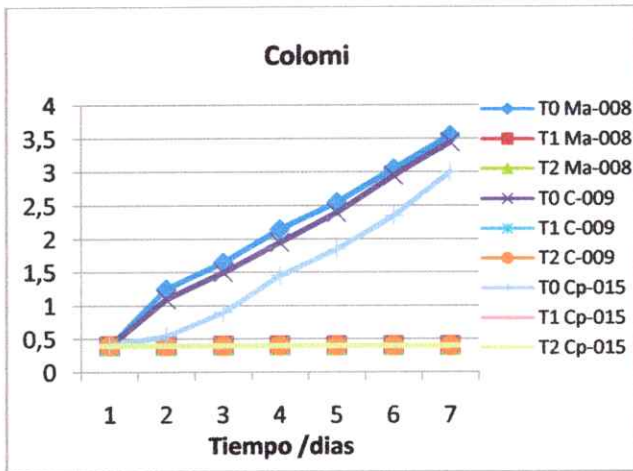


Figura 15: Comparación de las dos evaluaciones en resistencia al metalaxyl de la localidad de Colomi.

359

De acuerdo con los parámetros de evaluación y con los resultados obtenidos en las 2 repeticiones, se demuestra que en los 11 aislamientos, en el tratamiento T0 el crecimiento micelial fue normal ya que alcanzo a cubrir toda la placa en 9 días según la segunda evaluación, en cambio en el tratamiento T1 y T2 los aislamientos de *P. infestans* evaluados, el crecimiento micelial fue cero, mostrando así que dichos aislamientos ubicados en las diferentes zonas productoras de papa del departamento de Cochabamba no tienen resistencia al fungicida metalaxyl. Por lo que son considerados como sensibles.

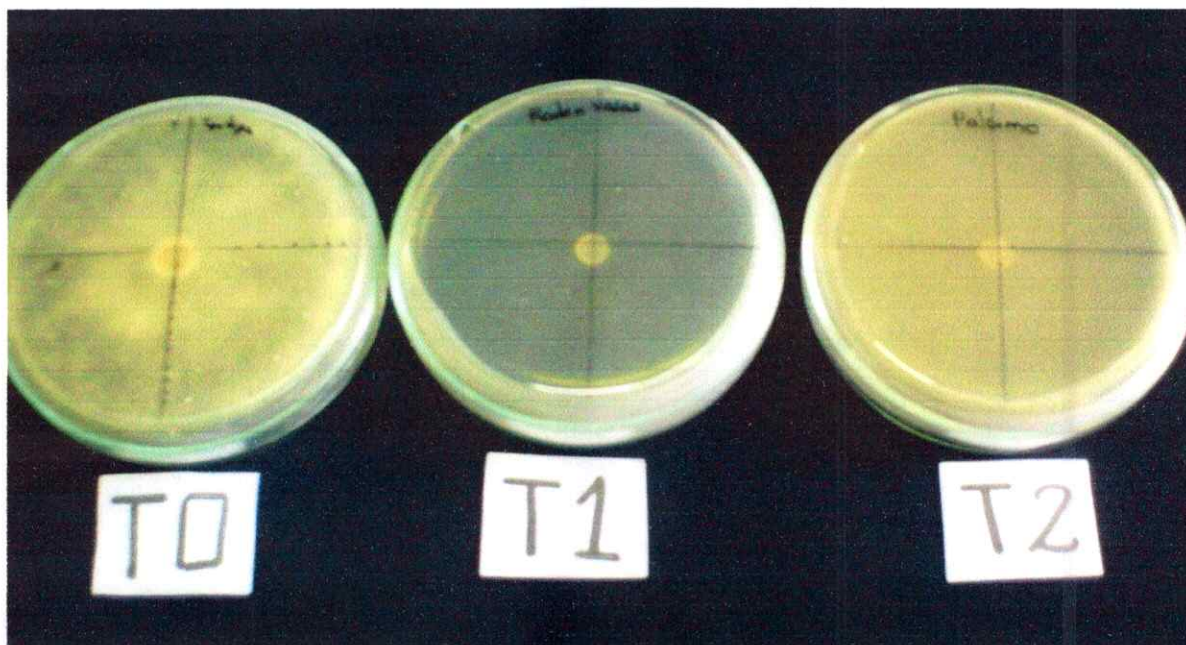


Figura 16: Cajas petri con los tratamientos (T0, T1 y T2)

Según Reis et al. (2003), se considera que aquellos aislamientos que crecieron menos del 40% con respecto al testigo, a las concentraciones de 5 y 100ug/ml, son registrados como sensibles; los que crecieron más del 40% a la concentración de 5 ug/ml y menos del 40% en la concentración de 100 ug/ml se registraron como tolerantes y aquellos aislamientos que registraron un crecimiento mayor a 40% con respecto al testigo tanto en la concentración de 5 ug/ml como en la de 100ug/ml, se consideran como resistentes.

Matuszak et al. (1994) durante 1998 y 1989 obtuvieron aislamientos *P. infestans* de papa en Michoacán y otros Estados del país. Al evaluar la sensibilidad de los individuos a metalaxyl se observó que los

35

aislamientos provenientes de Michoacán fueron sensibles al ser expuestos a este fungicida, por lo que el control químico mediante la utilización a este fungicida, era efectivo y recomendable para controlar el tizón tardío dentro del Estado. Asimismo E. Garay-Serrano, (comunicación personal) menciona que en las poblaciones de *P. infestans* aisladas de papa provenientes de Patambán, Michoacán, el porcentaje de los aislamientos que resultaron sensibles a metalaxyl corresponde al 60% y como tolerantes al 40%, sin aislamientos detectados como resistentes. Sin embargo, de acuerdo con E. Garay-Serrano (comunicación personal), en las poblaciones de Patzcuaro se detectaron organismos resistentes (33%). Esto es indicativo de que algunas poblaciones son más tolerantes al metalaxyl y por lo tanto el control del tizón tardío se dificultará más (Matuszak, 1994; Goodwin, 1997; Fernandez-Pavia et al 2005).

0357

V. CONCLUSIONES:

De los 5 municipios visitados se tiene una colección de 210 aislamientos de *P. infestans* en laboratorio.

Se identificaron 3 complejos de razas distribuidas en el departamento de Cochabamba, los genes de virulencia con mayor frecuencia son el R1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 y 11 que se encuentran en las zonas de Monte Puncu, Laime Toro, Colomi, Corani Pampa y Rodeo. Las razas más complejas se encuentran en la zona de Lope Mendoza y Colomi por que en cada una de estas localidades se encuentran 2 complejos de razas.

En algunas zonas hay una tendencia a la complejización de razas, por la adición de nuevos genes por ejemplo en Morochata los genes R4 y R9, en Lope Mendoza el gen R9 mostrando así que hay mayor complejidad racial.

El índice de diversidad genética hallada en Shanon es (1,034), donde muestra que la diversidad es baja, no obstante similar a la de otras poblaciones con reproducción asexual. Por lo tanto con los resultados obtenidos se demuestra que en el Departamento de Cochabamba, todavía no se manifiesta el tipo de reproducción sexual, pero no se descarta encontrar el tipo de reproducción sexual en el interior de nuestro país.

Todos los aislamientos evaluados por resistencia al metalaxyl mostraron ser sensibles a este fungicida.

0356

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda que para tener datos más exactos en índice racial, se realice el trabajo consecutivamente por lo menos 3 años.
- Para poder determinar si las poblaciones de *P. infestans* que predominan en Bolivia son nuevas o antiguas se recomienda realizar otro trabajo de investigación donde las zonas de recolección abarquen toda Bolivia.
- Para poder realizar manejo y control de *Phytophthora infestans* se plantea realizar un trabajo de investigación en control integrado.

0355

VII. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Agrios G. N. 1988. Fitopatología. Enfermedades de las plantas. Trad. Por Manuel Guzmán Ortiz, 2da reimpr. Edit. Limusa. Mexico D. F. 256 p.
- Abad, Z. G. 1983. *Phytophthora infestans*, en la zona Central del Perú: Rango de hospedantes variabilidad y resistencia vertical. Tesis M.Sc. Universidad Agraria La Molina. Lima, Perú.
- Black W. 1970. The Nature and Inheritance of Field Resistance to Late Blight (*Phytophthora infestans*). in Potatoes. Am potato J. 47: 279-288.
- Brondy, U.; Nelson, R.R.; Gregory, L. V. 1986. The residual and intetactive expressions of "defeated" wheat stem rust resistance genes. Phytopathology 76: 546-549.
- Calderoni A. 1978. Enfermedades de papa y su control. Hemisferio Sur. Argentina. P.79.
- Centro Internacional de la Papa (CIP). 1982 World potato facts. Lima, Perú.
- Centro Internacional de la Papa (CIP). 1992. Proyecto especial: producción de la papa con resistencia estable al tizón Tardío. Lima, Perú 3 p.
- Coca M. M. 1998. Variabilidad genética de poblaciones de *Phytophthora infestans* de cultivos de papa (*Solanun tuberosum* L.) de Cuscu, Perú.
- Coffey, M. D. 1987. *Phytophthora* root rot of avocado an integrated approach to control in California. Plant disease 71: 1046-1052.
- Coffey, M. D. 1991. Strategies for the integrated control of soilborne *Phytophthora* species. Pages 411-432 in: *Phytophthora*. Lucas, J. A.; Shattock, R. C.; Shaw, D. S.; Cooke, L. R., (Eds). Cambridge, Great Britain. British Micological Society.

Colque C. 1996. Caracterización de gens de virulencia en poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, que infectan a la papa y determinación de la resistencia en *Solanum spp.* Ing. Agr. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia 223 p.

Dickson, C.; Lucas, J. 1987. Patología Vegetal y patógenos de plantas. Limusa. México. (Citado en Moscoso, E. 1993. Determinación de la frecuencia de genes R, para Resistencia a *Phytophthora infestans* en familias avanzadas de papa (*Solanum tuberosum*). Tesis Ing. Agr. Facultad de Ciencias Agrícolas Cutuglahua, Pichincha. Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador).

Dowley, L. J.; O'sullivan, E. 1981. Metalaxil-resistant strains of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Ireland. Potato Research 24: 417-421.

Drenth, A. 1994. Molecular genetic evidence for a new sexually reproducing population of *Phytophthora infestans* in Europe. Ph. D. Thesis. Wageningen, Netherlands.

Ellis, C. R; Aviles, I. 1977. Enfermedades de la papa. II Tizón Tardío.

Eskes A. B. 1983. Expression of incomplete resistance to pathogens. Durable resistance in crops. Plenum Press NY.

Fernandez- Northcote E., Navia O y Gandarillas A., 1999 Bases de las estrategias de Control Químico del Tizón Tardío de la papa desarrolladas por PROINPA en Bolivia. Revista Latinoamericana de la papa. Asociacion Latinoamericana de la papa (ALAP). 25 p.

Flor, H. H. 1971. Current status of the gene hypothesis. Annual Review of Phytopathology. 9: 275-296.

French, E. R; Forbes, G; Landeo, J. 1994. Ola migratoria de variantes más agresivas de *Phytophthora infestans* amenazan a la papa. Aafitopatologia. 29 (1):5-18

Fry, W.; Tooley, P. Spielman, L. 1989. The importance of the Perfect Stage of *Phytophthora infestans* from the Standpoint of epidemiology and adaptation. In Report of the Planing Conference on Fungal Diseases of the Potato held at CIP, Lima September 21-25, 1987. Fungal Disease of the Potato.

Fry W. E., Goodwin S. B., Tooley P. W.; Sujkowski L. S., Koh Y. J.; Cohen B. A., Spielman L. J.; Deahl K. L., Inglis D. A. y Sandlan K. P. 1993. Historical and Recent Migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, Pathways, and implications. *Plant Disease*. July 1993. 77 (7): 653-659.

Fry W. y Spielman L. 1989. The importance of the perfect stage of *Phytophthora infestans* from the Standpoint of epidemiology and adaption. In Report of the planning Conference on Fungal Diseases of the potato held al CIP, Lima, September 21-25, 1987. *Fungal Diseases of the potato*.

Gabriel J. 1994. Resistencia a Híbridos Interespecíficos de papa al tizón tardío *Phytophthora infestans*(Mont) De Bary, su caracterización citológica. Tesis MSc Especialista en Genética. Colegio de Post Graduados. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Montecillo, México. 89 p.

Gabriel J. y Carrasco E. 1998 b. Evaluación Preliminar de la Resistencia Durable al tizón *Phytophthora infestans* en Cultivos Nativos de papa del Banco de Germoplasma Boliviano. P 153 -158. En Daniel y Osvaldo Chicaiza (Ed.) Segundo taller de PREDUZA en Resistencia Duradera en Cultivos Altos en la Zona Andina. 22-24 Septiembre 1998. Cochabamba, Bolivia.

Gabriel J. y Carrasco E. 1999. El estudio de la resistencia a enfermedades y su uso en la Agricultura Moderna p 32-42 en: Curso sobre aspectos técnicos en el Manejo de los Patosistemas de cultivos Altos, Resúmenes de seminario sobre resistencia duradera. Abril 22-27 de 1999. Quito, Ecuador.

Gallegly, M. E.; Galindo, J. 1958. Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in Nature in México. *Phytopathology* 48: 274-277.

Gallegly M. E. 1975. Genetics of pathogenicity of *Phytophthora infestans* . *Ann. Rev. of Pl. Pathology* p. 375-396.

García C. 1997. A propósito de la introducción de aislamientos de *Phytophthora infestans* papa investigación en Colombia. *Agronomía Colombiana*, julio-diciembre 1997. 14 (2) 154-157.

Henfling J. W. 1987. El tizón Tardío de la papa *Phytophthora infestans*. 2ª ed. Revista. Boletín de Información Técnica 4. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 25 p.

Herbas R. 1981. Manual de Fitopatología. Universidad Técnica de Oruro, Bolivia. 144 pp.

Hooker W. J. 1980. Compendio de enfermedades de la papa. Nematodos parásitos de la papa. Centro Internacional de la papa (CIP). Lima, Perú. P. 131-134.

Howard, H. W. 1970. Genetics of the potato *Solanum tuberosum*. Springer. New York.

Junchaya G. 1983. *Phytophthora infestans* en la Zona central de Perú: Rango de Hospedantes Variabilidad y Resistencia Varietal. Tesis M Sc. Fitopatología Lima, Perú 211 p.

Keyser, J.E. 1994. North America Research Scientist prepare to deal with complex new threats to potato crops. International Telex Service.

Landeo, j. 1989. Late Blight Breeding Strategy at CIP. In Report of the Planning conference on Fungal Diseases of the Potato (1987, Lima, Perú). Working papers. Lima, Perú, Centro Internacional de la Papa. p. 57-74.

Large, E.C. 1952. The interpretation of progress curves for potato blight and plant diseases. Plant Pathol. 1: 109-117.

Mont Koc R. 1993. Principios de Control de Enfermedades de las Plantas. Centro Preuniversitario. Universidad Agraria La Molina. Lima Perú. 287 p.

Montaldo A. 1984. Cultivo y Mejoramiento de la papa. Editado por Matilde De La Cruz, Fanny De La Torre y Julio Escoto B. Edit. IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). Serie: Libros y Materiales educativos 7 54. San José, Costa Rica. 706 p.

Morales, H.R. 1994. Relación entre la epidemia de *Phytophthora infestans* y la producción en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). Tesis Ing. Agr. Facultad de Ciencias Agrícolas Pichincha, Ecuador. Quito, Ecuador.

Moscoso E. 1993. Determinación de la Frecuencia de Genes R, para Resistencia a *Phytophthora infestans* en familias avanzadas de papa (*Solanum tuberosum*). Tesis Ing. Agr. Facultad de Ciencias Agrícolas Pichincha, Universidad Central de Ecuador. Quito, Ecuador.

Navia O. y Fernández – Northcote E. 1996. Manejo Integrado del tizón (MIP-Tizon). Programa de Investigación de la papa (PROINPA). Fitopatología ficha técnica 4: 1-4.

Nelson R. 1975. Genetics of Horizontal Resistance to Plant Diseases. *Phytopathology* 16: 359-378.

Niks R. E. y Lindhout W. H. 1999. Curso sobre Mejoramiento para Resistencia de enfermedades y plagas. 2ª ed. PREDUZCA, organizado por Daniel L. Danial. Quito, Ecuador 227 p.

Niederhauser. J. S. 199. *Phytophthora infestans*, the Mexican connection. Chapter 3. In. Lucas J. A. de *Phytophthora*. Cambridge, University.

Ñustez, C.A.; Estrada, N.; Martínez, R. 1990 Selección de híbridos de especies de papa por resistencia a *Phytophthora infestans* (Mont) Bary, fertilidad y Potencial Productivo. *Agronomía Colombiana* 7: 3-16.

Ordoñez M. E. 1993. Identificación de efectos residuales de Genes Mayores de Resistencia a *Phytophthora infestans*, en patata (*Solanum tuberosum*). Tesis Lic. Departamento de Ciencias Biológicas Cutuglahua. Pichincha. Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.

Otazu V., Hoopes R. W. y Caero G. 1982. El tizón tardío de la papa y su control. Ministerio de Asuntos Campesinos y Agropecuarios (MACA), Instituto de Tecnología Agropecuaria (IBTA). Cochabamba-Bolivia.

350

Parlevliet J. 1979. Components of Resistance that Reduce the Rate of Epidemic Development. Annual review Phytopathology 17: 203-212.

Parlevliet J. 1994. Resistencia duradera y como realizar la selección para obtenerla. P 1-8 en: Memorias del primer Taller sobre Resistencia Duradera en Cultivos Alto Andinos de Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú. 30 de mayo-3 junio de 1994. Quito, Ecuador.

Parlevliet J. 1979 b. Identificación y Evaluación de Resistencia Cuantitativa. P 201 -235. En Daniel L. Danial (Ed.) en: Primer Taller de PREDEZCA; Resistencia Duradera en Cultivos Altos de la Zona Andina 22-24 de Septiembre de 1997. Quito, Ecuador.

PROINPA, 1996, Informe Anual (compendio) 1994-1996. PROINPA. Cochabamba – Bolivia.

PROINPA, 1998, Informe Anual (compendio) 1997-1996. PROINPA. Cochabamba – Bolivia.

Reddick, D. 1939. Whence came *Phytophthora infestans*. Chron Bot 5: 410-412. (Citado en Abad, Z.G. y Abad, J.A. 1997. Another look at the origen of late blight of potatoes, tomatoes and pear melon in the Andes of South America. Plant Disease 81 (6): 682 - 688).

Sardiña, J. 1942. La obtención de las plantas resistentes enfermedades. Coruña, Estacion de Fitopatología. (Citado por Moscoso, E. 1993. Detrminación de la frecuencia de genes R, para resistencia a *Phytophthora infestans* en familias avanzadas de papa (*Solanumtuberosum*). Tesis Ing. Agr. Facultad de Ciencias Agrícolas Cutuglahua, Pichincha. Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.)

Spielman, L. J. Drenth, A.; Davidse, L.C.; Sujkoswky, L.J; Gu, W.; Tooley, P.W.; Fry, W. E. 1991. A second migration and population displacenment of *Phytophthora infestans*. Plant Pathology 40: 422-430.

Sujkowski, L. S. 1986. Seasonal variation in pathogenicity of *Phytophthora infestans*Journal of Phytopathology 117:160-172.

349

Tooley P. W., Sweigard J. A. y Fry W. E. 1986. Fitness and virulence of *Phytophthora infestans* isolates from sexual and asexual populations. *Phytopathology* 76 (11); 1209-12012.

Turkesteen L. J. 1993. Durables Resistance of potatoes against *Phytophthora infestan*. In *Durability of Disease Resistance*. Jacobs Th. And Parlevliet J. E. (Ed.) p. 115-124. Klumer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.

Van Oijen, M. 1991. Componentes of resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a review of the literatura. Identification of the major characterteristics of potato cultivars which affect yield loss caused by Late blight. Ph.D. Tesis., Agricultural University, Wageningen, Netherlads.

Walker, J.C. 1973. *Patología Vegetal*. 2ed. Trad. Por Antonio Aguirre. Omega, Barcelona, España. 239-252.

Watie R. L., Stewart G.R., Mackay J., Bevan J. y Lennartson M. 1993. Exploiting blight resitance for sustainable potato cultivation. *Biologi Italiano* 12 (7): 18-22. En *Resistencia el fundamento del manejo Integrado de Patógenos para el tizón tardío (Phytophthora infestans)* George R. Mackay. Lima, Perú.

Zan, K. 1962. Activity of *Phytophthora infestans* in soil in realtion to tuber infection. *Transactions of the British Mycological Society* 45, 205-221.

348