



**Instituto Nacional Autónomo de
Investigaciones Agropecuarias**

Fecha de Presentación: Diciembre – 2013

Estación Experimental: Santa Catalina

Programa / Departamento: Programa Nacional de Raíces y Tubérculos rubro papa (PNRT – papa).

Proyecto: Fortalecimiento de la Investigación y la producción de papa, para la seguridad alimentaria de las familias de la Sierra Ecuatoriana.

Título: Estudio de los componentes genéticos de la resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) (Mont.) de Bary en papa (*Solanum sp.*).

Ubicación: Provincia: Pichincha
Cantón: Mejía
Parroquia: Cutuglahua

Autor: Pablo Andrés Jaramillo Arias

Coautor (es): Xavier Cuesta
Jorge Rivadeneira

Colaboradores: Centro Internacional de la Papa (CIP)
Cristina Tello Departamento de Protección Vegetal (DNPV)

Fecha de inicio: Diciembre – 2013

Fecha de terminación: Septiembre – 2014

Fuente(s) de Financiamiento:

FUENTE	MONTO USD	PORCENTAJE
Fortalecimiento	8689,91	84 %
INIAP	620,71	6 %
TESISTA	1034,51	10 %

Presupuesto: Total \$ 10345,13

1. ANTECEDENTES

La papa, es uno de los cultivos alimenticios más importantes difundidos a nivel mundial, en producción de proteína por unidad de tiempo, superficie y en la obtención de energía, es superior al resto de los cultivos (Estrada, 2000). En cuanto a producción e importancia alimenticia, la papa ocupa el cuarto lugar, después del arroz, trigo y maíz, con una producción mundial de 368 millones de toneladas anuales (FAO, 2013). La papa es un alimento básico, tiene muchas cualidades y es una planta eficiente para proporcionar alimento nutritivo, por lo cual debe ser aprovechada para contribuir a solucionar el hambre; quienes se dedican a mejorar el cultivo tienen un gran desafío y una excitante oportunidad (Niederhauser, 1993). Según Devaux *et al.*, (2010), en el Ecuador, un total del 0.4% del territorio de uso agropecuario se dedica a la producción de papa. Con un área cosechada 34 317 hectáreas y un rendimiento promedio de 8.3 toneladas por hectárea (FAO, 2013).

El tizón tardío causado por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary es la enfermedad más importante y la de mayor riesgo de la papa. Este patógeno evolucionó en el centro de México y se ha difundido por todas las áreas paperas de América del Norte y del Sur, Europa, Asia y África, causando la destrucción o quemazón del follaje del cultivo (Estrada, 2000). Un cultivo de papa sin protección puede ser destruido en una semana o menos, por esta razón y la continua aparición de nuevas razas de *Phytophthora infestans* que han superado la resistencia de la mayoría de variedades en uso en el país, es necesaria la búsqueda permanente de la resistencia genética (Cuesta, 2002).

El éxito del fitomejoramiento depende básicamente de escoger los progenitores apropiados de manera que el cruzamiento origine individuos con las características deseadas. Los progenitores seleccionados deben poseer una buena aptitud combinatoria general para el carácter o caracteres que se buscan debido a que existen factores que dificultan la transmisión de éstos como: la complejidad de la herencia tetrasómica de la papa cultivada, la naturaleza poligénica de la resistencia al tizón tardío y el efecto del ambiente en la expresión de la enfermedad (Huarte, 1999).

Garófalo (2005) evaluó la aptitud combinatoria general y específica en 21 progenies de papa *Solanum phureja* eligiendo aquellas con resistencia a "Tizón tardío" y seleccionó los mejores progenitores diploides basado en valores altos de la ACG y ACE las cuales se incluyen en el esquema de mejoramiento genético del PNRT-papa. La aptitud combinatoria es el método utilizado para: escoger los mejores progenitores, dependiendo del comportamiento de los cruzamientos en los que participan para promover combinaciones híbridas. La aptitud combinatoria se divide en dos categorías: general y específica (Ramanna & Jacobsen, 1999). El término aptitud combinatoria general (ACG) se emplea para designar el comportamiento de una progenie en combinaciones híbridas y se asocia principalmente con la acción génica aditiva; mientras que la aptitud combinatoria específica (ACE) se emplea para designar aquellos casos en los cuales ciertas combinaciones lo hacen relativamente mejor en base del comportamiento promedio de las líneas involucradas y se asocia principalmente con los efectos genéticos que implican la dominancia (Sprague & Tatum, 1942). La aptitud combinatoria, usada para evaluar el

potencial de los padres en la producción de familias resistentes al tizón, provee de una base para seleccionar progenitores que puedan ser usados en un programa de mejoramiento (Tai & Hodgson, 1975).

Griffing (1956), propuso una técnica dialéctica para la determinación de la capacidad de combinación de líneas y caracterizar la naturaleza de la extensión de la acción de genes en plantas. Para realizar los cruzamientos dialécticos, Griffing distingue cuatro diferentes técnicas, las cuales varían dependiendo de que se realicen o no las autofecundaciones o las cruzas recíprocas de la F1. En las técnicas 2 y 4 no se consideran efectos maternos, es decir que es indiferente emplear un progenitor ya sea como masculino o femenino; en cambio las técnicas 1 y 3, cuando se sospecha la existencia de efectos maternos se realizan las cruzas recíprocas de la F1 (Henfling, 1987; Martínez, 1988). En esta investigación se utilizará el método 2 según la fórmula $p(p+1)/2$ donde intervienen los progenitores (p) y las cruzas directas. Este método es utilizado cuando el mejorador pretende sintetizar una nueva variedad y determinar las autofecundaciones que se produce en las combinaciones híbridas (Vinod *et al.*, 2005; Ruiz de Galarreta *et al.*, 2005)

La búsqueda de la resistencia genética al tizón tardío en germoplasma cultivado de papa y en sus parientes silvestres, se ha intensificado ya que es uno de los mejores métodos para combatir a la enfermedad, debido a esto, a lo largo del tiempo se han desarrollado cientos de investigaciones para desarrollar germoplasma con resistencia genética a *P. infestans*. Para ello se han desarrollado metodologías para evaluar en laboratorio la resistencia a este oomicete, de tal manera que se puedan superar algunas dificultades que se presentan en las pruebas de campo (Singh & Birhman, 1994).

Además Vleeshouwers *et al.*, (1999) compararon pruebas de campo y de laboratorio para evaluar resistencia a *P. infestans* en papa y encontraron que las evaluaciones en laboratorio son una buena alternativa para identificar genotipos con resistencia a la enfermedad. En estudios de laboratorio se ha demostrado que los componentes de resistencia como el tamaño de lesión (TL), periodo de latencia (PL) e intensidad de esporulación (IE), pueden brindar información valiosa sobre la resistencia genética de los genotipos evaluados (Colon *et al.*, 1995; Parlevliet, 1997; Gabriel *et al.*, 2007) y pueden ser utilizados como parámetros de selección de progenitores.

En base a estos antecedentes el Programa Nacional de Raíces y Tubérculos rubro – papa (PNRT-papa), plantea estudiar los componentes genéticos involucrados en la resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en progenitores diploides de papa previamente seleccionados (Cuesta, 2013), para elegir genotipos que presenten mejor respuesta a la resistencia al tizón tardío basados en la ACG y ACE y utilizarlos en el programa de mejoramiento para el desarrollo de variedades con resistencia a esta enfermedad.

2. JUSTIFICACIÓN

Los incrementos de agresividad de *P. infestans* han provocado una extensiva búsqueda de medidas de control. El control químico de la enfermedad tiene efectos negativos en la rentabilidad del cultivo, afecta el ambiente y la salud de los agricultores. Sin embargo, hasta el presente, es una de las estrategias más utilizadas. Por ello el mejoramiento genético constituye la más apropiada alternativa para mejorar la resistencia al tizón tardío causado por *Phytophthora infestans*, puesto que el patógeno evoluciona permanentemente hacia poblaciones más agresivas que pueden vencer la resistencia genética y crear resistencia a los productos químicos. El logro de este mejoramiento depende básicamente de realizar una selección exigente de los progenitores, en base a esto a través de investigaciones previas se han identificado a varias papas nativas que pueden ser utilizados como padres que ostentan las mejores características para resistencia al tizón tardío, pulpa color amarillo, buen sabor y forma redonda del tubérculo.

En base a lo mencionado y dada la importancia de esta enfermedad, es necesario desarrollar una alternativa de control al ataque del tizón tardío, que ayude a disminuir el uso de fungicidas. Para lo cual es necesario desarrollar germoplasma de papa con resistencia al tizón tardío combinando progenitores con estas características. Para ello se requiere tener información de los componentes genéticos de la resistencia, para identificar las mejores combinaciones híbridas y de esta forma incrementar la frecuencia alélica de los genes de resistencia en las progenies.

3. OBJETIVOS

3.1 General

- Evaluar los componentes genéticos de la resistencia al tizón tardío en germoplasma diploide de papa pertenecientes a la colección de trabajo del PNRT-papa (aptitud combinatoria general y específica).

3.2 Específicos

- Evaluar los componentes de la resistencia a *Phytophthora infestans* en las progenies de la primera generación (F1) provenientes de cruzamientos dialélicos entre 5 progenitores.
- Evaluar los efectos de ACG y ACE en la expresión de la resistencia al tizón tardío en cruzamientos dialélicos provenientes de 5 progenitores.
- Seleccionar progenitores basados en los valores de ACG y ACE para incluirlos en el esquema de mejoramiento genético del PNRT- papa.

4. HIPOTESIS

4.1 Hipótesis nula

No hay efectos de los componentes genéticos de la resistencia al Tizón Tardío entre pruebas de aptitud combinatoria general y específica sobre la resistencia al Tizón Tardío en los cruzamientos y progenies obtenidas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales de invernadero

- Alcohol
- Atomizador
- Bandejas de germinación plásticas
- Botellas de vidrio
- Cajas petri plásticas
- Cápsulas de gelatina
- Estiletes
- Vibrador
- Macetas plásticas
- Mallas plásticas
- Pinzas de polinizar
- Portaobjetos
- Silicagel
- Sustrato estéril
- Tutores

5.2 Materiales y equipos de oficina

- Computadora
- Hojas de impresión
- Libro de campo
- Cámara fotográfica
- Calculadora

5.3 Materiales de Laboratorio

- Agua destilada estéril
- Alcohol
- Agar – agar
- Balanza de precisión
- Filtros de 20 micras
- Vasos de precipitación (600ml)
- Cajas petri de vidrio
- Cajas petri plásticas
- Cajas plásticas con tapa
- Marcador permanente
- Microscopio
- Parafilm
- Papel aluminio
- Micropipeta automática
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Mechero de Bunsen
- Papel toalla
- Fundas plásticas
- Piseta

5.4 Características del sitio experimental

Las características del sitio experimental se describen en el Cuadro 1.

5.4.1 Ubicación

Cuadro 1. Ubicación y características del sitio experimental para el estudio de los componentes genéticos de la resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) (Mont.) de Bary en papa (*Solanum sp.*). Cutuglahua, Pichincha. 2013

UBICACIÓN	DESCRIPCIÓN
Provincia	Pichincha
Cantón	Mejía
Parroquia	Cutuglahua
Altitud	3058 msnm
Longitud	78°33' O
Latitud	00°22' S
Temperatura promedio/día	15.8 ° C
Temperatura máxima promedio/día	22.6 ° C
Temperatura mínima promedio/día	6.8 ° C
Humedad relativa promedio/día	76.3 %
Precipitación promedio/año	1 432 mm/año

Fuente: Estación Meteorológica Izobamba, ubicada en la EESC-INIAP, 2012

5.4.2 Características de temperatura y humedad del invernadero

Las características de temperatura y humedad se registrarán durante el desarrollo de la investigación, sin embargo las condiciones ambientales utilizadas como referencia del invernadero del INIAP donde se ubicará el ensayo son las siguientes Cuadro 2:

Cuadro 2. Características ambientales referenciales del invernadero para el estudio de los componentes genéticos de la resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) (Mont.) de Bary en papa (*Solanum sp.*). Cutuglahua, Pichincha. 2013

CARACTERÍSTICAS AMBIENTALES	DESCRIPCIÓN
Temperatura máxima promedio	28.0 ° C
Temperatura mínima promedio	7.0 ° C
Humedad relativa	70-90 %

Fuente: PNRT- Papa, 2012.

5.5 Factores en Estudio

5.5.1 Cruzamientos entre los progenitores seleccionados.

5.5.2 Progenies de papa.

5.6 Tratamientos

Los tratamientos serán quince cruzamientos provenientes de la combinación de los 5 progenitores según la fórmula $p(p+1)/2$ inmersos en un diseño Dialélico II de Griffing que considera a los progenitores (p) y las cruza directas (Griffing, 1956). Según se describe en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Esquema de cruzamientos entre cinco progenitores seleccionados

Progenitores		MASCULINO				
	X	p1	p2	p3	p4	p5
FEMENINO	p1	p1p1	p1p2	p1p3	p1p4	p1p5
	p2		p2p2	p2p3	p2p4	p2p5
	p3			p3p3	p3p4	p3p5
	p4				p4p4	p4p5
	p5					p5p5

Cuadro 4. Progenitores seleccionados para el estudio de los componentes genéticos de la resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) (Mont.) de Bary en papa (*Solanum sp*).

PROGENITORES	INTERPRETACIÓN
P1	Chaucha amarilla
P2	Chaucha roja
P3	Yema de huevo
P4	555*
P5	G 114*

*Clones diploides pertenecientes al Programa de Mejoramiento del INIAP (PNRT – papa)

Testigos referenciales para inoculaciones con *P. infestans*

t₁= CIP – Libertad (Resistente)

t₂= Uvilla (Susceptible)

5.6.1 Unidad Experimental

La unidad experimental estará conformada por un folíolo de cada progenie de papa.

5.7 Análisis Estadístico

5.7.1 Diseño Genético

Diseño dialélico, según el Modelo 1 Método 2 de Griffing (Martínez, 1975; Griffing, 1956), inmerso en un Diseño de Bloques Completos al Azar con cuatro repeticiones, cada repetición será representada por un folíolo que se lo ubicará en cámara húmeda según lo describe (Mosquera, 2007).

Cuadro 5. Esquema del análisis de la varianza según el Método 2 de Griffing, inmerso en un Diseño de Bloques Completos al Azar.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	
Total	$[rp(2q+p-1)/2] - 1$	59
Repeticiones	$r - 1$	3
Cruzas	$[p(p+1)/2] - 1$	14
ACG	$p - 1$	4
ACE	$\frac{p(p - 1)}{2}$	10
Error	Diferencia	42

5.7.2 Análisis Funcional

Se realizará la prueba de Tukey al 5% para cruzas y en las variables que se detecte significancia estadística. Se establecerá el grado de relación que exista entre los componentes de resistencia a través del Coeficiente de Correlación de Pearson al 5%. Además de ello se determinarán las estimaciones de los efectos para la aptitud combinatoria general y específica.

El análisis estadístico para las variables a evaluarse, se realizará con el paquete estadístico SAS.

5.8 Variables y métodos de evaluación

5.8.1 Periodo de Latencia (PL)

En esta variable, se contabilizará el número de días transcurridos desde la inoculación hasta el apareamiento de los signos (esporulación); para esto se realizarán observaciones diarias por la mañana y en la tarde (Pazmiño, 2008).

5.8.2 Tamaño de Lesión (TL)

En esta variable, por la mañana se tomará una fotografía de cada folíolo al séptimo día de la inoculación. Luego mediante el programa Image J, se calculará el área en mm² de cada lesión (Tello, 2008).

5.8.3 Intensidad de esporulación (IE)

En esta variable por la mañana se evaluará mediante estimaciones visuales la cantidad de esporulación, con una escala aleatoria en la cual 0 = ausencia de esporulación. 1 = esporulación baja, 2 = esporulación media y 3 = abundante esporulación (Pérez *et al.*, 2001)

5.9 Selección de progenitores

Los progenitores serán seleccionados en base a la estimación de los efectos de la ACG, siendo estos que presenten valores absolutos altos en la ACG para periodo de latencia y valores menores para tamaño de lesión y porcentaje de esporulación comparados con el testigo susceptible Uvilla.

6. MÉTODOS ESPECÍFICOS DE MANEJO DEL EXPERIMENTO

6.1 Sistema de siembra y manejo de progenitores

La siembra de los progenitores se lo realizará a través de dos sistemas: siembra en macetas pequeñas y el método de la botella.

6.1.1 Sistema de siembra en macetas

Las plantas escogidas como progenitores se establecerán en el invernadero de cruzamientos del PNRT- papa, estos progenitores se sembrarán en macetas de 15 cm de diámetro con una capacidad de un kilogramo de sustrato, donde se desarrollarán por un periodo aproximado de 15 días o hasta que alcancen una altura aproximada de 15 cm. Posteriormente se removerán las plantas de las macetas permitiendo que estas permanezcan con su sustrato, la planta será colocada sobre macetas de 25 cm de diámetro con una capacidad de siete kilogramos de sustrato, y serán sujetadas a un tutor, luego se procederá a remover con agua corriente el sustrato que cubre al tubérculo madre dejando expuestas las raíces y los estolones los que deberán retirarse conformen desarrollen cortándoles cuidadosamente con un bisturí debidamente desinfectado. Este sistema de siembra favorecerá la translocación de los carbohidratos hacia las bayas (Malagamba & Cabello, 1996).

Debido a posibles diferencias en la época y duración de la floración de los genotipos de papa, en el invernadero se sembrarán cada quince días, 10 macetas por cada progenitor con sustrato estéril (40% tierra, 40% humus y 20% pomina).

6.1.2 Método de la botella

Se cortarán del campo ramas de 30 a 40 cm de largo que tengan inflorescencias con 3-4 botones grandes y cerrados. Estas ramas se colocarán en botellas las cuales contendrán agua potable, 2 gotas de cloro y 2 ml de fertilizante foliar, el agua deberá ser cambiada cada semana. De esta forma se obtendrá una mayor cantidad de flores.

6.2 Inducción a la floración

El uso de luz adicional es el tratamiento más efectivo para aumentar la floración en la planta de papa. Casi todos los parentales responden con mayor floración al tratamiento de luz adicional, especialmente a la interrupción nocturna más que a la prolongación del día.

La interrupción nocturna que ha dado mejores resultados en zonas de días cortos es por tres horas (de 1 a 4am) usando focos incandescentes de 100W o lámparas Philips LR de 18 W por un periodo de tres semanas, comenzando dos semanas después del trasplante a las macetas grandes. Los focos o lámparas se colocan sobre las hileras a 2.5 m y a 1.8 m sobre el suelo (la distancia entre hileras es de 1.5 m) (Malagamba & Cabello, 1996).

El propósito es inducir a que la planta permanezca en la fase de floración el mayor tiempo posible y que no cambie a la fase de tuberización y senescencia (Estrada, 2000)

6.3 Recolección de flores masculinas, extracción y almacenamiento de polen

La recolección debe hacerse en la mañana antes de las 10 am asegurando el óptimo estado de las flores y permita un mayor rendimiento de polen. Este estado se logra cosechando las flores en las mañanas, antes de la visita de los insectos. Una vez recolectadas las flores, se doblan los pétalos y se separa el pistilo. Se dejan secar por 24 horas y luego se extrae el polen con la ayuda de un vibrador. El polen se recolectará en capsulas de gelatina y se almacenarán en pequeños recipientes oscuros con silica gel bajo condiciones de refrigeración a 5 °C (Malagamba & Cabello, 1996).

6.4 Determinación de la viabilidad de los granos de polen

Para determinar la viabilidad del polen se utilizará el método de la tinción de polen con aceto carmín (Estrada, 2000). En laboratorio se preparará tres placas portaobjetos por cada progenitor, en las cuales se colocará una pequeña muestra de polen proveniente de las cápsulas de gelatina. Posteriormente se colocará 2 a 3 gotas de la solución de aceto carmín, se identificará las placas y se las dejará reposar por 24 horas y luego se observará al microscopio óptico con lente 10X el porcentaje de viabilidad se determinará teniendo en

cuenta el número de granos viables (rosados y bien formados) en relación con los granos totales encontrados en cada campo óptico del microscopio (Garófalo, 2005)

6.5 Cruzamientos en invernadero

Por el sistema de siembra en macetas pequeñas y el método de la botella, una vez que los progenitores se encuentren en la etapa de floración, se eliminarán las flores abiertas y botones inmaduros, procediendo a la emasculación, que consiste en la remoción de los órganos masculinos, anteras, de la flor de la planta que se utilizará como hembra. Posteriormente se realizará la polinización.

Los cruzamientos se realizarán con polen fresco, que se recolectará con anterioridad y se lo mantendrá en refrigeración (4 - 5 °C) hasta utilizarlo. La polinización se realizará por la mañana antes de las 10 am a una temperatura de 12 °C y si los días son calurosos es posible hacerlos al final de la tarde. Una vez realizado el cruzamiento, se colocará una etiqueta con los nombres de los progenitores, la fecha de emasculación, fecha de polinización, número de flores cruzadas, la hora que se realizó el cruzamiento y el nombre de la persona que realizó el cruzamiento (Brown *et al.*, 1984).

6.6 Formación de bayas

Después de la polinización con un posterior desarrollo de la baya, los cuales serán cosechados cerca de 30 – 45 días dependiendo de la especie. Los frutos serán protegidos durante su desarrollo con una malla plástica para evitar la caída de las bayas al suelo.

Después de la cosecha, (25-40 días), se colocarán en bolsas de papel hasta su maduración a temperatura ambiente, esperando hasta que se tornen suaves lo cual permite que el proceso de extracción sea más fácil, la extracción se realizará en un recipiente con agua donde son separadas las semillas de las otras partes del fruto. Las semillas viables tienden irse hacia el fondo, mientras las semillas llamadas vanas flotan. Se filtrará la semilla en un papel toalla y se le secará a la sombra por uno a dos días (Orillo & Bonierbale, 2009)

6.7 Empaque y almacenamiento de semilla sexual

Las semillas viables de cada cruzamiento se almacenarán en sobres pequeños de papel laminado de aluminio, que finalmente se sellarán con la identificación del cruzamiento y la cantidad aproximada de semilla. En estas condiciones se puede conservar la semilla en refrigeración a 5°C hasta que termine su dormancia (Malagamba & Cabello, 1996).

6.8 Tratamiento pre siembra de la semilla sexual

Se desinfectará 150 semillas sexuales de cada cruzamiento sumergiéndolas en una solución de agua con cloro al 5% durante un minuto y luego se lavará con abundante agua destilada. Para romper el período de reposo y uniformizar la germinación, se sumergirán

las semillas en una solución de ácido giberélico a 1500 ppm durante 24 horas (1.5 g de ácido giberélico por litro de agua) (Wissar, 1983).

6.9 Siembra de semilla sexual en invernadero

Se sembrará la semilla sexual de cada cruzamiento en bandejas plásticas con sustrato de turba. En cada bandeja se sembrará 150 semillas sexuales a una profundidad de un centímetro, y se regará dos veces al día (mañana y tarde) con atomizador.

A los 21 días cuando las plántulas alcancen una altura de cinco centímetros y presenten tres hojas verdaderas, se trasplantarán a vasos plásticos con tierra esterilizada. Se regará todos los días y se fertilizará dos veces por semana.

6.10 Protocolo de aislamiento de *Phytophthora infestans*

6.10.1 Aislamiento de *P. infestans*

La raza de *P. infestans* que se empleará es una raza compleja con el aislamiento IC10.5 de la colección de *P. infestans* del Centro Internacional de la Papa, registrado como poseedor de los 11 genes de avirulencia.

6.10.2 Activación y multiplicación del inóculo

Para la activación y multiplicación del inóculo se realizará una infección en folíolos de la variedad Uvilla (susceptible); estos folíolos se mantendrán en cajas plásticas con alta humedad relativa interior con el fin de inducir el crecimiento de micelio.

6.10.3 Preparación del inóculo

Para la obtención de esporangios los folíolos con el oomicete crecido y esporulado, serán lavados en un chorro de agua esterilizada. La suspensión luego se la pasa a través de un filtro 20µm para eliminar impurezas. El inóculo se preparará a una concentración de 25 000 esporangios/mL.

6.10.4 Inoculación de folíolos

En laboratorio se realizarán pruebas de folíolos desprendidos, utilizando como inóculo una raza compleja de *P. infestans*.

En plantas de 6 a 8 semanas de edad se tomarán folíolos completamente desarrollados del tercio superior de la planta. Posteriormente, los folíolos serán colocados con el envés hacia arriba en cajas petri plásticas previamente preparadas sobre una malla plástica para evitar el contacto directo del folíolo con el agar – agua al 10% que será utilizado para conservar humedad dentro de la caja.

Cada folíolo será inoculado con 25µL de suspensión de esporangios, a una concentración de 25 000 esporangios/mL, en el centro del folíolo junto a la nervadura central; para cada genotipo de papa se utilizarán cuatro folíolos (4 repeticiones)

Para verificar la confiabilidad del inóculo de la raza compleja de *P. infestans* se utilizarán dos testigos: el clon CIP-Libertad, resistente a *P. infestans* y la variedad Uvilla, susceptible.

6.10.5 Incubación

Las cajas con los folíolos inoculados se ubicarán al azar formando los bloques (ANEXO 1) en un cuarto de incubación a 18°C y con una fotoperiodo de 14 horas luz (CIP, 1997).

7. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES	MESES												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Revisión de literatura	■	■	■	■						■	■	■	■
Elaboración y aprobación del proyecto	■	■											
Adquisición de insumos y materiales		■	■										
Implementación y manejo del ensayo			■	■	■	■	■	■	■	■			
Toma de datos			■	■	■	■	■	■	■	■	■		
Visita de tesis						■							
Análisis y tabulación de datos								■	■	■	■	■	
Interpretación de resultados											■	■	
Elaboración del documento final								■	■	■	■	■	
Entrega y defensa de tesis													■

8. PRESUPUESTO

Cuadro 6. Presupuesto para el estudio de componentes genéticos de la resistencia a tizón tardío (*Phytophthora infestans*) (Mont.) de Bary en papa (*Solanum sp*).

RUBROS	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO \$	TOTAL
MATERIALES DE INVERNADERO				
Alcohol	galón	5,00	11,87	59,35
Atomizador	1	1,00	3,50	3,50
Bandejas de germinación plásticas	1	10,00	15,50	155,00
Botellas de vidrio	1	50,00	1,25	62,50
Cápsulas	1	50,00	0,25	12,50
Focos	foco	6,00	4,00	24,00
Estiletes	1	2,00	2,25	4,50
Macetas plásticas	1	50,00	3,00	150,00
Macetas plásticas	1	60,00	1,05	63,00
Pinzas de polinizar	1	2,00	2,50	5,00
Portaobjetos	caja	1,00	4,15	4,15
Silicagel	560 g	1,00	35,00	35,00
Sustrato estéril	1	20,00	6,00	120,00
Turba BM2	33 kg	4,00	53,00	212,00
Tutores	1	50,00	1,00	50,00
Vasos de 12 onzas	paquete	300,00	0,01	4,20
Vibrador	1	1,00	10,00	10,00
Subtotal				974,70
MATERIALES DE LABORATORIO				
Agua destilada estéril	galón	1,00	2,24	2,24
Alcohol	galón	5,00	11,87	59,35
Agar – agar	50 g	3,00	20,16	60,48
Balanza de precisión	1	1,00	150,00	150,00
Fundas plasticas	rollo	1,00	2,50	2,50
Filtros de 12 y 20 micras	pliego	2,00	1,50	3,00
Vasos de precipitación de (600 ml)	caja	5,00	6,50	32,50
Cajas petri plásticas	caja	150,00	0,20	30,00
Cajas petri de vidrio	caja	20,00	1,50	30,00
Cajas plasticas con tapa	caja	1,50	5,00	7,50
Parafilm	rollo	4,00	7,80	31,20
Papel aluminio	rollo	4,00	17,90	71,60
Pipeta	1	1,00	1,93	1,93

Marcador permanente	marcador	4,00	1,20	4,80
Micropipeta automática	1	1,00	184,35	184,35
Tubos de Ensayo	tubo	20,00	0,80	16,00
Gradilla	1	1,00	13,80	13,80
Mechero de Bunsen	1	1,00	32,50	32,50
Papel toalla	rollo	10,00	4,25	42,50
Subtotal				776,25
INSUMOS				
Fertilizantes				
Ferti-siembra	45 kg	0,50	32,50	16,25
Úrea	45 kg	0,50	30,00	15,00
Subtotal				31,25
MATERIALES DE OFICINA				
Papel bond	Resma	3,00	4,50	13,50
Libreta de apuntes	Unidad	3,00	0,60	1,80
Carpetas	Docena	1,00	2,40	2,40
Impresiones	Hojas	300,00	0,25	75,00
Anillados	Unidad	5,00	2,50	12,50
Empastado	Unidad	5,00	25,00	125,00
Subtotal				230,20
OTROS				
Análisis de sustrato	Muestra	1,00	22,00	22,00
Aranceles Facultad	Trámite tesis	1,00	500,00	500,00
Visita de Tesis	Visita	1,00	20,00	20,00
Beca tesista	Mensual	10,00	729,81	7298,10
Subtotal				7840,10
TOTAL				9852,50
IMPREVISTOS				
Imprevistos (5 %)				492,63
TOTAL				10345,13

8.1 Fuentes de Financiamiento

En base al costo total, las fuentes de financiamiento y el aporte correspondiente a cada una de ellas, son las siguientes:

Fuente	Monto (USD)	Porcentaje
Fortalecimiento	8689,91	84%
INIAP	620,71	6%
Tesista	1034,51	10%
Total	10345,13	100%

9. BIBLIOGRAFÍA

BROWN, C., IWANAGA, M., & WISSAR, R. (1984). Técnicas de cruzamiento. En Manual sobre manejo de germoplasma de la papa. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima. PE. p 1 -21

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP). (1997). Laboratory Manual for *Phytophthora infestans* work at International Potato Center. Lima, PE. CIP. 37 p.

COLON, L.T., TURKENSTEEN, L.J., PRUMMEL, W., BUDDING, D.J. & HOOGENDOORN, J. (1995). Durable resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in old potato cultivars. Eur J Plant Pathol 101 : 387-397.

CUESTA, X. (2013). Potato quality traits: variation and genetics in Ecuadorian potato landraces. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, NL 197 pp.

CUESTA, X. (2002). Botánica y Mejoramiento Genético. En PUMISACHO, M. Y SHERWOOD, S. (eds). El Cultivo de la papa en Ecuador, INIAP y CIP, Quito, Ecuador. 33-42 p.

DEVAUX, A., ORDINOLA, M., HIBON, A., & FLORES, R. (2010) El sector papa en la región andina: Diagnóstico y elementos para una visión estratégica (Bolivia, Ecuador y Perú). Centro Internacional de la Papa (CIP).

ESTRADA, N. (2000). La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. La Paz: Plural editores. 17-33

FAO. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). (2013). Datos preliminares correspondientes al año 2012. Consultado el 15 de noviembre del 2013. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/S>

FAO. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). (2013). Datos preliminares correspondientes al año 2012. Consultado el 31 de Octubre del 2013. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/S>

GABRIEL, J., COCA, A., PLATA, G., & PARLEVLIET, J.E. (2007) Characterization of the resistance to *Phytophthora infestans* in local potato cultivars in Bolivia. Euphytica 153 (3):321 - 328

GARÓFALO, J. (2005). Evaluación de la aptitud combinatoria general y específica en 21 Progenies de papa *Solanum phureja* para resistencia a "Tizón tardío" (*Phytophthora infestans*). Quito Pichincha. Tesis Ing. Agr. Quito, EC. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. 123 p.

GRIFFING, B. (1956). A generalized treatment of the use of diallel crosses in quantitative inheritance. *Heredity* 10: 31-50

HENFLING, J. (1987). El Tizón tardío de la papa *Phytophthora infestans*. Lima: CIP. Boletín de información técnica N°. 425 p.

HUARTE, M. (1999). Host durable resistance to late blight: some experiences under long days un Argentina In Late blight: a threat to global food security. vol.1, Proceedings of the Global Initiative on Late Blight (GILB) conference (16-19 marzo, 1999, Quito) p 37.

MALAGAMBA, P. & CABELLO, R. (1996) Producción de semilla sexual de papa en: Manual de producción con semilla sexual. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima. Fasc. 2.1. 10 p.

MARTÍNEZ, A. (1988). Diseños Experimentales. Métodos y Elementos de Teoría. Ed. Trillas. México, D.F., México.

MARTÍNEZ G., A. (1975). Diseño y análisis de los experimentos de cruza dialélicas. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 228 pp.

MOSQUERA, T. (2007). Análisis Genético y Molecular de la Resistencia Cuantitativa a Tizón Tardío (*Phytophthora infestans*) en *Solanum phureja*. Bogotá. Tesis Doctorado en Ciencias Agropecuarias. Bogotá, CO. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Escuela de Posgrados. 181 p.

NIEDERHAUSER, S. J. (1993). International Cooperation and the role of the potato in feeding the world. *Am. Potato J.* 70:385-403

NIKS, R. E. & LINDHOUT, W. H. (1999) Mejoramiento para resistencia contra enfermedades y plagas. Quito, EC. PREDUZA. p 35 – 120

ORILLO, M. & BONIERBALE M., (2009) Biología reproductiva y citogenética de la papa – Manual Técnico. Centro Internacional de la Papa (CIP) 22 pp.

RAMANNA, M., & JACOBSEN, E. (1999). Introduction to plant breeding and genetic variation. Wageningen University. 22-51p.

RUIZ DE GALARRETA, J.I., EZPELETA. B., PASCUALENA, J. & RITTER, E. (2005). Combining ability and correlations for yield components in early generations of potato breeding. NEIKER – Basque Institute for Agricultural Research. Plant Breeding 125, 183-186.

PARLEVLLET, J.E. (1997). Selección de componetes de resistencia parcial. En: Resistencia Duradera en Cultivos Altos de la zona Andina. Quito, Ecuador. 238-259p.

PAZMIÑO, J.E. (2008). Comportamiento de la sección Lasiocarpa del género *Solanum* a la patogenicidad de *Phytophthora infestans* en Ecuador. Quito Pichincha. Tesis Ing. Agr. Quito, EC. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas.

PÉREZ, W., SALAS, A., RAY MINDO, R., HUAMAN, Z., NELSON R. & BONIERBALE M. (2001). Evaluation of wild potato species for resistance to late blight. Lima, Perú. CIP Program report 1999-2000. p. 49-62.

SINGH, B.P., & BIRHMAN, R.K. (1994). Laboratory estimation of field resistance of potato late blight. J. Phytopathology 140: 71-76

SPRAGUE, G., & TATUM, A. (1942). General vs. Specific Combinig Ability in Single-Crosses of Corn. Amer. Soc. Agron. 43:923-932.

TAI, G., & HODGSON, W. (1975). Estimating general combining ability of potato parents for field resistance to late blight. Euphytica 24. Pp. 285-289.

TELLO, C. (2008). Identificación de aspectos epidemiológico 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. Quito Pichincha. Tesis Ing. Agr. Quito, EC. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. 105 p.

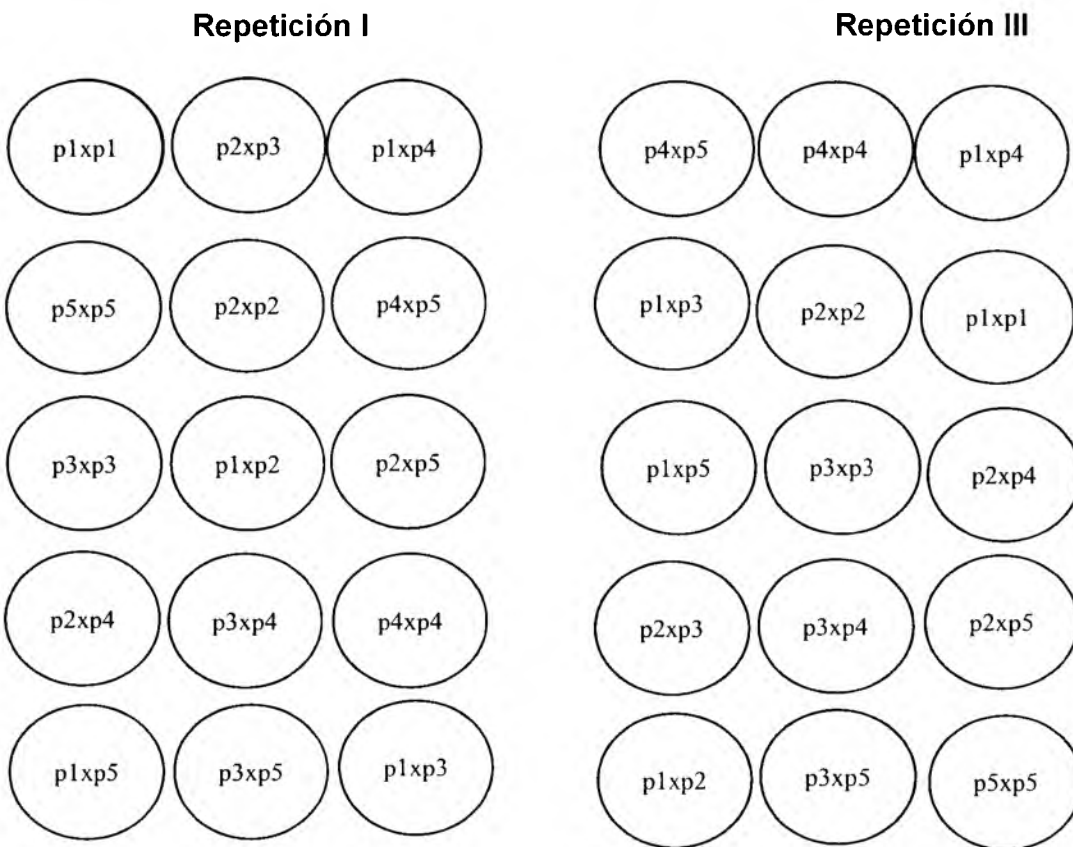
VINOD, K., JAI, G. & DHIMAN K.R. (2005) Combining ability analysis for tuber yield and late blight in potato. Central Potato Research Station, Kufri. Central Potato Research Institute, Shimla. Potato J. 32 (3-4): 129-130.

VLEESHOUWERS, VIVIANNE G.A.A., WILLEM van DOOIJEWEEERT, L.C. PAUL KEIZER, LUC SIJKES, FRANCINE G., & LEONTINE T. (1999) A laboratory assay for *Phytophthora infestans* resistance in various *Solanum* species reflects the field situation. European Journal of Plant Pathology 105: 241-250.

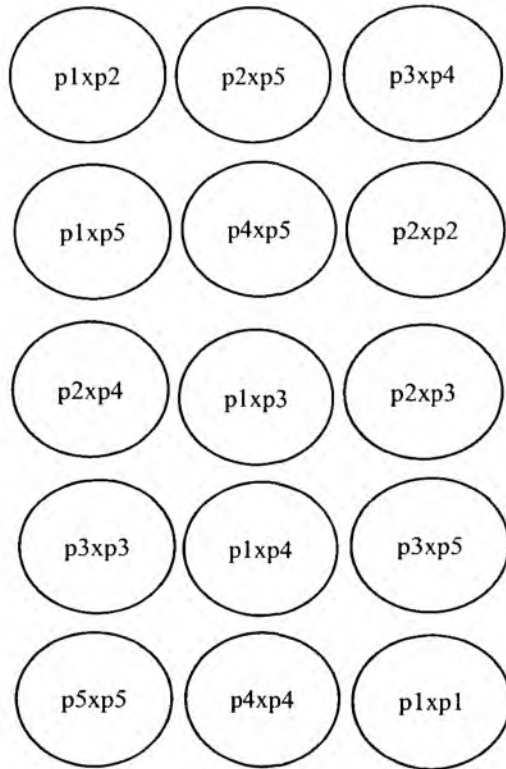
WISSAR, R (1983) Aspectos Agronómicos del Cultivo de la Papa a partir de Semilla Botánica en: Manual sobre Manejo de Germoplasma de papa. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima- Perú 33 p.

10. ANEXOS

Ubicación de las cámaras húmedas con los folíolos inoculados con una raza compleja de (*Phytophthora infestans*) (Mont.) de Bary en el laboratorio.



Repetición II



Repetición IV

