PN-ABJ-864
74578

Evaluación de Resistencia de la Papa al Nematodo del Quiste *Globodera pallida*

J. Franco, A. González y A. Matos

1990

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP)

Esta publicación se imprimió en los talleres
de la Unidad de Comunicación,
Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú, 1990.

Tirada: 1 000

XVIII-N&E-S-02-O-1 000

ISBN-92-9060-140

CONTENIDO

	Agradecimientos	iv
	Prólogo	v
1.	Introducción	1
2.	Consideraciones Generales	2
	2.1 Resistencia	2
	2.2 Fuente de inóculo	2
	2.3 Obtención de inóculo	4
	2.4 Viabilidad del inóculo	4
	2.5 Exudado radicular	5
	2.6 Tipos de inóculo	5
	2.7 Estandarización del inóculo	7
	2.8 Inoculación	7
3.	Evaluación de resistencia en plántulas provenientes de semilla.	7
	3.1 Prueba individual	8
	3.1.1 En vasos de plástico	8
	3.1.2 En platos de petri	12
	3.2 Prueba masal	13
4.	Evaluación de resistencia en esquejes	18
	4.1 Prueba en maceta	19
	4.2 Prueba en platos de petri	21
5.	Evaluación de resistencia en tubérculos	24
	5.1 Prueba en maceta	24
	5.2 Prueba en recipiente cerrado	29
	5.3 Prueba en platos de petri	32
	5.4 Prueba en campo	36
6.	Fuentes de resistencia.	43
7.	Criterios y parámetros de selección en el CIP.	44
8.	Conclusiones.	44
9.	Referencias bibliográficas utilizadas	51
	Anexo	55

AGRADECIMIENTOS

La publicación del presente documento representa el esfuerzo mancomunado de un gran número de técnicos pertenecientes a diversos organismos tanto nacionales como extranjeros, que con su colaboración e interés han permitido evaluar y procesar abundante información obtenida por ellos mismos. Los autores reconocen y agradecen el apoyo prestado por los técnicos Adán Vega, Ricardo Vega y Neri Arroyo del Departamento de Nematología y Entomología del Centro Internacional de la Papa (CIP). Con su participación invalorable han hecho posible la conducción de los diversos estudios y por lo tanto la preparación de esta publicación.

De manera especial reconocemos la participación de la Dra. María Scurrah, fitomejoradora del CIP y responsable del programa de mejoramiento para resistencia al nematodo del quiste de la papa G. pallida, quien constantemente nos proporciona material genético para su evaluación. Igualmente, agradecemos al Dr. G. Prain por la valiosa información proporcionada sobre el comportamiento de la variedad María Huanca en pruebas de campo realizadas con agricultores.

Finalmente nuestro reconocimiento a todas aquellas personas que en una u otra forma prestaron su colaboración en las diversas etapas de desarrollo de la metodología descrita en la presente publicación.

PROLOGO

El nematodo del quiste de la papa, con sus especies Globodera rostochiensis y Globodera pallida, es considerado como uno de los organismos más importantes que afectan el cultivo de la papa. No sólo ocasiona severas pérdidas en el rendimiento sino también drásticas medidas cuarentenarias, una vez detectada su presencia. La búsqueda de fuentes de resistencia a Globodera spp. en diversas colecciones de material genético de papa (Solanum sp.), tanto cultivado como silvestre, ha ocupado desde hace mucho tiempo, y en diversos países, la atención de numerosos investigadores. La metodología para la identificación de estas fuentes y la evaluación de las progenies resultantes de los trabajos de mejoramiento, destinados a incorporar esta resistencia a material genético avanzado, ha jugado también un papel determinante en el éxito o fracaso de este esfuerzo conjunto que llevan a cabo tanto los nematólogos como los especialistas dedicados al mejoramiento de cultivos.

Este documento se ha preparado con el propósito de brindar información y detalles, obtenidos durante varios años de investigación, sobre el desarrollo y la aplicación de diversas técnicas que se utilizan para evaluar material genético de papa por su resistencia al nematodo del quiste, en el departamento de Nematología y Entomología del Centro Internacional de la Papa (CIP). Estas experiencias han permitido diseñar una secuencia lógica y eficiente de pasos que han culminado en el lanzamiento de una variedad de papa resistente a las razas P4A y P5A de G. pallida.

Los métodos y el sistema que se presentan en esta publicación, no se consideran como única alternativa que deba reemplazar sistemas ya establecidos en otros programas. Es más bien un documento que puede ser empleado para complementar otros sistemas y ofrecer diversas alternativas. Estas, una vez probadas y seleccionadas según las condiciones y requerimientos del programa interesado, permitirán establecer un sistema práctico y eficiente para evaluar y seleccionar material genético de papa con resistencia al nematodo del quiste de la papa Globodera spp.

EVALUACION DE RESISTENCIA DE LA PAPA
AL NEMATODO DEL QUISTE Globodera pallida

J. Franco, A. González y A. Matos

1. INTRODUCCION

La evaluación para resistencia a G. rostochiensis (Woll.) Behrens 1975 y G. pallida (Stone) Behrens 1975, es uno de los pasos más importantes en todos los programas de mejoramiento. Con el descubrimiento de algunas especies de Solanum sp. resistentes al nematodo del quiste (Ellenby, 1952; Huijsman, 1960; Dunnett, 1961, 1964; Ross, 1962), se fueron desarrollando diferentes métodos de evaluación, utilizando plantas provenientes de tubérculo- semilla o de semilla (sexual).*

Los primeros trabajos de resistencia se realizaron con tubérculos sembrados directamente en el campo (Ellenby, 1945), o en macetas con suelo infestado (Mai, Peterson; 1952; Dunnett,1957; Jones y Pawelska, 1963). Otros trasplantaron esquejes en macetas igualmente infestadas (Cole y Howard, 1957). Sin embargo, los métodos de invernadero y campo son laboriosos y si no se diseñan y programan según los objetivos establecidos, los resultados no siempre son satisfactorios, aun bajo condiciones controladas de invernadero.

En laboratorio se han utilizado rodajas de papa en arena húmeda (Oostenbrink, 1950; Williams, 1957, 1963), recipientes cerrados de paredes transparentes (Foot, 1977; Phillips et al, 1981), y platos de petri con agar-agua donde colocan trozos de tubérculo con brotes vigorosos (Mugniery and Pearson, 1976). Estos métodos tienen la ventaja de ser económicos, no ocupan mucho espacio, no necesitan luz, y tanto la temperatura como la humedad pueden ser reguladas con precisión, permitiendo hacer estudios más detallados de resistencia.

Por lo general, en todos los casos en que se utilizan tubérculos-semillas (campo, invernadero y laboratorio), los resultados se obtienen a los dos años de haber realizado los cruzamientos.

La semilla (sexual) también ha sido motivo de estudios de evaluación para resistencia al nematodo del quiste. Partiendo de ella se han desarrollado plántulas en suelo infestado con quistes (Toxopeus y Huijsman, 1953; Huijsman 1955), en cajas de plástico con tapa movible, en recipientes especiales (Sprau, 1968; Oostenbrink, 1952), y en bolsas de plástico con agar-agua (Den Ouden, 1960).

Estos métodos resultan sumamente complicados y laboriosos, sobre todo cuando se evalúan miles de genotipos.

* Semilla se refiere a material para reproducción gámica y tubérculo-semilla a material para reproducción agámica.

2. CONSIDERACIONES GENERALES

Normalmente, en todo programa de mejoramiento para resistencia al nematodo del quiste, el primer paso se refiere al trabajo de los nematólogos. Esto se debe a que a lo largo de todo el proceso para la obtención de cultivares resistentes, se necesitan conocimientos técnicos acerca del parásito, que permitan desarrollar un método adecuado y sobretodo eficiente para identificar las plantas que realmente sean resistentes.

2.1 Resistencia

A diferencia de otras disciplinas de sanidad vegetal y aun de nematología, el concepto de resistencia al nematodo del quiste de la papa se define como la capacidad o el atributo de una planta de papa de impedir en forma total o parcial la multiplicación del nematodo. Como resultado de esta acción las poblaciones iniciales de nematodos, es decir, las que se encuentran en el suelo antes de un cultivo de papa, disminuirán o no se incrementarán en forma tan intensa como luego de emplearse una planta susceptible.

La resistencia al nematodo del quiste en una planta de papa puede deberse a la expresión de diversos mecanismos que impidan su desarrollo y multiplicación. Sin embargo, el mecanismo más conocido es aquel en que una vez que las raíces de las plantas de papa son invadidas por los segundos estados juveniles del nematodo, éstos no continúan su desarrollo debido a que no ocurre una respuesta compatible en el interior de las raíces (síncitos), que les permita alimentarse apropiadamente una vez que alcancen su estado sedentario (J3); y por lo tanto mueren o, en su mayoría, pasan a su estado de adulto como machos. Es importante indicar que tanto las plantas resistentes como las susceptibles son igualmente invadidas por los nematodos y en consecuencia ambas sufren pérdidas en el rendimiento debido al daño causado por la penetración de los segundos estados juveniles. Así mismo, estas pérdidas estarán en relación directa con la densidad de nematodos presentes en el suelo y la capacidad de la planta de papa para tolerar este daño de invasión.

2.2 Fuente de inóculo

Las dos especies del nematodo de quiste de la papa *G. rostochiensis* y *G. pallida* presentan numerosos patotipos o razas fisiológicas que pueden ser identificadas por su habilidad de multiplicarse en plantas de papa que contienen diferentes genes de resistencia y son denominadas hospedantes diferenciales. En el CIP se ha orientado la búsqueda de variedades resistentes hacia las razas P4A y P5A de *G. pallida* que son consideradas como las más agresivas dentro de todas las poblaciones del nematodo del quiste de la papa (Scurrah,1972; Bowman y Ross,1972; Franco y Evans,1978; Scurrah y Franco, 1978). La población prototipo utilizada en la evaluación para la raza P4A

proviene de Chocón-Jauja (Perú- centro) y para P5A de Otuzco (Perú-norte). El inóculo consiste en quistes viables que se obtienen de campos naturalmente infestados o de parcelas de multiplicación donde continuamente (en monocultivo) se desarrollan variedades susceptibles. La infestación del campo se puede estimar por la observación o el examen de las raíces de plantas de papa que están llegando a la floración. En este estado del cultivo, las hembras han reventado la corteza de la raíz y los cuerpos esféricos se pueden reconocer a simple vista. Un método sencillo para estimar la infestación del nematodo del quiste de la papa cuando el campo se halla sin cultivo es el de la botella. Consiste en colocar unos 50g de suelo bien mezclado, proveniente de diferentes partes del campo, en una botella de vidrio transparente. Se agrega agua suficiente para humedecer bien el suelo y enseguida se agita vigorosamente el contenido. Luego se agrega más agua hasta llegar casi al borde y los quistes que se encuentren en la muestra flotarán. Una vez que el material pesado se ha sedimentado (30-45 segundos) la columna líquida de la parte superior de la botella se vierte sobre un papel absorvente de modo que se pueden observar y contar los quistes a simple vista o con ayuda de una lupa común (Figura 1).

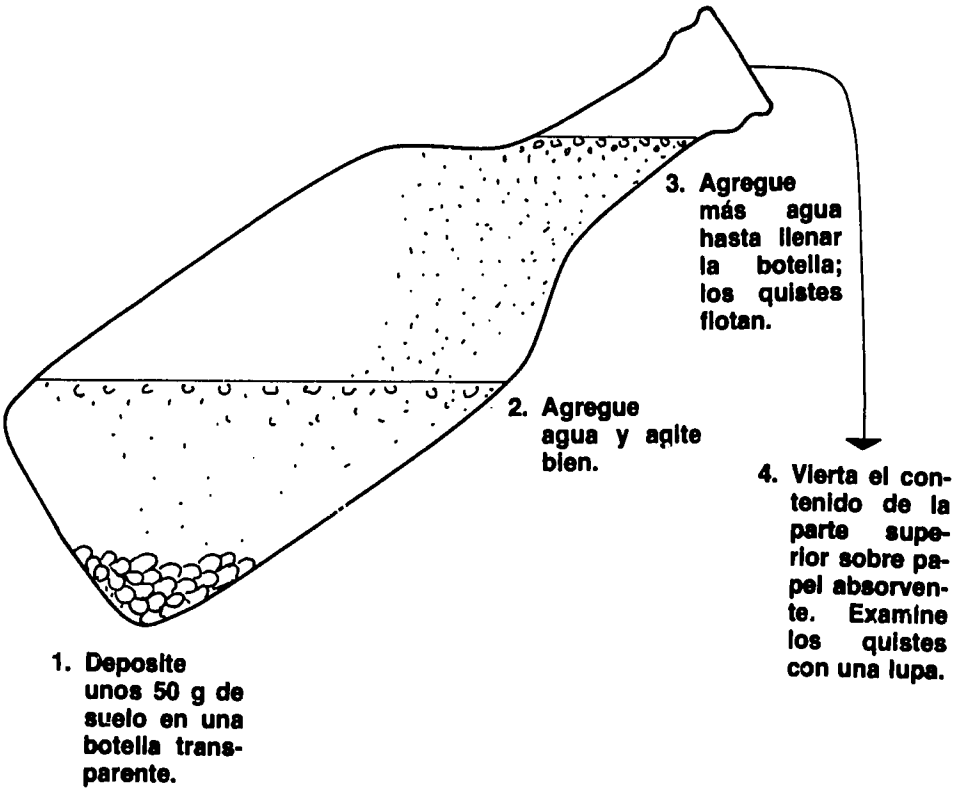


Figura 1. Método de la botella para la extracción de quistes en el campo.

2.3 Obtención de inóculo

Para la evaluación de clones de papa por resistencia a G. pallida es necesario contar con un buen número de quistes, para lo cual se procesan grandes volúmenes de suelo.

En este caso, los quistes que se encuentran en el suelo son extraídos mediante la técnica de flotación. Una vez que el suelo recolectado se ha dejado secar al aire (medio ambiente) y bajo sombra, se deposita en un recipiente (balde) con agua. Seguidamente el suelo se agita durante 10 segundos y se deja sedimentar; los quistes flotarán junto con el material orgánico del suelo y pueden ser recogidos de su superficie o separados por filtración sobre un pedazo de muselina. Una vez que el material flotante extraído seca completamente, se desmenuza y se coloca encima de una hoja de papel, que al inclinarse permitirá que los quistes, por su forma esférica rueden sobre su superficie hacia la parte más baja para su colección. Posteriormente se determina la viabilidad total de los quistes y se anota en la etiqueta de un frasco con tapa de rosca, que se emplea para guardar el inóculo. Los frascos con el inóculo se deben mantener en refrigeración, a 5°C, hasta el momento de su uso.

2.4 Viabilidad del inóculo

El número de huevos viables y de estados juveniles (J2) que contienen los quistes es afectado por factores como la antigüedad del inóculo, la edad de la población, el patotipo o la raza, las condiciones del medio ambiente y el tamaño del quiste, por lo cual la viabilidad total es desuniforme. Es muy difícil eliminar todos estos inconvenientes, pero al menos el tamaño de los quistes se puede uniformizar tamizándolos a través de una malla de 35 hilos (500 mm). Los quistes retenidos, previa determinación de su viabilidad total (Franco, 1981) se utilizarán en las diferentes pruebas de evaluación para resistencia.

Se entiende como viabilidad total (VT) a la cantidad total de huevos viables (que contienen un embrión normal o un segundo estado juvenil formado) presentes en los quistes. Esto se consigue macerando 25 quistes tomados al azar y contando los huevos viables y estados juveniles liberados.

Por otro lado, se define como viabilidad infectiva (VI) el número de estados juveniles que emergen estimuladas por el exudado radicular colectado de plantas susceptibles al nematodo del quiste, en un periódo determinado. Generalmente a la viabilidad infectiva le corresponde entre el 60 y 70% de la viabilidad total, porcentaje que puede ser afectado por factores como temperatura, aireación, calidad del exudado radicular (época de colección y su conservación), etc. Para determinar la viabilidad infectiva de los quistes, se toman al azar 25 quistes y se colocan en una canastilla de muselina. Estas

canastillas con los quistes son depositadas en vasos de 5 cm^3 y el conjunto es sumergido en agua destilada y colocado en incubadora a 20 ^oC. Al tercer día se remplaza el agua por el exudado radicular de papa de una variedad susceptible (ver 2.5). El exudado radicular es cambiado cada semana y se cuentan los estados juveniles que emergen en ese tiempo.

La diferencia entre la viabilidad total/quiste (VT) y la viabilidad infectiva por quiste (VI), corresponde a la viabilidad residual (VR). Esta última viabilidad representa los estados juveniles remanentes que no han emergido, pero que con el estímulo de futuros cultivos de papa, emergerán en las mismas proporciones.

Estos conceptos se representan en la expresión siguiente:

$$VT = VI + VR$$

VT= Contenido total de huevos viables por quiste (100%).

VI= Número de segundos estados juveniles que emergen por quiste (60-70%)

VR= Número de huevos remanentes por quiste (30-40%).

2.5 Exudado radicular

Para coleccionar exudado radicular es necesario contar con macetas sembradas con plantas de papa de una variedad susceptible y que dichas plantas no tengan más de 5 a 6 semanas de desarrollo (Fenwick and Widdowson, 1958; Widdowson, 1958a y b).

La maceta con la variedad susceptible se coloca sobre un soporte, de tal manera que el orificio de drenaje esté sobre un recipiente. Se riega la maceta hasta el punto de saturación y el agua que pasa a través del suelo es colectada en el recipiente. Con esta agua se vuelve a regar la misma maceta 2 ó 3 veces para obtener un exudado radicular más concentrado. Posteriormente se filtra el exudado radicular a través de un tamiz de 500 hilos o de un papel filtro, para eliminar impurezas. Para mantener el efecto estimulatorio del exudado radicular filtrado, éste se debe almacenar a 4 ^oC y por períodos no mayores de 60 días.

2.6 Tipos de inóculo

Después de que la hembra inmadura (color amarillo o blanco marfil) muere, la cutícula de su cuerpo esférico cambia de color y se convierte en un quiste marrón y duro, resistente a las condiciones ambientales desfavorables. Los quistes se desprenden fácilmente de las raíces y cada uno contiene desde unos pocos hasta 600 huevos.

Cada huevo está protegido además por su propia cáscara y alcanza a permanecer viable por 20 años o más. La eclosión de los huevos puede ser estimulada por efecto del exudado radicular de las raíces de papa, emergiendo en él los segundos estados juveniles.

Tenemos así los tres tipos de inóculo que se utilizan en los diferentes métodos de evaluación para resistencia al nematodo del quiste: quistes, huevos y segundos estados juveniles (J2). No hay diferencia significativa en el tipo de inoculación (Tabla 1), sin embargo, la inoculación con quistes presenta algunas ventajas prácticas sobre la inoculación con huevos y estados juveniles pues éstos exigen mayor labor y cuidado (González, 1982; González y Scurrah, 1982 a).

El inóculo en forma de quistes y huevos generalmente se utiliza para pruebas en macetas o recipientes cerrados, mientras que el inóculo de estados juveniles se usa para pruebas en platos de petri.

Tabla 1. Dos tipos de inóculo y resistencia de plántulas a *Globodera pallida*.

	Inóculo	
	Huevos	Quistes
No. de plántulas evaluadas	2675	2975
No. de plántulas resistentes a los:		
60 días	*	947
80 días	609	668
100 días	562	*
Porcentaje de resistencia	21,0%	22,5%

* No se notan hembras inmaduras.

2.7 Estandarización de inóculo

Para el caso de la inoculación con quistes, en la prueba en maceta o recipiente cerrado, con plántula, esqueje o tubérculo se estandariza el inóculo a la densidad de 20 huevos viables/g de suelo. Según la viabilidad total se determina el número de huevos o estados juveniles,o ambos por quiste, y fácilmente se estima el número de quistes por inoculación.

En el caso de la inoculación con huevos, se maceran los quistes previamente sumergidos en agua (12-24 horas) y se llevan a un vaso graduado o un recipiente con agua (100-200 cm^3) donde se agita vigorosamente por medio de un flujo de aire durante un minuto. En esta forma los huevos se desprenden de las paredes de los quistes y finalmente la suspensión se pasa a través de un tamiz para eliminar los trozos o restos de la cutícula de los quistes. De otro lado, si la inoculación es con estados juveniles (J2), se coloca un buen número de quistes en exudado radicular y se realiza el mismo procedimiento descrito para determinar la viabilidad infectiva de quistes (ver 2.4). Este último tipo de inoculación es más laborioso y exige más tiempo hasta lograr la emergencia de los estados juveniles. En ambos casos, la suspensión final se lleva a un volumen fijo y se agita vigorosamente para tomar luego 1 cm^3 con 4 repeticiones, y contar, con la ayuda de un microscopio-estereoscópico, la cantidad de huevos o estados juveniles que se encuentran en 1 cm^3. De ser necesario se ajusta la suspensión hasta lograr la concentración deseada.

2.8 Inoculacion

La inoculación varía según el método de evaluación para resistencia, sea en el estado de plántula o en el de tubérculo. En todo caso, la descripción para cada uno de los métodos se dará posteriormente.

3. EVALUACION DE RESISTENCIA EN PLANTULAS PROVENIENTES DE SEMILLAS

Es posible determinar resistencia en la progenie utilizando plántulas procedentes de semilla (sexual), con lo que se acorta el tiempo de selección y evaluación de progenitores. La prueba de plántula puede ser utilizada poco tiempo después de efectuados los cruzamientos.

Del programa de mejoramiento al nematodo del quiste se obtiene semilla (sexual) proveniente de cruzamientos entre clones con alto nivel de resistencia y buenas características agronómicas. Para romper el período de latencia de las semillas, se les trata con una solución acuosa de ácido gíbberelico a 1500 ppm durante 24 horas. Luego se enjuagan con agua y se dejan secar hasta la siembra. Las pruebas con plántulas se pueden realizar en forma individual o masal.

3.1 Prueba individual

Como su nombre lo indica, esta prueba consiste en evaluar individuo por individuo, utilizando diversos recipientes para su crecimiento.

3.1.1 En vasos de plástico

Esta prueba individual emplea vasos de plástico de 60 cm^3 y considera tres variantes dependiendo de la época de inoculación: en la siembra, en el trasplante y 15 días después del trasplante. En todo caso el sustrato utilizado es una mezcla de musgo y suelo en la proporción 2:1, desinfestada por medio de calor. Para la inoculación de plántulas en la siembra se procede de la siguiente forma:

Se llenan parcialmente los vasos de plástico y se inocula un determinado número de quistes para obtener una concentración de 20 huevos/g de suelo. Luego de remover suavemente el suelo para homogenizar la distribución de los quistes se coloca una semilla de papa en cada vaso y se cubre con el sustrato. Finalmente, se riegan ligeramente los vasos. Después de 8 a 10 semanas se realiza la evaluación .

De otro lado, en el caso de realizar las inoculaciones en el trasplante o a los 15 días después del trasplante, las semillas son sembradas en bandejas. Después de 15 días de la siembra se realiza el trasplante de todas las plántulas a vasos de plástico y es posible inocular el segundo grupo como se describe a continuación.

Los vasos de plástico se llenan parcialmente con el sustrato descrito y se inoculan los quistes en forma y concentración similar a lo indicado anteriormente (20 huevos/g de suelo).

Uniformizado el inóculo en el vaso, se cubre con el sustrato y se coloca una plántula de 3 a 4 cm de altura por vaso y luego se riegan ligeramente las plántulas. Después de 8 a 10 semanas se realiza la evaluación.

Finalmente, para la inoculación 15 días después del trasplante de las plántulas a los vasos, se inoculan las plántulas que se están desarrollando vigorosamente, tal como se indica a continuación.

Con la ayuda de un lápiz, se perforan dos orificios a 2 cm del tallo de la plántula en lugares opuestos, donde se introducen los quistes en la concentración de 20 huevos/g de suelo. Seguidamente se cubren los orificios presionando el sustrato con los dedos y se riegan ligeramente las plántulas. En forma similar a las anteriores, después de 8 a 10 semanas se realiza la evaluación.

De estas tres alternativas, se ha observado que la inoculación 15 días después del trasplante es la más recomendable porque se obtiene mejor desarrollo y mayor supervivencia de plántulas (Tabla 2). Sin embargo la densidad del inóculo es de gran importancia en la expresión de resistencia (Franco y González, 1988).

Tabla 2. Porcentaje de resistencia (R) a Globodera pallida en plántulas inoculadas en diferentes oportunidades.

	Siembra		Trasplante		Después del trasplante	
CRUCE	Total	(%R)	Total	(%R)	Total	(%R)
R1 X R2	41	(78)	50	(66)	50	(74)
R1 X S1	45	(33)	50	(16)	49	(16)
R2 X S1	45	(13)	50	(0)	50	(8)
S1 X S1	50	(16)	50	(8)	50	(8)

La evaluación de resistencia en plántulas se realiza utilizando la técnica de maceta volteada (Figura 2). Se toma la planta en forma invertida y golpeándola ligeramente se retira el vaso, quedando a la vista la masa volteada de raíces y tierra, donde se aprecian las hembras inmaduras prendidas sobre las raíces externas. De ser considerada la planta como resistente, esta se regresa a la maceta. Si es susceptible se elimina. Registre los resultados en la hoja de datos (Forma CIP 138-N. Ver Anexo). Los clones clasificados como resistentes se trasplantan a macetas más grandes para obtener tubérculos.

Se considera como planta resistente a la que no presenta hembras inmaduras sobre las raíces. Parcialmente resistente es toda aquella que presenta entre una y quince hembras inmaduras sobre las raíces, aunque otros autores han utilizado menos de cinco (Mai and Peterson, 1952). No obstante que las escalas de resistencia utilizadas en el CIP se han elaborado para pruebas con tubérculos, se utiliza el mismo criterio de evaluación para la prueba de resistencia en plántula. La escala utilizada es la siguiente:

0 = 0	hembras	inmaduras	Resistente (R)
1-15 (+)= 1	"	"	Parcialmente resistente(PR)
16-50 (++)=2	"	"	Moderadamente susceptible(MS)
más de 51(+++)=3	"	"	Altamente Susceptible (S)

Los diferentes niveles de susceptibilidad son anotaciones prácticas utilizadas en la evaluación, que indican grados de reproducción del nematodo sobre los hospedantes susceptibles.

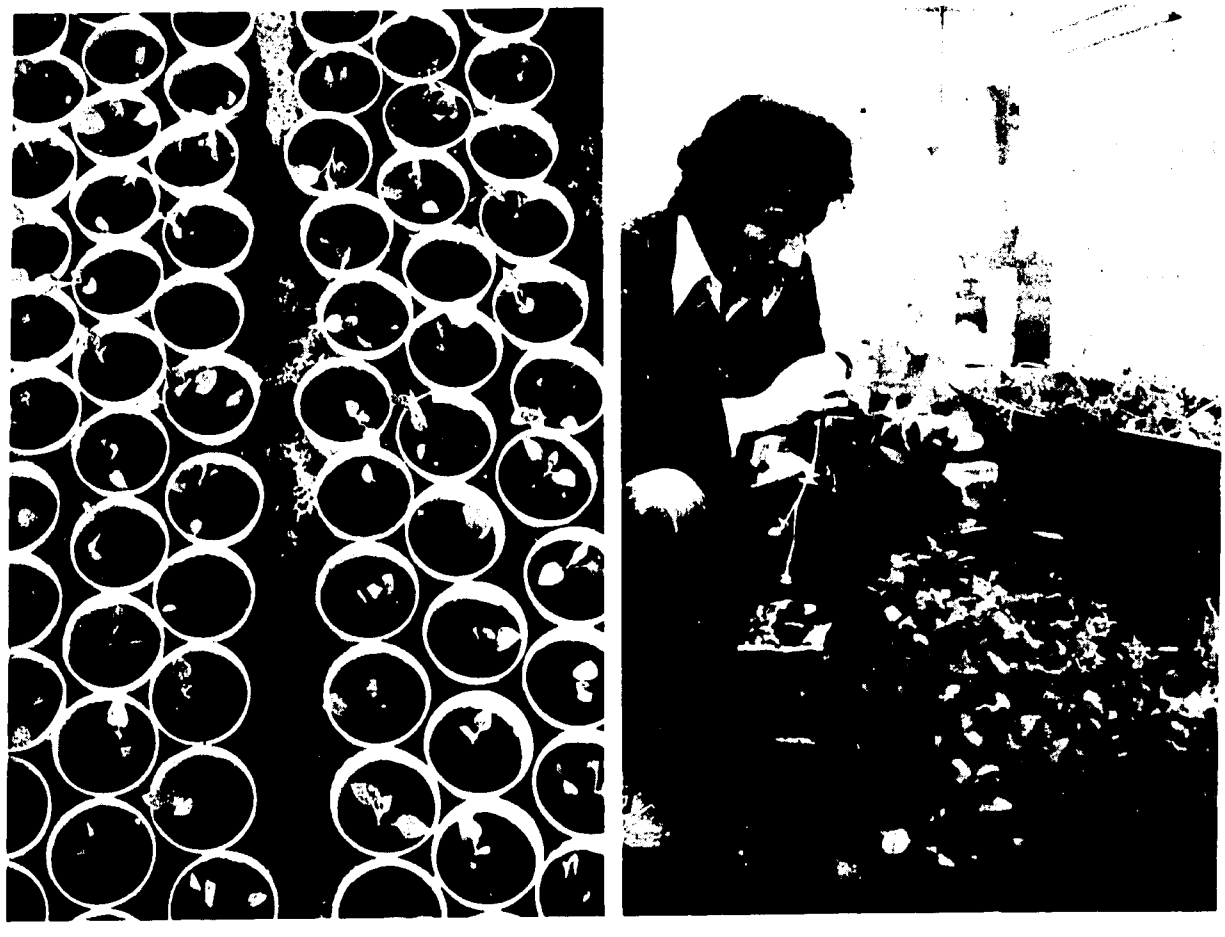


Figura 2. Evaluación de resistencia en plántulas (prueba en vaso de plástico).

Es importante notar que fisiológicamente una planta proveniente de tubérculo tiene diferencias marcadas en desarrollo sobre plántulas provenientes de semilla. Sin embargo, ambas son genéticamente idénticas, si los tubérculos-semillas provienen de una semilla o plántula. Por lo tanto, los estudios sobre herencia de resistencia y pruebas de evaluación de resistencia deben estar relacionadas en ambos casos.

La Tabla 3 muestra los resultados comparativos de una primera evaluación individual en plántula y una segunda evaluación de clones resistentes, en el estado de tubérculo. En primer lugar se puede apreciar que el porcentaje de resistencia en la prueba de plántula (22,0%) baja notablemente en la prueba de tubérculo (3,8%) donde numerosas plántulas fueron erróneamente clasificadas como resistentes. En segundo lugar, el manejo de plántulas en general y el criterio de evaluación deben ser mejorados ya que se ha demostrado que éstos tienen algún efecto en las diferencias significativas de las dos pruebas por diferencias en desarrollo (González y Scurrah, 1982 b y c).

Tabla 3. Segregación de resistencia en plántula versus segregación de resistencia en tubérculos.

		Prueba en plántula		Prueba en tubérculo*	
Cruce	Población	R	(%R)	R	(%R)
R1 x R2	81	62	(76,5)	33	(40,7)
R1 x S1	2861	690	(24,1)	145	(5,0)
R2 x S1	2087	355	(17,0)	12	(0,5)
Total	5029	1107	(22,0)	190	(3,8)

* Tubérculos, provenientes de la prueba en plántulas, que fueron resistentes.

Sin embargo, aunque aparentemente la prueba de plántula no tendría mucha aplicación, es útil en los programas de mejoramiento, porque permite esencialmente eliminar clones susceptibles, sobre todo cuando se tienen progenies muy numerosas. Además permite hacer una rápida selección de genotipos resistentes, cuya confirmación se obtendrá luego de efectuar una segunda evaluación en el estado de tubérculo, lo que significaría un año menos de cultivo.

3.1.2 En platos de petri

Este método de evaluación ha sido recientemente desarrollado (Mugniery y Balandras, 1986) y se ha introducido como una técnica rutinaria para evaluar familias. Esta técnica, al ser aplicada poco tiempo después de realizados los cruzamientos, permite acortar el tiempo de selección y obtener índices de los niveles de resistencia de la progenie, así como la heredabilidad de resistencia de los progenitores.

La ventaja de este método es que requiere poco inóculo y el tiempo de evaluación es corto. Sin embargo, es laborioso y exige mucha práctica.

Para evaluar resistencia en semilla (sexual) de papa, inoculada con Globodera sp. bajo condiciones de laboratorio se usa el método siguiente : Preparar agar-agua (AA) al 1,5 % y "plaquear" en platos de petri. Desinfestar la semilla en una solución alcohólica de bicloruro de mercurio (0,2%) por un minuto y colocarla en el plato de petri. Cuando la semilla ha germinado y la raíz tiene 1 a 2 cm de desarrollo, colocar tres estados juveniles del nematodo por punto de inoculación. Colocada la tapa de cada plato, estos se incuban a 15-18°C en posición vertical. La evaluación se efectúa a los 14-16 días después de la inoculación, por disección de la raíz y conteo del número de hembras y machos o estados juveniles interrumpidos ("bloqueados") en el desarrollo del nematodo (Figura 3).

Sugerencias:

La desinfección de las semillas se puede también realizar en hipoclorito de sodio al 1% durante tres minutos.

En la evaluación de resistencia de plántulas en platos de petri se han considerado dos niveles o categorías. Si la plántula no muestra hembras en el desarrollo,o hay la presencia de machos, se considera como resistente y si la plántula muestra 1 a 3 hembras inmaduras es susceptible .

La escala utilizada es la siguiente:

0	hembra inmadura	Resistente (R)
1 - 3	hembras inmaduras	Susceptible (S)

Es importante considerar que las plántulas de una familia son genéticamente diferentes y por tanto los niveles de resistencia se dan con base en los análisis estadísticos de la prueba de X^2 o la prueba de 2I (Arbonnier, 1966).

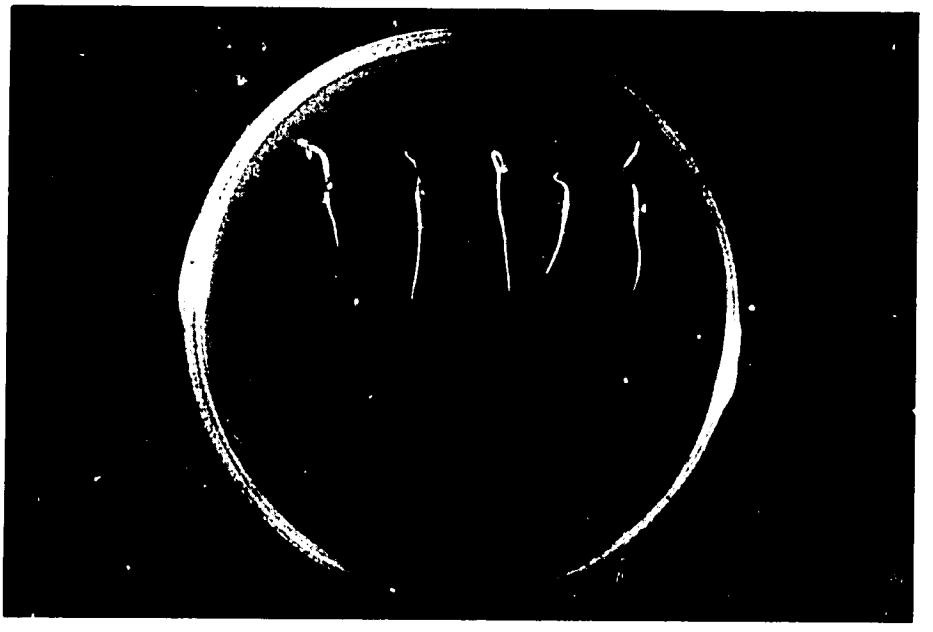


Figura 3. Evaluación de resistencia en plántulas (prueba en plato de petri).

Por razones prácticas hemos decidido seleccionar familias que tengan más del 50% de individuos resistentes entre el total probado.

En el Tabla 4 se muestran los resultados de las familias (modelo dialélico) probadas en el estado de plántula. Los cruzamientos entre resistentes (R1 x R2) y (R2 x R1) representan una distribución de frecuencia significativamente diferente (52,30,18 y 87,9,4 % respectivamente) de los cruzamientos (R2 x S1) y (S1 x R2) que son homogéneos entre sí (34, 24, 42 y 24, 17, 59% respectivamente). Así mismo, el cruzamiento (S1 x R1) y (S1 X S1) representan una distribución significativamente diferente de todos los cruzamientos estudiados (65,9,26 y 12,2,86 respectivamente). Es posible ordenar las familias en grupos de mayor a menor grado de resistencia observada, tal como sigue: (R2 x R1), (R1 x R2), (R2 x S1), (S1 x R2), (S1 x R1), (S1 x S1). En consecuencia, el método permite detectar familias con diferentes niveles de resistencia.

3.2 Prueba Masal

La prueba masal con plántulas tiene como objeto evaluar el mayor número de cruzamientos, para detectar aquellas familias con alta frecuencia de resistencia.

Tabla 4. Porcentaje de resistencia a G. pallida en la prueba de resistencia en platos de petri.

Cruzamientos	total	R : S	% R
R1 x R2	50	26 : 24	52
R2 x R1	46	40 : 6	87
R2 x S1	50	17 : 33	34
S1 x R1	46	30 : 16	65
S1 x R2	42	10 : 32	24
S1 x S1	50	6 : 44	12

R1 y R2 : Clones resistentes (702535 y 702698)

S1 : Progenitor susceptible (cv. Renacimiento).

En esta técnica se puede utilizar cualquier tipo de recipiente de diferente forma y tamaño, donde se desarrollan 10 a 40 semillas dependiendo del tamaño del recipiente. Se utiliza como sustrato una mezcla de suelo igual al descrito anteriormente.

La metodología se describe a continuación y en general sigue los lineamientos ya descritos anteriormente. En cada recipiente se deposita suelo hasta las 3/4 partes de su volumen y se inocula con quistes en la concentración de 50 huevos/g de suelo. Luego se uniformiza el inóculo en el recipiente y se completa la cuarta parte restante de suelo. Seguidamente se distribuyen las semillas sobre la superficie y luego de cubrirlas con una fina capa de suelo, los recipientes se riegan ligeramente. Durante el desarrollo de las plántulas se recomienda aplicar un fertilizante foliar para lograr buen crecimiento de las plantas, particularmente de la zona radicular.

Después de 8 a 10 semanas se realiza la evaluación contando el número de hembras inmaduras en la masa radicular mas suelo.

En la evaluación de resistencia en masa se aplican dos criterios. El primero,a las 10 semanas de la inoculación teniendo en consideración el número de hembras inmaduras por masa radicular. Como la evaluación por este método es muy laboriosa se recomienda utilizar recipientes del mismo tamaño con áreas descubiertas (Franco y González,1986), o ventanas que en este caso eran 16 , distribuidas regularmente sobre

toda la superficie (Figura 4). Para registrar el conteo de las hembras inmaduras en las 16 ventanas se utiliza la hoja de datos (Forma CIP-138N, Ver Anexo).

La escala de evaluación masal es la siguiente:

0 - 30	Promedio de hembras inmaduras	Resistente (R)
31- 56	" " "	Parcialmente Resistente (PR)
> 56	" " "	Susceptible (S)

El segundo criterio de evaluación se emplea al final del período vegetativo de la planta y utiliza la tasa de multiplicación de quistes del nematodo (TMN=cPf/cPi).

La Tabla 5 muestra que las familias probadas presentaron alta correlación (r=0,72, 0,83 y 0,92) entre estos dos criterios de evaluación (masa radicular y cPf/cPi) en tres tipos de recipientes (bandejas, caja retangular y caja circular). Estos coeficientes indican que es posible estimar el nivel de resistencia de una familia, contando el número de hembras inmaduras que se muestran en la masa radicular. Este criterio de evaluación tiene la ventaja de ser inmediato y no hay que lavar el suelo para contar los quistes, pues el objetivo fundamental de la evaluación para resistencia en masa es obtener datos preliminares de familias con alta frecuencia de resistencia. Además, la misma Tabla indica la posibilidad de utilizar cualquier tipo de recipiente para esta modalidad de evaluación de resistencia.

Respecto a la aplicación del método de evaluación masal, el análisis de variancia muestra diferencias significativas ($p<0.05$) entre las familias probadas. Estas diferencias son más claras entre familias provenientes de cruzamientos entre progenitores resistentes x resistentes (AG-001 y AG-002) y susceptible x susceptible (AG-007) que en aquellos cruzamientos entre progenitores resistentes x susceptibles (AG-003, AG-004, AG-005 y AG-006).

Estos resultados demuestran que el metodo permite detectar diferentes niveles de resistencia entre familias y conocer el valor genético de los progenitores (Franco y González, 1986).

El método de evaluación masal, sin embargo no indica la variabilidad genética dentro de la progenie probada,ya que es difícil determinar cual de los segregantes es responsable de la mayor o menor multiplicación dentro del recipiente,o si ambos lo son. Para superar

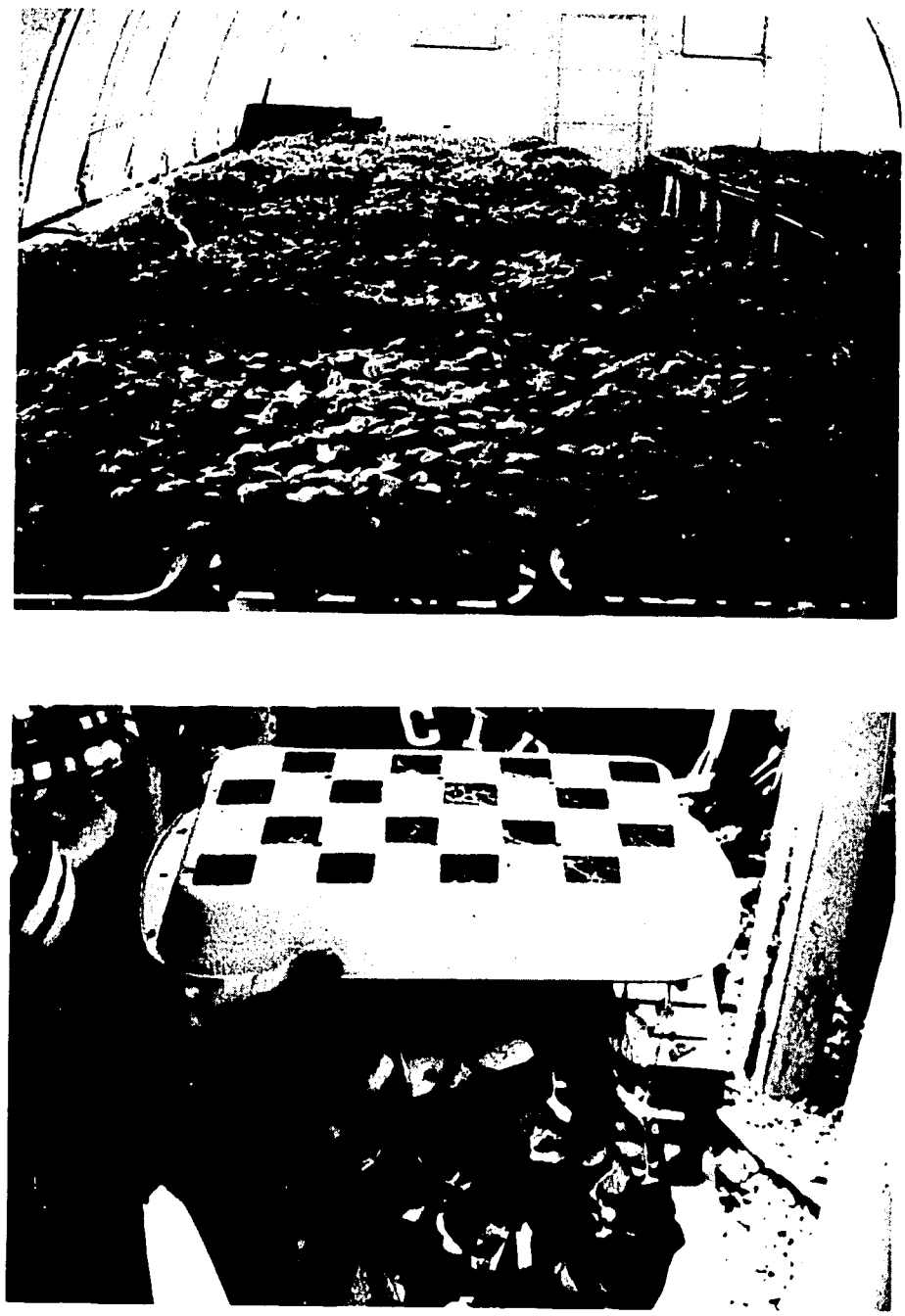


Figura 4. Evaluación de resistencia en plántulas (prueba masal).

Tabla 5. Correlación entre dos criterios de evaluación masal de plántulas (masa radicular y cPf/cPi) en diferentes recipientes.

	Recipientes de plástico					
	Bandeja		Caja rectangular		Caja circular	
Familias	Masa radicular	cPf/cPi	Masa radicular	cPf/cPi	Masa radicular	cPf/cPi
AG-001	194a*	5,5a	26ab	10,2a	37,3a	4,9a
AG-002	70a	4,2a	7a	8,8a	42,0a	5,7a
AG-003	736a	9,6ab	22ab	14,4a	108,0a	15,3ab
AG-004	1123a	21,5bc	47b	21,8ab	166,6a	33,3c
AG-005	950a	16,9c	25ab	19,1a	231,0a	28,2bc
AG-006	2216b	24,3c	43ab	34,3ab	124,6a	19,7abc
AG-007	3560c	40,5d	108c	48,6b	493,6b	102,5d
r**	0,72		0,83		0,92	

r* Prueba de significación de Duncan a $p<0.05$.

r** Correlación entre masa radicular y tasa de multiplicación en quistes (cPf/cPi) para cada tipo de recipiente.

este inconveniente, una vez seleccionadas las familias más promisorias se realizan pruebas individuales con semilla o en tubérculos, para así identificar los clones o individuos resistentes. Finalmente,se puede agregar que aunque la multiplicación del nematodo del quiste es menor en la prueba masal en comparación con la observada en las pruebas individuales en vasos, el método cumple con su objetivo ya que permite detectar los diferentes niveles de resistencia que poseen las familias (Figura 5). Por lo anterior, después de realizar estudios más detallados y por razones prácticas se recomiendan y utilizan, en forma rutinaria, en el CIP bandejas de plástico (de 38x24 cm) para la evaluación masal de plántulas (Franco y González, 1982).

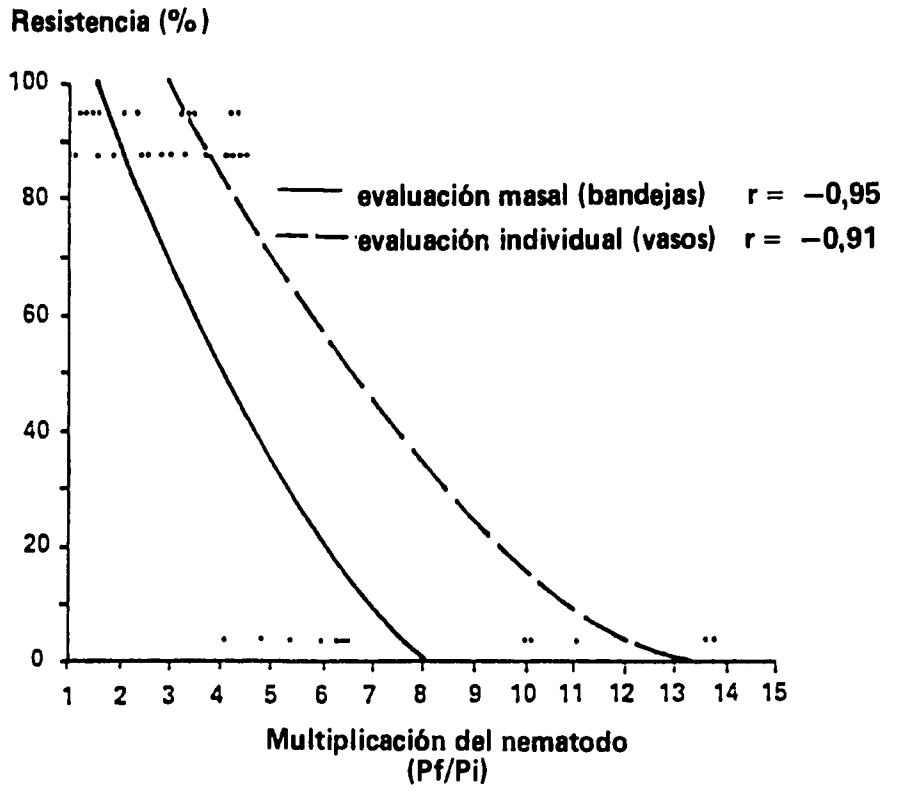


Figura 5. Relación entre el porcentaje de resistencia y la tasa de multiplicación (cPf/cPi) en la prueba individual y masal.

En la Tabla 6 se muestran los parámetros que se utilizan para evaluar resistencia en semilla (sexual) en las diferentes pruebas.

4. EVALUACION DE RESISTENCIA EN ESQUEJES

Esta técnica, aunque no es muy frecuente en el CIP, se utiliza cuando no hay disponibilidad de tubérculos de algún clon en especial. El sistema permite, entre otras ventajas, producir plantas vigorosas en almácigo para luego trasplantarlas cuando las condiciones sean adecuadas.

Con esta técnica es posible conocer el nivel de resistencia al año siguiente de realizado el cruzamiento, lo cual permite al mejorador ganar un año y conocer los resultados antes de la cosecha.

La planta madre o clon del cual se busca obtener esquejes, puede provenir de un tubérculo, de brotes, de meristemas, de esquejes, de tallos, de tuberculillos o de semilla.

Tabla 6. Pruebas, parámetros, escala y reacción consideradas en las evaluaciones de resistencia por observación visual de hembras formadas, y utilizando plántulas originadas de semilla.

Prueba	Parametro	Escala	Reacción*
1. Individual:			
-Vaso de plástico	Número de hembras jóvenes sobre la masa radicular	0	R
		1-15	PR
		16-50	MS
		>51	S
-Platos petri	Número de hembras formadas por plántula	0	R
		1-3	S
2. Masal			
-Bandejas	Número de hembras jóvenes sobre la masa radicular	0-30	R
		31-56	PR
		>56	S

* R = Resistente; PR = Parcialmente resistente; MS = Moderadamente susceptible; S = Susceptible.

4.1 Prueba en maceta

Esta prueba es muy similar a la prueba de evaluación en macetas cuando se utilizan tubérculos (ver 5.1) y se emplea únicamente con cierto material cuyo nivel de resistencia se quiere conocer muy rápidamente. Para realizar esta prueba se pueden emplear diversas técnicas de propagación o de multiplicación rápida de papa (Bryan y Quevedo, 1982). Es preferible utilizar esquejes de tallo lateral o de tallo juvenil, por lo que se necesita conocimiento, material y equipo especialmente preparado para obtener una óptima eficiencia de enraizamiento antes de realizar la evaluación de resistencia al nematodo del quiste (Figura 6).

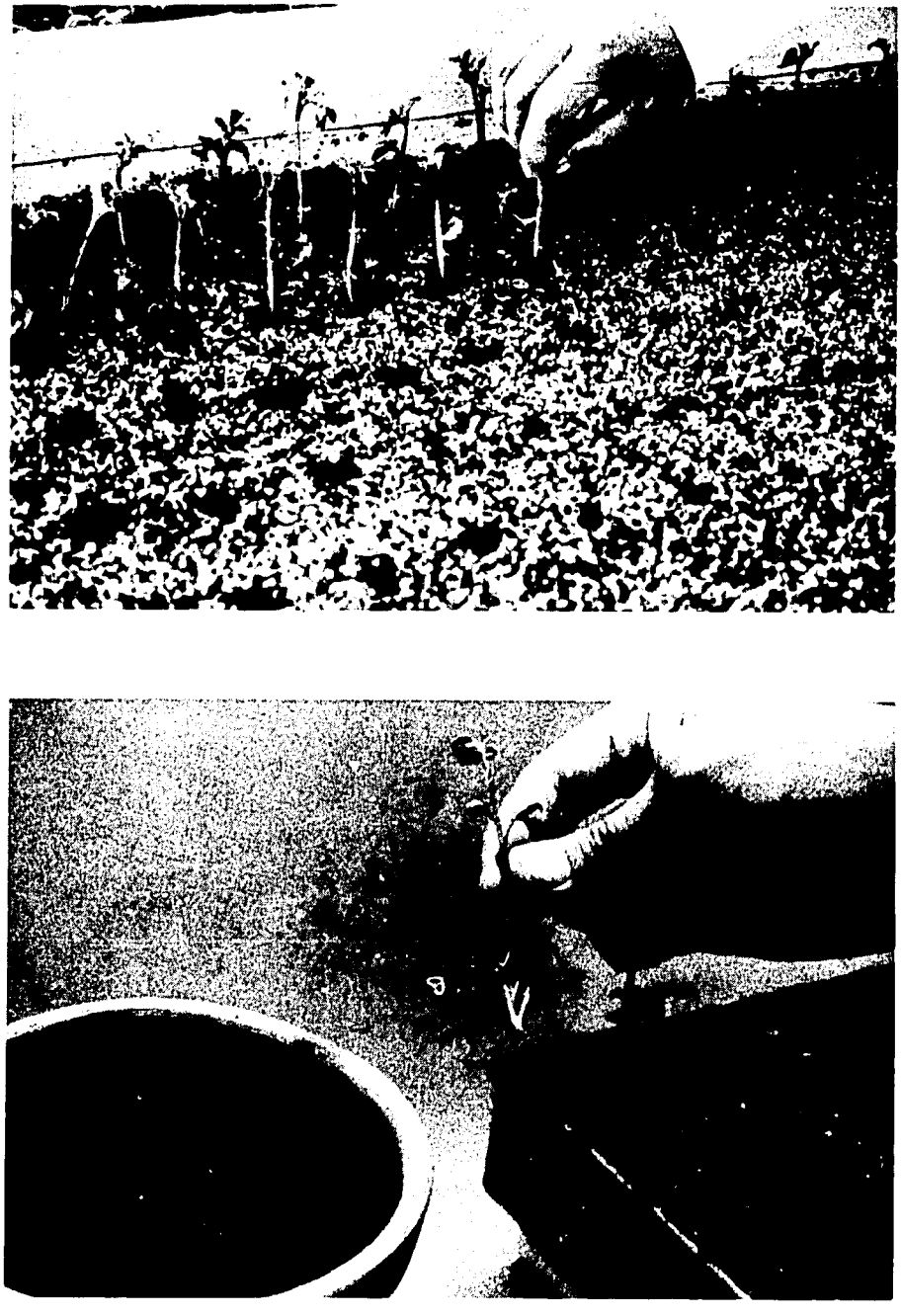


Figura 6. Evaluación de resistencia en esquejes (prueba en maceta).

El método para evaluar resistencia con esquejes en macetas es el siguiente:

- En primer lugar hay que considerar que los esquejes de tallo lateral deben tener de 12 a 15 cm de largo. Si se trata de esquejes de tallo juvenil, estos se deben cortar en secciones que contengan una hoja y su yema axilar hacia el medio.

- Una vez obtenidos estos esquejes son sumergidos en una hormona de enraizamiento, para luego colocarlos a enraizar en camas de arena, bajo sombra. Los esquejes no se deben plantar muy juntos.

- Dos horas después de la siembra se deben regar ligeramente para permitir la absorción de las hormonas por las raíces. Los esquejes normalmente enraizan entre los 15 y los 20 días después de la siembra y quedan listos para el trasplante.

- Previamente al trasplante el suelo se inocula con quistes viables a la densidad de 20 huevos/g de suelo. Este paso se puede realizar también 15 días después del trasplante, cuando la planta esté bien establecida.

- Los esquejes enraizados se trasplantan en macetas de 150 cm^3 de capacidad que contienen una mezcla de suelo orgánico y arena en la proporción de 3:1.

- Una vez realizado el trasplante, los esquejes se riegan ligeramente y en lo posible la temperatura del invernadero se debe mantener entre 20 y 25° C.

- La evaluación se efectúa 8 a 10 semanas después de la inoculación, siguiendo el mismo procedimiento que se indica en la prueba en maceta, cuando se utilizan tubérculos (ver 5.1) Utilice la hoja de datos. (Forma CIP 138-N, ver el Anexo).

Los resultados de un estudio comparativo de métodos para evaluar resistencia (Figura 7) mostraron que la tasa de multiplicación del nematodo tendió a ser mayor en los esquejes que en los tubérculos, pero las diferencias no son significativas. Sin embargo es importante indicar, que esto no es lo más frecuente, sobre todo si se tiene que evaluar esquejes provenientes de plantas que poseen un amplio rango de variabilidad en sus hábitos de crecimiento y habilidad de enraizamiento. Por ello, su empleo se recomienda únicamente con material avanzado que no presenta mucha variabilidad.

4.2 Prueba en platos de petri

Esta prueba, aunque opcional, permite evaluar un buen número de clones, pero para ejecutarla se necesitan condiciones controladas de temperatura, humedad y luz para que las hojas de los esquejes continúen su fotosíntesis.

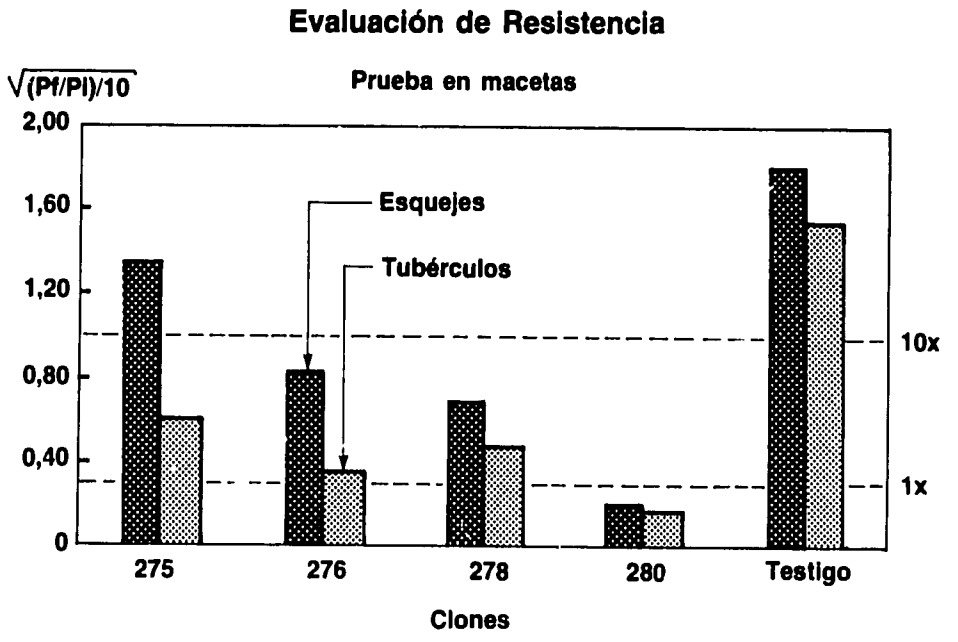


Figura 7. Tasas de multiplicación de G. pallida en tubérculos y esquejes de clones mejorados de papa con diferentes niveles de resistencia evaluados, por la prueba de macetas (Pi = 20 huevos y larvas por gramo de suelo).

El método para evaluar la resistencia en esquejes en platos de petri consiste en obtener esquejes de tallo lateral, o tallo juvenil, y tratarlos con una hormona para su enraizamiento en arena lavada y desinfestada. Después de 7 a 10 días a 20 °C, se retiran los esquejes y se lavan con agua de caño. Seguidamente los esquejes son colocados directamente en platos de petri con agar-agua al 2% y éstos se mantienen a 20° C y con luz. Cuando las raíces se han establecido, se inoculan cinco estados juveniles por punto en cada raíz. La evaluación de los esquejes se realiza 30 días después de la inoculación (Figura 8).

La evaluación de resistencia en esquejes en platos de petri se realiza considerando los mismos criterios que se indican para evaluar la resistencia en platos de petri cuando se utilizan tubérculos (ver 5.3).

En esta prueba existe la posibilidad de evitar el trasplante de esquejes a suelo desinfestado. Es posible, después de cortar los esquejes y tratarlos, ponerlos inmediatamente en el plato de petri. El único problema es que muchas raíces crecen directamente dentro del agar y no es posible inocularlas. La solución consiste en colocar una gota de metyl-celulosa con 50 larvas en la base del esqueje y dejar

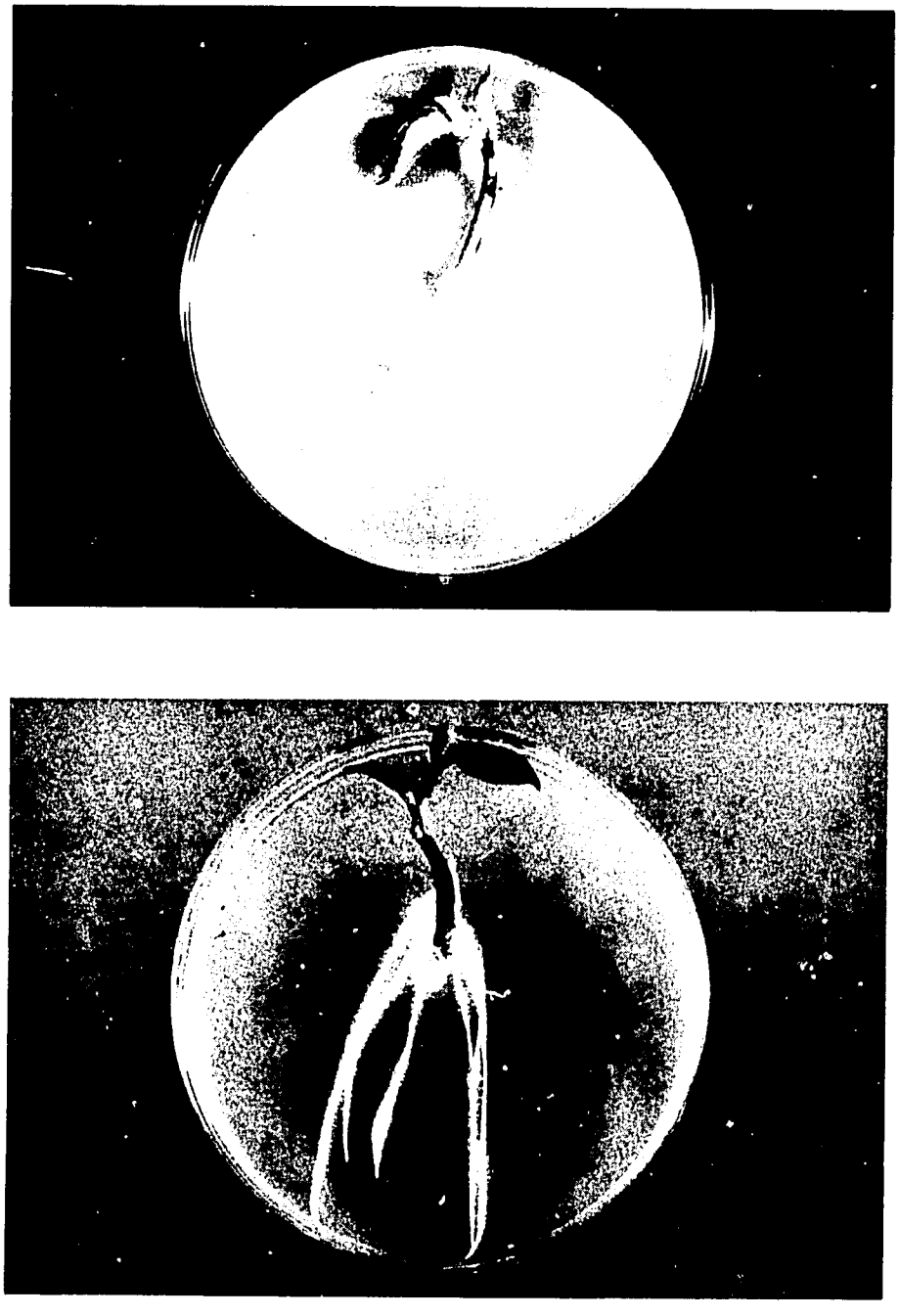


Figura 8. Evaluación de resistencia en esquejes (prueba en platos de petri).

que desarrollen. No se obtiene un nivel exacto de resistencia del clon pero sí una buena idea preliminar de su reacción ante el nematodo.

Los criterios y parámetros que se utilizan para evaluar resistencia en esquejes, (Prueba de maceta y plato de petri) son los mismos que se emplean cuando se utilizan tubérculos.

5. EVALUACION DE RESISTENCIA EN TUBERCULOS

Para evaluar resistencia al nematodo del quiste G. rostochiensis (Woll.) y G. pallida (Stone) Behrens, en su mayoría se emplean tubérculos que se desarrollan ya sea en macetas con suelo infestado (Dunnett, 1957; Ellenby, 1952; Mai and Peterson, 1952) en recipientes cerrados (Phillips et al. 1981), o en platos de petri (Mugniery y Pearson, 1976).

Para la evaluación de material genético en forma de tubérculos en cuanto a resistencia al nematodo del quiste de la papa hay varias pruebas que se pueden realizar bajo condiciones de laboratorio (recipiente cerrado y platos de petri), invernadero (macetas) y campo. Todas estas pruebas de evaluación miden la reproducción del nematodo en el material bajo estudio.

Las pruebas de macetas y de platos petri son las más precisas, mientras que las pruebas de campo son utilizadas mayormente para confirmar resistencia y estimar el valor agronómico y de adaptación de los clones.

5.1 Prueba en maceta

Esta prueba permite la evaluación de material genético en estado de tubérculo,con el objeto de determinar si la resistencia incorporada a nuevos clones es efectiva contra las poblaciones para las que se realizaron los cruzamientos. Generalmente se realizan dos de estas pruebas. En la primera, escencialmente eliminatoria, se eliminan todos los clones que muestran clara susceptibilidad, es decir, alta multiplicación del nematodo. La segunda, que es una prueba de verificación de resistencia, se realiza con los clones que se conservaron de la primera prueba.

En esta prueba las plantas se desarrollan bajo condiciones controladas de invernadero. Es posible evaluar un buen número de clones, pero es necesario contar con instalaciones y materiales en gran cantidad (Figura 9).

El método para evaluar resistencia en macetas consiste en emplear macetas de 150 cm^3 que se llenan hasta 75% de su capacidad con una mezcla de suelo orgánico y arena en la proporción de 3:1.

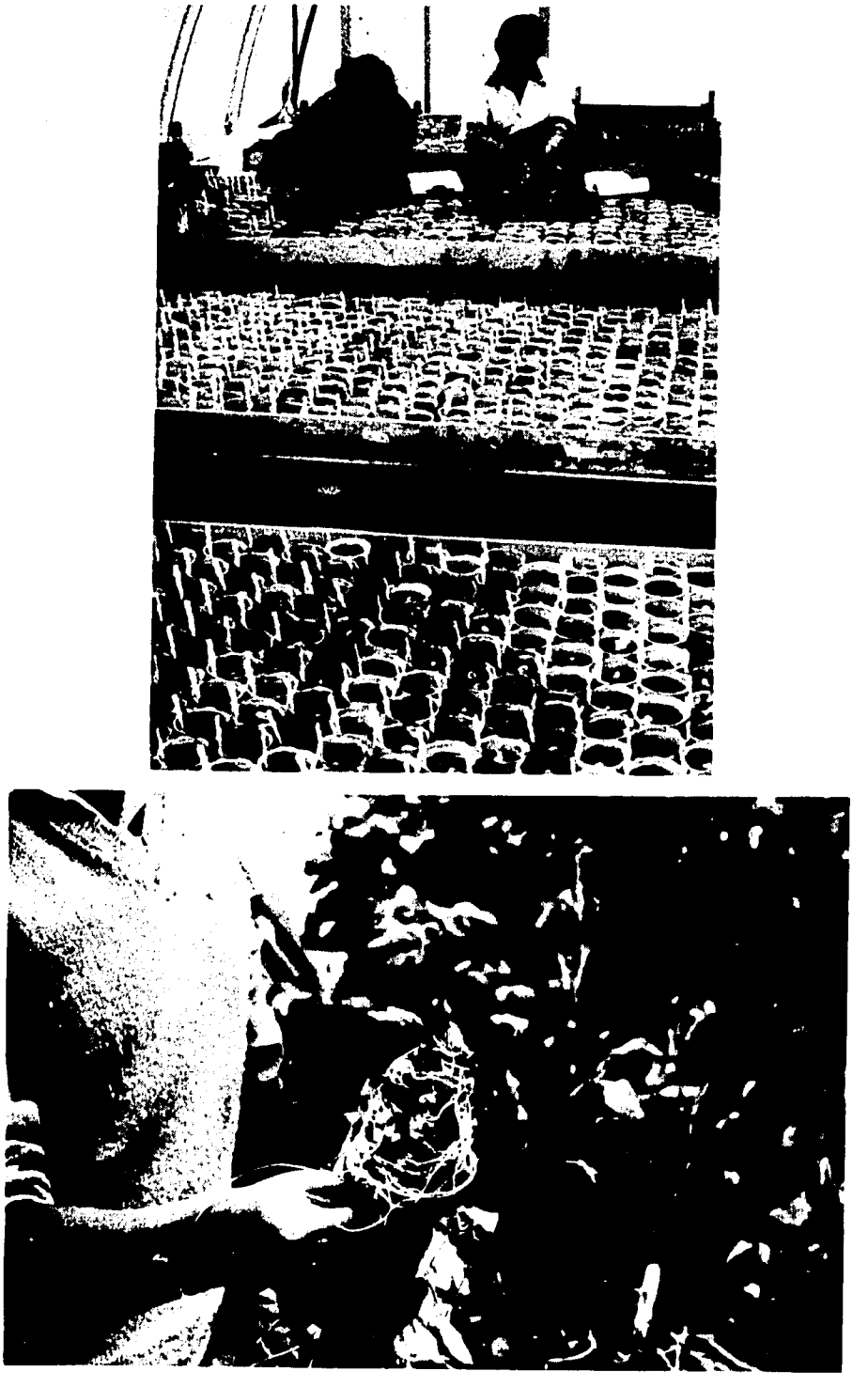


Figura 9. Evaluación de resistencia en tubérculo (prueba en maceta).

Seguidamente, como en casos anteriores, se inocula cierto número de quistes viables para obtener una densidad de 20 huevos/g de suelo. Este inóculo se homogeniza con la capa superior de la mezcla de suelo antes de sembrar un tubérculo pequeño o una porción de tubérculo que contenga un brote. Se cubre el material sembrado con la mezcla de suelo y se riega cuidadosamente cada maceta. La temperatura del invernadero se debe mantener entre 10 y 25 °C. durante las 8 a 10 semanas siguientes, cumplidas las cuales se realiza la evaluación.
Esta primera prueba, permitirá esencialmente eliminar aquellos clones susceptibles según el número de hembras inmaduras que se observen sobre la masa radicular (masa de suelo y raíces). Los clones seleccionados como resistentes se pueden mantener para producir tubérculos que se utilizarían en la segunda prueba.

Para la segunda prueba o de verificación de resistencia, se procede de igual forma que la anterior. Luego de la evaluación de la masa de suelo y raíces, las plantas se mantienen hasta el final de su periódo vegetativo, cuando se suspende el riego y se corta el follaje. Esto permitirá que las hembras del nematodo alcancen el estado de quiste y éstos puedan ser extraídos en su totalidad para determinar la población final de quistes (cPf) y luego de huevos (ePf), para así calcular las tasas de multiplicación respectivas.

Es importante incluir siempre una variedad susceptible en estas pruebas, para estimar la eficiencia del inóculo y el tiempo exacto de evaluación.

En las pruebas en macetas se utilizan tres diferentes parámetros para evaluar resistencia:

- El número de hembras observables en la masa radicular dos meses después de la inoculación (Ver Figura 9).

- La razón Pf/Pi (Población final/Población inicial) o tasa de multiplicación del nematodo (TMN) que puede medirse en quistes (cPf/cPi) o en huevos (ePf/ePi).

- Una medida de resistencia relativa, comparando la tasa de multiplicación ocurrida sobre el clon en prueba con la de una variedad susceptible (Dunnett,1957).

Para estos dos últimos casos, como se indica más adelante,se lava el suelo por los métodos respectivos y se extrae el total de nematodos (quistes) después de la maduración de la planta, anotando la evaluación en la hoja de datos (Forma CIP 138-N, ver el anexo).

La escala de evaluación utilizada en la prueba en maceta es la siguiente:

0	hembras jovenes sobre	Resistente	(R)
1 - 15	la masa de suelo y raíces	Parcialmente resistente	(PR)
16- 50		Moderadamente susceptible	(MS)
> 50		Susceptible	(S)
1,0	Tasa de multiplicación	Resistente	(R)
1,0 - 2,5	de quistes cPf/cPi	Parcialmente resistente	(PR)
2,6 - 5,0		Moderadamente susceptible	(MS)
> 5,0		Susceptible	(S)
< 1,0	Tasa de multiplicación	Resistente	(R)
1,0 - 3,7	de huevos ePf/ePi	Parcialmente resistente	(PR)
3,8 - 7,0		Moderadamente susceptible	(MS)
> 7,0		Susceptible	(S)
0	Indice de susceptibilidad	Resistente	(R)
1,0 - 12,5	$\% = \frac{\text{Pf del clon probado}}{\text{Pf del control}} \times 100$	Parcialmente resistente	(PR)
12,6 - 25,0		Moderadamente susceptible	(MS)
> 25,0		Susceptible	(S)

Aunque en el CIP la prueba de maceta es una técnica rutinaria de evaluación, la correlación del número de hembras inmaduras sobre la masa de suelo y raíces y la tasa de multiplicación en quistes es mayor cuando se trata de plantas susceptibles y menor para plantas resistentes. Los resultados de algunos estudios mostraron gran número de plantas erróneamente clasificadas como resistentes aun con número bajo de hembras inmaduras (23,1 hasta 50,0%), sobre la masa de suelo y raíces, comparado con la tasa de multiplicación con quistes (Figura 10). La eficiencia para selección de resistencia (0 a 14.3%) aumenta cuando se tiene menos de dos hembras inmaduras en la masa radicular, pues la tasa de multiplicación final de nematodos no es mayor que dos (Franco y González 1982).

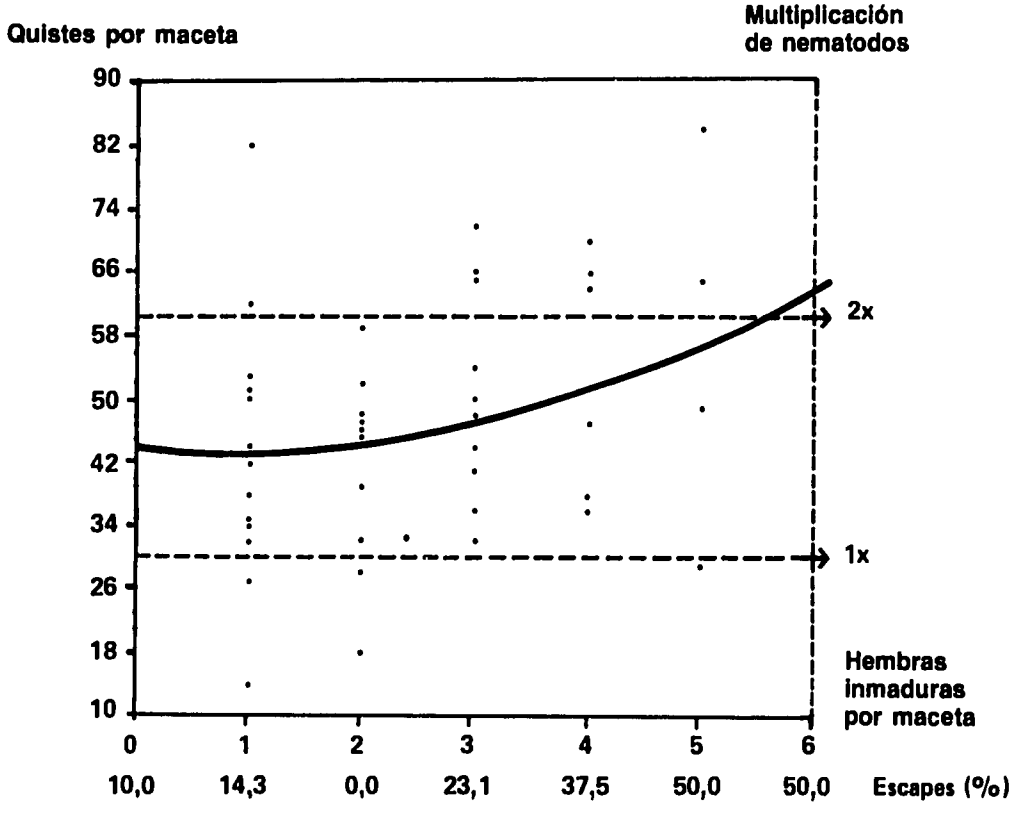


Figura 10. Relación entre el número de hembras inmaduras en la masa radicular y el número de quistes por maceta en la prueba de tubérculos.

El método de masa de suelo y raíces ahorra tiempo pero no evita la influencia compleja del medio ambiente, que contribuye a la variabilidad de los resultados. Este método es laborioso, y durante las pruebas se deben evitar condiciones de invernadero que afecten o no permitan el desarrollo normal de los nematodos (altas temperaturas por períodos prolongados son letales).

5.2 Prueba en recipiente cerrado

Para superar las limitaciones de la prueba de resistencia en maceta se ha acondicionado el método descrito por Foot (1977), que inicialmente fue desarrollado para estudios de biología. Este método aprovecha la cualidad de los tubérculos de papa de producir raíces en la oscuridad. Con este método se superan las desventajas de la prueba en maceta como son los factores de medio ambiente, y las limitaciones de espacio (Phillips *et al.*,1980).

En el método para evaluar resistencia en recipientes cerrados se utiliza un recipiente transparente de plástico de 4,5 cm de altura y 10 cm de diámetro, el cual se llena parcialmente con 100 cm^3 de un sustrato esterilizado, como el descrito en casos anteriores, que contenga humedad de 30% (se le agrega agua para alcanzar este porcentaje).

Luego se inocula con quistes o suspensión de huevos en la concentración de 20 huevos/g de suelo y se cortan porciones de tubérculos con brotes al tamaño requerido del recipiente, las cuales se colocan con la superficie cortada en contacto con el sustrato. Inmediatamente se les ajustan sus tapas respectivas, las que han sido previamente perforadas con una aguja para permitir el intercambio de gases y se les almacena en oscuridad a temperatura constante de 20°C.

La evaluación se realiza a las siete semanas, contando el número de hembras visibles a través de las paredes del recipiente o recuperando el total de quistes nuevos formados (Figura 11).

Los criterios y parámetros considerados para evaluar resistencia en los recipientes cerrados son los mismos que para la prueba en maceta.

Se han realizado estudios de correlación entre la prueba en maceta y los recipientes cerrados (Phillips *et al.*, 1981) con clones derivados de *Solanum vernei*, *S. tuberosum* spp. *andigena* (C.P.C. 2802) y cultivares susceptibles derivados de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* utilizando la población de *Globodera pallida* patotipo E (P5A).

Los resultados de la multiplicación del nematodo del quiste en maceta se compararon con los obtenidos con los recipientes cerrados. El coeficiente de correlación ($r = 0,75$; $P < 0,01$) entre estos dos métodos

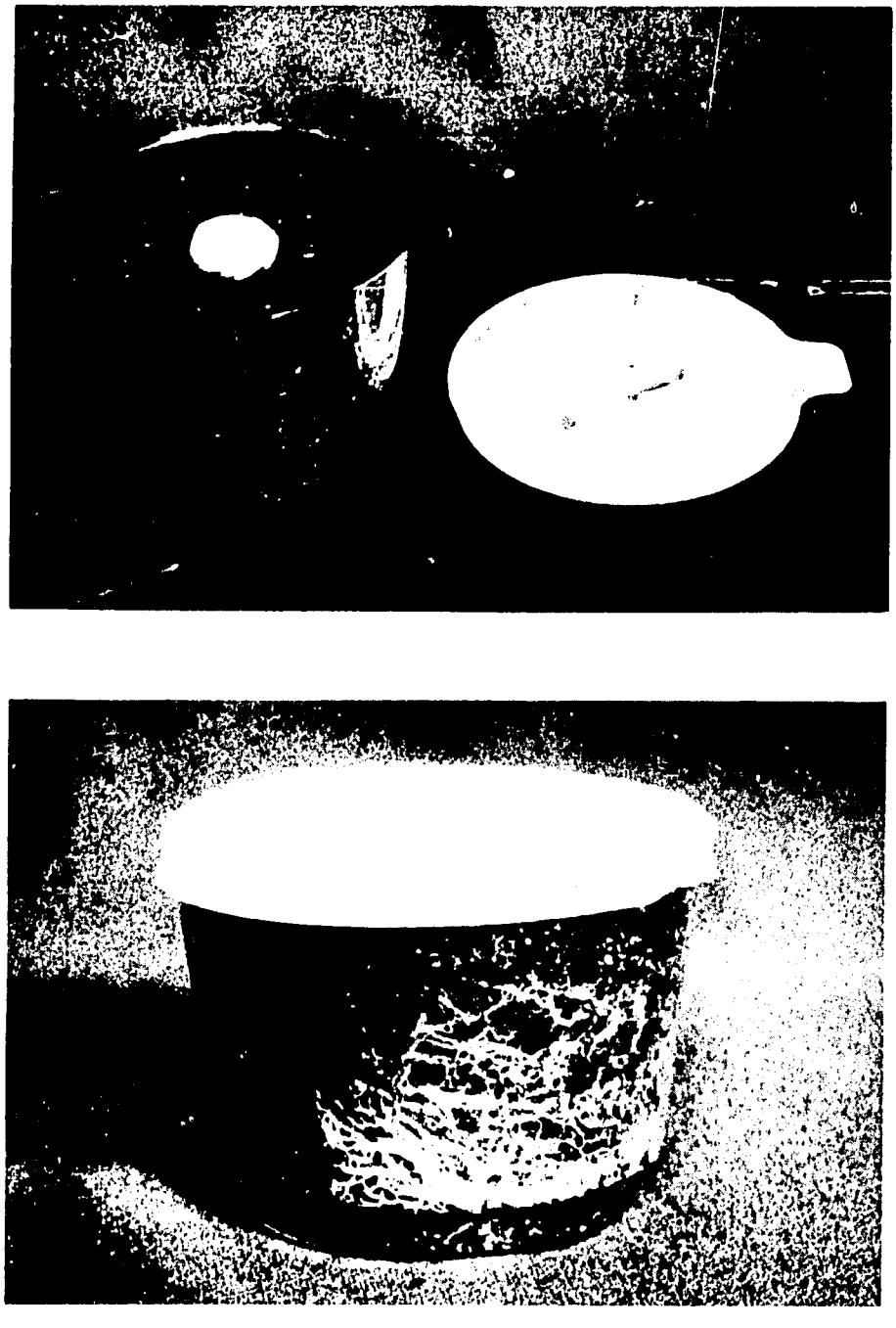


Figura 11. Evaluación de resistencia en tubérculo (prueba en recipiente cerrado).

es satisfactorio. De otro lado se determinó alta correlación (r = 0,87; p< 0,01) entre el número de hembras inmaduras que se mostraba a través de la pared del recipiente y el total de quistes recuperados, demostrando la utilidad del método para evaluar resistencia al nematodo del quiste. Sin embargo la multiplicación del nematodo por este método parece ser menor que la obtenida en macetas , como se observa en la Figura 12, en la que se comparó diferente material genético con diversos niveles de resistencia.

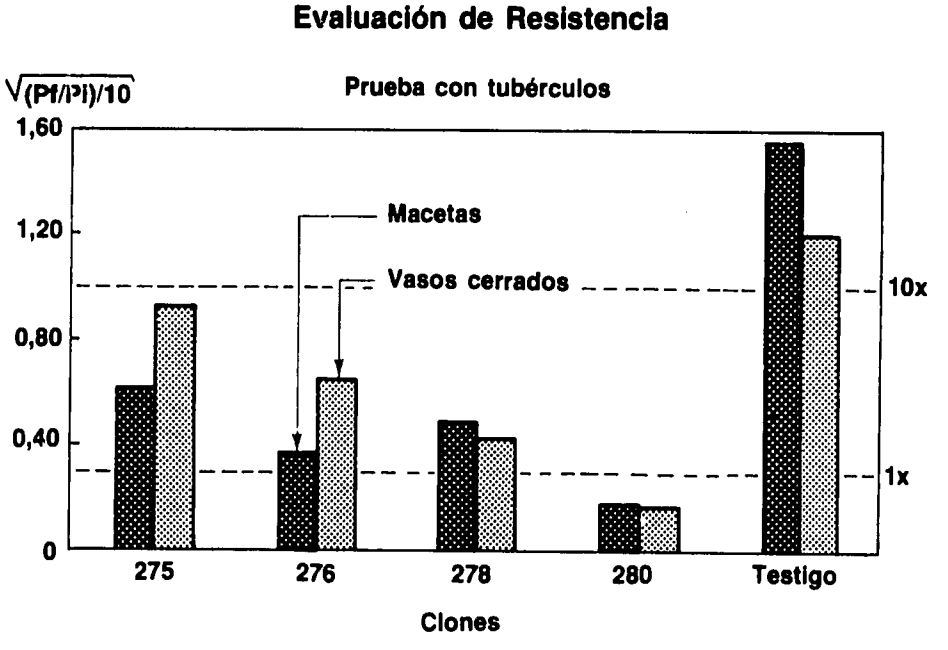


Figura 12. Tasas de multiplicación de G. pallida en clones mejorados de papa con diferentes niveles de resistencia, evaluados como tubérculos por la prueba de maceta y de vasos cerrados (Pi = 20 huevos y larvas por gramo de suelo).

5.3 Prueba en platos de petri

El método en platos de petri es más sensitivo que la prueba en maceta y consiste en hacer crecer las raíces en un plato de petri con agar-agua al 2%. Esto se consigue depositando una porción de tubérculo con un brote vigoroso sobre el agar y colocando el plato en forma vertical para que las raíces sigan su geotropismo. Lo resaltante de este método es que se puede conocer exactamente lo que está sucediendo durante todo el desarrollo. Es decir, se puede observar la penetración, el cambio de estadíos, la necrosis de raíces y finalmente las hembras inmaduras si la planta es susceptible. Este método exige mucha práctica y la inoculación es muy laboriosa, pero ésto se compensa porque no hay necesidad de lavar el suelo para establecer la evaluación final. Además, se necesitan comparativamente pocos quistes para la obtención dél inóculo.

La metodología para evaluar resistencia en tubérculos bajo condiciones de laboratorio se inicia con la preparación de agar- agua (AA) al 2% que se "plaquea" en platos de petri (9 cm). Luego se seleccionan brotes de papa sanos y vigorosos, se cortan con pequeñas porciones de tubérculo y se colocan en los platos con AA ya solidificado (una porción por plato). Seguidamente estos platos se incuban a 20°C en posición vertical y sin luz hasta que se observe la presencia de raíces de 1-2 cm de largo. En esta oportunidad y bajo un estereoscopio se seleccionan las raíces que se desarrollan sobre la superficie del agar y que tengan el diámetro adecuado (mayor de 1 mm), para ser inoculados con cinco estados juveniles mediante tranferencia directa sobre la zona de crecimiento (cerca al ápice) de la raíz. De haber más raíces se procede de igual forma (Figura 13).

La evaluación se efectua 30 días después de la inoculación, por conteo de las hembras que se hubieran desarrollado y que estén visibles sobre las raíces. Los números de estados juveniles inoculados y el de hembras inmaduras formadas se utilizarán para determinar el índice (%) de reproducción. Este índice se calcula por la fórmula siguiente:

$$\text{Indice de hembras o de reproducción del nematodo(\%)} = \frac{\text{No.de hembras desarrolladas}}{\text{No. de estados juveniles inoculados}} \times 100$$

Para llevar a cabo esta prueba en forma exitosa se recomienda emplear estados juveniles de hasta 10 días de emergidos y además desinfectar los tubérculos con clorox (5%) y con Dithane (dos por mil). En caso de contaminación de algunos platos inoculados, hay que eliminarlos.

Además con el fin de facilitar las observaciones posteriores hay que identificar los lugares de inoculación con un marcador fino.

La escala de evaluación utilizada en la prueba en plato de petri es la siguiente:

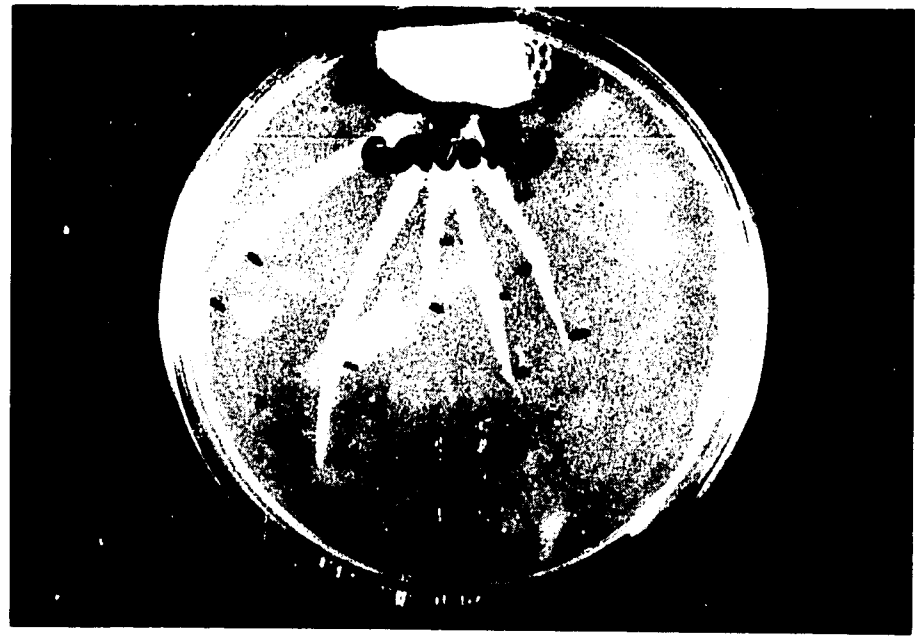
0,0		R
0,1-7,0	$\% = \frac{\text{Número de hembras formadas}}{\text{Estados juveniles inoculados}} \times 100$	PR
7,1-14,0		MS
>14,1		S

Con el objeto de determinar la eficiencia y el grado de correlación entre los métodos en maceta y en platos de petri, comúnmente utilizados en el CIP, se realizó un estudio comparativo de cada uno de ellos, en la evaluación de resistencia a Globodera pallida raza P4A.

En el método de maceta se aplicaron los dos criterios de evaluación de resistencia. El primero consiste en contar el número de hembras inmaduras visibles sobre la masa de suelo y raíces o masa radicular, y el segundo corresponde a la tasa de multiplicación del nematodo en quistes (cPf/cPi). En el método de platos de petri se empleó como criterio de evaluación de resistencia el índice de hembras, o de reproducción del nematodo (%).

En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos entre los métodos de evaluación en maceta y platos de petri de dos clones considerados como resistentes a P4A y a tres cultivares susceptibles. En primer lugar, aunque se determinó alta correlación entre los criterios de evaluación en maceta ($r=0,95$, $p<0,01$), se detectó cierto porcentaje de error o "escape", aun cuando el número de hembras en la masa radicular fue menor de cinco, tal como se indicó en la Figura 10. En segundo lugar, los resultados del plato de petri, donde difícilmente ocurren factores externos que alteren la evaluación, mostraron también correlación alta con los obtenidos por los criterios de número de hembras sobre la masa radicular ($r = 0,77$, $P<0,01$) y la tasa de multiplicación en quistes ($r = 0,78$; $P<0,01$) en las pruebas en macetas (Franco y González 1983), indicando la validez de los criterios empleados.

Para confirmar estos resultados y con el fin de establecer aún más el grado de eficiencia en la selección de genotipos resistentes por estos dos métodos de tamizado, ciertos grupos de clones fueron evaluados en igual forma (Tabla 8).



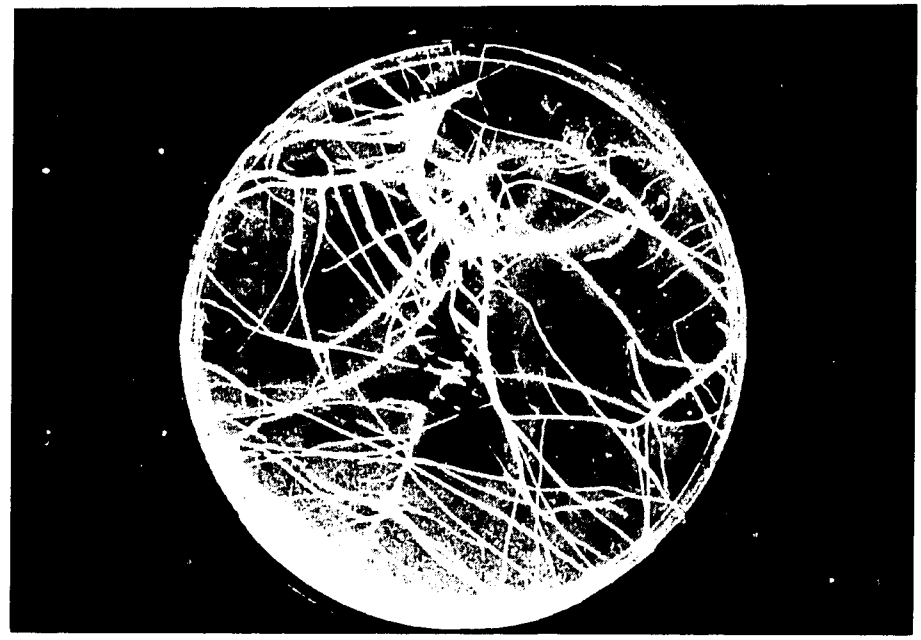


Figura 13. Evaluación de resistencia en tubérculo (prueba en plato de petri).

Tabla 7. Criterios de evaluación en la reproducción de Globodera pallida en algunas variedades de papa por dos métodos de evaluacion.

Clones	Maceta		Plato de Petri
	Masa de suelo y raíces.	cPf/cPi	%f
CIP-702535	1	0,88	1,2
CIP-702698	3	1,25	2,6
Renacimiento	89	15,77	52,5
Revolución	74	12,20	42,0
Mariva	81	16,0	45,0

Tabla 8. Variabilidad en porcentaje de clones de papa con resistencia a Globodera pallida, en dos metodos de evaluación.

Patotipo	Material	No. clones	% de Resistencia	
			Maceta	Plato de petri
P4A	280	217	15,6	3,7
	281	335	16,1	1,4
	G82	154	24,0	1,2
P5A	280	196	26,5	4,1
	281	265	19,6	1,0
	G82	89	--	--
P4A + P5A	280	148	19,6	2,0
	281	148	7,4	0,0
	G82	88	12,5	2,3

Los resultados muestran un porcentaje alto de clones que podrían erróneamente considerarse como resistentes en la prueba en maceta en comparación con los porcentajes de selección por el método de platos de petri. Sin embargo hay que tener presente que estas posibles divergencias podrían deberse a diferencias en el mecanismo de la resistencia de los clones o de su expresión por la naturaleza misma de cada uno de los métodos. Aun más, los porcentajes obtenidos con el método del plato de petri representan únicamente a los clones que mostraron índice de hembras igual a cero, y no a los que permitieron cierta multiplicación del nematodo, pero sin alcanzar a la que ocurre en los clones susceptibles. Por ello, para identificar estas diferencias en comportamiento según los diversos niveles de resistencia, se seleccionaron 59 clones considerados como los más resistentes, después de dos pruebas en macetas, para evaluarlos en platos de petri. Con los resultados obtenidos fué posible establecer diferentes niveles de resistencia, medida por la presencia variable o ausencia de hembras inmaduras en la raíz (Tabla 9). Estos niveles constituyen en la actualidad la escala de evaluación para las pruebas en platos de petri.

Tabla 9. Escala de evaluación o niveles de resistencia a Globodera pallida en la prueba de plato de petri.

		% de clones resistentes*		
Niveles de resistencia	% F	P4A	P5A	P4A + P5A
Resistente	0	22,0	18,6	5,1
Parcialmente resistente	1-7	37,3	22,0	11,9
Moderadamente susceptible	7-14	3,4	10,2	10,1
Susceptible	>14	8,5	20,3	1,7

5.4 Prueba en campo.

El objetivo de esta prueba es identificar o comprobar si la resistencia incorporada a clones de papa es realmente efectiva en el lugar donde se ejecute la prueba, así como también para evaluar sus características agronómicas. Esta prueba, aunque bajo ciertas circunstancias es opcional, es muy importante porque su ejecución se lleva a cabo en un campo naturalmente infestado y no necesita instalaciones especiales. Con esta prueba, además de evaluar la resistencia de los clones, se mide la tolerancia al ataque del nematodo (Tolerancia = habilidad o capacidad de una planta para producir rendimientos económicos aceptables en campos infestados por

el nematodo) mediante la comparación del rendimiento de cultivares o variedades comerciales predominantes en la región (que se consideran como testigos) y el obtenido en los clones bajo prueba.

El diseño de campo que se escoja dependerá del número de tubérculos disponibles de cada clon por someter a prueba. En todos los casos la uniformidad y severidad de la infestación del campo se determinan alternando en los diseños una variedad de papa susceptible con las líneas avanzadas por probar. Estas variedades susceptibles deberán ser las más comunes de la región donde se instale la prueba.

De contar solamente con 4 a 6 tubérculos de las líneas por probar, se recomienda el diseño explicado en la Figura 14. Esta prueba constituye más que todo un paso inicial para descartar todos los clones que muestren alta susceptibilidad al nematodo y para incrementar el número de tubérculos. Los que resulten seleccionados por su resistencia, deberán ser probados una vez más para confirmar su resistencia.

De contar con un número mayor de tubérculos se empleará el diseño que se presenta en la Figura 15 (20-30 tubérculos) o en la Figura 16 (60-90 tubérculos).

Esta prueba se refiere esencialmente a determinar si la reproducción del nematodo es afectada por los clones bajo prueba. Una forma de determinar el efecto de los clones es por medio de la tasa de multiplicación. Esto se realiza mediante la toma de muestras de suelo antes de la siembra y después de la cosecha, para así determinar el número de quistes presentes en ellas y detectar si ha ocurrido un incremento. Para ello se calcula la tasa de multiplicación del nematodo. La otra forma, la más importante, es evaluar si la reproducción del nematodo ha sido exitosa al cabo de 10 a 12 semanas después de la siembra (Figura 17).

En este caso al extraer cuidadosamente las plantas de papa se observará sobre las raíces de los cultivares susceptibles numerosas hembras inmaduras. Por el contrario, en las raíces de aquellos clones que se muestren resistentes, no se verá ninguna o solo se observará un número muy reducido de hembras. La escala para evaluar y determinar el comportamiento de los clones es la que se índica en la respectiva hoja de evaluación (Forma CIP-144 ver el anexo). Para realizar esta prueba la única condición es disponer de un campo infestado. Esto se determina por la historia del campo y la toma de muestras del suelo,o ambas cosas, las que se procesarán para determinar la presencia de quistes (mínimo 20 quistes viables/100 g de suelo). Además se aplicarán los insumos normales de fertilización, prácticas culturales y productos fitosanitarios (NO emplear insecticidas sistémicos como Aldicarb, Carbofuran, Oxamyl,etc.). Toda la información relativa al campo y las labores realizadas se registran en la forma respectiva (Forma CIP 142-N; ver el anexo).

Bloque I				Bloque II				
o	o	o	o	o	o	o	o	o
(T)								
o	o	o	o	o	o	o	o	o
*	o	*	o	o	*	o	*	o
(C1)		(C5)			(C8)		(C7)	
*	o	*	o	o	*	o	*	o
o	*	o	*	o	o	*	o	*
	(C3)		(C7)			(C1)		(C5)
o	*	o	*	o	o	*	o	*
*	o	*	o	o	*	o	*	o
(C2)		(C6)			(C3)		(C4)	
*	o	*	o	o	*	o	*	o
o	*	o	*	o	o	*	o	*
	(C4)		(C8)			(C6)		(C2)
o	*	o	*	o	o	*	o	*
o	o	o	o	o	o	o	o	o
o	o	o	o	o	o	o	o	o

(o) Testigo (T): cultivar susceptible más común de la zona.
(*) Clon en prueba; distribuidos al azar.

Figura 14. Diseño de campo para pruebas de líneas avanzadas (4-6 tubérculos) en campos infestados.

Bloque I	Bloque II
o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o
C1 * * * * * * * * *	C7 * * * * * * * * *
o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o
C2 * * * * * * * * *	C1 * * * * * * * * *
o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o
C3 * * * * * * * * *	C10 * * * * * * * *
o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o
C4 * * * * * * * * *	C9 * * * * * * * * *
o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o
C5 * * * * * * * * *	C3 * * * * * * * * *
o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o
C6 * * * * * * * * *	C2 * * * * * * * * *
o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o
C7 * * * * * * * * *	C4 * * * * * * * * *
o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o
C8 * * * * * * * * *	C6 * * * * * * * * *
o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o
C9 * * * * * * * * *	C5 * * * * * * * * *
o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o
C10 * * * * * * * *	C8 * * * * * * * * *

(o), (*) Ver significado en la Figura 14.

Figura 15. Diseño de campo para pruebas de líneas avanzadas (20-30 tubérculos) en campos infestados.

Bloque I				Bloque II
(C1)	(C2)	(C3)	(C4)	
o * * *	o * * *	o * * *	o * * *	o o
o * * *	o * * *	o * * *	o * * *	o o
o * * *	o * * *	o * * *	o * * *	o o
o * * *	o * * *	o * * *	o * * *	o o
o * * *	o * * *	o * * *	o * * *	o etc o
o * * *	o * * *	o * * *	o * * *	o o
o * * *	o * * *	o * * *	o * * *	o o
o * * *	o * * *	o * * *	o * * *	o o
o * * *	o * * *	o * * *	o * * *	o o
o * * *	o * * *	o * * *	o * * *	o o

(o), (*) Ver significado en la Figura 14.

Figura 16. Diseño de campo para prueba de líneas avanzadas (60-90 tubérculos) en campos infestados.

Figura 17. Evaluación de resistencia en tubérculo (prueba en campo).

En el caso del primer diseño (Figura 14) se extrae una planta del clon en prueba y se observan las raíces.De no mostrar ésta la presencia de nematodos, se extraerán las plantas susceptibles que la rodean , para verificar si éstas presentan hembras o no. En caso negativo se considera que el área no se encontraba infestada y que simplemente el clon probado habría sido un "escape", y se procede a la evaluación del mismo clon en otro bloque (II). En el caso de los clones que se muestren resistentes , se dejará la otra planta hasta su madurez y se cosecharán los tubérculos para las futuras pruebas (Figuras 15 ó 16).

El diseño que se presenta en la Figura 15 se utilizará cuando se cuente por lo menos con 20 tubérculos de cada clon para probar. Estos se sembrarán en dos repeticiones de un surco de 3 a 4,5 m de largo cada uno, dependiendo del número de tubérculos (10 ó 15 respectivamente). En ambos lados se sembrará la variedad susceptible más comúnmente empleada en la región para verificar la infestación y comparar su rendimiento. Para la evaluación por resistencia (época de floración) se extraerán plantas de la variedad susceptible para verificar la presencia de nematodos (hembras inmaduras). Si se observan éstas en varias plantas y en cantidades numerosas, se procederá a levantar cuidadosamente con una herramienta adecuada 2 ó 3 plantas por cada clon y se tomarán los datos en las respectivas hojas de registro (Forma CIP 144; ver el anexo). En igual forma se procederá con las plantas del testigo.

De contarse con mayor número de tubérculos (60 ó 90) se empleará el diseño de la Figura 16. Los tubérculos de cada clon se sembrarán en tres surcos de 3 m de largo y se intercalará un surco de la variedad susceptible. Para mayor precisión se hacen 2 ó 3 repeticiones por clon. Las plantas para evaluar por resistencia (2 ó 3 por surco) se extraerán de los surcos laterales, dejando el surco central para la evaluación de rendimiento. La extracción de plantas se realiza con gran cuidado. Si la variedad susceptible utilizada como testigo tiene una evaluación de 3 en la escala (Tabla 10), entonces una línea avanzada con 0 ó 1 puede ser considerada como resistente.

Para registrar los datos de resistencia en las dos últimas pruebas (Figuras 15 y 16), se utiliza la hoja "Evaluación de resistencia y desarrollo en el campo" (Forma CIP No 144; ver el Anexo), al reverso de la cual están indicadas las escalas de evaluación. Para los rendimientos se utiliza la hoja de datos de "Parcelas de multiplicación y adaptación" (Forma CIP No 145; ver el Anexo), mostrada en el Anexo. Estos rendimientos darán la información necesaria para medir la tolerancia de las líneas avanzadas al daño ocasionado por los nematodos. Todas las líneas que presenten rendimientos superiores a la variedad testigo serán consideradas como tolerantes y podrán ser seleccionadas si poseen las características agronómicas deseables de la región.

Los clones que resulten seleccionados luego de esta prueba pueden llevarse a ensayos regionales para su futuro lanzamiento como nuevas variedades resistentes al nematodo del quiste de la papa.

Tabla 10. Pruebas, criterios y parámetros considerados en el CIP, en las evaluaciones de resistencia.

Prueba	Criterio	Parámetro	Escala	Reacción*
Macetas	Observación visual de hembras formadas	Número de hembras jóvenes sobre el bolo de raíces	0 1-15 16-50 >50	R PR MS S
	Estimar la reproducción por población final (Pf) de quistes (c) y/o huevos (e)	Tasa de multiplicación de quistes: cPf/cPi	1,0 1,1-2,5 2,6-5,0 >5,0	R PR MS S
		Tasa de multiplicación de huevos: ePf/ePi	<1,0 1,0-3,7 3,8-7,0 >7,0	R PR MS S
	Reproducción en relación a hospedero susceptible	Indice de susceptibilidad: $\% = \frac{\text{Pf del clon probado}}{\text{Pf del control susceptible}} \times 100$	0,0 1,0-12,5 12,6-25,0 >25,0	R PR MS S
Recipiente cerrado	Igual que el anterior			
Plato de Petri	Número de hembras formadas	Indice de hembras: $\% = \frac{\text{No. hembras formadas}}{JJ_2 \text{ inoculadas}} \times 100$	0,0 0,1-7,0 7,1-14,0 >14,0	R PR MS S
Campo	Observación visual de hembras considerando desarrollo radicular	Número de hembras sobre las raíces	Ninguna = 0 1-15 = 1 16-50 = 2 >50 = 3	R PR MS S

*R= Resistente; PR = parcialmente resistente; MS = moderadamente susceptible; S= susceptible.

6. FUENTES DE RESISTENCIA

Las dos cualidades fundamentales que debe poseer una planta resistente son: capacidad de impedir la reproducción del nematodo y heredabilidad de esta característica.

El primer paso en un programa de mejoramiento es el proceso de identificar plantas que no reproduzcan al nematodo, o de ocurrir, que estos lo hagan en forma muy limitada. Para cumplir esta etapa, primeramente, se prueba el material genético de la colección de papas cultivadas y luego del material de papas silvestres. La razón es que el mejoramiento es más fácil a partir de material cultivado que de material silvestre, pues éste arrastra consigo algunas cualidades no deseables. Si otros programas están trabajando en resistencia, se puede avanzar rápidamente probando material que ya ha sido identificado como resistente en otros lugares.

Es importante tener en consideración a la población del nematodo que se desea probar: debe ser típica de la zona donde será utilizada esa resistencia. Además, se debe tener cuidado con la identificación de especies y razas. En la zona andina existen dos especies de nematodo del quiste y entre éstas, ocho razas identificadas con diferenciales europeos. Es extremadamente difícil para un programa de mejoramiento abarcar a todas estas razas. En el CIP se optó por concentrar el programa de mejoramiento contra dos razas denominadas P4A y P5A de Globodera pallida que representan más o menos 74% de las razas en la zona andina.

Más de 3000 entradas de cultivares nativos de la colección de germoplasma del CIP, mayormente S. tuberosum spp. andigena, fueron evaluadas contra las poblaciones P4A de Chocón (Centro del Perú) y la población P5A de Otuzco (Norte del Perú). Se determinó que estas razas se reproducían en todos los clones. Sin embargo, la reproducción del nematodo fue consistentemente más baja en algunos de ellos y significativamente menor que la del testigo susceptible. Los clones parcialmente resistentes (grupo Hualash) fueron inicialmente identificados para la población P5A y se inició el programa de mejoramiento para el nematodo del quiste.

Dos clones provenientes de Bolivia fueron determinados como parcialmente resistentes a la población P4A (CIP 702535 y CIP 702698), asimismo, al evaluar material clonal proveniente del programa de mejoramiento de Holanda, se determinó resistencia a P4A y susceptibilidad a P5A.

La experiencia con estas fuentes de resistencia demuestran que la segregación para resistencia a G. pallida puede ser alterada sustancialmente por cambios en la intensidad de la selección. El porcentaje de segregantes resistentes fue menor conforme el número de hembras permitido en la masa de suelo y raíces fue decreciendo. Sin embargo, los entrecruzamientos de genotipos altamente resistentes incrementaron la frecuencia de segregantes resistentes. Los

recombinantes con resistencia a ambos patotipos P4A y P5A pueden ser encontrados en progenies provenientes de dos fuentes resistentes. Sin embargo, la resistencia para cada patotipo parece estar condicionada por un grupo diferente de genes. La proporción de segregantes con resistencia a ambos patotipos es relativamente baja; por lo que la frecuencia de progenies con resistencia a ambos patotipos podría incrementarse entrecruzando clones con resistencia doble.

7. CRITERIOS Y PARAMETROS DE SELECCION EN EL CIP

Después de describir las metodologías (así como las limitaciones) de las diversas pruebas para evaluación de resistencia a G. pallida, se ha procedido a establecer una serie de criterios para cada una de ellas. Estos criterios de evaluación y sobre todo la determinación de sus parámetros, también deben ser considerados conforme a su grado de complejidad o disponibilidad de facilidades o de personal.

Así, en la Tabla 10, se presentan los diversos parámetros que se utilizan para medir o establecer (de acuerdo a escalas preparadas conforme a resultados de muchos años) los diversos tipos de reacción que pueden mostrar las plantas de papa una vez que son expuestas al nematodo del quiste.

Estas reacciones parecen exactamente delimitadas por las escalas establecidas para cada parámetro, pero en algunos casos resulta algo complejo determinarlas, sobre todo si se trata de definir la reacción de un clon mediante un sólo parámetro. Por ello, lo más recomendable es el empleo de parámetros provenientes de diferentes pruebas (Tabla 11). Además, lo más importante es mantener una idea clara de los objetivos, es decir selección de materiales resistentes y eliminación de materiales susceptibles, para finalmente obtener material que, llevado al campo, ofrezca las ventajas de una planta con buen rendimiento, características agronómicas deseables y que no permita el incremento de las poblaciones de nematodos a niveles dañinos para el cultivo.

8. CONCLUSIONES

El desarrollo y la aplicación de una metodología para la evaluación de resistencia al nematodo del quiste de la papa (Globodera pallida) en el CIP ha exigido de una detallada secuencia de pasos de laboratorio, invernadero y campo, que condujo a la obtención de la variedad resistente María Huanca.

Este prolongado y constante esfuerzo se ve, finalmente, plasmado en este documento, en el que se incluyen diversos resultados que han permitido diseñar y fijar una completa estrategia para el desarrollo y la obtención de clones de papa con resistencia a los patotipos P4A y P5A de G. pallida. Sin embargo, es importante entender que toda esta

Tabla 11. Reacción de clones de papa a G. pallida raza P4A en pruebas de macetas y platos de petri.

	Maceta		Plato de petri	Indice de suscep.	
	Masa de suelo y raíces	(ePf/ePi)	(%f)	(%)	Reacción
279137-5	0	0,99	0,0	0,0	R
280174-4	0	0,80	0,0	0,0	R
280189-1	0	0,64	0,0	0,0	R
280236-6	0	1,00	0,0	0,0	R
280160-5	3	0,95	4,0	0,0	PR
276008-16	1	2,11	5,0	9,0	MS
278107-3	2	1,40	3,0	5,4	MS
AG-278017-32	2	2,00	10,0	17,9	MS
AG-278017-35	3	3,16	6,2	11,1	MS
AG-278036-6	3	1,64	7,0	12,5	MS
AG-279098-5	2	2,66	2,1	3,8	MS
AG-279098-9	1	1,37	2,6	4,7	MS
280230-13	1	1,10	4,0	7,1	MS
280240-11	2	1,35	10,0	17,9	MS

*R = Resistente; PR = parcialmente resistente; MS = moderadamente susceptible.

estrategia es un conjunto de acciones dinámicas, por lo que constantemente se pueden modificar o mejorar según los cambios o desarrollos tecnológicos.

Estas estrategias se sumarizan en la Figura 18. Como punto de partida se utiliza la prueba masal de plántulas. Se continúa con la prueba de macetas, la prueba en platos de petri y las pruebas de campo. Las pruebas utilizadas en forma apropiada y bajo condiciones pertinentes han permitido desarrollar, según su empleo, dos tipos de material. Uno para distribución interna o para el Programa Nacional de Papa y el otro desarrollado bajo condiciones de cuarentena para distribución a otros programas o para exportación (México, Panamá, Pakistán, Colombia y Ecuador). En esta forma y con la colaboración de técnicos de diversos programas se ha logrado seleccionar exitosamente ciertos clones con características agronómicas deseables y con resistencia a las razas de G. pallida existentes en el Perú (Figura 19) y el Ecuador (Figura 20).

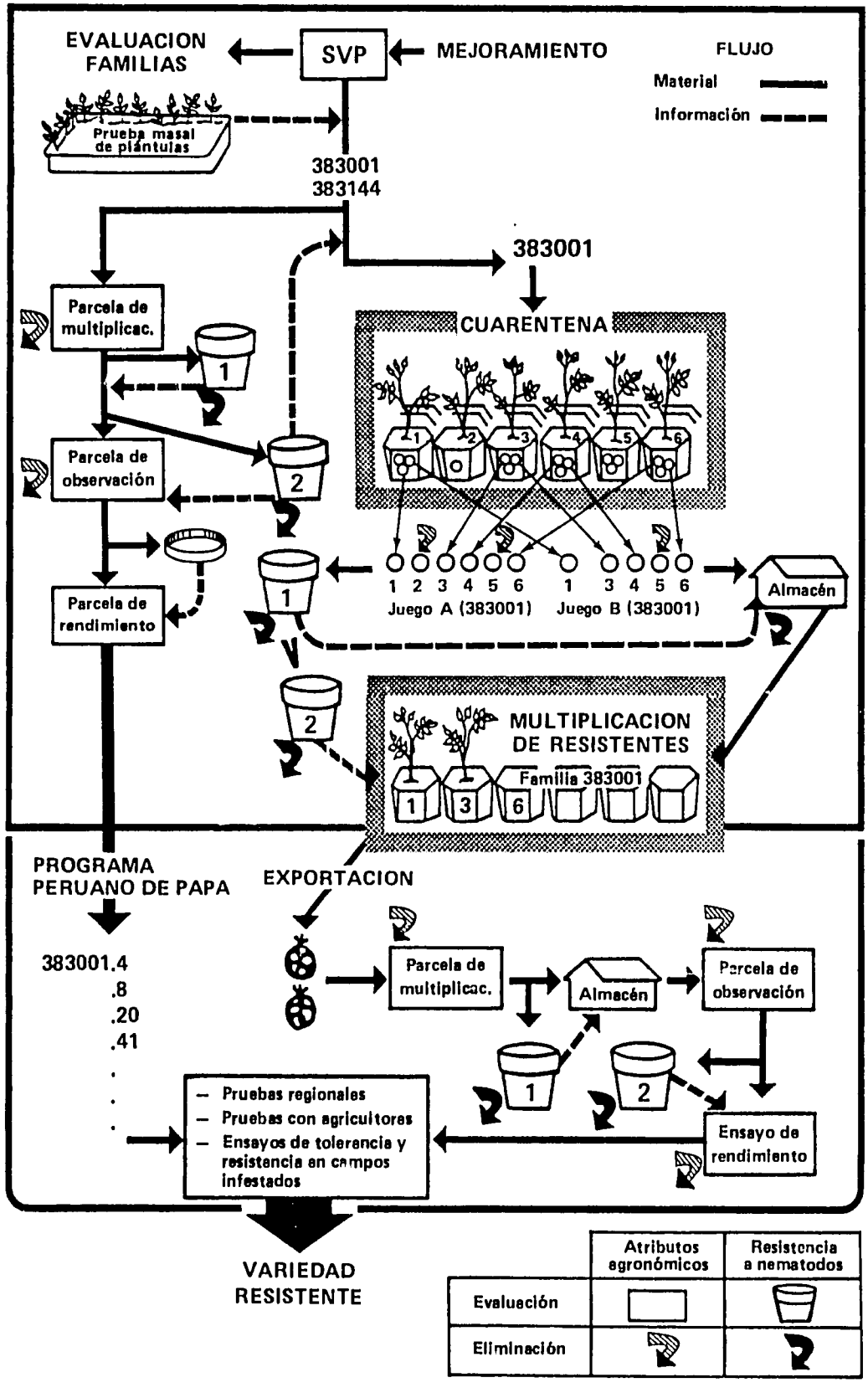


Figura 18. Proceso de evaluación de familias y clones para resistencia a Globodera pallida.

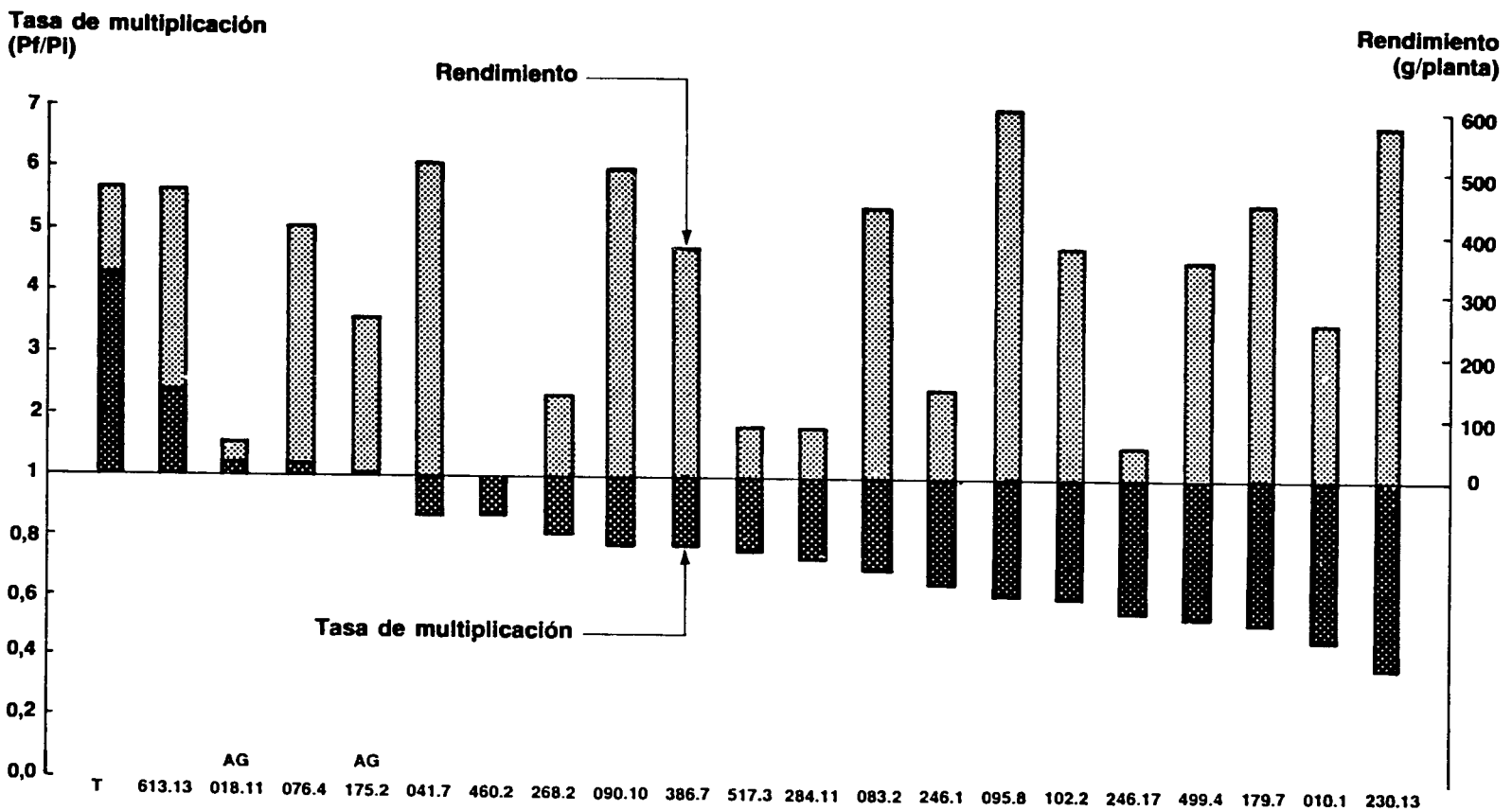


Figura 19. Comportamiento y multiplicación de 20 clones resistentes y un testigo (Participación = T) en campo infestado de nematodos, Umpa, 1983-84.

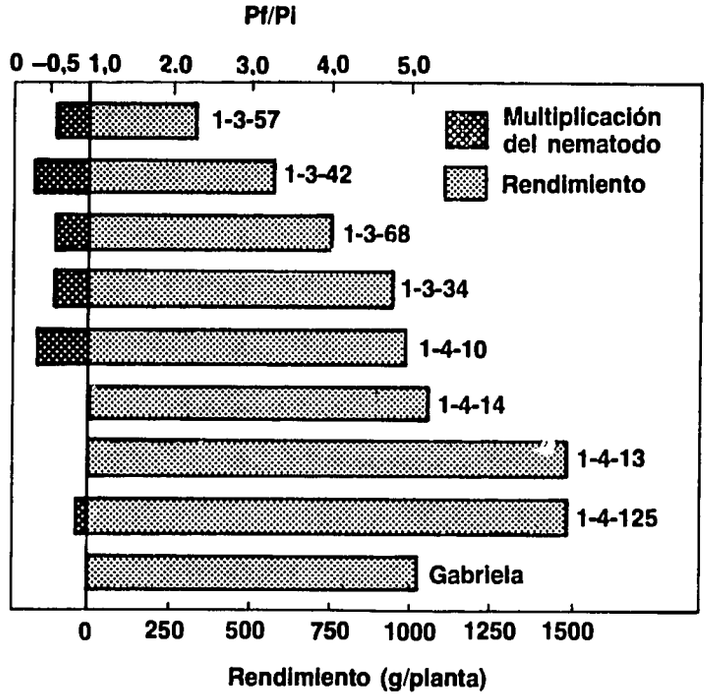


Figura 20. Rendimiento y multiplicación del nemátodo del quiste (G. pallida) en 8 clones avanzados (Quito, Ecuador, 1984).

En esta forma, los autores esperamos estar contribuyendo al desarrollo - en otros países - de programas similares que puedan llevar a cabo una selección de clones de papa con resistencia a poblaciones locales del nematodo del quiste (Globodera pallida).

Recientemente, y como una feliz culminación a los esfuerzos realizados por los técnicos nacionales involucrados en esta magnifica labor, se ha lanzado para beneficio de los agricultores una variedad resistente a G. pallida, nominada "María Huanca". Esta nueva variedad corresponde a un clon seleccionado por el CIP como resistente a la raza P5A de G. pallida. Este clon identificado previamente como G-3 (CIP 279142.12),fué entregado conjuntamente con otros clones al Programa Nacional de Papa del Perú para sus respectivas evaluaciones de campo bajo condiciones locales. Luego de cumplir satisfactoriamente esas pruebas en una serie de campos de agricultores y reunir los requisitos agronómicos deseables por los agricultores y consumidores de la región, este clon fue escogido para ser lanzado como una nueva variedad de papa resistente a las razas P4A y P5A del nematodo del quiste de la papa. Entre otros atributos que se han observado en las pruebas de campo con esta variedad, están su moderada resistencia a la rancha (Phytophthora infestans), y a heladas. Además, en pruebas realizadas en el CIP, la variedad María Huanca mostró inmunidad al virus X de la papa (PVX) e hipersensibilidad al virus Y de la papa

(PVY). En otras pruebas se comportó resistente a las razas 1 y 2 de verruga (Synchytrium endobioticum) y tolerante al carbón de la papa (Angiosorus solani).

Finalmente y para completar la información acerca de esta nueva variedad de papa, se presentan los resultados obtenidos en dos pruebas llevadas a cabo en colaboración con agricultores, (CIP, 1988) en campos que se encontraban naturalmente infestados por el nematodo del quiste de la papa (G. pallida, raza P4A). Uno de los campos presentó alta infestación (64 huevos/g de suelo), mientras que en el otro ésta fue más baja (4 huevos/g de suelo). En el primero se utilizó la variedad susceptible Revolución (semiprecoz) como testigo y en el segundo la variedad Yungay (tardía). En ambos casos se incluyó también la aplicación de un nematicida granulado. A la madurez de los cultivos se cosecharon los campos y se obtuvieron los rendimientos respectivos así como las poblaciones de nematodos para cada uno de los casos. Estos resultados muestran que María Huanca (G-3) tuvo un comportamiento sobresaliente, ya que los rendimientos no fueron afectados como en la variedad semiprecoz, Revolución, (Figura 21a) y no presentó una multiplicación del nematodo como en el caso de la variedad tolerante Yungay (tardía), que en el campo de menor población inicial se incrementó aproximadamente 100 veces cuando se le aplicó nematicida y 85 cuando nó (Figura 21b). Además, es importante indicar que aunque el tratamiento con nematicida no mostró ningún efecto notorio sobre María Huanca como con las otras dos variedades, bajo ciertas condiciones podría ser favorable para reducir los niveles de infestación del nematodo.

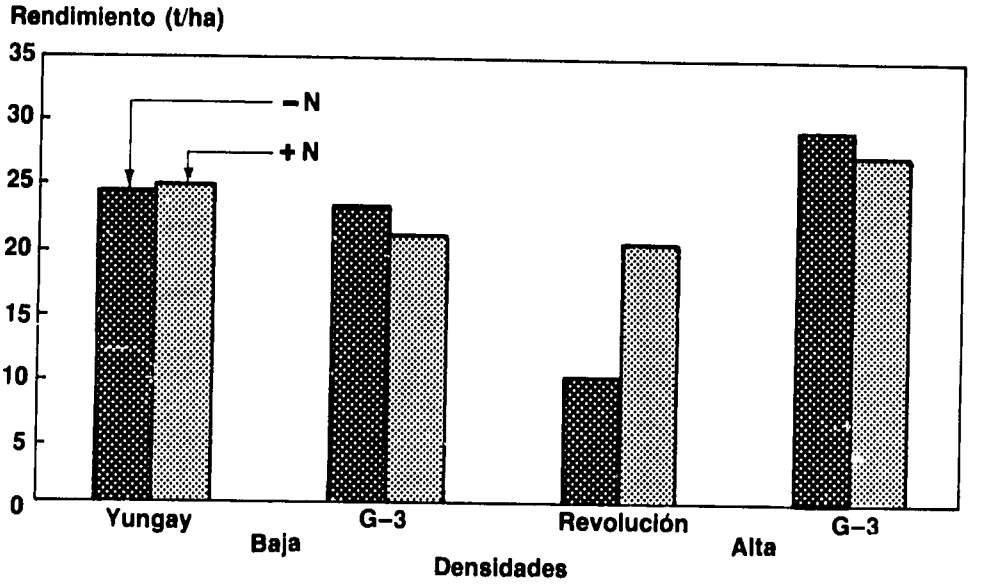


Figura 21 a. Respuesta de los cultivares (G-3) resistente a la raza P_5A de G. pallida, Yungay (Tardía) y Revolución (Precoz) susceptible al nematodo en dos campos infestados con densidades diferentes del nematodo (Baja = 4 y alta = 64 huevos/g de suelo) y la aplicación de un nematicida granulado.

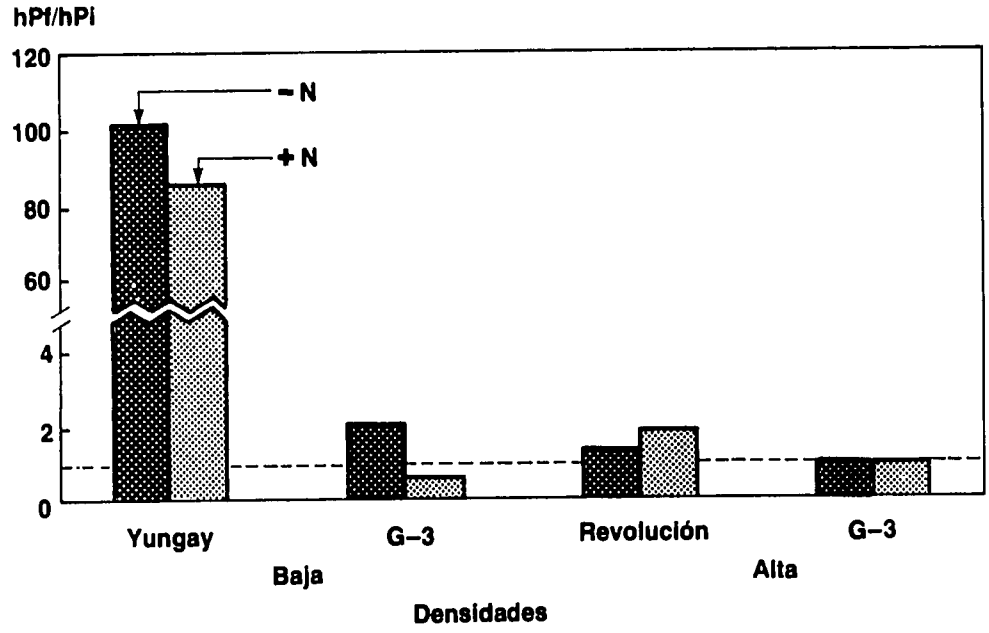


Figura 21b. Tasa de multiplicación de G. pallida (huevos/g de suelo) en dos cultivares susceptibles de papa y la variedad resistente María Huanca (G-3).

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS UTILIZADAS

1. Arbonnier, P., 1966. L'analyse de L' Information. Aperçu Théorique et application a la loi multinominale. Annales de Sciences Forestières 23: 950-1009.

2. Bryan, J. E.; Jackson, M.T.; Melendes G., N. 1981. Técnicas de multiplicación rápida de papa. Centro Internacional de la Papa. Lima. 22 pp.

3. Bowman, L.A.; Ross, H. 1972. Differentiation between Heterodera rostochiensis and on undescribed allied species by female colour morphometrics and pathogenicity. Nematologica 18: 256-269.

4. Cole, C.S.; Howard, H.W. 1957. The genetics of resistance to potato root eelworm of S. tuberosum spp. andigena. Euphytica. 6: 242-246.

5. Centro Internacional de la Papa. 1988. Informe Anual,CIP. p73.

6. Den Ouden, H. 1960. An improved method for making thin agar layers in polythene bags. Nematologica 5: 255-259.

7. Dunnet, J.M. 1957. Variation in pathogenicity of the potato root eelworm (Heterodera rostochiensis Woll.) and the significance in potato breeding. Euphytica 6: 77-89.

8. Dunnett, J.M. 1961. Inheritance of resistance to the Duddingston strain in the breeding line stemming from S. multidissectum. Scottish Society for Research in Plant Breeding Report: 39-46.

9. Dunnett, J.M. 1964. Inheritance of resistance to potato root eelworm Heterodera rostochiensis (Woll.) in breeding line stemming from S. sanctae-rosae Hawkes. Scottish Society for Research in Plant Breeding Report: 41-48.

10. Ellenby, C. 1945. Susceptibility of South American tuber-forming species of Solanum to the potato root eelworm Heterodera rostochiensis. Wollenweber. Emp. J. Expt. Agric. 13: 158-168.

11. Ellenby, C. 1952. Resistance to the root eelworm Heterodera rostochiensis Wollenweber. Nature 170: 1016-1018.

12. Fenwick, D.W.; Widdowson, E. 1958. The conduct of hatching test rostochiensis Woll. J. Helminth. 22: 125-134.

13. Foot, M.A. 1977. Laboratory rearing of potato cyst nematode; a method suitable for pathotyping and biological studies. New Zealand Journal of Zoology 4: 183-186.

14. Franco, J. 1981. Nematodos del quiste de la papa Globodera spp Centro Internacional de la Papa. Lima. 33 pp.

15. Franco, J.; Evans, K. 1978.Multiplication of some south American and European populations of potato cyst nematodes Globodera spp. on potatoes possessing the resistance genes H1, H2 and H3. Pl. Path. 27(1): 1-6.

16. Franco, J.; González, A. 1982. Screening for resistance to potato cyst nematode (Globodera spp.). Proceeding of the Fifth cyst nematode Workshop. North Carolina State University Releight, N.C. : 55-61.

17. Franco, J.; González, A. 1983. Determinación de resistencia a Globodera pallida por diferentes métodos. Fitopatología 19(2):60

18. Franco, J.; González, A. 1986. Evaluación de plántulas para resistencia al nematodo quiste de la papa Globodera spp II: Prueba masal. Fitopatología 21(2): 81-85.

19. Franco, J.; González, A. 1988. Evaluación de plántulas para resistencia al nematodo del quiste de la papa Globodera spp. I. Prueba individual (en prensa).

20. González, A. 1982 Herencia de la resistencia a Globodera pallida raza P4A en dos clones de Solanum tuberosum spp andigena. Tesis M. Sc. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima - Perú. 96 pp.

21. González, A.; Scurrah, M. 1982a. Determinación de resistencia en plántulas al nematodo del quiste Globodera palLida. Fitopatología 17(1): 2.

22. González, A.; Scurrah, M. 1982b. Herencia de resistencia a Globodera pallida raza P4A en dos clones de Solanum tuberosum ssp andigena. Fitopatología 17(2): 25-29.

23. González, A.; Scurrah, M. 1982c. Discrepancy between testing seedling and tuber in progeny screening for resistance to potato cyst nematode Globodera pallida. In: W.J. Hooker (Edi), Research for the potato in the year 2000. CIP. p. 89-90.

24. Huijsman, C.A. 1955. Breeding for resistance to the potato root eelworm. II. Data on the inheritance of resistance in andigenum - tuberosum crosses obtained in 1954. Euphytica 4: 133-140.

25. Huijsman, C.A. 1960. Some data on the resistance against the potato root eelworm (Heterodera rostochiensis Woll.) in Solanum kurtzianum Euphytica 9: 185-190.

26. Jones, F.W.; Pewelska, K. 1963. The behaviur of populations of potato root eelworm (Heterodera rostochiensis Woll) towards some resistant tuberosum and other species of solanum. Ann appl. Biol. 51: 277-294.

27. Mai, W.F.; Peterson, L.C. 1952. Resistance of Solanum ballsii and Solanum sucrence to the golden nematode Heterodera rostochiensis Woll. Science 116: 224-225.

28. Mugniery, D.; Balandras, C. 1986. Test de résistance de descendance de pomme de terre a Globodera rostochiensis Woll. Potato Research 29: 131-140.

29. Mugniery, D.; Pearson, F. 1976. Methode d'elevage de quelques nematodes d' kyste du genre Heterodera Sci. Agron. Rennes. 1976 : 217-220.

30. Oostembrink, 1950. Het aardappelaaltje (Heterodera rostochiensis Woll.) een gevaarlijke parasiet voor de eenzijdige aardappel - cultuur. Plziekt. Dienst. Wageningen. 115, pp.230.

31. Oostembrink, M. 1952. De monocyste-cultuur bij het waardplan tenonderzoek van Heteroderás. Tijdschrift over Planten ziekten 58: 84-87.

32. Phillips, M.S.; Forrest, J.S.; Wilson, L.A. 1981. Screening for resistance to potato cyst nematodes using closed containers. Ann. appl. Biol. 96(3): 317-322.

33. Ross, H. 1962. Uber die veregbung der resiztenz gegen der kartoffelnematoden (Heterodera rostochiensis Woll.) in Kreuzungen von S. famatinae Bitt. and Wittm. mit S. tuberosum und S. chacoense Bitt. Derzuchter 32: 74-80.

34. Scurrah, M. 1972. Variability in Heterodera attacking the potato in Perú. In: Prospects for the potato in the develping world. CIP. Lima-Perú. pp. 172-180.

35. Scurrah, M.; Franco, J. 1978. Summary of the research progress on potato cyst nematode, Globodera spp. In Developments in the Control of Nematode Pest of Potato, Report of 2nd. Nematode Planning Conference 1978. pp. 35-57.

36. Sprau, F. 1968. Uber neve Methoden der untersuchungen von zystenbildenden Nematoden und einige damit erzielte Ergebnisse. Mededelingen Rijksfacultet Landbovwwetens chappen Ghent 33(3): 691-706.

37. Toxopeus, H.J.; Huijsman, C.A. 1953. Breeding for resistance to potato root eelworm. I. Preliminary data concerning the inheritance and the nature of resistance. Euphytica 2: 180-186.

38. Widdowson, E. 1958a. Potato root diffusate production. Nematologica 3: 6-14.

39. Widdowson, E. 1958b. Observations on the collections and storage of potato root diffusate. Nematologica 3: 173-178.

40. Williams, T.D. 1957. Development of isolated female larvae of the potato-root eelworm (Heterodera rostochiensis Woll.) Nature 180: 1000.

41. Williams,T.D. 1963 The development of female of the potato root-eelworm (Heterodera rostochiensis Woll.) on tuber-pieces of susceptible and resistant potatoes. Euphytica 12: 277-284.

ANEXO

HOJA DE DATOS

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP)

Departamento de Nematología

Material _____

Fecha de Siembra _____

Evaluación _____

Cosecha _____

1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									
21									
22									
23									
24									
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
41									
42									
43									
44									
45									
46									
47									
48									
49									
50									

Forma CIP 138-N

Previous Page Blank

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP)

HOJA INFORMATIVA DE LA PARCELA

1 NOMBRE Y DIRECCION DEL COOPERADOR: _____

2. LOCALIDAD DE LA PARCELA: DEPTO.: _____
DISTRITO: _____
LOCALIDAD: _____
ALTURA: _____
LATITUD: _____
LONGITUD: _____

3. HISTORIA DE LA PARCELA: _____

4 DESCRIPCION GENERAL DEL SUELO (arenoso, arcilloso, etc.):

5 CONDICION DE SEMILLA A LA SIEMBRA (Indicar los clones según condición de semilla o cualquier anormalidad observada
BUENA _____
REGULAR _____
POBRE _____

6 FECHA DE SIEMBRA: _____ FECHA DE COSECHA: _____

7 FERTILIZACION: FORMULACION: N _____ P _____ K _____
CANTIDAD: _____
APLICACION: A LA SIEMBRA: _____ AL APORQUE: _____

8 NUMERO DE QUISTES EN 100 g DE SUELO: ANTES _____ DESPUES _____

9 LABORES CULTURALES Y CONTROL DE PLAGAS:

FECHA	OPERACION	DOSIS	MODO DE APLICACION

Forma CIP Nº 142-N

Previous Page Blank

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP)

EVALUACION DE RESISTENCIA Y DESARROLLO EN EL CAMPO

Localidad: **Ejecutor:**

BLOQUE ó REPETICION	Parcela	CLON	Fechas / No. tub. sembrados	Fechas / No. de plantas emergidas	Fecha: / Vigor de planta	Tuberización	EVALUACION DE GLOBODERA 1	2	3	4	Reacción	Virus / Fechas	Observaciones

Forma CIP No. 144

VIGOR: Al momento de la evaluación de Globodera:
Escala 1 - 5:

1 = poco desarrollo, planta débil
5 = buen desarrollo, planta vigorosa

TUBERIZACION: Número/tamaño (N/T)

Número: Escala 1 - 3

1 = no hay tubérculos
2 = pocos tubérculos
3 = muchos tubérculos

Tamaño: Escala 1 - 3

1 = pequeños
2 = medianos
3 = grandes

EVALUACION DE GLOBODERA: Nematodo/raíces (N/R)

Nematodos: Escala:

0 = no hay hembras
+ = pocas hembras, difíciles de ver
++ = pocas hembras, fáciles de ver
+++ = muchas hembras en casi todas las raíces

Raíces: P = pobre
R = regular
B = buena

REACCION: R = Resistente (0)
PR = Parcialmente resistente (+)
S = Susceptible (++; +++)

VIRUS: Anotar el número de plantas eliminadas por mostrar síntomas de virus.

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP)

PARCELA DE MULTIPLICACION Y ADAPTACION

Localidad: Ejecutor:

BLOQUE o REPETICION

Surco o parcela	CLON	Fecha: /	/	/	Senescencia	Fecha / COSECHA			TUBERCULOS				Comentarios	Seleccionable
		No. tub. sembrados	No. de plantas emergidas	Vigor o tipo de planta		Peso comercial	Peso total	Por planta	Apariencia	Forma	Ojos	Color		

Forma CIP No. 145

VIGOR o TIPO DE PLANTA:	1 = planta débil 5 = planta vigorosa, tipo atractivo
SENESCENCIA:	P = precoz M = mediano T = tardía
APARIENCIA:	1 5; 1 = poco atractiva 5 = muy atractiva
FORMA:	Como redonda, oval, oblonga, larga, etc.
OJOS:	1 = superficiales 2 = semiprofundos 3 = profundos
COLOR:	Predominante y otros
COMENTARIOS:	Incidencia de plagas y enfermedades; eliminación de plantas (indicar el número), etc.
SELECCIONABLE:	Sí No