

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
Escuela de Ingeniería Agronómica

IDENTIFICACIÓN DE ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS RELACIONADOS
CON LA EXPRESIÓN DE RESISTENCIA DE LA PAPA (*Solanum
tuberosum*) PARA LAS POBLACIONES DE *Phytophthora infestans*
PREDOMINANTES EN TRES LOCALIDADES DE LA SIERRA
ECUATORIANA.

TESIS DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERA AGRÓNOMA

CRISTINA MARGARITA TELLO TORRES

QUITO - ECUADOR

2008



7. RESUMEN

El "Tizón tardío" causado por *Phytophthora infestans* es la principal enfermedad del cultivo de papa en el Ecuador. Puede ocasionar pérdidas de hasta el 100% dependiendo de la variedad y las condiciones ambientales (FRY *et al.*, 1993). El Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), mantiene un programa para el desarrollo variedades con resistencia a la enfermedad (ANDRADE, 1995). En los últimos años se han obtenido clones promisorios con diferentes niveles de resistencia, algunos de ellos presentan un comportamiento inconsistente, siendo resistentes en determinados sitios experimentales y susceptibles en otros, creando cierta incertidumbre en el momento de seleccionar genotipos superiores⁶; para lo cual en esta investigación se estudiaron algunos aspectos epidemiológicos relacionados con la expresión de resistencia de la papa (*Solanum tuberosum*) para las poblaciones de *Phytophthora infestans* predominantes en las provincias de Pichincha, Carchi y Cotopaxi en Ecuador, esto implicó cuantificar el efecto de la interferencia entre parcelas y su influencia en la expresión de resistencia horizontal de genotipos de papa, identificar si existen mezclas de razas con diferentes niveles de agresividad en las diferentes localidades donde el PNRT-papa evalúa sus materiales y determinar la influencia de posibles genes mayores (R) en la expresión de resistencia, en genotipos de papa del programa de mejoramiento del INIAP.

Para esta investigación se instalaron tres ensayos en campo, el primero se ubicó en la provincia de Pichincha, cantón Mejía, Estación Experimental Santa Catalina, donde se evaluó el efecto de interferencia entre parcelas; el segundo en la provincia de Carchi, cantón San Pedro de Huaca, Guananguicho y por último en la provincia de Cotopaxi, cantón Latacunga, Instituto Agropecuario Simón Rodríguez, en los cuales se colectaron los diferentes aislamientos de *Phytophthora infestans* para el estudio de las poblaciones del patógeno en los laboratorios del Centro Internacional de la Papa.

En el ensayo en campo para determinar el efecto de interferencia entre parcelas. Los factores en estudio fueron seis genotipos de papa (99-38-5, 98-11-6, 97-1-10 y las variedades I Frippa y Brenda), tres arreglos (genotipos resistentes entres susceptibles, susceptibles entre resistentes y al azar) y dos tamaños de parcela (dos y cuatro surcos). Se utilizó un diseño de parcela dos veces dividida con tres repeticiones. Las unidades experimentales fueron parcelas con superficies de 8.52 m² (3.6 m x 2.2 m) y 15.84 m² (3.6 m x 4.4 m) de dos surcos y cuatro surcos respectivamente. Cada bloque estuvo rodeado por cortinas de avena de 2 m de ancho para contrarrestar el efecto entre sub-parcelas. Se evaluaron variables de resistencia, mediante el cálculo del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) y de rendimiento de cada genotipo de papa.

⁶ Comunicación personal Ing. Agr. José Ochoa, Técnico DNPV - INIAP

Para evaluar la resistencia al "Tizón tardío" de los genotipos de papa, se realizaron lecturas semanales, determinando visualmente el porcentaje de infección y con los datos obtenidos se calculó el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (AUDPC); debido a que en este experimento se evaluó principalmente la resistencia de los clones al "Tizón tardío" se realizó una aplicación con fungicida sistémico cuando las plántulas presentaron una altura de 8 a 10 cm lo que permitió homogenizar el inóculo del "Tizón tardío" (*P. infestans*) sobre los genotipos de papa, así, estos tuvieron la misma oportunidad de ser evaluados. Para la variable de rendimiento, se registró el peso total de la producción de cada genotipo, obteniéndose el rendimiento en kg/parcela neta.

En la etapa de laboratorio, los factores en estudio fueron once clones diferenciales de papa (R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10 y R11), siete genotipos de papa (los mismos genotipos del primer experimento incluyendo la variedad I-Estela) y 90 aislamientos de *Phytophthora infestans* de cada localidad, en total 270 aislamientos. Se utilizó un diseño completamente al azar con cinco observaciones. La unidad experimental estuvo conformada por un folíolo de cada genotipo de papa. Los folíolos cortados fueron colocados en cajas Petri plásticas de aproximadamente 60 cm², que contenían un fondo de agar-agua al 10%. Las variables evaluadas fueron: para el análisis de la población del patógeno se determinó el porcentaje de incidencia de razas virulentas; mientras que, para el análisis de la resistencia se midió la eficacia de virulencia de los aislamientos en los genotipos de papa, el período de latencia, la intensidad de esporulación y el tamaño de lesión (CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA, 1997).

Para obtener el inóculo se recolectaron folíolos enfermos con "Tizón tardío" en parcelas ubicadas en las tres localidades con los mismos genotipos de papa mencionados, los cuales se lavaron con agua estéril y se incubaron por 24 horas para que se produzca la esporulación. La preparación y calibración del inóculo se realizó siguiendo las recomendaciones del protocolo de manejo de laboratorio para *P. infestans* del CIP. En cada folíolo se colocó una gota de inóculo de 10 µl de una suspensión de aproximadamente 20000 zoósporas por ml, a un lado de la nervadura principal, posteriormente se mantuvieron las cajas Petri en un cuarto frío (18 °C) con control artificial de 12 horas de luz y con una humedad relativa del 85%.

Para cada aislamiento se registró la reacción exhibida visualmente en los folíolos de los clones diferenciales de papa (con genes individuales para resistencia vertical a diferentes razas reconocidas del hongo). A los seis días de inoculados los folíolos, se evaluó la respuesta de compatibilidad: (+) si se presentaba una lesión acompañada de esporulación del hongo, (-) en ausencia de lesiones o (H) si se presentaba respuesta de hipersensibilidad, cuando se observaron puntos necróticos dentro de la gota del inóculo, obteniéndose así el porcentaje de incidencia de razas virulentas. De la misma manera se realizó las evaluaciones en los folíolos de los genotipos de papa inoculados para obtener la eficacia de virulencia en los mismos.

El análisis estadístico de la información permitió obtener los siguientes resultados, no existe interferencia entre parcelas para "Tizón tardío" en el cultivo de papa; las epidemias de las variedades en los dos arreglos evaluados presentaron tendencias similares, por lo que la evaluación de materiales adyacentes, una cerca de otra, no tiene efecto importante en la expresión de la resistencia y por lo tanto, no existen errores en las evaluaciones.

La severidad promedio de las variedades en la mezcla fue menor que en parcelas; en mezcla las variedades susceptibles presentaron un menor AUDPC; mientras que, las variedades resistentes tuvieron un AUDPC mayor. Adicionalmente, la severidad de las mezclas fue menor en parcelas grandes.

Aunque el tamaño de parcela tuvo un efecto importante en la epidemia de la enfermedad, no afectó la expresión de la resistencia de los materiales evaluados. La severidad de la enfermedad fue mayor en parcelas grandes, pero la secuencia de los materiales evaluados de acuerdo a su severidad fue similar, por lo que, la evaluación de la resistencia es confiable en los dos tamaños de parcela que el mejorador utiliza.

Las poblaciones heterogéneas en virulencias del patógeno, cuando los materiales presentan genes mayores y diferencias en agresividad del patógeno aparecen como las principales causas que afectan la expresión de la resistencia. Así los clones 97-1-10, 98-11-6, 99-38-5 y las variedades I-Fripapa y Brenda poseen genes mayores y al proteger de la infección de parte de la población del patógeno, permiten sobrestimar la resistencia cuantitativa de estas variedades.

Las poblaciones heterogéneas en virulencias sobreestiman la resistencia, especialmente al inicio del período de evaluación, por lo que, gran parte de los materiales seleccionados como resistentes, presentan niveles significativos de enfermedad en etapas tardías de evaluación.

Aparentemente, existen poblaciones más agresivas para ciertas fuentes de resistencia. Este es el caso de las poblaciones de *P. infestans* de Carchi que produjeron tamaños de lesión mucho mayores en el clon 97-1-10 que en Pichincha y Cotopaxi, por esta razón los niveles de AUDPC en este clon fueron mayores en Carchi.

Aparentemente, existe una interacción entre resistencia cuantitativa en la planta y agresividad en el patógeno. Este es el caso de los aislamientos en Carchi, que son más agresivos para 97-1-10 que los aislamientos de Pichincha.

Brenda en Cotopaxi presentó niveles de AUDPC bajos, similares a I-Estela; mientras que, en Pichincha los niveles de severidad fueron similares a Superchola, variedad susceptible. Esta inconsistencia se debió a que el gen mayor de Brenda en Cotopaxi protegió a gran parte de la población del patógeno; mientras que, en Pichincha protegió a una pequeña parte de la población.

El patógeno presenta una gran variabilidad en las tres provincias estudiadas. Así, se identificaron 39, 27 y 17 razas en las provincias de Pichincha, Carchi y Cotopaxi respectivamente, siendo solo una raza similar entre provincias.

La principal causa de las inconsistencias observadas en la selección y evaluación de material resistente en el programa de papa del INIAP están asociadas con la presencia de genes mayores en el germoplasma de papa, que se expone en los procesos de selección a una gran variabilidad genética del patógeno.

De conformidad con lo anterior se presenta las siguientes recomendaciones:

Tener presente en las evaluaciones de resistencia a *Phytophthora infestans* que la severidad de la enfermedad aumenta conforme es mayor el tamaño de la parcela, por lo que, es necesario realizar las evaluaciones para seleccionar genotipos con resistencia, en las parcelas de cuatro surcos, cuyos resultados pueden estar más cercanos a la realidad de un monocultivo.

Confirmar los resultados de interferencia entre parcelas en las diferentes localidades, puesto que, esta parte de la investigación solamente se realizó en la provincia de Pichincha, sería interesante verificar lo que sucede en otras localidades.

Utilizar la variedad I-Estela en los programas de cruzamientos del PNRT-papa, para la obtención de nuevas variedades resistentes, puesto que, en la presente investigación se descartó la presencia de genes mayores en dicha variedad.

SUMMARY

Late blight, caused by *Phytophthora infestans*, is the most important disease of potatoes in Ecuador. The pathogen is feared by farmers, it is ability to destroy entire fields of potatoes in a few weeks. The Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), has a program to obtain the resistant varieties to disease. In the last years, promissory clones have been obtained by different levels of resistance, some of them present a weird behavior, being resistant in some experimental spots and sensitive in others places, creating certain uncertainty in the moment to select top genotypes; for which in this investigation were studied some epidemiological aspects related to the expression of resistance of potato (*Solanum tuberosum*) for the predominant populations of *Phytophthora infestans* in the provinces of Pichincha, Carchi and Cotopaxi in Ecuador, for which it was necessary quantify the effect of the interplot interference and its influence in the expression of quantitative resistance to potato late blight, identify if exist mixtures of races with different levels of aggressiveness in the different localities where the Programa Nacional de Raíces y Tubérculos-Papa evaluates its materials and determine the influence of possible major genes (R) in the expression of resistance, in genotypes of potato belonging to the program of improvement of the INIAP.

This study consisted of two experiments. The first experiment in the field, established the effect of the interplot interference, it was located in the province of Pichincha - Mejía, Estación Experimental Santa Catalina; for the second experiment in laboratory, it was necessary to locate two assays more, they were localated in the province of Carchi - San Pedro of Huaca, Guananguicho and finally in the province of Cotopaxi - Latacunga, Instituto Agropecuario Simón Rodríguez, in which the different isolations of *Phytophthora infestans* were collected for the study of the populations of the pathogenic in the laboratories of the Centro Internacional de la Papa (CIP).

In the filed experiment to determine the effect of interplot interference, the factors in study were six genotypes of potato (99-38-5, 98-11-6, 97-1-10 and the varieties I-Fripapa and Brenda), three arrangements of genotypes (resistant genotypes between susceptible between resistant and at random) and two plot sizes (two and four rows). For this it was used a design of plot twice divided with three repetitions. The experimental units were plots of 8.52 m² (3.6 m x 2.2 m) and 15.84 m² (3.6 m x 4.4 m) of two rows and four rows respectively.

Every block was surrounded by curtains of oats of 2 m of wide to offset the effect between sub-plots. Parameters of resistance were evaluated; they were the area under the disease progress curve (AUDPC) and yield of every genotypes of potato.

To evaluate the resistance to the "Late blight" of the genotypes of potato, were recorded weekly, determining visually the percentage of infection and with the obtained information was calculated the area under the disease progress curve. For the variable of yield were recorded the total production's weight of every genotype in kg/plot net.

In the phase of laboratory about inoculations of *Phytophthora infestans*, the factors in study were eleven differential clones of potato (R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10 y R11), seven genotypes (the same genotypes of the first experiment including the variety I-Estela) and 90 isolations of *Phytophthora infestans* of every place, in total 270 isolations. It was used a design completely at random with five observations. The experimental unit was shaped by a foliolo of every genotype.

In the greenhouse the plants were placed on pots, the inoculated leaflets were placed on Petri dishes wuith agar-water 10%. The variables quantified for the laboratory test were: for the analysis of the population of the pathogenic, the percentage of incident virulent races; whereas, for the analysis of the resistance, the inoculum efficiency in the genotypes of potato, the latent period, sporulation intensity and lesion size.

Phytophthora infestans was isolated from single foliage lesions by natural infection in experimental plots in the Pichincha, Carchi and Cotopaxi provinces, and maintained on a modified rye agar médium. The oomycete was collected from the promissory clones 99-38-5, 98-11-6, 97-1-10 and from the varieties I-Fripapa, Superchola and Brenda. Sporangial suspensions were adjusted to 20 000 sporangia/ml of distilled, sterile water, with a hemacytometer. The detached leaflets were inoculated with 10 μ l of the suspensión. In the laboratory, the detached leaflets were incubated in Petri plates at 18 °C, 12 hours light of photoperiod and relative humidity close to 85%.

For every isolation there was registered the reaction exhibited visually in the detached leaflets of the differential clones of potato (with individual genes for qualitative resistance to different recognized races of the pathogen). To six days of inoculated the detached leaflets, the response of compatibility was evaluated: (+) if one was presenting an injury accompanied of esporulación of the pathogen, (-) in absence of injuries or (H) if one was presenting response of hypersensitivity, then it was obtained the percentage of incident of virulent races. Of the same way it was realized the evaluations in the detached leaflets of genotypes of potato inoculated to obtain the efficiency of virulence in the same ones.

From the statistical analisis done the following results were obtained:

Interplot interference does not exist for "Late blight" in the culture of potato; the epidemics of the varieties in both evaluated arrangements presented similar trends, for what the evaluation of adjacent materials, one near other one, does not have important effect in the expression of the resistance and therefore mistakes do not exist in the evaluations.

The average severity of the varieties in the mixture was minor that in plots; in it mixes the capable varieties they presented a minor AUDPC; whereas, the resistant varieties had a major AUDPC. Additional, the severity of the mixtures was minor in big plots.

Though plot sizes had an important effect in the epidemic of the disease, it did not affect the expression of the resistance of the evaluated materials. The severity of the disease was major in big plots, but the sequence of the materials evaluated from agreement to its severity was similar, for what, the evaluation of the resistance is reliable in both plot sizes that the mejorador uses.

The heterogeneous populations in virulences of the pathogenic one, when the materials present major genes and differences in aggressiveness of the pathogenic one appear as the principal reasons that affect the expression of the resistance. This way the clones 97-1-10, 98-11-6, 99-38-5 and the varieties I-Fripapa and Brenda possess major genes and they having protected of the infection on behalf of the population of the pathogenic one, allow to overestimate the quantitative resistance of these varieties.

The heterogeneous populations in virulences overestimate the resistance, specially to the beginning of the period of evaluation, for what, great report of the materials selected like resistant, they present significant levels of disease in late stages of evaluation.

Seemingly, more aggressive populations exist for certain sources of resistance. This one is the case of the populations of *P. infestans* of Carchi province, that produced very much major lesion size in the clon 97-1-10 that in Pichincha and Cotopaxi province, for this reason levels of AUDPC in this clon were major in Carchi province.

Seemingly, there is an interaction between quantitative resistance in the plant and aggressiveness in the pathogenic one. This one is the case of the isolations in Carchi province, that are more aggressive for 97-1-10 that the isolations of Pichincha province.

Brenda in Cotopaxi province presented levels of low AUDPC, similar to I-Estela; whereas, in Pichincha province the levels of severity were similar to Superchola, suceptible variety. This inconsistency owed to itself that Brenda's major gene in Cotopaxi protected to great part of the population of the pathogenic one; whereas, in Pichincha province it protected to a small part of the population.

The pathogenic one presents a great variability in three studied provinces. This way, 39, 27 and 17 races were identified in the provinces of Pichincha, Carchi and Cotopaxi respectively, being alone a similar race between provinces.

The principal reason of the inconsistencies observed in the selection and evaluation of resistant material in the potato's program of the INIAP are associated with the presence of major genes in the germoplasma of potato, which is exposed in the processes of selection to a great genetic variability of the pathogenic one.

Of conformity with the previous thing one presents the following recommendations:

To have present in the future evaluations of resistance to *Phytophthora infestans* that the severity of the disease increases as is major the plot size, for what, it is necessary to realize the evaluations to select genotypes with resistance, in the plots of four rows, which results can be closer to the reality of a monoculture.

To confirm the results of interplot interference in the different localities, because, this report of the investigation only was realized in the Pichincha province, would be interesting to check what happens in other localities.

One recommends to use the variety I-Estela in the programs of crossings of the PNRT-papa, for the obtaining of new resistant varieties, because, in the present investigation, there discarded the presence of major genes in the above mentioned variety.