

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE
PLANTAS**



**“INCORPORACIÓN DE RESISTENCIA A *Phytophthora
infestans* L. DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS A
Solanum tuberosum MEDIANTE POLIPLOIDIZACIÓN
SEXUAL UNILATERAL”**

Presentado por:

BENNY JULISSA ORDOÑEZ AQUINO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGISTER SCIENTIAE EN
MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS**

Lima - Perú

2015

ABSTRACT

The objective of this work was to generate interspecific sexual hybrids resistant to *P. infestans* by means of unilateral sexual polyploidization of fourteen advanced tetraploid potato clones and fourteen interspecific diploid hybrids from the groups Piurana (*Solanum chiquidenum* and *S. pauciseccum*), Megistracroloba (*S. sogarandinum*) y Tuberosa (*S. cajamarquense*). From these crosses, a total of 1812 hybrids, grouped in 64 families were generated.

Screening for late blight resistance was carried out under field conditions at Monobamba in 2012 using an alpha lattice design, 357 hybrids were selected by moderate to-high resistance levels to late blight. However, the well-documented positive effect of sexual tetraploidization in the resistance of the new hybrids seems to be accompanied by a worsening of pollen fertility. Only, 186 hybrids showed moderate to high pollen, and can be used as male parent in future crosses. The previous selected hybrids were characterized for their agronomic traits in field at La Molina 2013. Traits of number and length of stolons and yield shows statistically significant differences among cross combinations. Also, ploidy levels were estimated by counting the number of chloroplasts. Congruent with the frequency of 2n pollen in the male parents, the 91% of the hybrids were identified as tetraploids. Simultaneously, detached leaf assay with two complex races of *P. infestans*, *PCO055* and *PCO002* were performed to evaluate late blight reactions of hybrids selected, and to supplement large scale field testing for resistance to late blight.

Finally, to verify late blight resistant levels, 231 hybrids were assessing under field infection at Monobamba in 2014, selecting 155 clones with proven moderate to high resistance.

This is the first report of successful use of distant wild relative species from groups mentioned above for introgression of late blight resistance in the genetic background cultivated using unilateral sexual polyploidization.

Keywords: potato, late blight, wild species, unilateral sexual poliploidization.

RESUMEN

Esta investigación consistió en la generación de híbridos interespecíficos con resistencia a *P. infestans*, a partir de cruzamientos entre catorce clones élite tetraploides, y catorce híbridos interespecíficos diploides derivados de los grupos silvestres, Piurana (*S. chiquidenum* y *S. pauciseccum*), Magistracroloba (*S. sogarandinum*) y Tuberosa (*S. cajamarquense*); Se generaron 1812 híbridos, agrupados en 64 familias.

Después de un primer tamizado bajo un diseño alfa látice en la localidad de Monobamba, 2012, se seleccionaron 357 híbridos que poseían valores en el rango de altamente a moderadamente resistentes. Los híbridos seleccionados se caracterizaron agronómicamente, en un campo de La Molina, 2013. Las variables de número y longitud de estolones y rendimiento presentaron diferencias estadísticas significativas entre las distintas combinaciones de cruzamientos. También, se estimó el nivel de ploidía por conteo de cloroplastos, de un total de 355 híbridos evaluados, el 91 por ciento son tetraploides. En relación a la fertilidad, solo 186 híbridos presentaron alta a moderada viabilidad de polen. Simultáneamente, muestras de hojas de los híbridos seleccionados se evaluaron con dos aislamientos complejos de *P. infestans*, PCO055 y PCO002, a fin de complementar las pruebas en campo.

Finalmente, se realizó un segundo tamizado en campo en la localidad de Monobamba, 2014, para verificar los niveles de resistencia de los híbridos, seleccionándose 155 híbridos que poseían valores de resistencia en el rango de alto a moderadamente resistentes.

Este es el primer reporte de utilización exitosa de especies de los grupos mencionados para la incorporación de resistencia a tizón tardío en el fondo genético cultivado, utilizando la poliploidización sexual unilateral.

Palabras clave: papa, tizón tardío, especies silvestres, poliploidización sexual unilateral.

F30.
073
T
c.1

ÍNDICE GENERAL

ABSTRACT

RESUMEN

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ANEXOS

I.	INTRODUCCIÓN	1-3
II	REVISIÓN DE LITERATURA	4-30
	2.1 Clasificación Taxonómica de <i>Solanum</i>	5
	2.2 Especies silvestres de <i>Solanum</i>	5-8
	2.2.1 Grupo Piurana	7-8
	2.2.1.1 <i>Solanum chiquidenum</i>	7
	2.2.1.2 <i>Solanum paucisectum</i>	7-8
	2.2.2 Grupo Tuberosa	8
	2.2.2.1 <i>Solanum cajamarquense</i>	8
	2.2.3 Grupo Megistracroloba	8
	2.2.3.1 <i>Solanum sogarandinum</i>	8
	2.3 Barreras para la Hibridación	10-13
	2.3.1. Híbridos interespecíficos diploides con resistencia a tizón tardío.	13-14
	2.4 Tipos de Citoplasma.	15-16
	2.5 Polen.	17
	2.6 Gametos no reducidos.	17-20

H3872

2.7 Poliploidización Sexual.	20-21
2.7.1 Poliploidización Sexual Unilateral.	21-22
2.8 <i>Phytophthora infestans</i> .	23-27
2.9 Resistencia a <i>Phytophthora infestans</i>	27-30
III MATERIALES Y MÉTODOS	31-46
3.1 Lugar de Ejecución	31
3.2 MATERIALES	31-32
3.2.1 Materiales Biológicos	31-32
3.3 METODOLOGÍA	32-45
3.3.1 Diseños Experimentales	32
3.3.1.1. Viabilidad del polen	32-33
3.3.1.2. Cruzamientos	33-34
3.3.1.3 Evaluación de la resistencia a <i>P. infestans</i> de los híbridos generados mediante tamizado en campo bajo infección natural, utilizando un diseño alfa látice con dos repeticiones.	35-38
3.3.1.4 Evaluación Morfo-agronómica de los híbridos seleccionados utilizando un diseño alfa látice con dos repeticiones.	39-42
3.3.1.4.1 Variables Morfo-agronómicas.	39-42
3.3.1.5 Conteo de cloroplastos.	42-43
3.3.1.6 Prueba de hojas sueltas utilizando dos aislamientos de <i>P. infestans</i> .	43-44
3.3.1.7. Evaluación de la resistencia a <i>P. infestans</i> de los híbridos seleccionados mediante tamizado en campo bajo infección natural, utilizando un diseño alfa látice con tres repeticiones.	44-45
3.3.2 Análisis estadístico	45
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47-91
4.1 Cruzamientos.	47-54
4.1.1 Cruces con híbridos del Grupo Piurana (<i>Hyb chq</i> e <i>Hyb pcs</i>).	48
4.1.2 Cruces con híbridos del Grupo Tuberosa (<i>Hyb cjm</i>).	48

4.1.3 Cruces con híbridos del Grupo Megistracroloba (Hyb <i>sgr</i>).	49
4.1.4 Germinación de híbridos.	52-53
4.1.5 Híbridos en campo.	54
4.2 Evaluación de la resistencia a <i>P. infestans</i> de los híbridos mediante tamizado en campo bajo infección natural, utilizando un diseño alfa con dos repeticiones (Monobamba, 2012).	54-64
4.3 Evaluación agronómica de los híbridos seleccionados utilizando un diseño alfa-látice con dos repeticiones (La Molina, 2013).	64-71
4.4 Viabilidad de polen de los híbridos seleccionados.	71-73
4.5 Conteo de cloroplastos.	74-76
4.6 Prueba de hojas sueltas (DLA).	76-80
4.7 Evaluación de la resistencia a <i>P. infestans</i> de los híbridos seleccionados, mediante tamizado en campo bajo infección natural, utilizando un diseño alfa-látice con tres repeticiones (Monobamba, 2014).	81-91
V CONCLUSIONES.	92-93
VI RECOMENDACIONES.	94
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	95-112
VIII. ANEXOS.	113-120

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1	Resistencia de las especies silvestres de <i>Solanum</i> (Grupo Piurana, Megistracroloba y Tuberosa) frente a diferentes enfermedades.	6
Tabla 2	Asignación de especies con EBN desconocidos mediante cruzamientos con especies que poseen EBN estándares.	11
Tabla 3	Nomenclatura del tipo de citoplasma.	16
Tabla 4	Escala de viabilidad de polen	33
Tabla 5	Escala para determinar la ploidía en papa	42
Tabla 6	Comportamiento de los cruces según la procedencia de ambos parentales, indicando el número de parentales involucrados, polinizaciones, número de semillas.	47
Tabla 7	Comportamiento de los cruzamientos 4x × 2x.	50
Tabla 8	Germinación por tipo de cruzamiento 4x × 2x.	53
Tabla 9.	Valores promedio de temperatura (T°C), porcentaje de humedad relativa (HR%), radiación fotosintéticamente activa (PAR) y precipitación (mm) en los meses en que se desarrolló el experimento en campo, Monobamba 2012.	55
Tabla 10	Análisis de variancia para las variables AUDPC, RAUDPC y SAUDPC en un diseño alfa látice, Monobamba 2012.	56
Tabla 11	Valores promedio de AUDPC, RAUDPC y SAUDPC de los parentales e híbridos agrupados por tipo de cruce.	58
Tabla 12	Resumen de los individuos seleccionados después de la evaluación en campo, agrupados por tipo de cruce.	64
Tabla 13	Análisis de variancia para las variables agronómicas evaluadas (uniformidad, vigor, número de estolones y longitud de estolones) en campo, La Molina 2013.	65
Tabla 14	Promedio de número y longitud de estolones de los parentales 4x y los híbridos en campo, La Molina 2013.	66

Tabla 15	Análisis de variancia para las variables agronómicas evaluadas (peso total de tubérculos, número total de tubérculos y rendimiento) en campo, La Molina 2013.	67
Tabla 16	Promedios de peso de tubérculo (kg), número total de tubérculos y rendimiento (kg/plt) en los híbridos y los parentales 4x.	68
Tabla 17	Rango de viabilidad de polen de los híbridos seleccionados luego del primer tamizado en campo.	71
Tabla 18	Evaluación de reacción de los híbridos seleccionados a dos aislamientos complejos mediante prueba de hojas sueltas.	78
Tabla 19	Reacciones de Compatibilidad (C) /Incompatibilidad (I) de los testigos utilizados en la prueba de hojas sueltas (DLA).	79
Tabla 20	Análisis de variancia combinado de porcentaje de lesión de los híbridos con los dos aislamientos complejos.	80
Tabla 21	Valores promedio de temperatura (T°C), porcentaje de humedad relativa (HR%), radiación (PAR) y precipitación (mm) en los meses en que se desarrolló el experimento en campo, Monobamba 2014.	81
Tabla 22	Análisis de variancia de las variables AUDPC, RAUDPC y SAUDPC en un diseño alfa látice, Monobamba 2014.	83
Tabla 23.	Consolidado del promedio y rango de valores de AUDPC, dependiendo del tipo de cruce.	84
Tabla 24.	Resumen de los individuos seleccionados después de la evaluación en campo Monobamba 2014, agrupados por tipo de cruce.	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Distribución geográfica de las especies silvestres del Grupo Piurana (<i>S. paucissectum</i> y <i>S. chiquidenum</i>), Megistracroloba (<i>S. sogarandinum</i>) y Tuberosa (<i>S. cajamarquense</i>).	6
Figura 2	Distribución de los valores de AUDPC (▲) de los genotipos silvestres de <i>S. sogarandinum</i> , <i>S. chiquidenum</i> , <i>S. cajamarquense</i> y <i>S. paucissectum</i> , evaluados bajo infección natural en dos localidades endémicas, Comas y Oxapampa, Junín-Perú, 2008.	9
Figura 3	Ploidía del embrión y del endospermo, el ratio del EBN del parental femenino y masculino en el endosperma híbrido después de cruzamientos intra (inter) EBN entre especies de <i>Solanum</i> que difieren en ploidía y EBN.	13
Figura 4	Distribución de los valores de AUDPC (▲) de los híbridos interespecíficos diploides provenientes de rescate de embriones (Hyb <i>chq</i> , Hyb <i>cjm</i> , Hyb <i>pcs</i> e Hyb <i>sgr</i> , evaluados bajo infección natural en dos localidades endémicas, Monobamba y Oxapampa, Junín-Perú, 2008.	14
Figura 5	Relaciones del tipo de citoplasma en la especies de <i>Solanum</i> .	15
Figura 6	Representación esquemática del proceso meiótico y los tres mecanismos de restitución meiótica.	19
Figura 7	Observación de gametos no reducidos (polen 2n), señalados por una flecha, a un aumento de 200x.	20
Figura 8	Relaciones genómicas en la formación de un embrión híbrido producto de un cruzamiento 4x × 2x.	21
Figura 9	Ciclo de vida de <i>Phytophthora infestans</i> .	23
Figura 10.	Triángulo que muestra las relaciones involucradas para que se produzca la enfermedad en papa.	26
Figura 11	Campo experimental de híbridos diploides interspecíficos de <i>S. tuberosum</i> al final de la infección con <i>P. infestans</i> , se observa la	27

presencia de algunas plantas moderadamente resistentes.

Figura 12	Procedimiento de generación de híbridos interespecíficos provenientes de especies silvestres con resistencia a <i>P. infestans</i> . Se presenta dentro de corchetes ([]) de color azul todo lo que incluye la presente tesis.	46
Figura 13	Monitoreo de T °C y HR % durante la duración del experimento en campo de evaluación de resistencia a <i>P. infestans</i> . Monobamba 2012.	55
Figura 14	Distribución de los valores de AUDPC según el tipo de cruce y los parentales correspondientes. Monobamba 2012.	59
Figura 15	Distribución de frecuencias de los valores de AUDPC de las familias que tienen como donante a los híbridos de <i>S. chiquidenum</i> .	60
Figura 16	Distribución de frecuencias de los valores de AUDPC de las familias que tienen como donante a los híbridos de <i>S. paucisectum</i>	61
Figura 17	Distribución de frecuencias de los valores de AUDPC de las familias que tienen como donante a los híbridos de <i>S. cajamarquense</i> .	62
Figura 18	Distribución de frecuencias de los valores de AUDPC de las familias que tienen como donante a los híbridos de <i>S. sogarandinum</i> .	63
Figura 19	Distribución de frecuencias de los valores de rendimiento (kg/plt) de los parentales 4x y los híbridos agrupados por tipo de cruce.	69
Figura 20	a) Moderada viabilidad de polen, perteneciente a un híbrido HER-44.7 (=AdvClones × Hyb <i>cjm</i>); b) Tétradas estériles, pertenecientes a los híbridos de la familia HER-24-111 (=AdvClones × Hyb <i>chq</i>).	72
Figura 21	a) Individuo HER-18.76 (=AdvClones × Hyb <i>chq</i>) con 11 cloroplastos en la célula guarda, corresponde a un triploide; b) Individuo HER-18.36 (=AdvClones × Hyb <i>chq</i>) con 13 cloroplastos en la célula guarda, corresponde a un tetraploide.	75
Figura 22	Histograma de distribución del nivel de ploidía de los híbridos evaluados agrupados por tipo de cruce.	76

Figura 23	Evaluación de hojas sueltas de la cepa PCO055 en los híbridos HER colectados de campo LM2013.	76
Figura 24	a) Reacción incompatible (I), y b) reacción compatible (C) en los híbridos provenientes del cruce “AdvClones × Hyb <i>chq</i> ”.	77
Figura 25	Monitoreo de T °C y HR % durante el experimento en campo de evaluación de resistencia a <i>P. infestans</i> . Monobamba 2014.	82
Figura 26	Distribución de los valores de AUDPC según el tipo de cruce y los parentales correspondientes; Monobamba 2014.	84
Figura 27	Distribución de frecuencias de los valores de AUDPC de las familias que tienen como donante a los híbridos de <i>S. chiquidenum</i> .	85
Figura 28	Distribución de frecuencias de los valores de AUDPC de las familias que tienen como donante a los híbridos de <i>S. paucissectum</i>	86
Figura 29	Distribución de frecuencias de los valores de AUDPC de las familias que tienen como donante a los híbridos de <i>S. cajamarquense</i> .	87
Figura 30	Distribución de frecuencias de los valores de AUDPC de las familias que tienen como donante a los híbridos de <i>S. sogarandinum</i> .	88

ÍNDICE DE ANEXOS

Tabla 1	Lista de los parentales femeninos utilizados	113
Tabla 2	Lista de parentales masculinos utilizados	114
Tabla 3	Listado de los híbridos seleccionados al final del experimento	117-120
Figura 1	Pedigree de los híbridos tetraploides generados y seleccionados por resistencia a <i>P. infestans</i> , proveniente de la fuente <i>S. chiquidenum</i> .	115
Figura 2	Pedigree de los híbridos tetraploides generados y seleccionados por resistencia a <i>P. infestans</i> , proveniente de la fuente <i>S. paucissectum</i> .	115
Figura 3	Pedigree de los híbridos tetraploides generados y seleccionados por resistencia a <i>P. infestans</i> , proveniente de la fuente <i>S. cajamarquense</i>	116
Figura 4	Pedigree de los híbridos tetraploides generados y seleccionados por resistencia a <i>P. infestans</i> , proveniente de la fuente <i>S. sogarandinum</i> .	116

I. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum*) es uno de los cultivos alimenticios, de mayor producción en el mundo, alcanzando 352.4 millones de toneladas y cubriendo aproximadamente 19.81 millones de hectáreas cultivadas en el año 2012 (FAOSTAT, 2013).

El tizón tardío causado por el oomiceto *Phytophthora infestans*, es la principal enfermedad que afecta al cultivo de la papa a nivel global, provocando daños económicos significativos (Glass *et al.*, 2001, Hijmans *et al.*, 2000; Świeżyński y Zimnoch-Guzowska., 2001), con un impacto equivalente a \$ 3.5 mil millones de pérdidas al año en países en vías de desarrollo (White y Shaw, 2010).

El uso de cultivares resistentes al tizón tardío es importante en la reducción de los costos de producción, por lo que constituye una de las metas más perseguidas en el mejoramiento genético de la papa (Cooper-Bland *et al.*, 1996). El Centro Internacional de la Papa (CIP), ha iniciado desde hace muchos años investigaciones para combatir esta importante enfermedad, contando en su Banco de Germoplasma con cerca de 1500 accesiones, de aproximadamente 152 especies silvestres (A. Salas, comunic. personal). Esta diversidad contiene un inexplorado nivel de resistencias y tolerancias a distintas enfermedades y/o plagas.

El flujo de genes entre las especies cultivadas y silvestres es limitado por barreras de hibridación internas (Ramon y Hanneman, 2002) que pueden ser pre zigóticas o post zigóticas. Algunas son atribuidas a fallas en la embriogénesis debido a incongruencias en los genomas parentales (Lester y Kang, 1998). Estas barreras de incompatibilidad existen para mantener la integridad del genoma de especies simpátricas (Dinu *et al.*, 2005; Liedl *et al.*, 1996). Sin embargo, la utilización de cruces interespecíficos es una herramienta útil para la introgresión de caracteres de interés en el fondo genético cultivado. Basado en este conocimiento, la manipulación de la biología reproductiva de los genotipos silvestres de papa, provee una buena estrategia para el mejoramiento de la papa cultivada

En los últimos años han surgido tecnologías moleculares para la modificación de genomas, incluyendo generación y uso de haploides, utilización de gametos no reducidos ($2n$); la transformación genética, la inserción de secuencias mediante la ingeniería genética, como la transgénesis, la cisgénesis e intragénesis; tecnologías para la edición de genomas, como las nucleasas de dedos de zinc (ZFN), nucleasas tipo activadores de transcripción (TALE), nucleasas de secuencias palindrómicas repetidas inversas (CRISPR-Cas), la metilación de ADN dependiente de ARN, la genética inversa, etc. (Lusser *et al.*, 2012; Mussolino y Cathomen, 2012; Rommens *et al.*, 2007; Townsend *et al.*, 2009; Tzfira *et al.*, 2012; Wijnker *et al.*, 2012). La aplicación complementaria de estas herramientas genómicas impulsarán las ganancias genéticas obtenidas por los programas de mejoramiento al facilitar la identificación de la base molecular para la resistencia a las diferentes enfermedades que afectan al cultivo y otras características de interés.

Las técnicas de manipulación genética seguirán siendo parte esencial en el mejoramiento de la papa, y el uso de especies silvestres como fuentes de resistencia en programas de mejoramiento serán cada vez más importante para el control de las principales enfermedades y/o plagas (Pérez-de-Castro *et al.*, 2012, Chauvin, 2003).

El premejoramiento genético de *S. tuberosum* para resistencia a *P. infestans*, genera nuevos materiales de papa para ser utilizados como progenitores en futuras hibridaciones; esto permitirá ampliar la base genética de la papa y, asimismo, reducirá la dependencia de los agricultores a los fungicidas, y consecuentemente, las pérdidas causadas por el tizón tardío.

El presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de incorporar nuevas fuentes de resistencia a *Phytophthora infestans* en poblaciones avanzadas de papa del Centro Internacional de la papa (CIP) mediante hibridación interespecífica utilizando gametos no reducidos. Los objetivos específicos de esta investigación fueron:

- Generar híbridos interespecíficos a partir de cruzamientos $4x \times 2x$.
- Evaluar la resistencia a *P. infestans* de los híbridos generados bajo condiciones de infección natural en campo.
- Evaluar agronómicamente a los híbridos seleccionados.
- Evaluar la viabilidad de polen de los híbridos seleccionados. Evaluar la ploidía, mediante conteo de cloroplastos, de los híbridos seleccionados.
- Evaluar mediante una prueba de hojas sueltas, utilizando dos razas complejas de *P. infestans*, a los híbridos seleccionados.
- Evaluar la resistencia a *Phytophthora infestans* de los híbridos seleccionados bajo condiciones de infección natural en campo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

La papa cultivada, *Solanum tuberosum*, es una planta dicotiledónea y tetraploide ($2n=4x=48$), es decir tiene cuatro sets de cromosomas similares (donde “n” es el número gamético y “x” es el número básico). Asimismo, posee una serie poliploide, que comprende especies silvestres y cultivadas; alrededor del 70 por ciento de las especies silvestres son diploides ($2n=2x=24$), las restantes especies son poliploides, sobre todo en el nivel tetraploide ($2n=4x=48$) o hexaploide ($2n=6x=72$) (Spooner *et al.*, 2008).

Existen dos grandes grupos importantes en el Mejoramiento Genético: el Grupo Andigena, que se cultiva a lo largo de los Andes, desde 2.000 hasta 4.000 m.s.n.m, y adaptado a condiciones de días cortos, y el Grupo Tuberosum, adaptado a condiciones de días largos y por lo tanto más ampliamente cultivados en las regiones templadas (Spooner *et al.*, 2007).

Otros grupos, diploides de papa, como *Stenotomum* y *Phureja* también se cultivan y utilizan como fuente de diversidad genética. Huamán y Spooner (2002) incluyeron a la subsp. *Goniocalyx* dentro del grupo *Stenotomum*, mientras que el grupo *Phureja*, fue clasificado en un grupo diferente debido a su ausencia de dormancia.

La taxonomía de las especies de *Solanum* sección *Petota*: *Solanaceae* se complica a causa de la introgresión, la hibridación interespecífica, la auto- y aloploidía, la compatibilidad sexual entre ellas, además de la posible divergencia reciente, la plasticidad fenotípica y la consecuente gran similitud morfológica entre las especies.

Estas complicaciones biológicas han llevado a la discordancia de los diferentes taxónomos (Ovchinnikova *et al.*, 2011).

2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *SOLANUM*

Según la clasificación de Hawkes (1992), las especies de *Solanum* se agrupan de la siguiente manera:

División: Fanerógama

Subdivisión: Angiospermas

Clase: Dicotiledóneas

Subclase: Simpétala

Sección: Anisocárpeas

Orden: Tubifloríneas

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Sección: Petota

Series: 18 series

Especie: 8 especies cultivadas y aprox. 152 especies silvestres.

2.2 ESPECIES SILVESTRES DE *SOLANUM*

Muchas de las especies silvestres de *Solanum*, en este caso las que conforman los grupos Piurana (*S. chiquidenum* y *S. paucissectum*), Magistracroloba (*S. sogarandinum*) y Tuberosa (*S. cajamarquense*) poseen características de resistencia a distintas enfermedades (Tabla 1).

Tabla 1. Resistencia de las especies silvestres de *Solanum* (Grupos Piurana, Megistracroloba y Tuberosa) frente a diferentes enfermedades.

Enfermedad (agente causal)	Tizón tardío (<i>P. infestans</i>)	Enrollamiento de la hoja de la papa (virus PLRV)	Podredumbre blanda (<i>Erwinia carotovora</i>)	Marchitez (<i>Verticillium spp</i>)
<i>S. chiquidenum</i> (<i>chq</i>)	X	X	X	
<i>S. paucissectum</i> (<i>pcs</i>)	X			X
<i>S. sogarandinum</i> (<i>sgr</i>)	X			
<i>S. cajamarquense</i> (<i>cjm</i>)	X			

FUENTE: modificado de Ochoa, 2004.

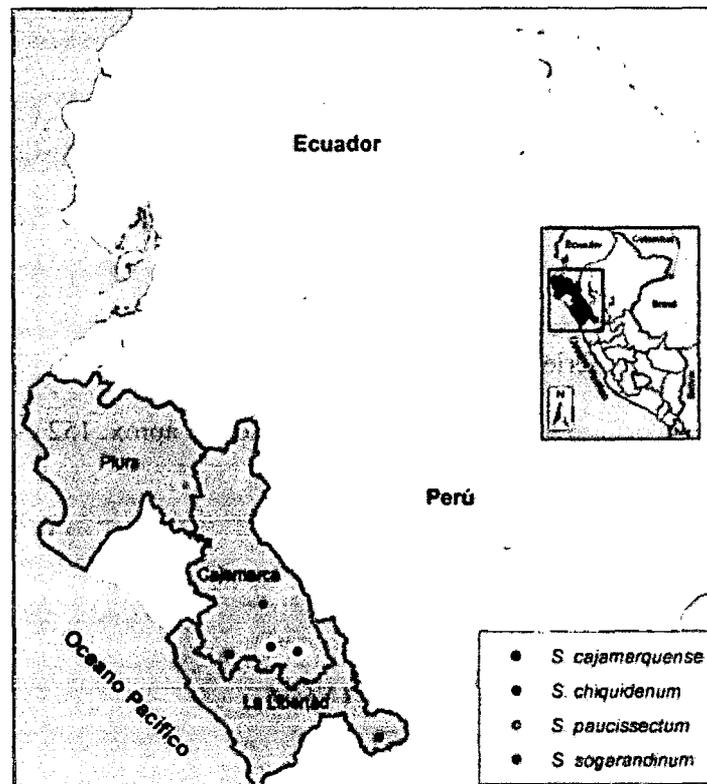


Figura 1. Distribución geográfica de las especies silvestres del Grupo Piurana (*S. chiquidenum* y *S. paucissectum*), Megistracroloba (*S. sogarandinum*) y Tuberosa (*S. cajamarquense*).

FUENTE: Elaboración propia.

2.2.1. GRUPO PIURANA

La literatura revela que no existen experimentos extensivos de cruzabilidad entre especies cultivadas y especies silvestres de la serie Piurana, a pesar del potencial que presentan las especies que la conforman.

Entre estas tenemos:

2.2.1.1 *Solanum chiquidenum* (chq)

Se encuentra distribuida tanto en el departamento de La Libertad como Cajamarca, alrededor de los 3200 m.s.n.m. Es una planta erecta, alta y estolonífera, sus tubérculos son pequeños redondos o ligeramente comprimidos y moniliformes (Ochoa, 2004).

En el CIP se han evaluado 40 genotipos de 2 accesiones (CIP 761870 y CIP 762573), los genotipos de ambas accesiones exhibieron altos niveles de resistencia a *P. infestans* en campo. Perez *et al.* (2001) informaron la probable presencia de resistencia cuantitativa en estos genotipos.

2.2.1.2. *Solanum paucissectum* (pcs)

Posee una distribución muy restringida, concentrándose en la Provincia de Huancabamba en el Departamento de Piura; alrededor de los 2600 a 3360 m.s.n.m. La planta es erecta, a veces arrositada hacia la base y el tallo es cilíndrico y glabro. Flores lilas y bayas cónicas u ovoides, de color verdè oscuro con jaspes reticulados Posee estolones largos y los tubérculos son moniliformes, redondos y blancos. (Ochoa, 2004).

En el CIP se han evaluado 40 genotipos de tres accesiones (CIP 762124, CIP 762125 y CIP 762126). Los genotipos pertenecientes a la accesión CIP 762124 mostraron una distribución normal de resistencia en dos ambientes (Comas, Junín y Oxapampa, Pasco). Los genotipos de la accesión CIP 762125 exhibieron valores de resistencia muy cercanos a los controles utilizados como resistentes y moderadamente resistentes cuando se evaluaron en Comas con respecto a su comportamiento en la localidad de Oxapampa, Pasco.

Finalmente, con respecto a la accesión CIP 762126, algunos genotipos resultaron más resistentes que el control más resistente en ambos ambientes (Figura 2).

2.2.2. GRUPO TUBEROSA

2.2.2.1. Solanum cajamarquense (cjm)

Se encuentra distribuida en los valles interandinos alrededor de los 2000 a 2600 m.s.n.m. Es una planta erecta, densamente pilosa en todas sus partes, pelos blancos-plateados, tallo recto, de color verde claro. Flores blancas y bayas redondas, de color verde claro con algunos jaspes verticales verdes-violáceos. Estolones muy largos y tubérculos moniliformes, redondos u ovalados. Es por sí sola una especie única y exótica sin estrechas afinidades con ninguna otra (Ochoa, 2004).

En el CIP se han evaluado y observado niveles de resistencia prometedores en 40 genotipos de dos accesiones de *S. cajamarquense* (CIP 762616 y CIP 762619); la mayoría de los genotipos más resistentes que el control moderadamente resistente pertenecieron a la accesión CIP 762619. Los 36 genotipos de la accesión CIP 762620, presentaron una distribución normal en los valores de resistencia; los genotipos que componen esta accesión presentan la reacción de resistencia más uniforme a *P. infestans* con respecto a todas las especies mencionadas.

2.2.3. GRUPO MEGISTACROLOBA

2.2.3.1. Solanum sogarandinum (sgr)

Distribuida alrededor de los 3000 a 4050 m.s.n.m en los departamentos de Ancash, Huánuco, La Libertad y Cajamarca al norte del Perú. Es una planta arrositada con entrenudos cortos. Bayas redondas de color verde claro con jaspes marrones claros. En el CIP se ha evaluado 14 genotipos de la accesión (CIP 761586), la cual exhibió niveles moderadamente resistentes en dos ambientes.

Finalmente, en estudios posteriores en CIP, se re evaluaron los 40 genotipos de cada una de las dos accesiones de *S. chiquidenum* (CIP 761870 y CIP 762573, respectivamente), tres accesiones de *S. cajamarquense* (CIP 762616, CIP 762619 y CIP 762620, con 40, 40 y 36 genotipos, respectivamente), 3 accesiones de *S. paucissectum* (CIP 762124, CIP 762125 y CIP 762126, con 40, 39 y 40 genotipos, respectivamente) (CIP, sin publicar) (Figura 2)

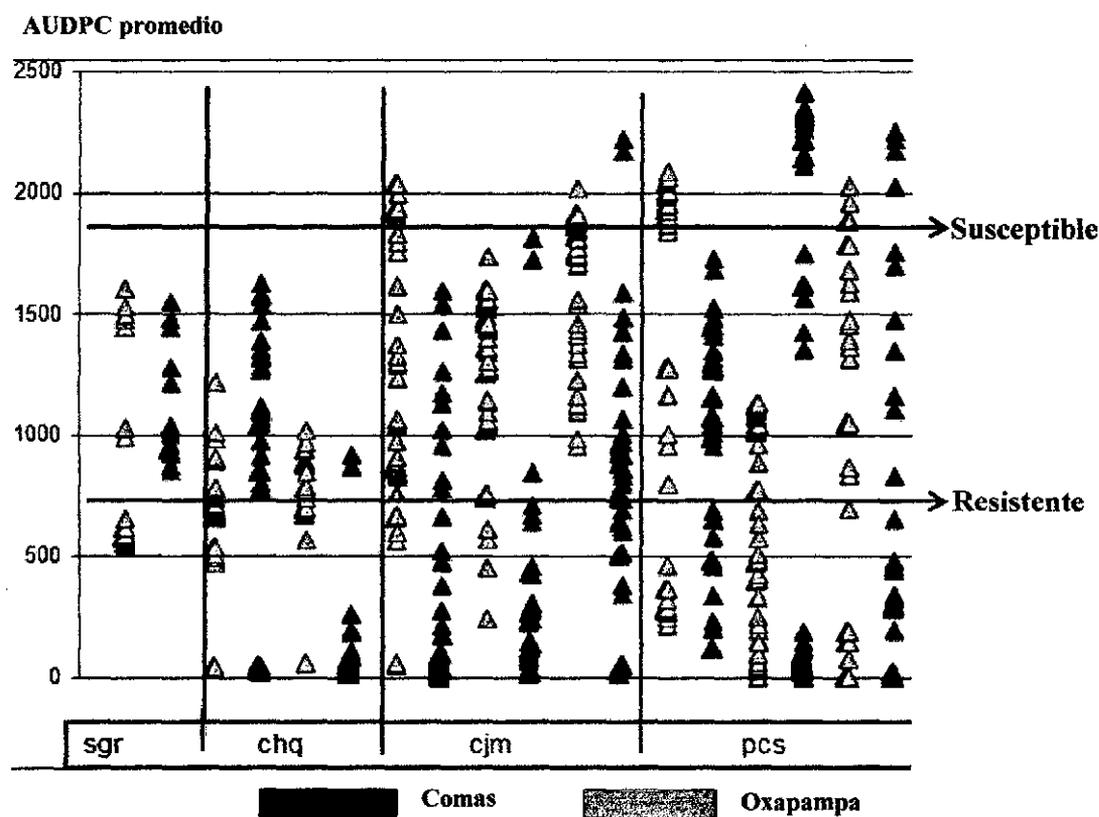


Figura 2. Distribución de los valores de AUDPC (▲) de los genotipos silvestres de *S. sogarandinum* (*sgr*), *S. chiquidenum* (*chq*), *S. cajamarquense* (*cjm*) y *S. paucissectum* (*pcs*), evaluados bajo infección natural en dos localidades endémicas, Comas y Oxapampa, Junín-Perú, 2008.

FUENTE: Elaboración propia

2.3. BARRERAS PARA LA HIBRIDACIÓN

El flujo génico entre las diferentes especies de *Solanum* está limitado por barreras de hibridación que pueden ser internas o externas.

Las barreras de hibridación externas pueden ser: aislamiento geográfico, floración no simultánea, adaptación a nichos ecológicos diferentes, etc. (Moyle, 2007). Las barreras de hibridación internas, han sido clasificadas en 2 grupos: las pre zigóticas, en el caso de *Solanum* actúan a niveles polen-estilo, en éstos casos los granos de polen se detienen en el estilo (Camadro *et al.*, 2004, Ispizúa *et al.*, 1999; Jackson y Hanneman, 1999; Raimondi y Camadro, 2003), y los post zigóticas, que inducen una disfunción en el desarrollo normal del endospermo, el cual será incapaz de proveer suficiente alimento al embrión hasta que haya alcanzado un estadio cotiledóneo maduro.

Para superar las barreras post zigóticas varios autores han utilizado la técnica de doble polinización seguida de rescate de embriones de ser el caso (Iwanaga *et al.*, 1991; Ramon y Hanneman, 2002; Samitsu y Hosaka, 2002; Singsit y Hanneman, 1991)

Sin embargo hay que recordar que estas efectivas barreras de incompatibilidad existen para mantener la integridad del genoma entre las especies simpátricas (Dinu *et al.*, 2005; Liedl *et al.*, 1996).

Adicionalmente, existen otros mecanismos que regulan la formación exitosa de semilla híbrida. Así, Johnston y Hanneman (1980) propusieron que los factores genéticos contribuidos por los gametos maternos y paternos en el endosperma tendrían una proporción 2:1 (llamado El Número de Balance del Endospermo o EBN, por sus siglas en inglés), también conocido como la *ploidía efectiva* de las especies de *Solanum* y éste sería necesario para el desarrollo normal de la semilla híbrida (Carputo y Barone, 2005; Carputo *et al.*, 1999; Ortiz y Ehlenfeldt, 1992; Ramon y Hanneman, 2002). El EBN no es equivalente a la ploidía cromosómica, ya que a cada especie se le atribuye un número de EBN diferente (puede ser 1, 2 o 4) (Smith y Desborough., 1986), y es asignado luego de cruzamientos con genotipos estándares (Tabla 2).

Estudios posteriores acerca del control genético del EBN en *Solanum*, sugirieron que el EBN es controlado por tres genes no ligados que funcionan como un sistema tipo umbral (Ehlenfeldt y Hanneman 1988; Johnston y Hanneman 1996).

Cuando no se producen gametos $2n$, el balance en la proporción del EBN es obtenida solo si los parentales (masculino y femenino) tienen un mismo EBN (Carputo *et al.*, 1998); de tal manera, el EBN representa un fuerte mecanismo de aislamiento en *Solanum*. Así, las especies diploides con un EBN=1, se aíslan sexualmente, debido a que los cruzamientos con haploides de *S. tuberosum* (*tbr*) ($2n=24$, EBN=2) y otras especies diploides con EBN=2, fallan debido a un cociente desequilibrado del EBN en el endospermo híbrido.

Tabla 2. Asignación de especies con EBN desconocidos mediante cruzamientos con especies que poseen EBN estándares

EBN desconocido	EBN estándar	Resultado	Conclusión
4x "A"	2x (2EBN) 4x (4EBN)	falla 4x	"A" es 4x (4EBN)
4x "B"	2x (2EBN) 4x (4EBN)	3x falla	"B" es 4x (2EBN)
2x "C"	2x (2EBN) 4x (2EBN)	2x 3x, 4x	"C" es 2x (2EBN) con gametos 2n
2x "D"	2x (2EBN) 4x (4EBN)	4x falla	"D" es 2x (2EBN) con gametos 2n
2x "E"	2x (2EBN) 4x (4EBN)	falla falla	"E" puede ser 2 x(1EBN)

FUENTE: Modificado de Ortiz y Ehlenfed, 1992.

No obstante, se han reportado algunos éxitos inesperados en el desarrollo de la semilla híbrida en cruces inter-EBN, indicando que pueden deberse a la incompleta penetrancia del requerimiento de la proporción del EBN, a inusuales eventos de fertilización, o a la endomitosis del núcleo polar (Johnston y Hanneman, 1996), mientras que Massuelli y Camadro (1997) interpretan que estos éxitos inesperados se deben a una segregación para el EBN.

Aun así, otros problemas de cruzabilidad se presentan a pesar de que ambos progenitores tienen la misma ploidía y EBN. Por tanto, el EBN parece ser insuficiente para explicar cuando, después de cierta etapa el desarrollo del embrión se detiene; sólo sería parte de un sistema más complejo de barreras interespecíficas (Masuelli y Camadro, 1997).

Se han empleado diversas técnicas para superar las barreras inter-EBN en *Solanum*; Singit y Hanneman (1991) emplearon el cultivo *in vitro* de embriones para superar las barreras del EBN de *S. chancayense* que posee EBN=1 ($2n=2x=24$); Watanabe *et al.* (1992, 1995) para lograr la introgresión del germoplasma de *S. acaule* ($2n=4x=48$) que posee un EBN=2, con las especies diploides que poseen EBN=1: *S. brevidens*, *S. etuberosum* y *S. fernandezianum*.

Conocer las barreras a la hibridación existentes en papa y los niveles a las que actúan, permiten a los mejoradores planificar la estrategia a seguir para conseguir híbridos presumiblemente difíciles, disponiendo de un mayor acervo genético para la mejora del cultivo.

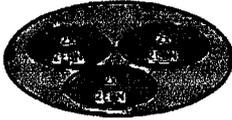
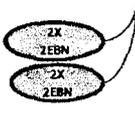
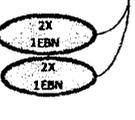
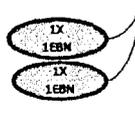
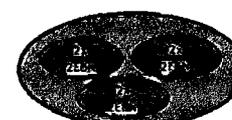
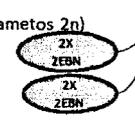
♀ Parental femenino	♂ Parental masculino	Ploidía de embrión	Ploidía del endospermo	♀EBN: ♂EBN		
<i>S. tuberosum</i> , 4x (4EBN)	× <i>S. andigena</i> , 4x (4EBN)			4x	6x	2:1 (éxito)
<i>S. tuberosum</i> , 4x (4EBN)	× <i>S. acaule</i> , 4x (2EBN)			4x	6x	4:1 (falla)
<i>S. tuberosum</i> , 4x (4EBN)	× <i>S. chacoense</i> , 2x (2EBN)			3x	5x	4:1 (falla)
<i>S. tuberosum</i> , 4x (4EBN)	× <i>S. chacoense</i> , 2x (2EBN)			4x	6x	2:1 (éxito)

Figura 3. Ploidía del embrión, del endospermo y el ratio del EBN del parental femenino y masculino en el endosperma híbrido después de cruzamientos intra (inter) EBN entre especies de *Solanum* que difieren en ploidía y EBN.

FUENTE: Carputo y Barone, 2005.

2.3.1 Híbridos interespecíficos diploides con resistencia a tizón tardío.

El programa de mejoramiento del CIP encontró dificultades para obtener híbridos interespecíficos de genotipos diploides cultivados de los grupos Phureja (*S. phureja*) y Stenotomum (*S. stenotomum* y *S. goniocalyx*) y genotipos diploides silvestres del Grupo Piurana (*S. paucissectum* y *S. chiquidenum*) y Tuberosa (*S. cajamarquense*). La doble polinización seguida del cultivo *in vitro* de pro-embriones resultó exitosa para rescatar embriones inmaduros provenientes de cruza en las cuales los embriones no lograban su desarrollo completo. Al rescatarlos fue posible, por lo tanto, obtener genotipos, que

fueron evaluados para las características de interés (Ordoñez, 2008). La progenie obtenida de los cruces interespecíficos se evaluó por su nivel de resistencia al tizón tardío en dos localidades endémicas (Figura 4); obteniéndose 166 genotipos resistentes agrupados por su genealogía (Hyb *chq*, Hyb *cjm*, Hyb *pcs* e Hyb *sgr*, 71, 71, 22 y 2, respectivamente), éstos se evaluaron por características agronómicas promisorias (CIP, sin publicar).

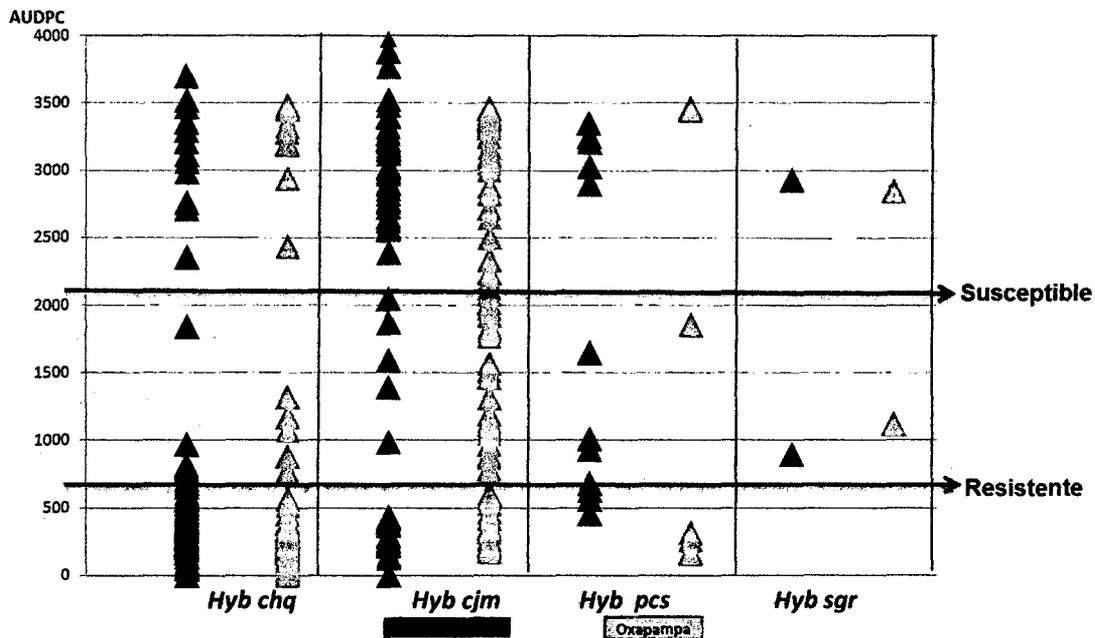


Figura 4. Distribución de los valores de AUDPC (▲) de los híbridos interespecíficos diploides provenientes de rescate de embriones (Hyb *chq*, Hyb *cjm*, Hyb *pcs* e Hyb *sgr*, evaluados bajo infección natural en dos localidades endémicas, Monobamba y Oxapampa, Junín y Pasco, Perú, 2008.

FUENTE: Elaboración propia

Se confirmó la naturaleza híbrida de los 166 híbridos resistentes, utilizando dos marcadores microsatélites (SSR) (Quispe, 2009). De los híbridos confirmados se evaluó la presencia de gametos no reducidos (en este caso polen 2n) para determinar aquellos con los valores más altos (Anexo 1, tabla 2), para ser utilizados como parentales en experimentos posteriores.

2.4 TIPOS DE CITOPLASMA

El ADN citoplasmático, se encuentra presente en cloroplastos y mitocondrias, y se caracteriza porque es de herencia materna y con una nula contribución paterna.

La combinación de la relación del tipo de ADN del cloroplasto (ctDNA) con el tipo mitocondrial (mtDNA), es lo que se denomina tipo citoplasmático.

Hosaka (1986) distinguió 7 tipos diferentes de haplotipos cloroplásticos de una selección de especies silvestres y cultivadas (Figura 5), concluyendo:

- T, restringido a *S. tuberosum ssp. tuberosum*.
- A, característico de *S. tuberosum ssp. andigena* y *S. maglia*.
- S, encontrado en *S. goniocalyx*, *S. phureja*, *S. stenotomun*, *S. chaucha* y una accesión de subespecie *andigena*.
- C, presente en *S. acaule*, *S. bukasovii*, *S. canasense*, *S. multidissectum* y *S. juzepczukii*.
- W, presente en especies silvestres y se considera el tipo más primitivo.

(Van den Berg y Jacobs, 2007)

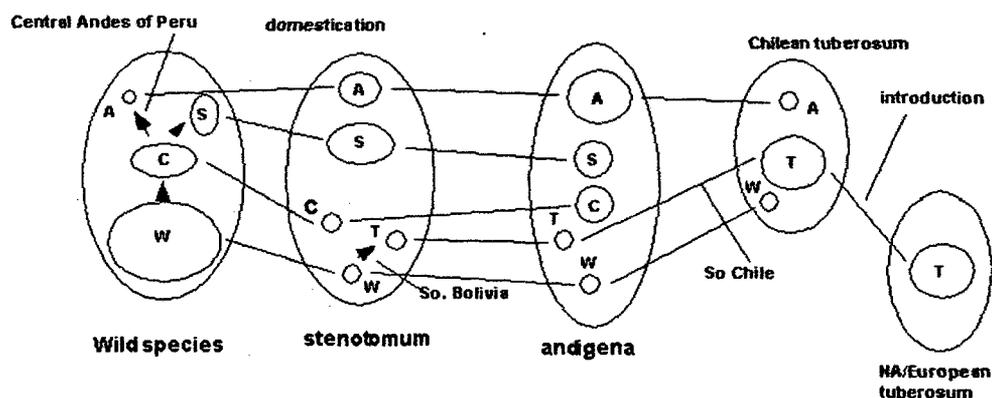


Figura 5. Relaciones del tipo de citoplasma en la especies de *Solanum*

Nota: Tamaño de círculos equivale al porcentaje de genotipos que presentan el tipo de citoplasma mencionado.

FUENTE: adaptado de Hosaka y Hanemann (1988).

Finalmente, Hosaka y Sanetomo (2012) propusieron una nueva nomenclatura, identificando seis tipos de citoplasma (Tabla 3):

Tabla 3. Nomenclatura del tipo de citoplasma.

Tipo de Citoplasma	Descripción	Nota ^y
M	Tipo materno o tipo ancestral de papas cultivadas.	C/ε
P	Derivado de <i>S. phureja</i> en el pool genético de la papa cultivada.	S/ε
A	Tipo más frecuente en <i>S. tuberosum ssp. andigena</i> .	A/ε
W	Presente en especies silvestres.	W/α, W/γ o W/δ
T	Tipo más frecuente en <i>S. tuberosum ssp. tuberosum</i> .	T/β
D	Derivado de <i>S. demissum</i> en el pool genético de la papa cultivada.	W/α

*Posible combinación de DNA cloroplástico/mitocondrial.

FUENTE: Hosaka y Sanetomo (2012).

Los citoplasmas de tipo P y A son tipos de citoplasma relativamente distintos dentro de los citoplasmas de tipo M y W, respectivamente, cada uno de los cuales tiene diversas variaciones citoplasmáticas (Hosaka y Sanetomo, 2009; Sanetomo y Hosaka, 2011).

Para el caso del tipo mitocondrial (mtDNA), se han descrito cinco tipos: α, β, γ, δ, y ε (Löss *et. al.*, 1999).

El citoplasma T/β es el más predominante en la papa cultivada. Tanto en el tipo de citoplasma T/β como en el W/γ, la esterilidad se caracteriza por anomalías visibles, como la no formación de polen, o varias anomalías en las anteras. Por otro lado, el tipo de citoplasma W/α produce abundante polen de *apariencia normal* sin embargo no es funcional (Hosaka y Sanetomo, 2012).

Actualmente la nomenclatura de Hosaka y Sanetomo (2012) es la que se emplea en los estudios de diversidad citoplasmática.

2.5. POLEN

La cantidad y calidad de polen producido por flor es un componente fundamental en las investigaciones relacionadas a la cruzabilidad. La calidad del polen se correlaciona con la viabilidad de éste, es decir, a la proporción de los granos de polen que son viables. La viabilidad se puede medir siguiendo diferentes metodologías, la más fácil es determinar la viabilidad del polen por tinción y conteo directo (Kelly *et al.*, 2002). El colorante Gelatina de Acetocarmín Glicerol es el más utilizado en papa, debido a que proporciona información adicional de la morfología nuclear.

El porcentaje de viabilidad se determina considerando el número de granos viables en relación con los granos totales encontrados en cada campo microscópico. Aunque ésta técnica sobrestima la viabilidad, al existir granos coloreados que no germinan, hasta la fecha es el método más rápido para determinar la viabilidad del polen (González *et al.*, 2002), además, de ser el primer paso a seguir al seleccionar genotipos, pues con ésta información se determina que genotipos son aptos para actuar como progenitores masculinos o femeninos y así elaborar un plan de cruzamientos correcto. Adicionalmente es importante conocer si los genotipos seleccionados para el plan de cruzamientos poseen gametos no reducidos (gametos $2n$), que son producidos por eventos meióticos anómalos (Camadro *et al.*, 1993; Ünal y Alp, 2002).

2.6 GAMETOS NO REDUCIDOS ($2n$)

La ocurrencia de gametos $2n$ parece estar controlada genéticamente, pero la expresión de estos genes está influenciado por el medio ambiente (Ramanna y Jacobsen, 2003). Algunos autores mencionan que un gen mayor es responsable de la formación de los gametos $2n$ mientras que varios genes menores controlan su frecuencia (Dewitte *et al.*, 2012).

Dependiendo de la fase en que actúan, los genes se clasifican en pre-meióticos, meióticos y post-meióticos. La mutación de dichos genes altera significativamente la

meiosis, afectando la fertilidad gamética y puede conducir a la formación de gametos, con el número somático de cromosomas o no reducidos. (Bretagnolle y Thompson, 1995).

Generalmente el origen de los gametos no reducidos ocurre por la desviación de los procesos meióticos. Durante la meiosis normal, ocurren dos divisiones sucesivas en las células meióticas; la primera dirigida a la separación de los cromosomas homólogos apareados y la segunda, a la separación de las cromátidas hermanas de cada cromosoma. En la restitución de la primera división meiótica (FDR), el apareamiento y/o la separación de los cromosomas homólogos no ocurre en la anafase I, así, la primera división meiótica ocurre como en una división mitótica y la segunda división meiótica ocurre normalmente, con las dos cromátidas hermanas moviéndose hacia los polos opuestos; mientras que en la restitución de la segunda división meiótica (SDR), el apareamiento y separación de los cromosomas homólogos ocurre normalmente durante la primera división meiótica, pero las cromátidas hermanas no se separan durante la segunda división meiótica (Carputo *et al.*, 2003).

Un gameto no reducido se considera gameto producto de la FDR si posee dos cromátidas no hermanas y gameto producto de la SDR si posee dos cromátidas hermanas. Adicionalmente a los dos mecanismos mencionados anteriormente, existe una tercera clase de proceso de formación de gametos $2n$, conocida como restitución meiótica indeterminada (IRM), ha sido estudiada en híbridos de *Lilium*, en los cuales las células madre del polen contienen univalentes y bivalentes que se dividen ecuacional y reduccionalmente, respectivamente, y generan gametos $2n$ que solo conservan parcialmente la heterocigosidad de los padres en el centrómero, y como resultado los gametos $2n$ pueden ser FDR o SDR (Lim *et al.*, 2001; De Storme y Geelen, 2013) (Figura 6).

La incidencia de gametos no reducidos es frecuente en el reino vegetal y su ocurrencia ha sido reportada en muchas especies de familias como Solanaceae, Brassicaceae, Leguminosae, Rosaceae, y Vitaceae (Veilleux, 1985; Camadro, 1986; Barba-González *et al.*, 2005).

En el género *Solanum* se ha determinado que los gametos no reducidos tienen importantes implicaciones evolutivas y a la vez son importantes herramientas en la mejora genética de la papa, ya que permiten elevar la ploidía de aquellos individuos

diploides hasta el nivel tetraploide y continuar con un programa convencional de mejoramiento del cultivo (Adiwilaga y Brown, 1991; Bastiaanssen *et al.*, 1998; Camadro *et al.*, 2004).

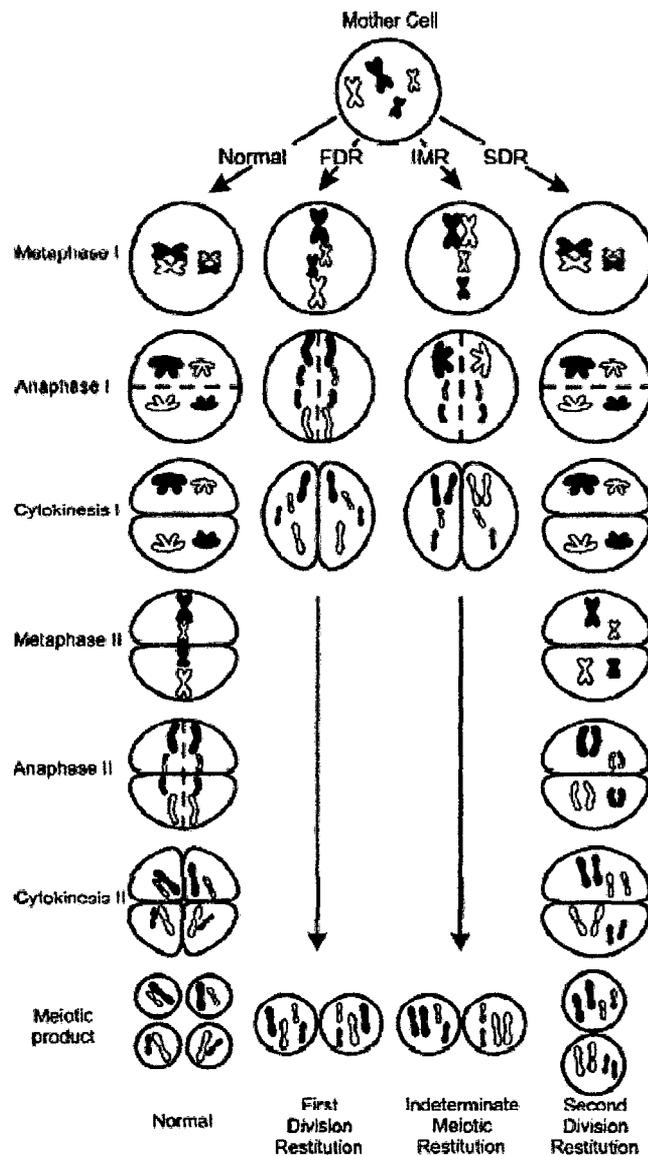


Figura 6. Representación esquemática del proceso meiótico normal y los tres mecanismos de restitución meiótica.

FUENTE: Barba-Gonzalez *et al.*, 2004.

Los gametos no reducidos (Figura 7) son de gran interés en el mejoramiento genético de la papa, ya que facilitan la poliploidización sexual y a la vez proporcionan un método muy efectivo para transmitir la diversidad genética de las especies diploides ($2x$) al nivel tetraploide ($4x$). Pueden ser detectados por la ocurrencia de una progenie tetraploide cuando se realizan cruzamientos $4x \times 2x$ (polen $2n$) o $2x \times 4x$ (huevos $2n$), con una distribución bimodal del diámetro del polen y la presencia de tétradas, díadas y/o tríadas en el estadio de formación de microsporas.

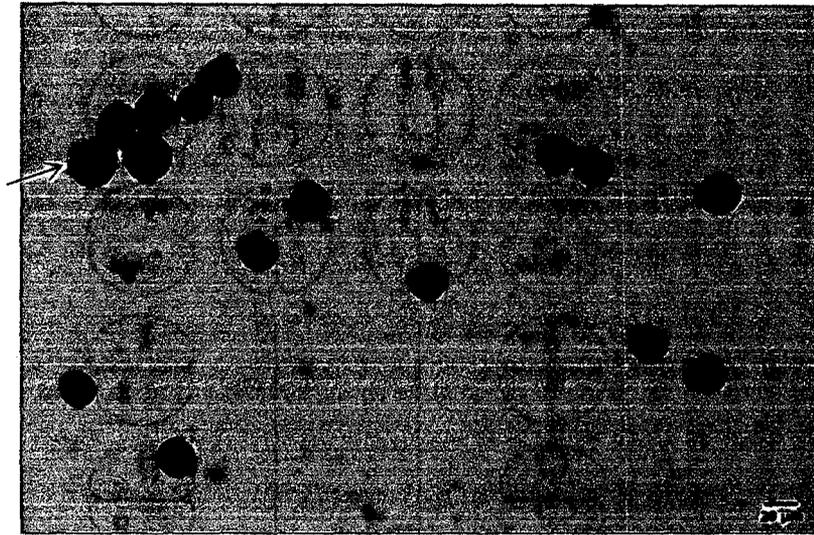


Figura 7: Observación de gametos no reducidos (polen $2n$), señalados por una flecha, a un aumento de 200x. Barra=20um.

2.7 POLIPLOIDIZACIÓN SEXUAL

La poliploidización sexual es el proceso por el cual se produce una descendencia cuyo número de cromosomas es mayor del que se esperaría si cada uno de los progenitores aportara la mitad del número de cromosomas que posee. Este proceso puede ser unilateral o bilateral; y generalmente, ocurre como consecuencia de la fusión en la fertilización, de gametos no reducidos (Carputo *et al.*, 2003).

La poliploidización sexual es el método más eficiente y de fácil aplicación para restaurar el nivel tetraploide comparado con la poliploidización asexual debido a que originará progenies con varios grados de heterocigosis y variabilidad genética, evitando la endocria en una medida que dependerá del modo de formación de los gametos $2n$ y del número de entrecruzamientos por brazo cromosómico (Camadro, 1986; Khan *et al.*, 2010).

La poliploidización asexual se realiza mediante la aplicación de agentes antimitóticos en tejidos somáticos o por regeneración de plantas a partir de callos derivados de tejido foliar en cultivos *in vitro*, o por fusión de protoplastos.

2.7.1 POLIPLOIDIZACIÓN SEXUAL UNILATERAL

La poliploidización sexual unilateral ocurre en cruces interploides, en los cuales uno de los parentales posee gametos no reducidos. Los cruzamientos pueden ser: $2x \times 4x$ o $4x \times 2x$; dependiendo de si el parental masculino o el femenino presentan los gametos reducidos, respectivamente (Ortiz *et al.*, 2009).

La Figura 8 muestra las contribuciones genómicas involucradas en la formación de un híbrido producto de un cruce $4x \times 2x$.

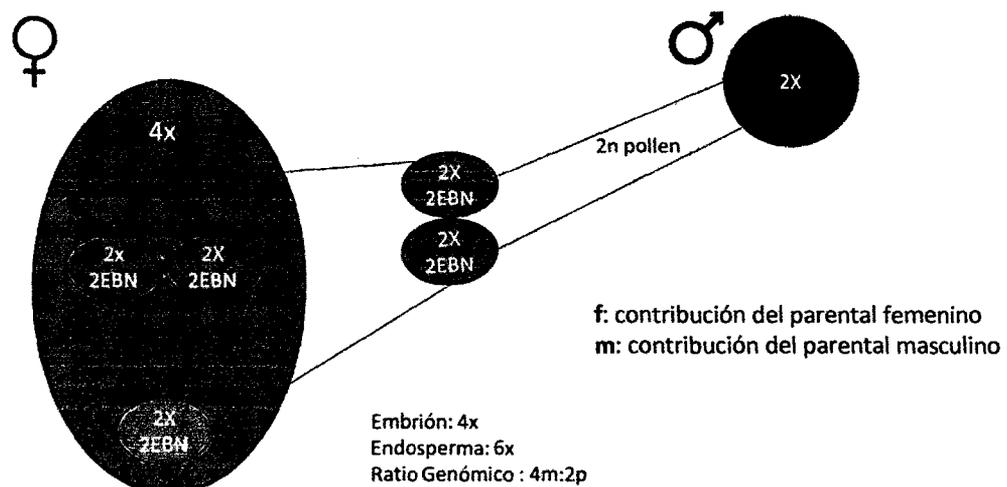


Figura 8. Relaciones genómicas en la formación de un embrión híbrido producto de un cruzamiento $4x \times 2x$.

FUENTE: Elaboración propia.

No son recientes los esfuerzos por parte de los mejoradores de papa de utilizar esta metodología;

Ortiz et al. (1991) realizaron cruzamientos $4x \times 2x$, y como parentales masculinos utilizaron híbridos que tenían un fondo genético de diferentes especies silvestres como *S. sparsipilum*, *S. chacoense* y *S. verneii*, para obtener una progenie híbrida tetraploide a la que se le evaluó esterilidad masculina, producción de polen $2n$ y rendimiento en diferentes ambientes.

Mientras que, Carputo et al. (1997) utilizaron la poliploidización sexual unilateral dentro de un esquema de mejoramiento para la introgresión de germoplasma de *S. commersonii* en el fondo genético de *S. tuberosum*. Luego de una serie de retrocruzamientos lograron obtener genotipos tetraploides que combinaban características favorables de ambos parentales.

Buso et al. (2003) generaron seis familias tetraploides, a partir de nueve clones élite tetraploides y tres genotipos dihaploides derivados de *S. tarijense* y *S. berthaultii*, y evaluaron las familias generadas para las características de rendimiento, madurez y apariencia general del tubérculo, encontrando familias que superan a los mejores clones tetraploides en rendimiento, pero que mostraron madurez tardía. Así, las mejores familias, representarían nuevas fuentes de alelos potencialmente útiles para el mejoramiento, en particular para incrementar el rendimiento del tubérculo por encima del rendimiento de cultivares élite.

En relación a la utilización de la poliploidización sexual unilateral para estudiar la resistencia a tizón tardío; Park et al. (2005) realizaron cruzamientos entre un tetraploide resistente a tizón tardío derivado de un clon híbrido ABPT (A, B, P y T indican *S. acaule*, *S. bulbocastanum*, *S. phureja* y *S. tuberosum*, respectivamente), y un parental diploide susceptible RH89-039-16, que producía polen $2n$; para generar una progenie (RH4X-103), a fin de identificar su resistencia utilizando prueba de hojas sueltas, luego mapearon el gen de resistencia identificándolo como *Rpi-ABPT* y construyeron un mapa de alta resolución del locus *Rpi-ABPT*.

Finalmente, sus resultados sugieren que *S. bulbocastanum* es la especie donante de la resistencia transmitida a la progenie generada.

2.8. PHYTOPHTHORA INFESTANS (MONT) DE BARY

Phytophthora infestans pertenece a una clase denominada oomiceto, la cual está compuesta de un grupo diverso de microorganismos eucarióticos parecidos a hongos. El hemibiotrófico estilo de vida de *P. infestans* (Figura 9) ha sido extensivamente estudiado, y comprende tres pasos básicos, formación de micelio en la planta huésped, la expansión espacial de la zona de la lesión afectada en la planta huésped y, la formación y dispersión de las esporas (Park *et al.*, 2009).

Phytophthora infestans tiene diferentes formas de esporas como zoosporas producidos por la auto-reproducción y oosporas producidos por reproducción sexual. Ciclos de reproducción sexual y asexual, que a la vez producen diferentes formas de esporas: oosporas y zoosporas, respectivamente.

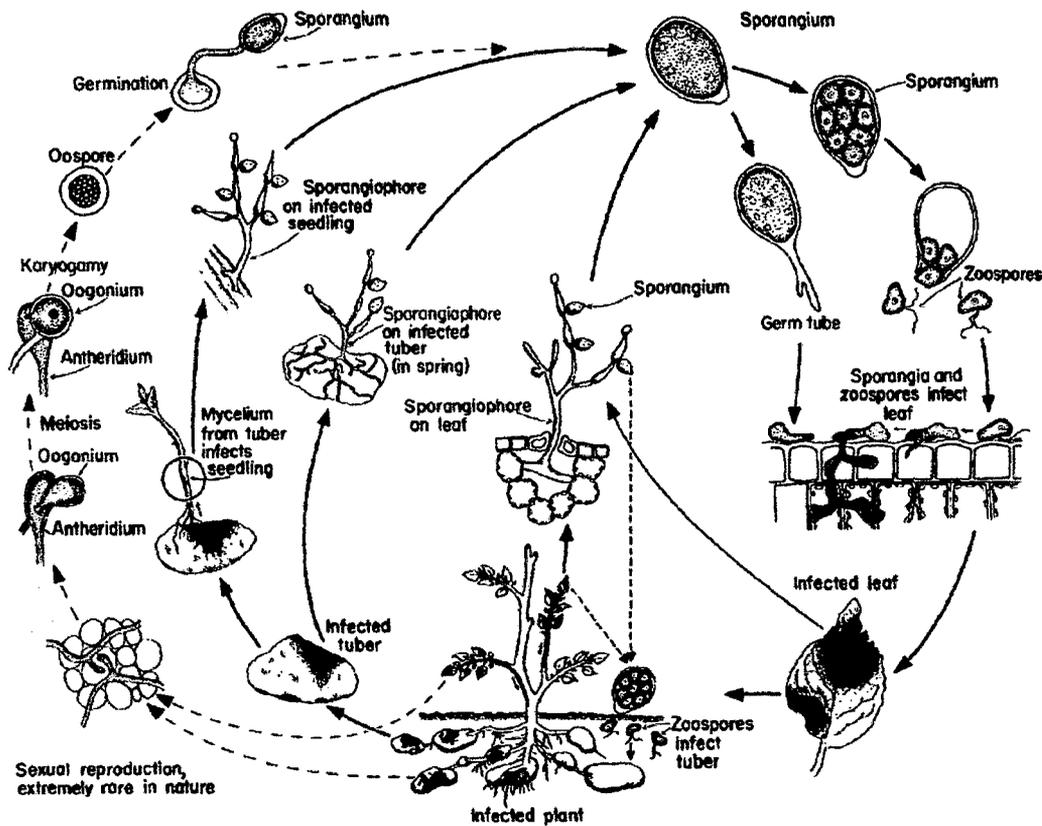


Figura 9. Ciclo de vida de *Phytophthora infestans*.

FUENTE: Agrios, 1997

La reproducción sexual ocurre entre los tipos de apareamiento A1 and A2. En 1950, el tipo de apareamiento A2 fue descubierto en México y alrededor de 1970, se extendió por todo el mundo (Fry *et al.*, 1993).

Forbes *et al.* (1997) señalaron que existe un riesgo de la reproducción sexual del patógeno en las zonas de producción de papa cerca de la frontera entre Perú y Bolivia, porque las poblaciones de *P. infestans* documentadas en el Perú tienen el tipo de apareamiento A1, mientras que las colectas de Bolivia tienen el tipo de apareamiento A2. Aunque la recombinación y la migración entre poblaciones de *P. infestans* podría conducir a aumentar los riesgos tanto para los productores de papa y para los recursos fitogenéticos de los Andes, también podrían ayudar a la identificación de sitios útiles de detección de resistencia para programas de mejoramiento de papa (Clayton y Shattock., 1995).

Durante los estadios iniciales de la infección, *P. infestans* secreta abundantes efectores dentro del espacio extracelular de la planta y el citoplasma; estos efectores pueden ser de dos tipos:

- Los efectores apoplásticos interactúan con los objetivos intracelulares tales como receptores de membrana o proteínas. Estas se pueden clasificar en: inhibidores de enzimas, pequeñas proteínas ricas en cisteína y la familia similar a Nep1 (NPL).
- Los efectores citoplasmáticos se transportan dentro de la célula de la planta a través de un haustorio y están representados por dos clases: la familia de proteínas *RXLR* y la familia de proteínas Crinkler (CRN) (Kamoun, 2006).

La clase de efectores denominados *RXLR* mantienen un *motif* conservado de: arginina (R), un aminoácido cualquiera (X), leucina (L) y arginina (R), y parecen estar implicados en la translocación del oomiceto a la célula hospedera. Estos efectores presentan dos dominios: dominio N-terminal, que involucra al péptido señal y al *motif* *RXLR*; y el dominio C-terminal que se encarga de realizar la acción elicitora y operativa dentro de la célula huésped (Lamour *et al.*, 2007).

Estudios recientes sugieren que los efectores *RXLR* inducen específicamente la respuesta hipersensible (HR) en presencia de los genes de resistencia (R) en las plantas. Se espera que estos efectores tengan una actividad de avirulencia (*Avr*), activando así

directa o indirectamente la muerte celular, y las respuestas de resistencia a enfermedades asociadas-mediadas por proteínas *R* específicas.

Las funciones por las cuales, los efectores *RXLR* promueven la virulencia están bajo un intenso estudio. Hasta la fecha, las actividades de virulencia de los efectores *RXLR* siguen siendo desconocidas, pero algunos estudios de casos han demostrado que suprimen la inmunidad vegetal como en *PAMP* (patrón molecular asociado a patógenos) (Oh *et al.*, 2010).

Por otro lado, los efectores *CRN* codifican para péptidos que provocan la necrosis de la planta. Los efectores *CRN* poseen una región N-terminal altamente conservada de unos 50 aminoácidos (el dominio *LFLAK*, implicado en la translocación del hospedero). Algunos de los miembros de esta familia de genes inducen la secreción de otras proteínas que favorecen la colonización de la planta (Schornack *et al.*, 2009).

Se han estudiado los efectores para identificar genes *R* y clasificar sus actividades en los sitios de reconocimiento específicos, debido a que los ensayos de efectores podrían acelerar el clonamiento de genes *R* y ayudar a evitar esfuerzos redundantes de clonamiento, de usarse la cisgenesis en la búsqueda de resistencia a *P. infestans* por parte de los mejoradores.

En el primer estudio de este tipo, genes de los efectores *RXLR* extraídos de la secuencia del genoma de *P. infestans* se emplearon en ensayos de expresión de alto rendimiento en planta, de germoplasma de papas silvestres para descubrir las actividades de avirulencia y acelerar la clonación de sus genes *R* afines (Vleeshouwers *et al.*, 2008).

La evaluación de la distribución de variantes de los efectores a través de las poblaciones del patógeno, y ensayos de actividad, ambos de manera conjunta, pueden utilizarse para monitorear las poblaciones del patógeno a fin de responder a una ocurrencia potencial o aparición de razas que superan los genes *R*.

Además, el conocimiento de los genes de *P. infestans* implicados en la infección de las plantas así como su funcionamiento, permitirán diseñar estrategias efectivas en el control de la enfermedad tizón tardío, y nos proporcionará información acerca de la complejidad genética del patógeno y la razón del éxito de su patogenicidad (Landeo *et al.*, 1999; Kirk *et al.*, 2005).

Tizón tardío, es la plaga más devastadora que afecta al cultivo de la papa, reportada en la historia de la humanidad. La enfermedad está presente en todas las zonas paperas del mundo y es considerada la más importante, porque si los campos no están protegidos adecuadamente con aplicaciones planificadas de fungicidas y/o si las condiciones ambientales, son al mismo tiempo, óptimas para el desarrollo del patógeno (12 a 15°C de temperatura y 95 a 100 por ciento de humedad relativa) (Figura 10), los sembríos pueden ser totalmente destruidos en 10 a 15 días aproximadamente (Andersson, 2007).

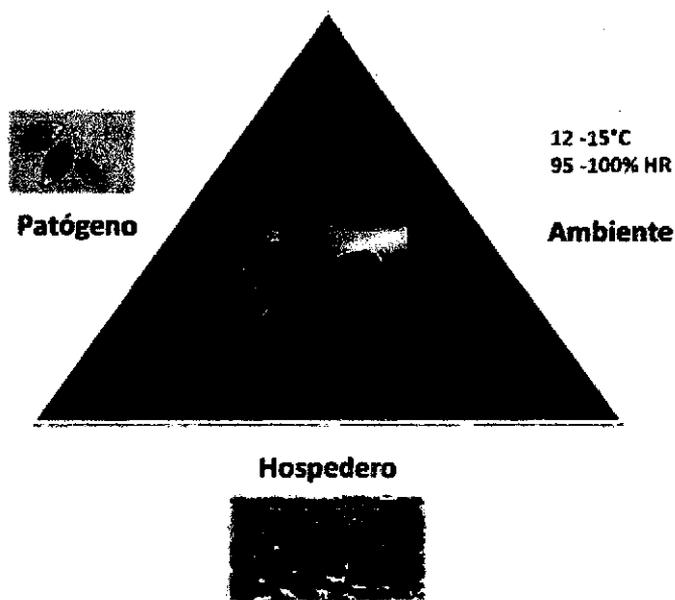


Figura 10. Triángulo que muestra las relaciones involucradas para que se produzca la enfermedad en papa.

FUENTE: Elaboración propia

El tizón tardío se está convirtiendo en una enfermedad reemergente en todo el mundo debido al desarrollo de resistencia en las poblaciones del patógeno a los fungicidas pertenecientes a la fenilamidas y la ocurrencia de genotipos nuevos y más agresivos (Constanzo *et al.*, 2004). En Latinoamérica es considerado un problema altamente prioritario, ya que los daños en las áreas de cultivo son altamente significativos (Figura 11), a pesar, de que en todos los países existe por lo menos unas cuantas variedades moderadamente resistentes, que en general, no corresponden a las principales variedades.

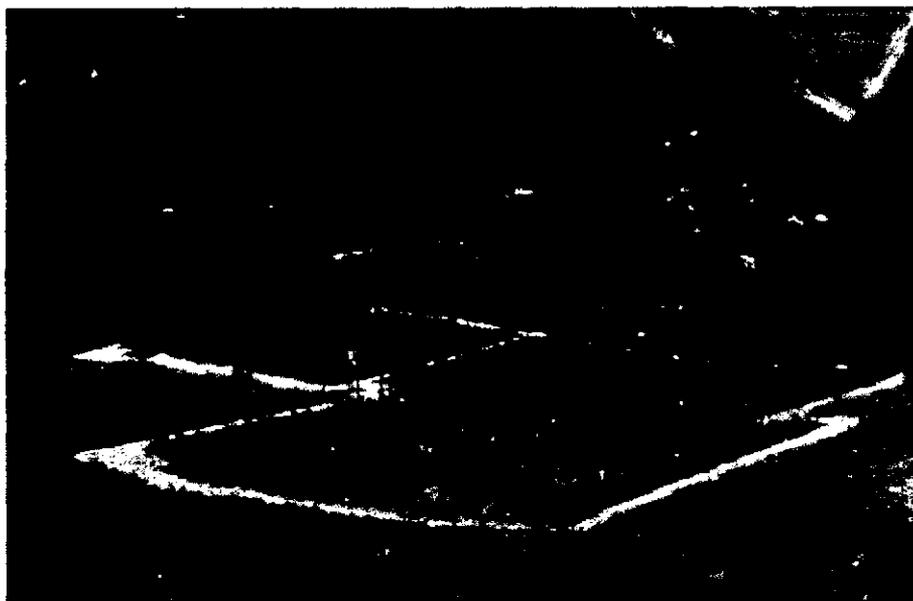


Figura. 11. Campo experimental de híbridos diploides interspecíficos de *S. tuberosum* al final de la infección con *P. infestans*. Se observa la presencia de algunas plantas moderadamente resistentes.

2.9. RESISTENCIA A *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Se han identificado 2 tipos de resistencia a *P. infestans*, una Resistencia Vertical llamada resistencia específica, cualitativa, verdadera, hipersensible a razas, que es monogénica (su control genético está basado en genes mayores de resistencia (genes *R*) que determinan que la resistencia sea efectiva sólo con razas específicas del patógeno) y se hereda de forma mendeliana. A pesar de que ésta resistencia es fácil de identificar y relativamente simple para transferir a través del mejoramiento, sólo es posible utilizarla temporalmente debido a que es vencida rápidamente por la evolución de nuevos patotipos que son más virulentos y agresivos a los genes cualitativos existentes en las plantas hospederas. Esta resistencia actúa retardando el principio de la enfermedad. Y otra Resistencia Horizontal llamada también resistencia no específica, general, cuantitativa, de campo o duradera, que es parcial y poligénica y por tanto es efectiva

contra todas las cepas del patógeno, mostrando una resistencia durable. Se asume que ésta resistencia tiene un carácter cuantitativo debido a que está gobernada por un grupo de genes menores e independientes y se considera que no es específica para una sola raza del patógeno lo que le da un carácter estable, mostrando ésta estabilidad en el tiempo y en el espacio. Se manifiesta con la disminución en la velocidad de propagación de la enfermedad en la planta o con la diferencia en la tasa de destrucción del follaje (Rietman *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2007; Ortiz *et al.*, 1994).

La resistencia vertical y la resistencia horizontal indican la expresión de acciones diferentes de los mismos genes en fondos genéticos diferentes (Kamoun *et al.*, 1998; El Kharbotly *et al.*, 1996). Muchas especies silvestres de *Solanum* poseen altos niveles de resistencia cuantitativa y se consideran potenciales para el Mejoramiento de la Papa (Garry *et al.*, 2005; Staples, 2004), debido a esto muchos países están realizando investigación en resistencia genética, donde el énfasis es resistencia horizontal, aunque la resistencia vertical no está descartada en muchos de los programas de mejoramiento (Lozoya-Saldaña, 2011, Núñez, 2000).

Un aspecto muy importante dentro de estos programas es el monitoreo de las poblaciones del patógeno para poder determinar las medidas de control de la enfermedad, más acertadas para cada lugar.

El conocimiento sobre las razas de *P. infestans* presentes en una determinada zona, la resistencia de estos aislamientos a fungicidas sistémicos, la agresividad, etc.; contribuyen a diseñar estrategias de manejo integrado oportunas y eficaces, que involucren la selección de variedades resistentes, empleo de fungicidas adecuados, etc.

Es común en trabajos de búsqueda de resistencia, usar aislamientos locales del patógeno con amplia virulencia, evitando así el uso de aislamientos foráneos, que pondrían en mayor riesgo a los hospedantes establecidos en una determinada zona agrícola. La confirmación de la resistencia de los genotipos evaluados puede ser comprobada en cada lugar, validando así los resultados obtenidos.

La mayoría de los trabajos de investigación realizados en el Perú utilizan razas complejas, entre ellas, los aislamientos más utilizados son: *POX-067*, perteneciente al linaje clonal *EC-1*, con genes de avirulencia *R1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11*; el empleo de este aislamiento permite seleccionar material genético libre de la mayoría de genes de

resistencia conocidos, a excepción de los genes *R8* o *R9* de los 11 genes *R* reportados, además, existen otras cepas *PCO055*, *PCO002*, y *PSR19*.

Es importante resaltar que a la fecha existen 11 genes *R* identificados claramente, y que estos son solamente una muestra de los genes *R* totales presentes en las especies cultivadas y silvestres de papa, pues se presume la posibilidad que el número sea aún mayor (Świeżyński *et al.*, 2000); lo cual implicaría también una mayor variabilidad del patógeno con respecto al número de factores de virulencia que se podría encontrar en las razas.

Cuando el patógeno expresa un gen *Avr* y la planta expresa el gen *R* correspondiente, se induce una respuesta hipersensible y la infección se detiene. A este fenómeno se lo llama interacción incompatible (I). Por otro lado, cuando un gen *Avr* es expresado sin que tenga su gen *R* correspondiente en la planta, la respuesta hipersensible no es activada y la enfermedad se produce. A este último, se lo denomina interacción compatible (C) (Taylor, 1996).

Entender los modelos de interacción planta-patógeno resulta indispensable para generar eficientes sistemas de manejo del cultivo.

Las pruebas más extendidas para evaluar la resistencia de las plantas al patógeno en cuestión son:

-Tamizado en campo

Consiste en evaluar bajo condiciones naturales, en un campo de cultivo un conjunto de plantas, en un lugar donde la presión del patógeno es alta, con una buena combinación de razas y donde las condiciones climáticas sean óptimas para el patógeno, es decir una zona endémica para la enfermedad.

Una alternativa si la zona no tiene una alta presión de la enfermedad es una adicional inoculación artificial del patógeno con aislamientos seleccionados. La resistencia se evalúa empleando una escala en porcentaje o grado de severidad en el tiempo.

-Tamizado en invernadero:

Consiste en la inoculación artificial de un conjunto de plantas dentro de un invernadero controlado para las variables de temperatura y humedad relativa, y se registra la severidad de la enfermedad por lecturas, como en el caso anterior, utilizando la escala de AUDPC.

-Tamizado en laboratorio:

Consiste en las inoculaciones sobre una planta, un conjunto de plántulas o en folíolos dentro de las condiciones controladas de un laboratorio.

La ventaja es que se puede evaluar un gran número de muestras. Se va cuantificando en el tiempo el área de las lesiones y los otros componentes.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Citogenética y en el campo experimental del Centro Internacional de la Papa (CIP) en La Molina, Lima (12°07'63"S, 76°94'84"W, 244 m.s.n.m); en los invernaderos #42 y #43 de la Estación Experimental Santa Ana en Huancayo, Huancayo, Junín (12°07'S, 75°14'W, 3280 m.s.n.m) y en un campo experimental ubicado en Monobamba, Jauja, Junín (11°21'40"S y 75°19'31.9"W, 1489 m.s.n.m).

3.2. MATERIALES

3.2.1. Materiales Biológicos

-Para Cruzamientos:

- **Receptores de la Resistencia:**

Catorce clones tetraploides ($2n=4x=48$), como parentales femeninos, a los cuales se les denominará en conjunto como "AdvClones" (Anexo I, Tabla 1):

Ocho clones *S. tuberosum spp tuberosum* pertenecientes a la población LTVR (Población resistente a virus y adaptada a trópicos bajos); cuatro clones *S. tuberosum spp andigena*; pertenecientes a la población B3 (Población adaptada a trópicos altos) y dos variedades de *S. tuberosum spp tuberosum*.

- **Donadores de la Resistencia:**

Catorce híbridos diploides, con resistencia a *P. infestans*, que provienen de cruces de especies del grupo Phureja (*S. phureja*) y Stenotomum (*S. stenotomun* y *S. goniocalyx*), todas ellas con EBN=2, con especies diploides silvestres de los grupos Piurana (*S. paucissectum* y *S. chiquidenum*; EBN=2); Megistracroloba (*S. sogarandinum*, EBN=2) y Tuberosa (*S. cajamarquense*, EBN=1?), con porcentaje de polen 2n alto (mayor de 2 por ciento), como parentales masculinos. (Anexo I, Tabla 2).

A estos parentales se les renombrará como Hyb *chq*, por proceder de *S. chiquidenum*, Hyb *pcs* por proceder de *S. paucissectum*, Hyb *cjm*, por proceder de *S. cajamarquense* e Hyb *sgr*, por proceder de *S. sogarandinum*.

-Para la prueba de hojas sueltas

- Se utilizó la raza compleja *PCO055* de *P. infestans*, que presenta los genes de virulencia *R 1, 2, 3, 4, 6, 7,8, (9), 10, 11*, a excepción del gen *R5* de los 11 genes *R* conocidos de *S. demissum*; y la raza compleja *PCO002*, que presenta los genes de virulencia *R 1.2.3.6.7.10.11*, a excepción de los genes *R4, 5, 8, 9* de los 11 genes *R* conocidos de *S. demissum*.

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. DISEÑOS EXPERIMENTALES

3.3.1 1. VIABILIDAD DE POLEN

Se evaluó la viabilidad del polen de los parentales masculinos mediante la tinción de los granos de polen con el colorante Gelatina Acetocarmín Glicerol al 2 por ciento. El polen se recolectó en cápsulas de gelatina por vibración mecánica de las flores, con un cepillo eléctrico acondicionado como vibrador, se tomó una pequeña cantidad de la muestra con

la punta de un palillo de madera, colocándose en el centro de una lámina portaobjetos que contenía una a dos gotas del colorante, y se procedió a remover ligeramente para después proceder a cubrirla con una laminilla cubreobjeto.

Utilizando un microscopio óptico Modelo BH2 (Olympus America, Inc), se evaluaron 250 granos de polen por genotipo; registrándose cualquier condición resaltante de la morfología del polen como polen no coloreado, vacío o que presente alguna anomalía como eclipse de esterilidad o polen doble. Asimismo, se evaluó la viabilidad de polen de aquellos híbridos seleccionados después del primer tamizado en campo utilizando la metodología mencionada anteriormente. Se utilizó la siguiente escala (Tabla 4) para clasificar a los individuos en base al porcentaje de viabilidad de polen que presentan.

Tabla 4. Escala de viabilidad de polen.

Escala	Rangos	Descripción de la viabilidad
1	0	Estéril
3	>0 ≤ 50	Bajo
5	>50 < 80	Moderado
7	≥80 - 100	Alto

FUENTE: Ordoñez., 2014

3.3.1.2. CRUZAMIENTOS

Se estableció y ejecutó un plan de cruzamientos en los invernaderos de la Estación Experimental Santa Ana del CIP-Huancayo, Huancayo, Junín (12°07'S, 75°14'W, 3280 m.s.n.m), durante los meses de Noviembre a Marzo del 2011. Se sembraron los 14 genotipos élite tetraploides (con resistencia a virus y características agronómicas deseables) y los 14 híbridos interespecíficos diploides (provenientes de cruces entre nativas diploides y silvestres del Grupo Piurana, Megistracroloba y Tuberosa) con

resistencia cuantitativa a *P. infestans*, que previamente se habían tamizado en condiciones de infección natural en dos ambientes endémicos a ésta.

Se plantaron un mínimo de seis tubérculos por cada parental utilizado. Antes de realizar los cruzamientos se verificó la ausencia del viroide causante del tubérculo fusiforme de la papa (PSTVd, por sus siglas en inglés) y del virus T de la papa (PVT, por sus siglas en inglés) en todos los genotipos, para asegurar la fitosanidad de éstos. Las plantas se sembraron en forma encimada, en macetas N° 7 con sustrato preparado, así se evitó la formación de estolones y tubérculos, promoviéndose una mayor floración. La emasculación se realizó en estadio de botón y la colección del polen se hizo de flores maduras, próximas a la dehiscencia. Las polinizaciones se llevaron a cabo durante la mañana con polen fresco o aquel colectado el día anterior o máximo con dos días de conservación en cápsulas de gelatina, en condiciones de preservación con silicagel en una refrigeradora (Kenmore, Inc.) a 4°C de temperatura. Se polinizaron un mínimo de 10 flores por cada genotipo. Las bayas generadas de los cruzamientos, se cosecharon aproximadamente a los 48 días después de la polinización, las bayas se dejaron madurar al medio ambiente en el interior de bolsas de papel hasta que estuvieron suaves al tacto y emitían un olor característico (como de pepino dulce), momento en el cual se procedió a la extracción de la semilla.

Las semillas se trataron con una solución de 1500 ppm (partes por millón) de ácido giberélico (Sigma-Aldrich, USA, Inc) por 24 horas para romper su dormancia y lograr una germinación uniforme dentro de placas de Petri.

Se registró el número de polinizaciones (p) realizadas así como el número de bayas (b) y semillas (s) generados por cada cruzamiento, de tal manera de hallar la eficiencia del cruzamiento (CE), que se calcula: [(semillas/bayas)/polinizaciones].

Una vez que estuvieron lo suficientemente desarrolladas, las plántulas, se trasplantaron a pequeñas macetas pre fabricadas (Jiffystrips N°7, Jiffy Products, Shippagan, Canadá) con sustrato Promix Bx (Premier Brands, Inc, Stanford Ct), que contiene los elementos necesarios para el adecuado crecimiento de las plantas; transcurridos 35 días, se trasplantaron a macetas N° 7, para su posterior mantenimiento en invernadero. Cuando las plantas estuvieron bien establecidas en el invernadero, se propagaron 15 esquejes de cada uno de todos los genotipos., 10 de los cuales se reservaron para el primer tamizado en campo y los otros cinco como una reserva para las evaluaciones posteriores.

3.3.1.3 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A *P. INFESTANS* DE LOS HÍBRIDOS GENERADOS, MEDIANTE TAMIZADO EN CAMPO BAJO INFECCIÓN NATURAL, UTILIZANDO UN DISEÑO ALFA LÁTICE CON DOS REPETICIONES

Preparación del terreno

Se realizó la preparación de terreno y surcado (0.90 m entre surco) de manera oportuna.

Siembra

Se sembraron 5 esquejes de cada genotipo por repetición; a un distanciamiento de 0.9 m entre surcos y 0.30 m entre esquejes. Rodeando toda la parcela experimental se sembraron los infectores (var. Tomasa Condemayta y Perricholi), variedades que sirven para mantener una fuente de inóculo constante dentro del experimento durante todo el ciclo del cultivo. La siembra se efectuó el 31 de Diciembre del 2012 en un campo experimental ubicado en Monobamba, Jauja, Junín (11°21'40"S y 75°19'31.9"W, 1489 m.s.n.m).

Diseño Experimental

El modelo lineal para el diseño alfa es:

$$y_{ijk} = \mu + t_i + r_j + b_{jk} + e_{ijk}$$

Donde:

y_{ijk} : valor de la característica observada para los i_{th} tratamientos recibidos en el bloque k_{th} dentro de la repetición j_{th} (superbloque),

t_i : efecto fijo del tratamiento i_{th} ($i = 1, 2, \dots, t$); r_j es el efecto de la repetición $-th$ (superbloque) ($j = 1, 2, \dots, r$);

b_{jk} : efecto del bloque incompleto k_{th} dentro de la repetición j_{th} ($k = 1, 2, \dots, s$) y

e_{ijk} : error experimental asociado con la observación del tratamiento i_{th} en el bloque incompleto k_{th} dentro de la repetición completa j_{th} .

Labores Culturales

-Abonamiento: se utilizaron las siguientes fuentes: Cloruro de potasio (K), Superfosfato de Calcio triple (PO₂), Urea (N), Nitrato de Amonio (N) con una dosis de N P K (120-180-100). A la siembra se aplicó el 50 por ciento de la fuente de Nitrógeno y el 100 por ciento de las fuentes de Fósforo y Potasio, respectivamente. En el momento del aporque se aplicó el restante 50 por ciento de la fuente de Nitrógeno.

-Deshierbo: La eliminación de malezas se llevó a cabo manualmente como medida de control de enfermedades.

-Aporque: Proporciona el soporte necesario a la planta y cubre los estolones, proporcionando un ambiente propicio para una adecuada tuberización, se realizó a los 45 días después de la siembra.

-Control Fitosanitario: La protección con el fungicida (Mancozeb, Drokasa Perú, S.A.) se realizó cada cinco días hasta los 45 días después de la siembra, realizándose un total de nueve aplicaciones, para permitir un buen desarrollo vegetativo, posterior a esa fecha las plantas se dejaron expuestas al patógeno para la infección natural.

Evaluación

A los 45 días después de la siembra, se iniciaron las evaluaciones de la severidad de la infección utilizando la escala desarrollada por el CIP basada en una calificación visual. Las lecturas se tomaron a intervalos de cinco días, resultando un total de ocho lecturas en el tiempo. Se cuantificó la enfermedad, expresada en porcentaje de infección que ocurre en cada unidad experimental (cinco plantas por surco) según la siguiente escala:

- **HR:** Altamente resistente a tizón tardío
- **R:** Resistente a tizón tardío.
- **MR:** Moderadamente resistente a tizón tardío.
- **MS:** Moderadamente susceptible a tizón tardío.
- **S:** Susceptible a tizón tardío.
- **HS:** Altamente susceptible a tizón tardío.

El Área bajo la curva del Progreso de la Enfermedad (AUDPC, por sus siglas en inglés), utilizado para evaluar la severidad del daño ocasionado por el oomiceto, es un parámetro adimensional; valores bajos corresponden a individuos resistentes y valores altos a susceptibles. Este parámetro se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{AUDPC} = n \{(X_i + X_{i+1})/2\} T_i$$

Donde:

X_i : Porcentaje de severidad del daño causado por *P. infestans* en el follaje en la fecha i .

T_i : Tiempo en días transcurridos desde el establecimiento del transplante a la i -ésima lectura del daño causado por *P. infestans*.

n : número total de lecturas.

Otra variable complementaria, es el AUDPC relativo (RAUDPC). El RAUDPC se calcula dividiendo el AUDPC entre el *máximo AUDPC potencial*.

El *máximo AUDPC potencial* es el AUDPC que tendría una variedad o clon si tuviera 100 por ciento de infección en todas las lecturas. El *máximo AUDPC potencial*, se calcula multiplicando el número total de días entre la primera y la última lectura por 100 (Forbes *et al.*, 1993).

Asimismo, se utilizó la escala de valores del 0 al 9, desarrollada por Yuen y Forbes (2009) para evaluar el progreso y la severidad del daño ocasionado, denominada SAUDPC.

Esta se calcula a partir de los valores de AUDPC; sin embargo, para usar esta escala se requiere tener un cultivar susceptible como referencia en todos los experimentos que van a ser comparados.

La escala de valores de susceptibilidad (SAUDPC) se calcula usando la siguiente fórmula:

$$Sx = Sy \frac{Dx}{Dy}$$

Donde:

Sy y Dy representan, el valor de la escala de susceptibilidad asignada y la medida de la enfermedad observada (AUDPC) para el genotipo estándar, respectivamente; y,

Sx y Dx representan, el valor de la escala de susceptibilidad calculada y la medida de la enfermedad observada para el genotipo en cuestión, respectivamente.

Así, se divide el valor de la susceptibilidad asignada al testigo por la medida de resistencia del testigo (AUDPC) para generar una constante. Esta puede ser multiplicada luego por la medida de resistencia de cada cultivar de interés para obtener el valor de la susceptibilidad de ese genotipo (Forbes *et al.*, 2014).

Los tratamientos de estudio fueron los híbridos generados y sus respectivos parentales. Se incluyeron como testigos a los genotipos LBr_40 (CIP 387164.4) que se comporta como resistente (R), Atzimba (CIP 720045) y Monserrate (CIP 720071), ambas, como moderadamente resistentes (MR), Yungay (CIP 701209) como susceptible (S) y Tomasa Condemayta (CIP 720072) como altamente susceptible (HS).

Como infectores, es decir clones que se siembran alrededor de las parcelas a fin de mantener la fuente de inóculo constante dentro del experimento, se utilizaron las variedades Tomasa Condemayta (HS) y Perricholi (MR).

Las lecturas de severidad concluyeron cuando el testigo susceptible alcanzó el 100 por ciento de severidad.

Se seleccionaron aquellos híbridos que mostraron un nivel de resistencia de moderado, resisten y altamente resistente (MR, R y HR), según los valores de AUDPC, RAUDPC y SAUDPC, para su siembra y evaluación por características agronómicas, a partir de los esquejes que se mantuvieron en invernadero.

3.3.1.4 EVALUACIÓN MORFO-AGRONÓMICA DE LOS HÍBRIDOS SELECCIONADOS UTILIZANDO UN DISEÑO ALFA LÁTICE CON DOS REPETICIONES

Preparación del terreno

La preparación de terreno y surcado (0.90 m entre surco) se realizó siguiendo el calendario experimental del CIP.

Siembra

Se sembraron cinco tubérculos de cada genotipo por repetición. El distanciamiento fue de 0.9 m entre surcos y 0.30 m entre tubérculos. La siembra se efectuó en el mes de Junio del 2013, en un campo experimental del CIP, en La Molina, Lima (12°07'63"S, 76°94'84"W, 244 m.s.n.m).

Labores Culturales

-Abonamiento: se utilizaron las siguientes fuentes: Cloruro de potasio (K), Superfosfato de Calcio triple (PO₂), Urea (N), Nitrato de Amonio (N) con una dosis de N P K (180-160-160). A la siembra se aplicó el 50 por ciento de la fuente de Nitrógeno y el 100 por ciento de las fuentes de Fósforo y Potasio, respectivamente. En el momento del aporque se aplicó el restante 50 por ciento de la fuente de Nitrógeno.

-Deshierbo: La eliminación de malezas se llevó a cabo manualmente como medida de control de enfermedades.

-Aporque: Proporciona el soporte necesario a la planta y cubre los estolones, proporcionando un ambiente propicio para una adecuada tuberización, se realizó a los 45 días después de la siembra.

-Control Fitosanitario: Se aplicaron fungicidas y/o insecticidas ante la presencia de plagas y/o enfermedades.

Cosecha

La cosecha se realizó en forma manual de cada unidad experimental para las respectivas evaluaciones. Se evaluaron número y peso de tubérculos por híbrido por repetición (Núm. tub/plt y Peso tub/plt).

3.3.1.4.1 Variables Morfoagronómicas

La evaluación morfoagronómica comprendió la evaluación de las variables de vigor y de uniformidad de la planta, número y longitud de estolones, entre ellas:

I Vigor de la planta

A los 45 días después de la siembra, siguiendo la siguiente escala:

Escala	Estado	Descripción
1	Muy débil	Todas las plantas pequeñas < 20 cm. o con follaje escaso, plantas débiles, tallos muy delgados, y color pálido.
3	Débil	La mayoría (75 %) de las plantas pequeñas < 20 cm. o todas de un porte de 20-30 cm. con follaje escaso, plantas débiles, tallos delgados, y color pálido.
5	Medio	Las plantas muestran un porte intermedio.
7	Vigoroso	La mayoría de las plantas (75%) de un porte > de 50 cm. con buen follaje, plantas robustas, tallos gruesos, y hojas bien desarrolladas.
9	Muy vigoroso	Todas las plantas > 70 cm. con cobertura 100 % del surco. Plantas muy robustas, tallos muy gruesos, y follaje muy abundante.

FUENTE: De Haan *et al.*, 2014

II Uniformidad de la planta

Apreciación visual de las plantas, teniendo en consideración el tipo, porte de la planta, vigor y floración, se realizó a los 45 a 50 después de la siembra.

Escala	Estado	Descripción
1	Muy desuniforme	Completamente heterogénea en tamaño, vigor y estadio de desarrollo
3	Desuniforme	La mayoría de las plantas (75%) muestran cierta heterogeneidad en tamaño, vigor y estadio de desarrollo.
5	Medio	Las plantas muestran un promedio de uniformidad.
7	Uniforme	La mayoría de las plantas (75%) muestran homogeneidad en tamaño, vigor y estadio de desarrollo.
9	Muy uniforme	Casi el 100% de las plantas muestran completa homogeneidad en tamaño, vigor y estadio de desarrollo.

FUENTE: De Haan *et al.*, 2014

III Número de estolones

Evaluación general en base a la inspección de estolones.

Escala	Estado	Descripción
1	Muy pocos	No presentan estolones o muy escasos (0 a 4).
3	Pocos	De 5 a 10 estolones.
5	Medio	De 11 a 15 estolones.
7	Alto	De 16 a 25 estolones.
9	Muy alto	Más de 25 estolones.

FUENTE: De Haan *et al.*, 2014

IV Longitud de estolones

Evaluación general en base a la medición de los estolones.

Escala	Estado	Descripción
1	Muy corto	$X \leq 20$ cm de longitud.
3	Corto	$20 \text{ cm} < X \leq 40$ cm longitud.
5	Medio	$40 \text{ cm} < X \leq 60$ cm longitud.
7	Largo	$60 \text{ cm} < X \leq 80$ cm longitud.
9	Muy largo	$X > 80$ cm longitud.

FUENTE: De Haan *et al.*, 2014

3.3.1.5 CONTEO DE CLOROPLASTOS

La determinación del nivel de ploidía de los híbridos seleccionados se realizó utilizando la técnica de conteo del número de cloroplastos en las células guarda de los estomas en la epidermis de los folíolos terminales de las plantas, utilizando la escala propuesta por Huamán (1995) (Tabla 5). Este es un método indirecto y rápido para la determinación de ploidía en papa.

Tabla5. Escala para determinar la ploidía en papa.

Nº de cloroplastos en las células guardia de los estomas	Ploidía
6 - 8	Diploide ($2n=2x=24$)
9 - 11	Triploide ($2n=3x=36$)
12 - 14	Tetraploide ($2n=4x=48$)

FUENTE: Huamán, 1995.

Se colectaron dos o tres folíolos terminales del tercio superior de cada genotipo, luego, con la ayuda de una pinza fina se extrajo el tejido epidérmico del envés del folíolo (de una zona próxima a las nervaduras), y se colocó en una lámina portaobjeto que contenía una gota del colorante Yodo-yoduro de potasio (KI-I₂ EtOH) cubriéndolo suavemente con una laminilla, observándose bajo microscopio Modelo BH2 (Olympus America, Inc).

3.3.1.6 PRUEBA DE HOJAS SUELTAS UTILIZANDO DOS AISLAMIENTOS COMPLEJOS DE *P. INFESTANS*.

Para la prueba de hojas sueltas (DLA, por sus siglas en inglés *detached leaf assay*) se utilizaron los aislamientos *PCO055* (razas 1.2.3.4.6.7.8 (9).10.11) y *PCO002* (razas 1.2.3.6.7.10.11). Estos aislamientos se seleccionaron a causa del espectro de virulencia de sus respectivas razas. El mantenimiento y preparación del inóculo se realizó de acuerdo a los protocolos previamente publicados (Vleeshouwers *et al.* 2000).

Se colectaron tres hojas del tercio superior de cada individuo a evaluar, a los 45 días después de la siembra en La Molina 2013, y se colocaron en placas Petri conteniendo agar (Sigma-Aldrich, USA, Inc) al 1.5 por ciento en el lado abaxial de cada hoja. Se colocó 10 μ l de inóculo, conteniendo una suspensión esporangial de 3000 esporangios/ml (previamente refrigerados a una temperatura de 5- 8°C para promover la liberación de zoosporas), en cada lado de la vena principal de ambas hojas contenidas en una placa de Petri de 14 cm de diámetro. Las placas fueron colocadas bajo oscuridad a 18°C por el lapso de 1 a 3 horas para promover la liberación de zoosporas, luego se incubaron en una cámara de crecimiento a 18°C, 12 horas luz y 95 por ciento de humedad relativa, a fin de propiciar las condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad.

Las lesiones se evaluaron tres días después de la inoculación, determinándose los patrones de resistencia versus susceptibilidad.

Esta prueba ayuda también a evaluar la presencia de genes R conocidos o nuevos.

Un genotipo es considerado:

- **Compatible**, cuando se observan lesiones expandidas (no expresan genes R)
- **Incompatible**, cuando la infección resulta fallida (expresan genes R), o muestra una respuesta hipersensible (manchas necróticas).

Como testigos se emplearon los cultivares con reacciones conocidas: LBr_40, Atzimba, Yungay y Chata_Blanca.

La variable “porcentaje de lesión en la hoja” se transformó a función Arcoseno para analizar el efecto del aislamiento (*PCO055* y *PCO002*) y la interacción híbridos × aislamiento mediante un análisis de variancia combinado considerando a los híbridos como efectos fijos y a los aislamientos como efectos aleatorios.

3.3.1.7. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A *P. INFESTANS* DE LOS HÍBRIDOS SELECCIONADOS, MEDIANTE TAMIZADO EN CAMPO BAJO INFECCIÓN NATURAL, UTILIZANDO UN DISEÑO ALFA LÁTICE CON TRES REPETICIONES.

Los híbridos seleccionados por su resistencia luego del primer tamizado, así como sus respectivos parentales se sembraron en la localidad de Monobamba, Jauja, Junín (11°21'40"S y 75°19'31.9"W, 1489 m.s.n.m), en el mes de Enero del 2014.

Se cuantificaron las mismas variables que en el primer tamizado (AUDPC, RAUDPC y SAUDPC).

Los tratamientos de estudio fueron los híbridos seleccionados y sus respectivos parentales. Se incluyeron como testigos a los genotipos LBr_40 (CIP 387164.4) que se comporta como resistente (R), Atzimba (CIP 720045) y Monserrate (CIP 720071) como

moderadamente resistentes (MR), Yungay (CIP 701209) como susceptible (S) y Tomasa Condemayta (CIP 720072) como muy susceptible (HS).

Como infectores, es decir clones que se siembran alrededor de las parcelas a fin de mantener la fuente de inóculo constante dentro del experimento, se utilizaron las variedades Tomasa Condemayta (HS) y Perricholi (MR).

Las lecturas de severidad concluyeron cuando el testigo susceptible alcanzó el 100 por ciento de severidad de la enfermedad.

3.3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con los resultados de las variables relacionadas a la evaluación de la resistencia (AUDPC, RAUDPC y SAUDPC), para el tamizado de infección natural de *P. infestans*, y las variables relacionadas a la evaluación agronómica (uniformidad y vigor de la planta, grado de floración, número y longitud de estolones, número de tubérculos, peso de tubérculos y rendimiento), se realizó el análisis de variancia y la comparación de medias con el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System 9.2, USA), de cada una de las localidades que se mencionan.

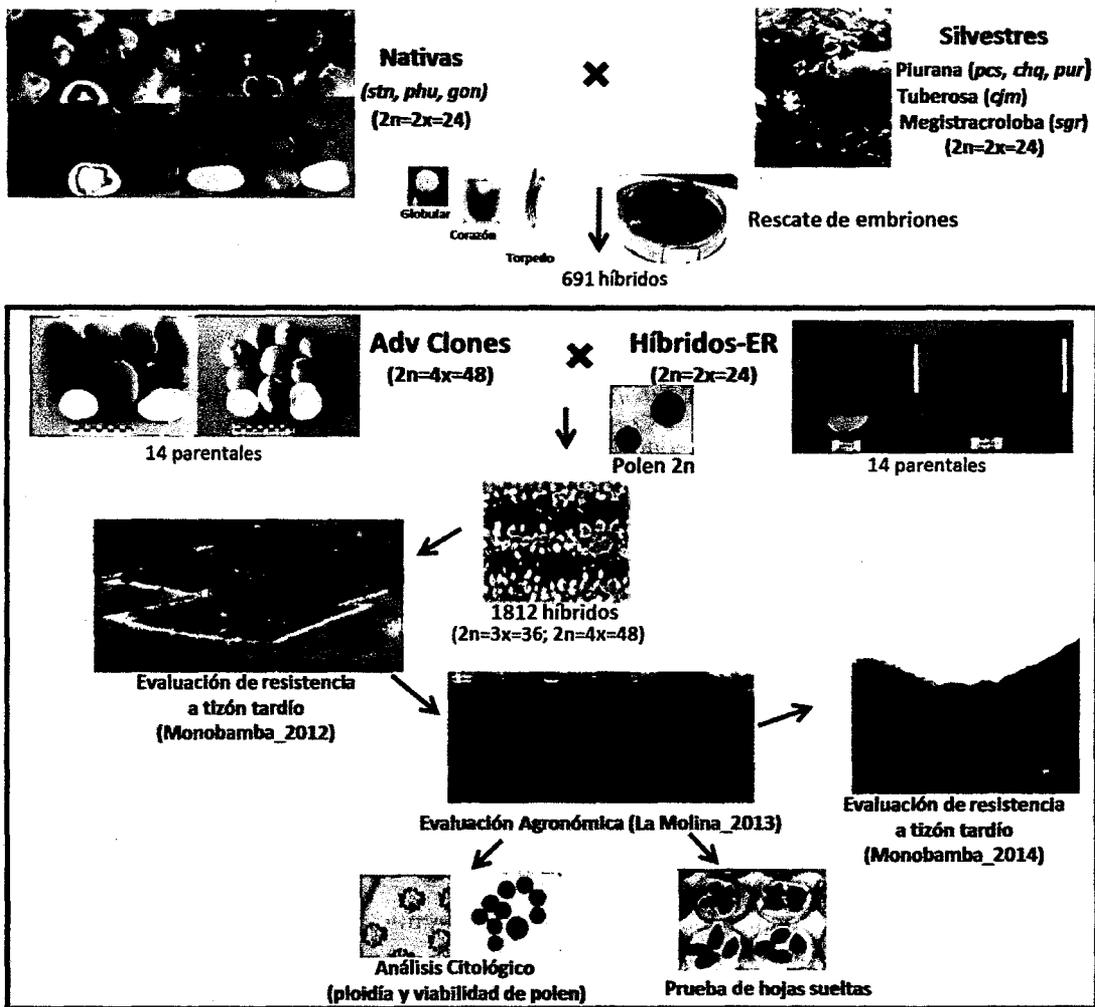


Figura 12. Procedimiento de generación de híbridos interespecíficos provenientes de especies silvestres con resistencia a *P. infestans*. Se presenta dentro de corchetes ([]) de color azul todo lo que incluye la presente tesis.

FUENTE: Elaboración propia

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CRUZAMIENTOS

Debido a la complejidad y el número diferente de híbridos provenientes de especies silvestres de cada grupo taxonómico y los parentales tetraploides; se realizó un agrupamiento según la procedencia de los parentales.

Como resultado de las hibridaciones entre los clones tetraploides avanzados y los híbridos interespecíficos diploides resistentes a *P. infestans*, se generaron un total de 1978 semillas de todas las combinaciones (Tabla 6).

Tabla 6. Comportamiento de los cruces según la procedencia de ambos parentales, indicando el número de parentales involucrados, polinizaciones, número de semillas.

Tipo de cruce	h	m	p	b	s	CE	FN	R
AdvClones × Hyb <i>chq</i>	12	10	764	183	906	0.0064	35	1-136
AdvClones × Hyb <i>pcs</i>	9	2	190	26	191	0.0386	11	1-48
AdvClones × Hyb <i>cjm</i>	14	1	354	212	868	0.0115	14	5-151
AdvClones × Hyb <i>sgr</i>	4	1	36	22	13	0.0164	4	1-5
Total	14	14	1344	443	1978	0.0033	64	1-151

Nota: h= parentales femeninos; m= parentales masculinos; p = polinizaciones; b = bayas; s = semillas; CE = eficiencia del cruzamiento ($\frac{s}{b/p}$); FN=número de familias generadas, R=rango de número de individuos en las familias.

4.1.1 Cruces con híbridos del Grupo Piurana (Hyb *chq* y Hyb *pcs*)

Con respecto a los cruzamiento AdvClones × Hyb *chq*; del total de catorce parentales femeninos, 12 lograron cruzarse exitosamente con los 10 Hyb *chq*. Estos cruces exitosos formaron 183 bayas con un total de 906 semillas. La relación semillas/bayas de 4.95, y la eficiencia del cruzamiento (CE) de 0.0064, la más baja, comparada con las demás combinaciones. En cuanto al número de familias generadas por cruce (FN), 35 para este caso, se puede observar que comparada con las demás combinaciones fue la más numerosa, presentándose el número máximo en una familia con 136 individuos.

Con respecto al cruzamiento AdvClones × Hyb *pcs*, del total de 14 parentales femeninos, solo nueve lograron cruzarse exitosamente con los dos Hyb *pcs*. Estos cruces formaron 26 bayas (b) con un total de 191 semillas. La relación semillas/bayas de 7.35, y la eficiencia del cruzamiento (CE) de 0.0386, la más alta, comparada con las demás combinaciones. El número de familias generadas por cruce (FN) de 11, y el número máximo de individuos en una de estas familias fue de 48.

4.1.2 Cruces con híbridos del Grupo Tuberosa (Hyb *cjm*)

Con respecto al cruzamiento AdvClones × Hyb *cjm*; los 14 parentales femeninos lograron cruzarse exitosamente con el único Hyb *cjm* utilizado, lográndose 212 bayas con un total de 868 semillas. La relación semillas/ bayas fue de 4.09, y la eficiencia del cruzamiento (CE) de 0.0115. El número de familias generadas por cruce (FN) fue de 14, y el número máximo de individuos en una de estas familias fue de 151.

4.1.3 Cruces con híbridos del Grupo *Megistracroloba* (*Hyb sgr*)

Con respecto al cruzamiento AdvClones × *Hyb sgr*, del total de 14 parentales femeninos, solo cuatro de ellos lograron cruzarse exitosamente con el único *Hyb sgr* utilizado, obteniéndose 22 bayas con un total de 191 semillas. La relación semillas/bayas de 0.59 y la eficiencia del cruzamiento (CE) de 0.0164. El número de familias generadas por cruce (FN) fue de cuatro, y el número máximo de individuos en una de estas familias fue de cinco.

Asimismo, es importante resaltar que no todos los cruzamientos resultaron exitosos, a pesar que los parentales masculinos presentaron porcentajes de polen $2n$ mayores a 2 por ciento (Anexo 1-Tabla 2), debido, posiblemente, a la diferencia de ploidía u otras incompatibilidades o incongruencias.

El análisis de la eficiencia del cruzamiento (CE) de los diferentes cruzamientos es de tipo informativo, pues la CE utiliza la relación de semillas/bayas y la hace significativa, dando una ponderación al número de polinizaciones requeridas para obtener la relación semillas/bayas.

Utilizando la CE se elimina el sesgo introducido por la obtención de un gran número de semillas provenientes de pocas bayas pero que requiere un gran número de polinizaciones. Se cree que en la determinación de la cruzabilidad, la relación semillas/bayas elimina la mayor parte de la varianza ambiental, mientras que las polinizaciones incluyen cierta varianza ambiental; por lo tanto cuando los valores de la relación de semillas/bayas parece ser altos, los valores CE correspondientes son menos impresionantes. Así, la cruzabilidad inherente de estos grupos es menor que la esperada de una simple relación semillas/bayas (Jackson y Hanneman, 1999).

Con respecto al comportamiento de los cruzamientos, la tabla 7 presenta los porcentajes promedio de formación de bayas y de semillas en aquellas combinaciones de cruces

exitosos. Los cruzamientos AdvClones × Hyb *cjm* y AdvClones × Hyb *sgr*, son los que presentaron los promedios más altos en formación de bayas, con 59.8 y 61.1 por ciento, respectivamente; el promedio más bajo en formación de bayas fue de 13.7 por ciento y pertenece al cruzamiento AdvClones × Hyb *pcs*; sin embargo, este cruce presentó el valor promedio más alto de semillas/bayas con 7.35, comparado con las demás combinaciones de cruzamientos.

Tabla 7. Comportamiento de los cruzamientos 4x × 2x.

Tipo de cruce ^a	Combinación de cruces exitosos		Semillas/bayas
	Nº	Promedio ^b (%)	Promedio ^c
AdvClones(12) × Hyb <i>chq</i> (10)	35	23.9 ± 0.52	4.95 ± 3.92
AdvClones (14) × Hyb <i>cjm</i> (1)	14	59.8 ± 0.25	4.09 ± 13.5
AdvClones (9) × Hyb <i>pcs</i> (2)	11	13.7 ± 0.15	7.35 ± 1.43
AdvClones (4) × Hyb <i>sgr</i> (1)	4	61.1 ± 0.14	0.59 ± 1.91

^a El número de genotipos involucrados en el tipo de cruzamiento se encuentra entre paréntesis.

^b Promedio de formación de bayas (porcentaje de bayas/flores) de todas las combinaciones de cruzamientos realizados, con su respectiva desviación estándar.

^c Promedio de semillas/bayas entre las combinaciones de cruzamiento exitosas con su respectiva desviación estándar.

Los cruzamientos interespecíficos han contribuido al conocimiento de los mecanismos de evolución en las plantas, especialmente en cuanto al rol de la hibridación (Rieseberg *et al.*, 1995). En la evolución de las especies de papa, la hibridación fue un evento importante, y varios autores han sugerido que más de 10 por ciento de las especies de *Solanum* de la sección Petota son resultado de la hibridación (Cara *et al.*, 2013; Heřmanová *et al.*, 2007). Así, en *Solanum*, no son recientes los intentos de transferir resistencia de diferentes especies silvestres a las especies cultivadas, pero debido a las distintas barreras de incompatibilidad que presentan, a menudo barreras post zigóticas, que incluyen una inviabilidad híbrida que actúa en una etapa muy temprana del

desarrollo, no se llegan a lograr mayores éxitos, limitando la generación de stocks de premejoramiento. Estos intentos de cruzabilidad responden a que la diversidad genética disponible en la papa cultivada está estrechándose de manera vertiginosa como resultado del intensivo mejoramiento y selección entre un grupo limitado de parentales élite. Urge la necesidad de incorporar nuevas fuentes de material genético proveniente de especies silvestres dentro de los materiales mejorados. Budin y Gavrilenko (1994) mencionan que menos del 10 por ciento de las especies silvestres de papa están involucradas en el proceso de mejoramiento.

Una de las metodologías conocidas desde hace mucho tiempo, pero que en la actualidad no está siendo utilizada extensivamente, es la poliploidización sexual unilateral, para la incorporación eficiente de nuevas fuentes de resistencia en los programas de mejoramiento. Esta estrategia de mejoramiento ha sido utilizada para introgresar dentro del fondo genético de la papa cultivada, los genes deseables de varias especies silvestres, entre las cuales, se encuentran: *S. bukasovii*, *S. berthaultii*, *S. chacoense*, *S. commersonii*, *S. multidissectum*, *S. phureja*, *S. tarijense*, *S. sparsipilum*, entre otros (Alberino, *et al.*, 2004; Carputo *et al.*, 1997; Jansky y Peloquin, 2006; Jansky, 2006).

El éxito de las hibridaciones realizadas en la presente investigación confirmó la posibilidad de la transferencia de cromosomas enteros o segmentos a partir de híbridos interespecíficos diploides resistentes a tizón tardío. El efecto positivo y documentado, de la tetraploidización sexual en el rendimiento de la papa parece estar acompañado de una disminución de los caracteres de fertilidad, pero este efecto está ligado al tipo de citoplasma que se hereda de forma materna. Debido a ello, es necesario considerar el tipo de citoplasma del parental femenino para elaborar un diseño eficiente de combinaciones de cruzamientos, el cual puede resultar variable dependiendo del tipo de citoplasma involucrado y las interacciones núcleo-citoplasmáticas resultantes. La importancia de los genomas de los organelos (cloroplasto y mitocondrial) en el mejoramiento genético es debido a que su interacción afecta el fenotipo de los clones mejorados convencionalmente, así, el análisis y conocimiento del tipo de citoplasma, es de suma importancia en los estudios de cruzabilidad en papa (Löss *et al.*, 2000).

El conocimiento del tipo de citoplasma de los parentales femeninos, antes de iniciar los cruzamientos y la consecuente generación de los híbridos resulta sumamente valioso, pues brinda la posibilidad de ampliar la diversidad citoplasmática en el material de premejoramiento y en consecuencia en el material mejorado. De los catorce parentales femeninos (4x) utilizados, seis presentan el citoplasma de tipo D, cinco tipo T, dos tipo W, y uno no fue determinado (Mihovilovich, comunicación personal). Así, los híbridos generados heredan el tipo de citoplasma del parental femenino correspondiente.

Hosaka y Sanetomo (2012) mencionan que entre las combinaciones de cruzamientos en *S. tuberosum ssp. tuberosum* (citoplasma tipo T) y *S. tuberosum ssp. andigena* (citoplasma tipo A), los híbridos provenientes de cruzamientos T × A producen rendimientos más altos que los que provienen de cruzamientos A × T o de cruzamientos T × T (inter-variedades). Por lo tanto, el citoplasma de tipo T se considera atractivo para la mejora de variedades de alto rendimiento, sin embargo, una característica negativa del citoplasma de tipo T es la incidencia de tipos diferentes de esterilidad masculina, que limita la elección de estos como progenitores masculinos. Por otra parte, la presencia de los citoplasmas de tipo D y W/c-derivado de *S. stoloniferum* está incrementándose en el acervo genético de la papa cultivada.

4.1.4 Germinación de híbridos

Las cuatro combinaciones de cruzamientos: AdvClones × Hyb *chq*, AdvClones × Hyb *pcs*, AdvClones × Hyb *cjm* y AdvClones × Hyb *sgr*, generaron 906, 191, 868 y 13 semillas, respectivamente. De un total de 1978 semillas, 1812 germinaron exitosamente, con un porcentaje promedio de germinación total de 91.6; estos resultados se reflejan en la Tabla 8.

Tabla 8. Germinación por tipo de cruzamiento 4x × 2x.

Tipo de cruce	s	sg	PG%
AdvClones × Hyb <i>chq</i>	906	839	92.6 ± 14.71
AdvClones × Hyb <i>pcs</i>	191	172	90.1 ± 11.72
AdvClones × Hyb <i>cjm</i>	868	790	91 ± 15.6
AdvClones × Hyb <i>sgr</i>	13	11	85 ± 16.67
Total	1978	1812	91.6

Nota: s= semillas, sg=semillas que germinaron exitosamente, PG%=porcentaje de germinación con su respectiva desviación estándar.

El rango de porcentaje de germinación en todas las combinaciones de cruzamientos fue de 85 a 92.6. El porcentaje promedio de germinación para todas las familias fue de 91.6 por ciento. El menor promedio pertenece al cruzamiento AdvClones × Hyb *sgr* y el mayor corresponde al cruzamiento AdvClones × Hyb *chq*.

A fin de facilitar las evaluaciones posteriores, a cada individuo generado se le asignó un código "HER" seguida de un número asignado para cada familia, e individuos dentro de cada familia, para distinguirla de las demás.

El rango de individuos de cada familia fue diverso; de las 64 familias generadas, la familia más numerosa (HER-51) tenía 151 individuos, mientras que 12 familias (HER-1, HER-6, HER-7, HER-10, HER-11, HER-28, HER-29, HER-33, HER-36, HER-37, HER-38 y HER-63), presentaron solo un individuo, y los individuos de 5 de las 12 familias (HER-28, HER-33, HER-36, HER-37 y HER-38) exhibieron fenotipos muy débiles, estas familias provenían del cruzamiento AdvClones × Hyb *chq*.

4.1.5 Híbridos en campo

De todos los híbridos HER generados y que germinaron exitosamente, se encontraron algunos que eran difíciles de mantener *in vivo*, ya que al ser transferidos como plántulas al sustrato Promix (Premier Brands, Inc, Stanford Ct), bajo condiciones de invernadero no lograron establecerse, por lo cual no fue posible incluirlos en la evaluación de la resistencia a *P. infestans* en campo, en Monobamba 2012; pues su naturaleza débil podría sesgar el resultado final; a razón de ello en el tamizado en campo de un total de 1812 solo se evaluaron 1039 híbridos, de los cuales 622, provienen del cruzamiento AdvClones × Hyb *chg*; 116, del AdvClones × Hyb *pcs*, 292 del AdvClones × Hyb *cjm* y 9 del AdvClones × Hyb *sgr*.

Adicionalmente se incluyeron a los parentales tetraploides y diploides, así como testigos con niveles de resistencia previamente conocidos para el primer tamizado en campo.

4.2 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A *P. INFESTANS* DE LOS HÍBRIDOS, MEDIANTE TAMIZADO EN CAMPO BAJO INFECCIÓN NATURAL, UTILIZANDO UN DISEÑO ALFA DE DOS REPETICIONES (MONOBAMBA - 2012)

Durante el ensayo en campo se monitorearon los parámetros climatológicos, como temperatura (T°C), humedad relativa (HR%), radiación fotosintéticamente activa (PAR) y precipitación (mm), por medio de una estación meteorológica (HOBOWARE, SA) instalada en el campo. Estos parámetros fueron analizados con el programa HOBOWARE.

Durante todo el ciclo del cultivo, se presentó una temperatura promedio de 20.1°C, de un rango mínimo de 14.1°C a una máxima de 31.9°C; la humedad relativa promedio fue de 88.4 por ciento, de un rango mínimo de 42.9 por ciento a una máxima de 98.9 por ciento. (Tabla 9 y Figura 13). Las condiciones climáticas en las que se realizaron las evaluaciones fueron favorables para la evaluación de la severidad del daño del oomiceto en el diseño experimental.

Tabla 9. Valores promedio de temperatura (T°C), porcentaje de humedad relativa (HR%), radiación fotosintéticamente activa (PAR) y precipitación (mm) en los meses en que se desarrolló el experimento en campo, Monobamba 2012.

Variables*/ Mes	Enero	Febrero	Marzo	Abril
T °C max.	28.1	26.1	26.1	27.7
T °C prom [‡]	20.4	19.9	16.6	20.4
T °C min.	16	16.5	19.9	16.6
HR % max.	97.4	98.1	97.7	95.9
HR % prom [‡]	85.1	89.3	90.2	87.9
HR % min.	57.1	66.1	68.4	63.5
Max: PAR uE	2367.3	2283.8	2146.2	2428.7
Min: PAR uE	1.2	1.2	1.2	1.2
Precipitación mm	189.8	249.6	255.9	176.8

*Registros cada media hora.

[‡]Prom: valores promedio. Fecha de siembra: 31 Diciembre, Duración del ciclo de cultivo: Enero-Abril.

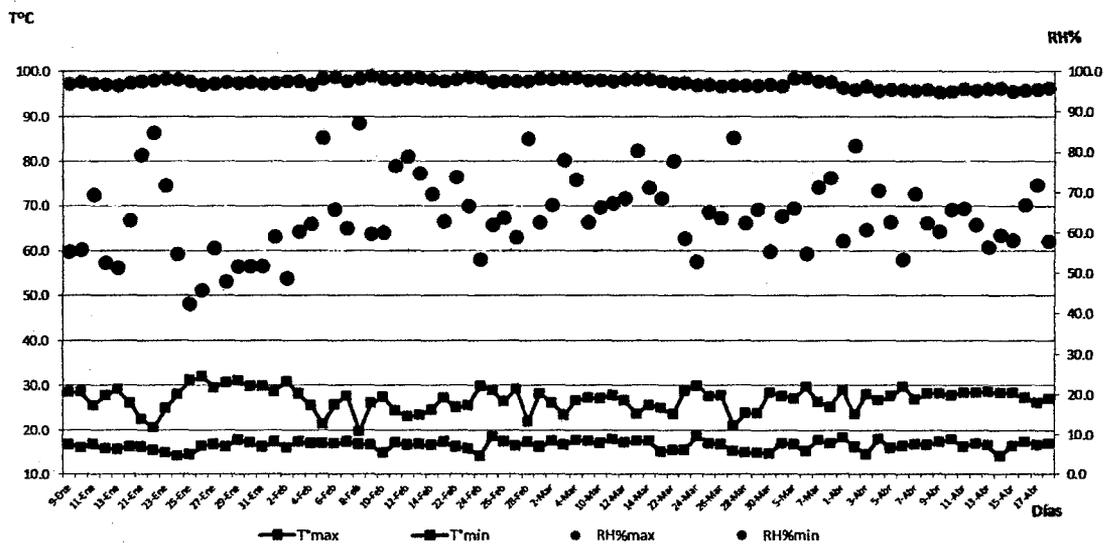


Figura 13. Monitoreo de T °C y HR % durante la duración del experimento en campo de evaluación de resistencia a *P. infestans*. Monobamba 2012.

El análisis de variancia para las variables AUDPC, RAUDPC y SAUDPC (Tabla 10) reflejó que existieron diferencias estadísticas altamente significativas para todos los híbridos evaluados. La alta significación para los tratamientos determina que los

híbridos evaluados presentaron diferentes niveles de resistencia y que existe suficiente variabilidad genética.

Tabla 10. Análisis de variancia para las variables AUDPC, RAUDPC y SAUDPC en un diseño alfa látice, Monobamba 2012.

Fuente de variación	gL	AUDPC		RAUDPC		SAUDPC	
		CM	Pr>F	CM	Pr>F	CM	Pr>F
Repeticiones	1	20974	*	0.001	*	4.317	ns
Bloq en rep (Ajustado)	104	307262.6	ns	0.017	ns	5.07	ns
Tratamientos	1110	706741	**	0.004	**	9.53	**
Error Intrabloque	986	366721		0.02		5.5783	
Total	2201						
CV		16.1		16.1		10.1	
Promedio		1363.7		0.325		5.15	
r ²		0.86		0.9		0.94	

ns: no significativo a $P < 0.05$; *: Significativo a $P < 0.05$; **: Significativo a $P < 0.01$; ***: altamente significativo a $P < 0.001$.

Estos resultados obtenidos sugieren que los híbridos interespecíficos generados en este estudio presentan un rango amplio en cuanto a valores de AUDPC, observándose reacción desde completamente resistentes (< 600) hasta completamente susceptibles (>3000) entre híbridos provenientes del mismo tipo de cruce.

Solo en las variables AUDPC y RAUDPC, el análisis de variancia muestra que existen diferencias significativas entre las repeticiones, lo cual se debería a que un individuo puede presentar un rango de valores. El coeficiente de variación (CV) de 16.1 por ciento para ambas variables nos indica que nuestros datos son confiables, debido a que el modelo alfa-látice es el más adecuado cuando se tiene un alto número de material genético para evaluar.

Sin embargo, se procura tomar en cuenta el análisis de variancia de la variable SAUDPC, pues la escala basada en Yuen y Forbes (2009) elimina la variabilidad del

AUDPC y RAUDPC y nos proporciona un dato más confiable de la resistencia o susceptibilidad del genotipo; así cuando observamos esta variable no existen diferencias entre las repeticiones, ni en los bloques pero si entre los clones evaluados, además de presentar un coeficiente de variación (CV) de 10.1, el más bajo si se compara con las otras variables utilizadas.

Se utilizó la escala de susceptibilidad basada en los valores de AUPDC (SAUDPC) para seleccionar aquellos híbridos con rangos de resistencia de moderado a altamente resistentes. Los individuos de los cruces ubicadas en la categoría 0, son altamente resistentes. Aquellos ubicados en la categoría 1 y 2, son consideradas como resistentes y finalmente, aquellas ubicadas en la categoría 3 y 4 son catalogadas como moderadamente resistentes. El valor 6 se asignó al testigo Yungay que se considera como susceptible.

En la tabla 11 se muestra a los individuos agrupados por tipo de cruce y su correspondiente valor promedio de AUDPC, RAUDPC y SAUDPCS, así como la respectiva desviación estándar por variable.

El rango de los valores de AUDPC que tienen los parentales 4x, es 0 y el máximo de 2533.3 y el valor promedio fue de 1284.64 ± 977.3 . En cuanto a los valores de parentales 2x, el valor mínimo es 0 y el máximo es 1690.5 y el valor promedio fue de 441.92 ± 548.8 .

Tabla 11. Valores promedio de AUDPC, RAUDPC y SAUDPC de los parentales e híbridos agrupados por tipo de cruce

Parentales/ Tipo de cruce	Nº individuos	AUDPC [‡]	RAUDPC [‡]	SAUDPC [‡]
Parentales 4x	14	1284.64 ± 977.3 a	0.306 ± 0.2 a	5.85 ± 4.7 a
AdvClones × Hyb <i>chq</i>	668	1250.67 ± 750.5 a	0.310 ± 0.2 a	4.98 ± 2.8 a
AdvClones × Hyb <i>pcs</i>	114	1251.44 ± 777.9 a	0.312 ± 0.2 a	5.01 ± 2.8 a
AdvClones × Hyb <i>cjm</i>	282	1551.57 ± 582.2 a	0.378 ± 0.1 a	5.96 ± 2.2 a
AdvClones × Hyb <i>sgr</i>	9	793.23 ± 732.8 b	0.187 ± 0.2 b	2.83 ± 2.7 b
Parentales 2x	14	441.92 ± 548.8 b	0.106 ± 0.1 b	1.76 ± 2.3 b

‡ Valores en la columna seguidos por la misma letra, no tienen diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

El testigo Tomasa (Altamente susceptible) presentó un valor promedio de AUDPC de 2625.07 y el testigo LBr_40 (resistente) presentó un valor promedio de AUDPC de 12.87. El valor promedio de AUDPC del testigo Yungay (susceptible) fue de 1503.33.

El uso de variables adicionales a la extensamente utilizada variable AUDPC, permitió establecer diferencias adicionales entre los híbridos de cada combinación de cruzamiento. Con los histogramas elaborados en base a los niveles de severidad, el criterio que marcaría las diferencias entre los híbridos sería el grado de aparición y desarrollo de síntomas. Estas diferencias sugieren que están actuando diferentes mecanismos de defensa en los híbridos provenientes de los cruces, dando así una nueva información acerca de la capacidad de cada individuo para contrarrestar el desarrollo de síntomas y del progreso de la enfermedad en la progenie misma.

En la Figura 14 se observa un histograma con la distribución de los valores promedio de AUDPC por tipo de combinación, al lado de ambos parentales, lo que nos muestra un panorama general de la variabilidad de resistencia presentada en toda la progenie.

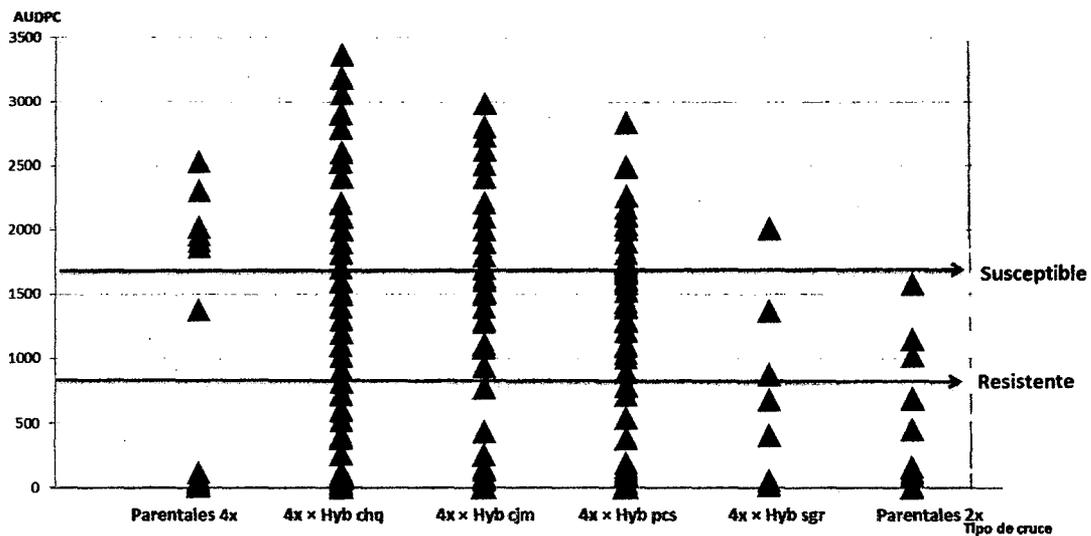


Figura 14. Distribución de los valores de AUDPC según el tipo de cruce y los parentales correspondientes. Monobamba 2012.

Consecuentemente, se agrupó a los híbridos de acuerdo a la combinación híbrida, junto a los testigos utilizados, para generar histogramas que permitan mostrar la distribución de los valores de AUDPC en todas las familias dentro de cada combinación híbrida por tipo de donante.

Los colores asignados en los histogramas están relacionados con los colores de distribución de las especies, como aparece en la Figura 1, de tal manera de facilitar el seguimiento de la resistencia de las especies involucradas en las evaluaciones posteriores, además, se adicionaron los valores de AUDPC de los diferentes testigos utilizados en la evaluación a los histogramas generados.

Se observa una distribución normal de los valores de AUDPC para los 668 híbridos evaluados, provenientes del cruzamiento AdvClones \times Hyb *chq*.

Los valores de AUDPC obtenidos estuvieron en el rango de 0 a 3046, presentando un valor promedio y correspondiente desviación estándar de 1250.67 ± 750.5 . Si se analizan los intervalos de AUPDC en el histograma, el que presenta el mayor número de híbridos es el rango de 1219 a 1522, mientras que el menor número de híbridos está en el rango de 2742 a 3405, como lo refleja la Figura 15.

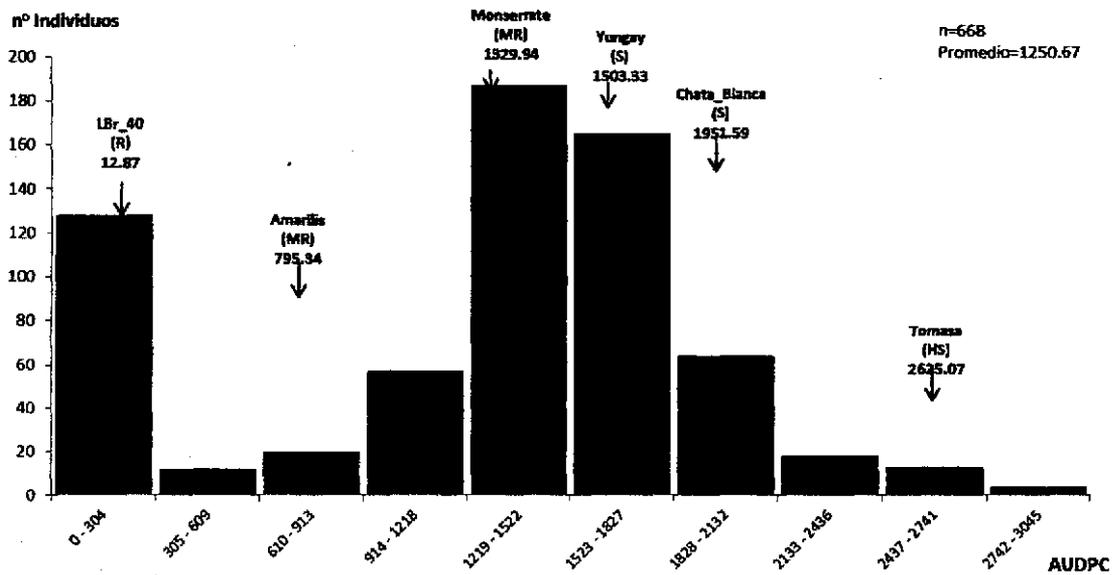


Figura 15. Distribución de frecuencias de los valores de AUDPC de las familias que tienen como donante a los híbridos de *S. chiquidenum*.

Con respecto a la distribución de los valores AUDPC para los 114 híbridos evaluados, provenientes del cruzamiento AdvClones × Hyb *pes*.

Los valores de AUDPC estuvieron en el rango de 0 a 2538.0, con un valor promedio y correspondiente desviación estándar de 1251.44 ± 777.9 . Si se analizan los intervalos de AUPDC en el histograma, el que presenta el mayor número de híbridos es el rango 1269.0 a 1903.5, mientras que el menor número de híbridos está en el rango de 635 a 951, como lo refleja la Figura 16.

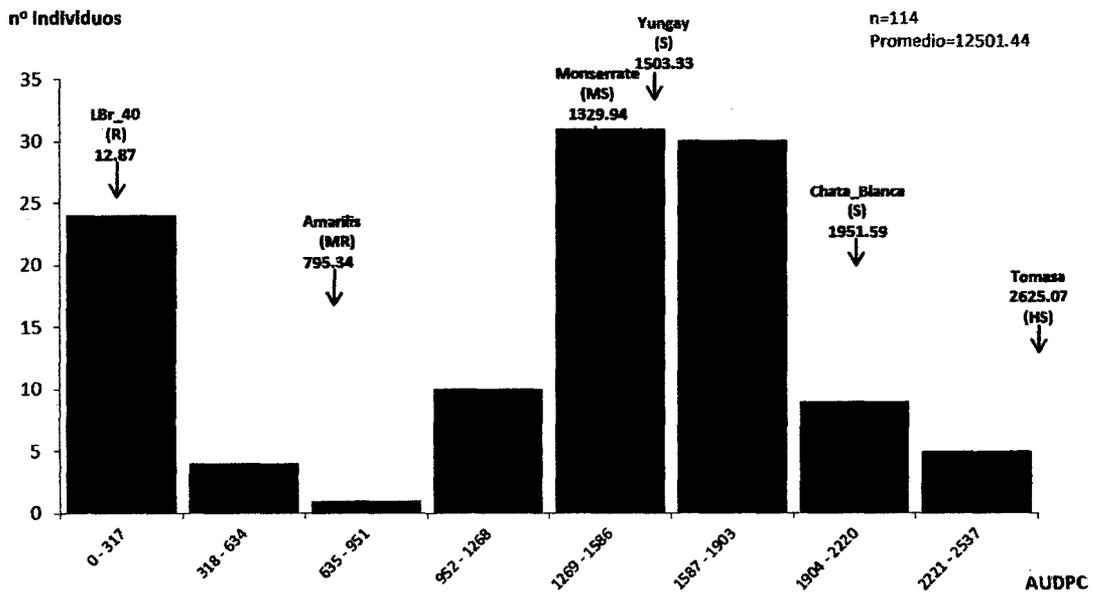


Figura 16. Distribución de frecuencias de los valores de AUDPC de las familias que tienen como donante a los híbridos de *S. pauciseccum*.

Con respecto a los 282 híbridos evaluados, provenientes del cruzamiento AdvClones × Hyb *cjm*, se observa una distribución de los valores de AUDPC desplazados hacia la derecha del gráfico, reflejando una mayor proporción de genotipos susceptibles en la progenie en estudio.

Los valores de AUDPC estuvieron en el rango de 0 a 2669.6, con un valor promedio y correspondiente desviación estándar de 1551.57 ± 582.2 . Si se analizan los intervalos de AUPDC en el histograma, el que presenta el mayor número de híbridos es el rango 1484 a 1779, mientras que el menor número de híbridos está en el rango de 297 a 593, como lo refleja la Figura 17.

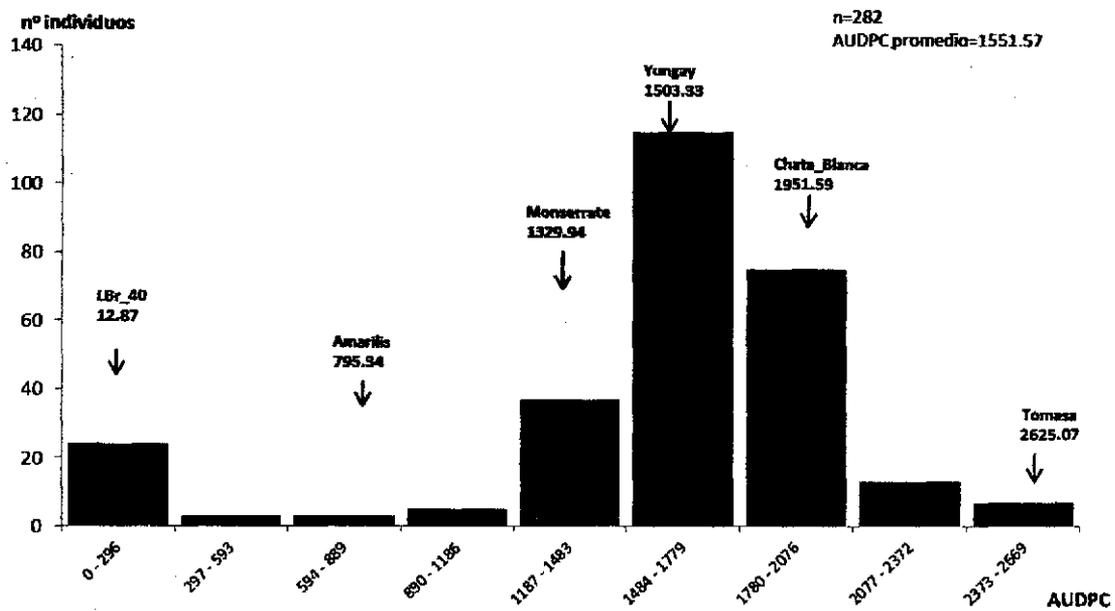


Figura 17. Distribución de frecuencias de los valores de AUDPC de las familias que tienen como donante a los híbridos de *S. cajamarquense*.

En cuanto a la distribución de los valores AUDPC para los nueve híbridos provenientes del cruzamiento AdvClones × Hyb sgr, se observa una distribución bimodal cuando se les agrupa (Figura 18), esto se explicaría por el número reducido de híbridos generados y evaluados.

Los valores de AUDPC estuvieron en el rango de 0 a 2142.7, con un valor promedio y correspondiente desviación estándar de 739.23 ± 732.8 . Si se analizan los intervalos de AUDPC en el histograma, el que presenta el menor número de híbridos está en el rango de 1715 a 2142.

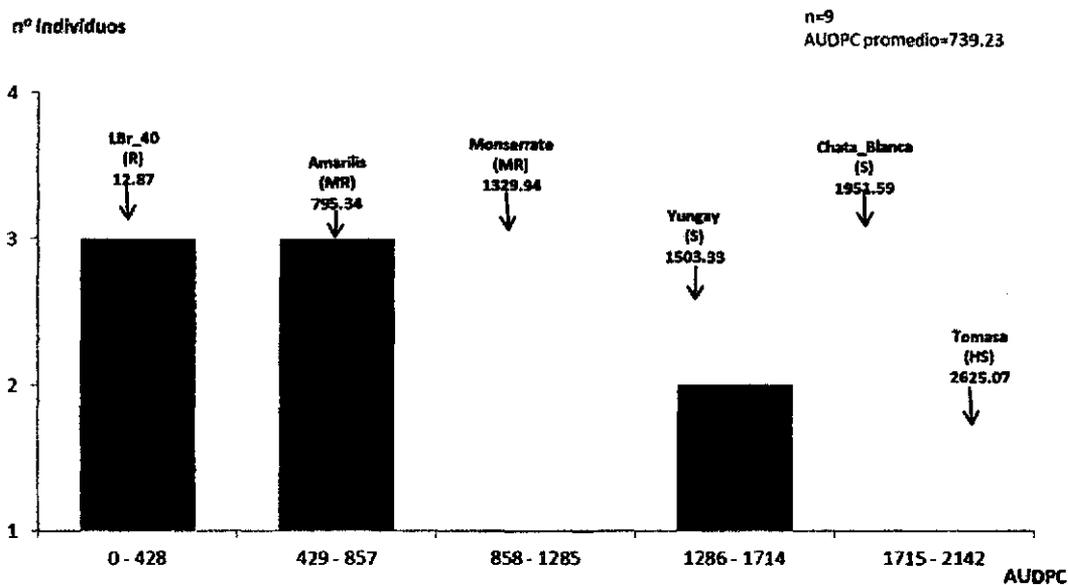


Figura 18. Distribución de frecuencias de los valores de AUDPC de las familias que tienen como donante a los híbridos de *S. sogarandinum*.

Lograr uno de los más importantes objetivos del mejoramiento genético de papa, que es desarrollar genotipos resistentes a tizón tardío, depende de varios factores. El factor más importante es la precisión de la evaluación de la resistencia y la identificación exitosa de materiales resistentes bajo infección natural en el campo. Esta precisión se logra utilizando adicionalmente a la variable AUDPC, las variables RAUDPC y SAUDPC. Como mencionan Maffei *et al.* (2011) cuando se desea realizar estudios para la selección de nuevos materiales para resistencia a tizón tardío, éstos deben ser sometidos a poblaciones variables del patógeno a campo abierto, y evaluarse bajo presión natural de inóculo en parcelas experimentales a fin de seleccionar a los más resistentes. Esto concuerda con la evaluación realizada en la presente investigación.

En base a los valores de AUDPC, RAUDPC y SAUDPC, de los 1039 híbridos evaluados en campo, se seleccionaron 357 híbridos, agrupados en 51 familias de las cuatro combinaciones de cruzamientos, que poseían valores de resistencia en el rango de altamente resistentes a moderadamente resistente, es decir, aquellos que presentaron valores según la SAUDPC de 0 a 5, para iniciar las evaluaciones morfo-agronómicas; lo que equivale a un 34.4 por ciento de híbridos seleccionados del total; de los cuales, 234

pertenecían a al cruzamiento AdvClones × Hyb *chq*, 60 al cruzamiento AdvClones × Hyb *pcs*, 55 al cruzamiento AdvClones × Hyb *cjm* y 8 al cruzamiento AdvClones × Hyb *sgr* (Tabla 12).

Tabla 12. Resumen de los híbridos seleccionados después de la evaluación en campo, Monobamba 2012, agrupados por tipo de cruce.

Tipo de cruce	Nº individuos generados	Nº individuos sembrados en campo	Nº individuos seleccionados por resistencia (SAUDPC:0-5)
AdvClones × Hyb <i>chq</i>	839	622 (74.1%)	234 (37.6%)
AdvClones × Hyb <i>pcs</i>	790	292 (37%)	60 (20.5%)
AdvClones × Hyb <i>cjm</i>	172	116 (67.4%)	55 (47.4%)
AdvClones × Hyb <i>sgr</i>	11	9 (8.8%)	8 (88.8%)
Total	1812	1039 (57.4%)	357 (34.4%)

4.3 EVALUACIÓN AGRONÓMICA DE LOS HÍBRIDOS SELECCIONADOS, MEDIANTE UN DISEÑO ALFA CON DOS REPETICIONES (LA MOLINA - 2013).

La evaluación agronómica de los híbridos interespecíficos seleccionados estuvo dirigida a la elección de aquellos que posean caracteres agronómicos promisorios. Los criterios que se emplearon en esta selección fueron uniformidad y vigor de planta, además de número y longitud de estolones, las cuales están relacionadas con la capacidad de tuberización, teniendo en cuenta que, en algunos casos como en *S. chiquidemum*, con tubérculos de tipo moniliforme, o como en *S. paucisectum*, que no tuberiza; también se evaluaron número total de tubérculos, peso de tubérculos y rendimiento.

El análisis de variancia las variables agronómicas (Tabla 13), vigor y uniformidad de planta, muestra que existen diferencias significativas entre los distintos híbridos, y no en las repeticiones, lo que refleja la variabilidad de los híbridos evaluados.

Con respecto a las variables número y longitud de estolones, los resultados reflejan que existen diferencias significativas en relación a los híbridos evaluados, lo que indica la existencia de suficiente variabilidad genética para esta característica; sin embargo también se observan diferencias entre las repeticiones y esto podría deberse a otros factores propios del campo de cultivo, como tipo de suelo, etc.

Tabla 13. Análisis de variancia para las variables agronómicas evaluadas (uniformidad, vigor, número de estolones y longitud de estolones) en campo, La Molina 2013.

Fuente de Variación	gL	Uniformidad		Vigor		Número de estolones		Longitud de estolones	
		CM	Pr>F	CM	Pr>F	CM	Pr>F	CM	Pr>F
Repeticiones	1	0.135	ns	0.34	ns	0.34	ns	1.75	*
Tratamientos	368	1.232	*	2.21	*	6.9	*	6.65	*
Bloq. en rep (Ajustado)	71	0.53	**	1.08	*	0.73	*	0.81	*
Error Intrabloque	297	0.243		0.43		0.47		0.58	
Total	737								
CV%		10.4		14.5		19		21	
Promedio		4.7		4.48		3.91		3.6	
r ²		0.87		0.87		0.89		0.91	

ns: no significativo a $P < 0.05$; *: significativo a $P < 0.05$; **: significativo a $P < 0.01$; ***: altamente significativo a $P < 0.001$.

Al agrupar a los híbridos seleccionados, se observó una gran variación en el desarrollo de los estolones, número y longitud, dependiendo del tipo de cruce, como se puede apreciar en la Tabla 14.

Existe un rango muy amplio de los valores de longitud y número de estolones en los híbridos provenientes del cruzamiento AdvClones \times Hyb *chg*, el cual contrasta con los valores de los parentales tetraploides (AdvClones) que presentan los valores más bajos con 1.51 y 1.31, para ambas variables, respectivamente. Asimismo, los híbridos

provenientes del cruzamiento AdvClones × Hyb *cjm* y AdvClones × Hyb *sgr*, presentaron el menor promedio si se comparan solo con las otras combinaciones, y no con los parentales, que presentan valores muy diferentes de los híbridos.

El mayor promedio, para las variables de número y longitud de estolones, lo presentan los individuos provenientes del cruzamiento AdvClones × Hyb *chq*, con 4.03 y 4.0, respectivamente; sin embargo este promedio se podría explicar porque esta combinación híbrida presenta un mayor número de individuos.

En relación a los parentales, como lo reflejan los valores de la Tabla 13, estos muestran los menores valores promedio en número y longitud de estolones, lo cual concuerda con la elección como parentales femeninos, a fin de que aporten a la progenie generada las características agronómicas deseables. Además, se diferencian significativamente de los híbridos generados como se observa por la prueba de Tukey al 95% realizada en ambas variables.

Tabla 14. Promedio de número y longitud de estolones de los parentales 4x y los híbridos en campo, La Molina 2013.

Población/Tipo de cruce	Nº individuos	Número de estolones^k	Longitud de estolones^v
Adv Clones (Parentales 4x)	13	1.31 ± 0.62 c	1.51 ± 0.75 c
Adv Clones × Hyb <i>chq</i>	232	4.03 ± 1.93 a	4.0 ± 1.82 a
Adv Clones × Hyb <i>cjm</i>	60	2.52 ± 0.98 b	2.0 ± 1.15 b
Adv Clones × Hyb <i>pcs</i>	55	3.40 ± 1.48 a	3.6 ± 1.40 a
Adv Clones × Hyb <i>sgr</i>	8	2.14 ± 1.40 b	2.0 ± 1.40 b

^k Letras distintas entre columna indican diferencias significativas. Prueba de Tukey (p<=0.05)

El comportamiento observado en el desarrollo de los estolones, número y longitud, se reflejó en los rendimientos.

De acuerdo al análisis de variancia para las variables de número de tubérculos, peso de tubérculos y rendimiento, existieron diferencias significativas entre tratamientos y no entre repeticiones (Tabla 15), lo que indica la existencia de suficiente variabilidad genética.

Tabla 15. Análisis de variancia para las variables de peso de tubérculos, número de tubérculos y rendimiento, en campo La Molina 2013.

Fuente de Variación	gL	Peso total de tubérculos		N° total de tubérculos		Rendimiento	
		CM	Pr>F	CM	Pr>F	CM	Pr>F
Repeticiones	1	0.764	ns	1980.6	ns	0.007	ns
Tratamientos	368	5.502	**	15871.2	**	0.235	**
Bloq. en rep (Ajustado)	71	1.698	**	4871.48	*	0.074	*
Error Intrabloque	297	0.4		2603.41		0.016	
Total	737						
CV%		17.2		22.1		16.1	
Promedio		3.7		126.9		0.77	
r ²		0.94		0.88		0.89	

ns: no significativo a $P < 0.05$; *: significativo a $P < 0.05$; **: significativo a $P < 0.01$; ***: altamente significativo a $P < 0.001$.

El coeficiente de variabilidad para el rendimiento fue de 16.1 por ciento, valor aceptable para un experimento agrícola (Calzada, 1981) siendo 38 por ciento el máximo valor aceptable para un experimento diseñado para evaluar características agronómicas. Esto nos indica que los factores externos al experimento incluyendo el manejo agrícola, no influyeron de manera sustancial en los resultados. Asimismo, la utilización de un diseño de bloques incompletos, como el alfa látice, permite un análisis confiable, teniendo en cuenta el número de individuos evaluados y de repeticiones.

En la tabla 16 se puede apreciar los valores promedio de rendimiento por combinación híbrida; los híbridos provenientes del cruce AdvClones \times Hyb *cjm*, presentaron el promedio más alto (0.969 kg/plt) superando al promedio de los parentales tetraploides (AdvClones), que fue de 0.769 kg/plt.

Asimismo, uno de los híbridos provenientes del cruce AdvClones \times Hyb *pcs* presentó un rendimiento de 0.701 kg/plt, el cual es el menor comparado con todos los híbridos generados a partir de ese donante, sin embargo el promedio del número de tubérculos/plantas, en este caso 118 tubérculos, contribuyó a aumentar el rendimiento

promedio de esa combinación. En esta misma combinación de cruzamientos, se encontró el promedio más alto con un valor de 1.671 kg/plt.

Tabla 16. Promedios de peso de tubérculo (kg), número total de tubérculos y rendimiento (kg/plt) en los híbridos y los parentales 4x.

Parental/Tipo de cruce	Nº individuos	Peso tubérculos [‡]	Nº total tubérculos [‡]	Rendimiento [‡] (kg/plt)
Adv Clones (Parentales 4x)	14	3.98 ± 1.6 a	52.5 ± 27.2 b	0.769 ± 0.3 b
Adv Clones × Hyb <i>chq</i>	232	3.57 ± 1.7 b	151.9 ± 96.1 a	0.745 ± 0.3 b
Adv Clones × Hyb <i>cjm</i>	60	4.54 ± 1.7 a	63.8 ± 27.2 b	0.969 ± 0.3 a
Adv Clones × Hyb <i>pcs</i>	55	3.30 ± 1.5 b	118.0 ± 61.8 a	0.701 ± 0.3 b
Adv Clones × Hyb <i>sgr</i>	8	3.28 ± 1.4 b	65.8 ± 21.5 b	0.706 ± 0.2 b

[‡]Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas. Prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)

En la Figura 19, se presenta la distribución de los valores de rendimiento de los híbridos y los parentales femeninos (4x). Se observa que híbridos provenientes de los cruces AdvClones × Hyb *chq* y AdvClones × Hyb *cjm*, son los que poseen un número más alto de individuos (4 y 3, respectivamente) con rendimientos que están en el rango superior de 1.5 a 1.75 kg/plt, lo cual supera a los rendimientos de los parentales femeninos.

Los resultados presentados concuerdan con Muthoni *et al.* (2012) donde mencionan que genotipos provenientes de cruzamientos entre especies distantes son más complementarios y heteróticos.

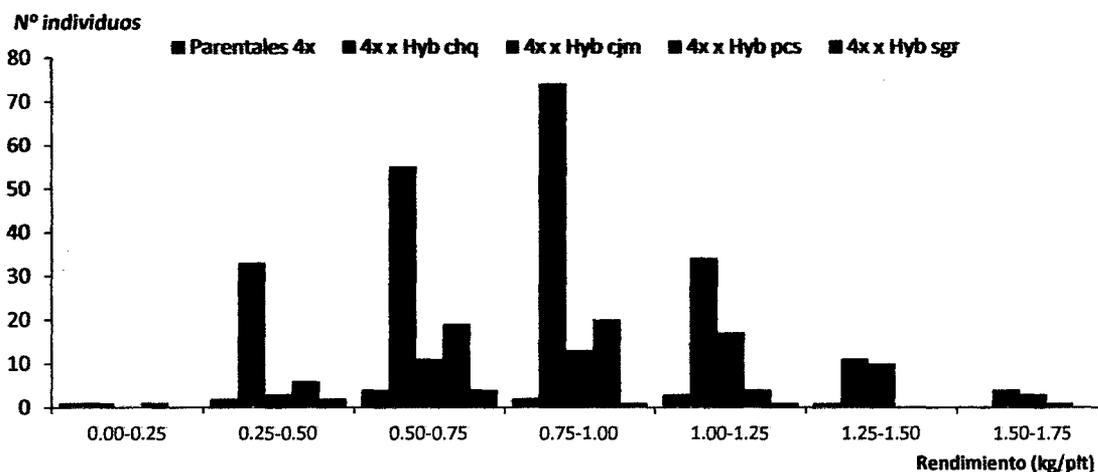


Figura 19. Distribución de frecuencias de los valores de rendimiento (kg/plt) de los parentales 4x y los híbridos agrupados por tipo de cruce.

Distintos autores refieren que los híbridos tetraploides provenientes de cruces $4x \times 2x$ poseen plántulas vigorosas, buena uniformidad y alto rendimiento de tubérculos, debido a la importancia de las interacciones intralocus (heterocigosis) e interlocus (epistasia) para la producción de tubérculos, ya que el polen $2n$ producido vía FDR por los parentales diploides pueden transmitir alrededor del 80 por ciento de heterocigosis y una gran cantidad de epistasia a la progenie $4x$ (Alberino *et al.*, 2004; Almekinders *et al.*, 1996; Jansky y Peloquin, 2006). Así, los cruzamientos $4x \times 2x$ conducen a la convergencia de la variabilidad de genotipos divergentes en un solo individuo que resulta en vigor híbrido o heterosis. La heterosis explicaría la superioridad de la poliploidización sexual con respecto a la duplicación somática de los cromosomas, este último sólo aumenta el número de cromosomas sin generar ningún tipo de variación genética en la progenie. La combinación parental, así como el genotipo de cada padre determina el fenotipo híbrido, sugiriendo que el resultado de la hibridación depende del equilibrio de interacciones positivas y negativas entre los genomas parentales. Aunque los híbridos interspecíficos varían ampliamente en relación a su fertilidad y vigor, una regla general es que los híbridos F1, tienden a superar a sus padres en vigor vegetativo o robustez.

El vigor híbrido o heterosis a menudo se utiliza para maximizar los rendimientos en los cultivos. La heterosis tiene implicaciones importantes para la biología evolutiva y, al

menos explicaría parcialmente el éxito de las especies aloploidoides y muchos linajes híbridos clonales. También puede contribuir al establecimiento exitoso de especies híbridas, pero este argumento es menos convincente ya que el vigor híbrido es más difícil de mantener en la segregación de generaciones híbridas (Rieseberg *et al.*, 2000). Aunque la heterosis sea probablemente el mayor contribuyente al éxito evolutivo de los híbridos, su base genética aún no es muy comprendida. Las posibles explicaciones de heterosis incluyen la dominancia (el enmascaramiento de los recesivos deletéreos), la sobredominancia (heterosis de un solo locus), o la epistasis (mejor rendimiento de características derivadas de diferentes linajes debido a interacciones no aditivas de QTL).

Camadro *et al.* (1993) refieren que Mendiburu y Peloquin (1976) observaron respuestas fuertemente heteróticas en progenies tetraploides derivadas de cruzamientos $4x \times 2x$: estas respuestas fueron atribuidas al mecanismo genético único por el cual se forman gametos no reducidos con núcleos genéticamente equivalentes a los formados por restitución de la primera división meiótica.

Generalmente los estudios de híbridos, usando caracteres morfológicos, asumen que podrían presentar características fenotípicas intermedias entre ambos parentales; sin embargo, a menudo esto no ocurre, porque la progenie pueden expresar un mosaico de los fenotipos parentales (Quiroga *et al.*, 2005). El grado en que la progenie híbrida difiere de los progenitores dependerá del grado de recombinación; algunos de los híbridos HER evaluados muestran características morfológicas diferentes a los parentales y otros presentaron fenotipos intermedios entre los tipos parentales o similares a ellos. Esto se observa en las características de número y longitud de estolones, en las que existieron individuos de todas las combinaciones híbridas con valores con valores extremos.

Además, nuestras observaciones han revelado algunas plantas híbridas débiles en vigor o tipos menos competitivos que aquellos tipos parentales, con una disminución en las diferentes características morfológicas (tuberización). Así, los parentales parecen tener

una ventaja selectiva basada en un set coherente de genes los cuales no son conservados como una unidad en algunos híbridos.

Luego del estudio de rendimiento de tubérculos, se eligieron aquellos clones que se ubicaron en la mitad superior del cuadro de distribución de frecuencias (Figura 19).

4.4 VIABILIDAD DE POLEN DE LOS HÍBRIDOS SELECCIONADOS

De los 357 híbridos seleccionados por su resistencia después del primer tamizado en campo, y sembrados para evaluar las características agronómicas en La Molina 2013, solo 311 presentaron floración, los 46 restantes presentaron aborto de botones florales en todo el ciclo del cultivo.

En la tabla 17 se muestra los resultados de los rangos de viabilidad de polen por combinación híbrida.

Tabla 17. Rango de viabilidad de polen de los híbridos seleccionados luego del primer tamizado.

Escala	1	3	5	7
Rango (% polen viable)	0	>0 ≤50	>50 <80	≥80 - 100
Descripción	Estéril	Bajo	Moderado	Alto
Tipo de cruce				
AdvClones × Hyb <i>chg</i>	115 (56.1%)	3 (1.4%)	36 (17.6%)	51 (24.9%)
AdvClones × Hyb <i>pcs</i>	9 (20.5%)	1 (2.3%)	19 (43.1%)	15 (34.1%)
AdvClones × Hyb <i>cjm</i>	10 (17.8%)	2 (3.6%)	28 (50%)	16 (28.6%)
AdvClones × Hyb <i>sgr</i>	2 (33.3%)	1 (16.6%)	3 (50.1%)	0
Total (311)	136 (43.7%)	7 (2.3%)	86 (27.6%)	82 (26.4%)

Se encontró un rango amplio de viabilidad del polen de los híbridos HER. El 54 por ciento de los híbridos generados, lo que equivale a 186 individuos, presentaron un rango de viabilidad de polen de moderada a alta (Figura 20a); sin embargo en ocho familias, el total de individuos (HER-12, .15, .24, .30, .31, .53, .55 y .61) presentaron tétradas estériles (Figura 20b); de estos, solo los individuos pertenecientes a la familia HER-12 y HER-31 poseerían citoplasma de tipo T, y las demás familias con citoplasma de tipo W.

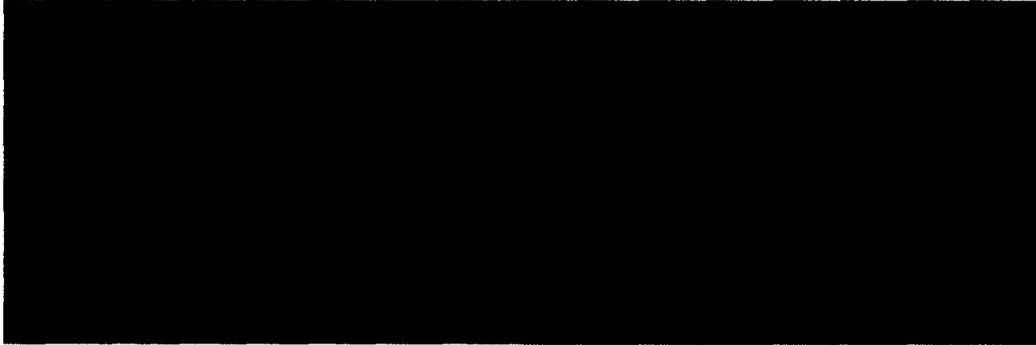


Figura 20. a) Moderada viabilidad de polen, perteneciente a un híbrido HER-44.7 (= AdvClones × Hyb *cjm*); b) Tétradas estériles, pertenecientes a los híbridos de la familia HER-24-111 (= AdvClones × Hyb *chq*).

La viabilidad del polen se relaciona directamente con la normalidad de la microsporogénesis. Generalmente, en híbridos interespecíficos se atribuye la reducción de la viabilidad a interacciones citoplasmáticas y varias anomalías meióticas, como formación de univalentes, debido a un apareamiento incompleto de los cromosomas (Jackson y Hanneman, 1999; Myburg *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2006). Se conoce muy poco sobre los cambios genómicos que pueden ocurrir en híbridos a consecuencia de la combinación de genomas de diverso origen en el núcleo (Marfil *et al.*, 2006). En híbridos que poseen solo fertilidad parcial se podría sugerir una diferenciación genética significativa de los genomas, la cual produciría un grado de aislamiento post cruzamiento. El grado de apareamiento cromosómico en un híbrido interespecífico puede usarse como un indicativo de la homología cromosómica, así como una relación evolutiva específica: Un porcentaje alto de apareamiento cromosómico en un híbrido indicaría una relación muy estrecha entre las especies parentales (Laskowska y Berbéc,

2005; Zhou *et al.*, 1999). Ocasionalmente las diferencias genómicas entre parentales conducen a la ocurrencia de una meiosis anómala y una reducción de la fertilidad. Una meiosis normal es indispensable para la introducción de pequeñas cantidades de un genoma diferente vía entrecruzamiento. Sin embargo, gametos desbalanceados ocurren como resultado de cruzar especies con genomas muy diferentes que conducen a una eliminación de cromosomas y a la formación de híbridos altamente estériles (Hermsen y Taylor, 1979; Ramon y Hanneman, 2002).

En el caso de cruzamientos $4x \times 2x$, es de esperarse problemas en la meiosis, en ausencia de polen $2n$, y esto concuerda con la distribución de la viabilidad del polen de los híbridos HER. Por otro lado, parte de la nulidad de la floración (aborto de botones florales en 46 híbridos) y la presencia de polen estéril en 136 híbridos, probablemente se deba a la esterilidad híbrida producto de interacciones deletéreas entre genes heteroespecíficos, o a algún producto meiótico anormal de rearrreglos cromosómicos de las especies parentales (Hardon y Tan, 1969; Hanneman y Peloquin, 1981).

La amplia variabilidad respecto a la viabilidad de polen de los híbridos generados, concuerda con estudios previos, como el de Jackson y Hanneman (1999), donde se menciona que la mayoría de híbridos generados en cruzamientos a partir de especies silvestres distantes presentan niveles moderados a altos de esterilidad masculina.

Iwanaga *et al.*, (1991) refieren que la variación en la fertilidad del polen de individuos provenientes de cruces $4x \times 2x$, proviene de los progenitores femeninos tetraploides, porque el polen $2n$ producto de FDR producido por los progenitores masculinos diploides tendría el mismo genotipo (Ms/ms) para el locus Ms .

A menudo, la esterilidad masculina resulta de la interacción de citoplasma de *S. tuberosum* con el gen dominante nuclear Ms de algunas especies diploides.

Con respecto a la influencia del tipo de citoplasma en la fertilidad de los híbridos, se puede observar que de los 357 híbridos, el 46.5 por ciento poseerían citoplasma tipo D, 32.8 por ciento tipo W, 17.9 por ciento tipo T y 2.8 por ciento aún no determinado. Cabe recalcar que, el 97.4 por ciento de los híbridos que tenían citoplasma de tipo W presenta polen estéril, lo que corresponde con la característica que confiere este tipo de citoplasma.

4.5 CONTEO DE CLOROPLASTOS

El número de cloroplastos en las células guarda de los estomas de los folíolos guarda una relación directa con el nivel de ploidía en la mayoría de cultivos, esto lo sustentan distintos autores (Ho *et al.*, 1990; Oselebe *et al.*, 2006; Seidler-Lozykowska, 2003; Singsit y Veilleus, 1991) que mencionan que el número de cloroplastos en las células guarda de los estomas aumentan proporcionalmente al aumento del tamaño de las células en respuesta al aumento de la ploidía (Figura 21). Algunos autores sugieren que los otros niveles de ploidía no son fehacientemente determinados por este método, sin embargo estudios recientes concuerdan que en células planas, tales como las células guarda de los estomas, es posible observar los cloroplastos prácticamente en una sección óptica, lo cual permite contar los cloroplastos correctamente (Kubínová *et al.*, 2013).

Mattheij y Puite (1992) encontraron una alta relación de ésta técnica con la citometría de flujo al evaluar híbridos somáticos provenientes de *S. tuberosum spp. tuberosum* y *S. circaefolium*, recomendándola por su practicidad con respecto a las sofisticadas y costosas técnicas que se utilizan para evaluar el nivel de ploidía.

De la poliploidización sexual unilateral (en este caso, $4x \times 2x$) se espera una progenie exclusivamente tetraploide dado que los embriones triploides no sobrevivirían debido al aborto y degeneración del embrión causado por un EBN imbalanceado, que deriva en un fuerte bloque triploide (Darmo y Peloquin, 1991; Johnston *et al.*, 1980; Peloquin *et al.*, 1989). En el caso de la sobrevivencia de plantas triploides, estas podrían servir como puente hacia la formación de poblaciones tetraploides (Carputo *et al.*, 1997; Husband, 2004; Köhler *et al.*, 2010).

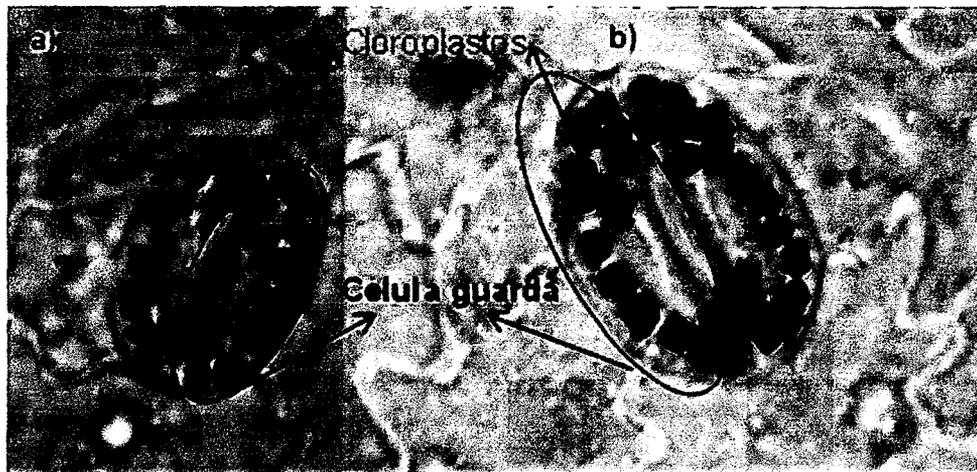


Figura 21. a) Individuo HER-18.76 (=AdvClones \times Hyb *chq*) con 11 cloroplastos en la célula guarda, corresponde a un triploide; b) Individuo HER-18.36 (=AdvClones \times Hyb *chq*) con 13 cloroplastos en la célula guarda, corresponde a un tetraploide.

La variación en la ploidía de la progenie evaluada, sugiere que hay una variación considerable en la frecuencia de gametos no reducidos en los parentales diploides masculinos. Con respecto a los 355 híbridos HER evaluados, 326, es decir el 91 por ciento de los híbridos fueron identificados como tetraploides y 29 (9 por ciento como triploides); esto concuerda con las investigaciones de Hanneman y Peloquin (1991), que refieren que más del 90 por ciento de la progenie de $4x \times 2x$ o cruces $2x \times 4x$ son tetraploides.

La progenie tetraploide es resultado de la unión de los gametos reducidos de los parentales femeninos tetraploides y los gametos no reducidos de los parentales masculinos diploides.

La existencia de gametos no reducidos en los parentales diploides se confirma además por la distribución de las ploidías observada en la progenie, que muestran un número sustancial de híbridos tetraploides, además de triploides.

En relación a la ploidía con respecto al tipo de cruzamiento, el 90.9, 94.5, 91.67 y 100 por ciento, correspondieron a individuos tetraploides en los cruces con Hyb *chq*, Hyb *pcs*, Hyb *cjm* e Hyb *sgr*, respectivamente; como se puede observar en la Figura 22.

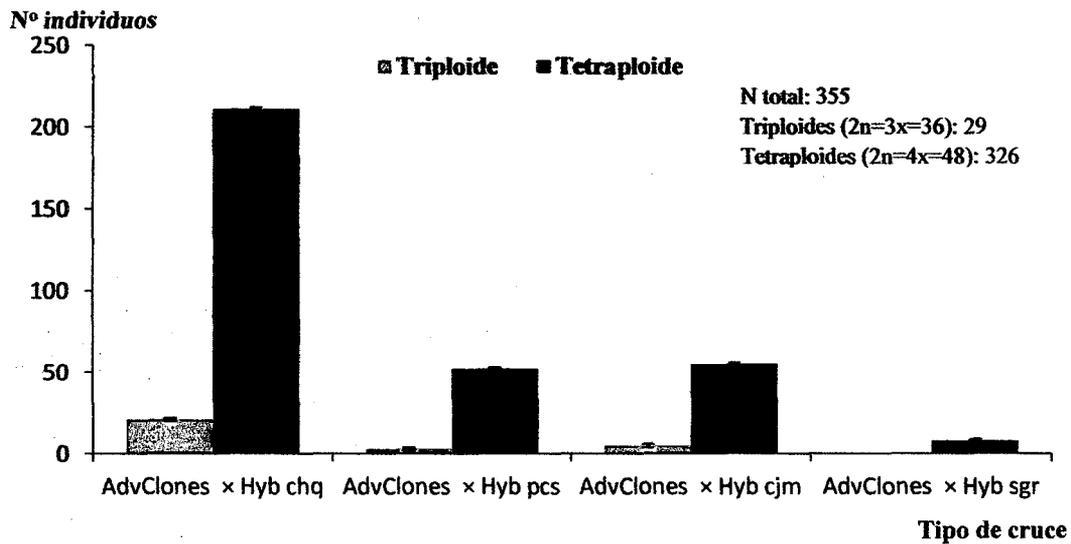


Figura 22. Histograma de distribución del nivel de ploidía de los híbridos evaluados agrupados por tipo de cruce.

4.6 PRUEBA DE HOJAS SUELTAS (DLA)

De los 357 híbridos sembrados en campo La Molina 2013, solo se evaluaron 355 utilizando los dos aislamientos complejos de *P. infestans* (Mont.) De Bary (*PCO055* y *PCO002*) (Figura 23).



Figura 23. Evaluación de hojas sueltas de la cepa PCO055 en los híbridos HER colectados de campo, La Molina 2013.

Se evaluó el porcentaje de lesión presente de manera visual, por la ocurrencia de lesiones expandidas (no expresan genes R conocidos), que se observa por el crecimiento micelial y una abundante esporulación; o no se muestran lesiones (reacción fallida) o respuesta hipersensible (presencia de puntos necróticos), se asignó reacciones de compatibilidad e incompatibilidad, respectivamente (Figura 24).

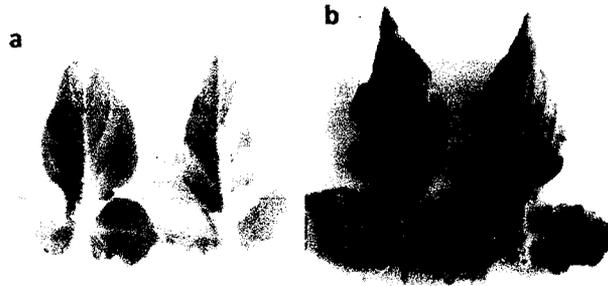


Figura 24. a) Reacción incompatible (I) y b) reacción compatible (C) en los híbridos provenientes del cruce “AdvClones × Hyb *chq*”.

Del total de individuos evaluados, el 55.5 por ciento parece estar libre de genes *R*, mientras que el 18.2 por ciento presentó reacción de incompatibilidad con ambas cepas, es decir, manchas necróticas, posiblemente a causa de la presencia de genes *R*; el 22.7 por ciento presentó reacción de compatibilidad/incompatibilidad en una y en otra cepa, finalmente, solo el 3.6 por ciento de los individuos evaluados presentaron datos no concluyentes (Tabla 18).

Cuando se agrupa por la fuente de resistencia, se encuentra 244 y 241 híbridos, libres de genes *R* en la cepa *PCO055* y *PCO002*, respectivamente. Se les considera libres de genes *R* si no presentan diferencias en la respuesta a las dos razas en todas las plantas que llevan las lesiones de extensión. En 104 y 110 híbridos se observó una respuesta incompatible con el aislamiento *PCO055* y *PCO002*, respectivamente. Se considera como incompatible, si las plantas inoculadas con la raza compleja son asintomáticas, o tienen puntos necróticos aislados, o las lesiones se extienden solo en las hojas más viejas. La presencia de esta reacción implicaría una posible presencia de genes *R*, pero para ello debería de comprobarse mediante la inoculación de estos genotipos con una raza 0 o simple, ya que se considera una raza incapaz de infectar cualquier planta que tenga

genes R dando una respuesta de completa incompatibilidad o una reacción de hipersensibilidad.

Tabla 18. Evaluación de reacción de los híbridos seleccionados a dos aislamientos complejos mediante prueba de hojas sueltas.

Tipo de cruce	PCO055			PCO002		
	(raza 1.2.3.4.6.7.8. (9).10.11)			(raza 1.2.3.4.6.7.8.10.11)		
	C	I	No evaluado o confirmado	C	I	No evaluado o confirmado
AdvClones × Hyb <i>chq</i>	143 (61.1%)	84 (35.8%)	7 (3.1%)	154 (65.8%)	76 (32.4%)	4 (1.8%)
AdvClones × Hyb <i>pcs</i>	41 (74.5%)	14 (25.5%)	0	35 (63.6%)	18 (32.7%)	2 (3.7%)
AdvClones × Hyb <i>cjm</i>	52 (86.6%)	6 (10%)	2 (3.4%)	50 (83.3%)	10	0
AdvClones × Hyb <i>sgr</i>	8 (100%)	0	0	2 (25%)	6 (75%)	0
Total	244 (68.3%)	104 (29.1%)	9 (2.6%)	241 (67.5%)	110 (30.8%)	6 (1.7%)

Nota= C: reacción compatible; I: reacción Incompatible

Es importante destacar que la expresión de los factores de virulencia o avirulencia son influenciados por varios factores, los principales son de carácter genético, inherentes tanto al patógeno como a la planta, como son la genética determinada por la virulencia del patógeno y la genética determinada por la resistencia específica de la planta, además de una condición que es inherente al ambiente bajo el cual se desarrolló la prueba (Al-Kherb *et al.* 1995). En este punto, como mencionan Świeżyński *et al.* (2000), es importante considerar factores que pueden influenciar en los resultados de laboratorio, como lo son la posición del foliolo en la planta cuando se colectan, la temperatura ambiental en la que se desarrollaron las plantas sometidas a la prueba, la concentración del inóculo, la fertilización aplicada a las plantas y el pre tratamiento del patógeno para obtener el inóculo.

Todos estos factores fueron considerados antes de realizar esta prueba y es la razón por la que se realizó solo en los híbridos seleccionados. Además las muestras de hojas fueron colectadas de las plantas sembradas en el campo en La Molina.

Asimismo, se incluyeron a testigos de resistencia conocida para incluirse en la prueba respectiva (Tabla 19), a fin de observar las reacciones de compatibilidad.

Tabla 19. Reacciones de Compatibilidad (C) /Incompatibilidad (I) en los testigos utilizados en la prueba de hojas sueltas.

Testigos	PCO055	PCO002
	(raza 1.2.3.4.6.7.8. (9).10.11)	(raza 1.2.3.4.6.7.8.10.11)
LBr-40 (R)	C	I
Perricholi (MR)	C	C
Yungay(S)	C	C
Chata Blanca (S)	C	C
r	C	x

La prueba de hojas sueltas (*DLA*) supera las limitaciones de tiempo y espacio, proporciona un entorno compacto, relativamente rápido y una evaluación fiable para la detección complementaria de plantas con resistencia al tizón tardío. Investigaciones recientes consideran que esta prueba es un método fiable para la cuantificación de la resistencia gobernada por genes mayores y menores, debido a lo cual se utiliza ampliamente en estudios complementarios, por ser una prueba rápida y sencilla que puede reducir tanto el costo y la duración de un tamizado de resistencia a *P. infestans* como lo han reportado anteriormente los estudios de Lebecka., 2008; Huang *et al.*, 2005 y Goth y Keane, 1997.

Adicionalmente, se realizó un análisis combinado de la variable porcentaje de lesión transformada a Arcoseno de los híbridos y la interacción del aislamiento con estos, a fin de observar las diferencias estadísticas (Tabla 20).

La interacción entre los dos aislamientos evaluados fue estadísticamente significativa ($p < .0001$), lo cual concuerda con la elección de ambas cepas para la validación de la resistencia a *P. infestans* y el descarte de la presencia de genes *R* conocidos en los individuos evaluados. Asimismo, se observa una alta variabilidad de reacciones en

todos los híbridos evaluados. A pesar de la significancia de la interacción, no hay cambios dramáticos en las reacciones de compatibilidad/incompatibilidad pues esta prueba es complementaria a la realizada en campo.

Tabla 20. Análisis de Variancia combinado de porcentaje de lesión de los híbridos con los dos aislamientos complejos.

Fuente de Variación	gL	Porcentaje de lesión [†]	
		CM	Pr>F
Aislamiento	1	339.098	**
Repetición (Aislamiento)	4	14.691	ns
Híbridos HER	354	2071.38	**
Aislamiento × Híbridos HER	343	643.976	**
Total	2096		
Promedio	25.65		
CV	17.84		
r²	0.97		

[†] transformado a ArcSeno.

ns: no significativo a $P < 0.05$; *: significativo a $P < 0.05$; **: significativo a $P < 0.01$; ***: altamente significativo a $P < .0001$.

Adicionalmente a estos resultados empíricos se decidió que los híbridos con mejor performance agronómico se evaluarán en campo bajo infección natural para una validación de la resistencia.

4.7 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A *P. INFESTANS* DE LOS HÍBRIDOS SELECCIONADOS, MEDIANTE TAMIZADO EN CAMPO BAJO INFECCION NATURAL, UTILIZANDO UN DISEÑO ALFA LÁTICE CON TRES REPETICIONES (MONOBAMBA – 2014)

Se seleccionaron 231 clones con resistencia para la validación en el siguiente año en Monobamba. El objetivo fue la evaluación del nivel de resistencia, como en el experimento anterior se incluyó a los respectivos parentales.

Las condiciones climáticas del experimento se presentan en la Tabla 21. Los rangos de Temperatura (T°C), humedad relativa (HR%), radiación fotosintéticamente activa (PAR) y precipitación (mm) están discriminados en valores máximos, promedios y mínimos desde la siembra hasta el final del experimento. Asimismo, en la Figura 25 se observa la gráfica de tendencias de registros promedio del periodo de cultivo de las variables meteorológicas en las curvas de Temperaturas en °C y porcentaje de Humedad Relativa.

Tabla 21. Valores promedio de temperatura (T°C), porcentaje de humedad relativa (HR%), radiación fotosintéticamente activa (PAR) y precipitación (mm) en los meses en que se desarrolló el experimento en campo, Monobamba 2014.

Variables*/ Mes	Enero	Febrero	Marzo	Abril
T°C max.	30.9	31.2	31.9	29.9
T°C prom[‡]	21.89	21.8	21.9	21.5
T°C min.	13.93	14.5	13.4	12.7
HR% max.	98	98.6	99	99.4
HR% prom[‡]	80.7	82.7	81.6	82.2
HR% min.	49.4	55.7	50.4	54.9
Max: PAR uE	2553.7	2553.7	2553.7	2553.7
Min: PAR uE	1.2	1.2	1.2	1.2
Precipitación mm	139.8	224.4	221.4	136.2

*Registros cada media hora.

‡Prom: valores promedio. Fecha de siembra: Abril, duración del ciclo de cultivo: Enero-Abril. S

En las dos temporadas de evaluación, los campos experimentales condujeron al desarrollo de la enfermedad en distintos grados de incidencia y severidad.

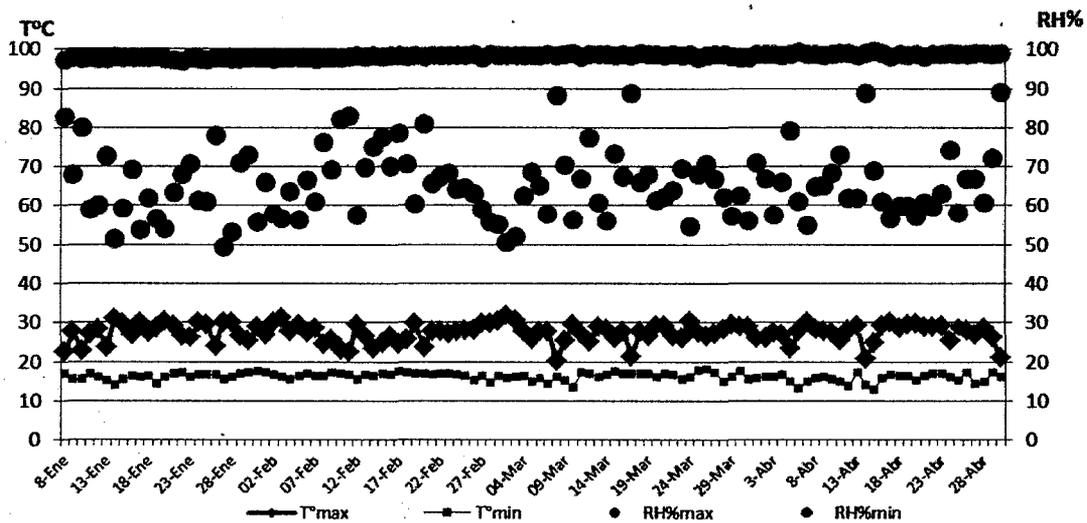


Figura 25. Monitoreo de temperatura (T°C), porcentaje de humedad relativa (HR%), durante el experimento en campo de evaluación de resistencia a *P. infestans*. Monobamba 2014.

El análisis de variancia para las variables AÚDPC, RAUDPC y SAUDPC (Tabla 22) reflejó que existieron diferencias estadísticas significativas para los híbridos evaluados. La alta significación para los tratamientos determina que los híbridos evaluados presentaron diferentes niveles de resistencia y que existe suficiente variabilidad genética.

Tabla 22. Análisis de variancia de las variables AUDPC, RAUDPC y SAUDPC en un diseño alfa látice, Monobamba 2014.

Fuente de Variación	gL	AUDPC		RAUDPC		SAUDPC	
		CM	Pr>F	CM	Pr>F	CM	Pr>F
Repeticiones	2	355950	**	0.0155	**	0.553	*
Bloques en rep. (Ajustado)	51	17886	*	0.00076	*	0.173	*
Tratamientos	269	4279185	**	0.1781	**	15.74	**
Error Intrabloque	487	12224		0.000521		0.12	
Total	809						
CV		14.1		8.64		8.64	
Promedio		1307.01		0.26		2.46	
r ²		0.99		0.99		0.98	

ns: no significativo a $P < 0.05$; *: significativo a $P < 0.05$; **: significativo a $P < 0.01$; ***: altamente significativo a $P < 0.001$.

El AUDPC es una variable pseudocuantitativa que cuantifica el nivel de resistencia genética del clon o variedad a *P. infestans* en condiciones de campo. No obstante, Yuen y Forbes (2009) estiman que el coeficiente de variación (CV) del AUDPC entre ensayos se reduce cuando se utiliza el RAUDPC, y se reduce aún más cuando se utiliza el SAUDPC. Esto concuerda con los valores de CV de las variables de RAUDPC y SAUDPC de este experimento que es de 8.64 en ambos casos, comparado con el CV del AUDPC que es de 14.1.

En la tabla 23, se observa a los individuos agrupados por tipo de cruce y su correspondiente valor promedio de AUDPC, RAUDPC y SAUDPC, así como su respectiva desviación estándar. Los valores de AUDPC indican un rango de reacciones desde completamente resistentes (< 900) hasta completamente susceptibles (>4000) entre individuos provenientes del mismo tipo de cruce.

El valor mínimo de AUDPC para los parentales tetraploides (4x), es 2.5 y el máximo de 4245.57, y el valor promedio En cuanto a los valores de parentales diploides (2x) el mínimo es 96.96 y el máximo corresponde al Hyb *cjm* con 2106.98.

Tabla 23. Consolidado del promedio de AUDPC, RAUDPC y SAUDPC de los híbridos y parentales.

Parentales/Tipo de cruce	Nº individuos	AUDPC	RAUDPC	SAUDPC [‡]
Parentales 4x	14	2427.74 ± 1514.1	0.49 ± 0.3	4.59 ± 2.9 a
AdvClones × Hyb <i>chq</i>	137	1193.30 ± 1165.6	0.24 ± 0.2	2.23 ± 2.3 c
AdvClones × Hyb <i>pcs</i>	53	1558.05 ± 1116.6	0.31 ± 0.2	2.95 ± 2.2 b
AdvClones × Hyb <i>cjm</i>	34	1257.21 ± 1069.3	0.25 ± 0.2	2.37 ± 1.9 c
AdvClones × Hyb <i>sgr</i>	7	827.60 ± 833.6	0.16 ± 0.1	1.66 ± 1.7 d
Parentales 2x	14	490.41 ± 493.1	0.1 ± 0.09	0.92 ± 0.9 e

[‡] Valores en la columna seguidos por la misma letra, no tienen diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (P<=0.05).

La Figura 26 refleja la distribución de los valores de AUDPC promedio y el número de individuos que se ubican en los diferentes rangos de estos valores, lo que nos muestra un panorama general de la variabilidad de resistencia presentada en toda la progenie, al lado de los parentales involucrados. Como en las gráficas anteriores, se mantuvo el color asignado al tipo de donante involucrado en el cruzamiento a fin de facilitar el seguimiento de las combinaciones híbridas generadas.

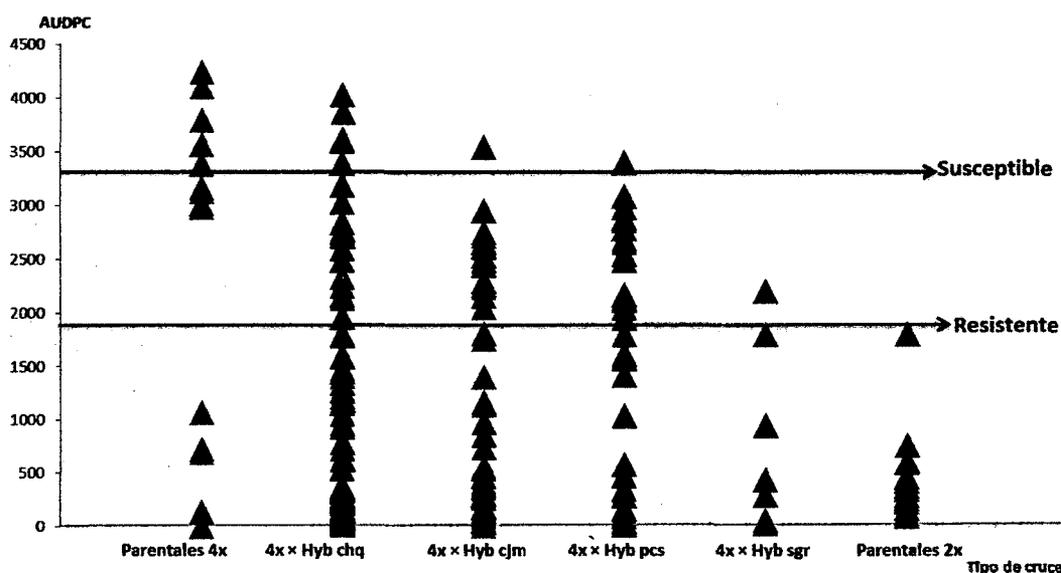


Figura 26. Distribución de los valores de AUDPC según el tipo de cruce y los parentales correspondientes; Monobamba 2014.

Se observa una distribución de los valores de AUDPC desplazados hacia la izquierda del gráfico para los híbridos provenientes de los cruzamientos AdvClones × Hyb *chq*, reflejando una mayor proporción de genotipos resistentes, y esto es consecuencia de la selección de híbridos resistentes en la primera evaluación de tamizado en campo realizado en Monobamba 2012. Los valores de AUDPC estuvieron en el rango de 0 a 4491.4, presentando un valor promedio de 1193.30 ± 1165.6 . Si se analizan los intervalos de AUPDC, el que presenta el mayor número de híbridos es el rango 0 a 499.9, mientras que el menor número de híbridos está en el rango de 3993 a 4491, como lo refleja la Figura 27.

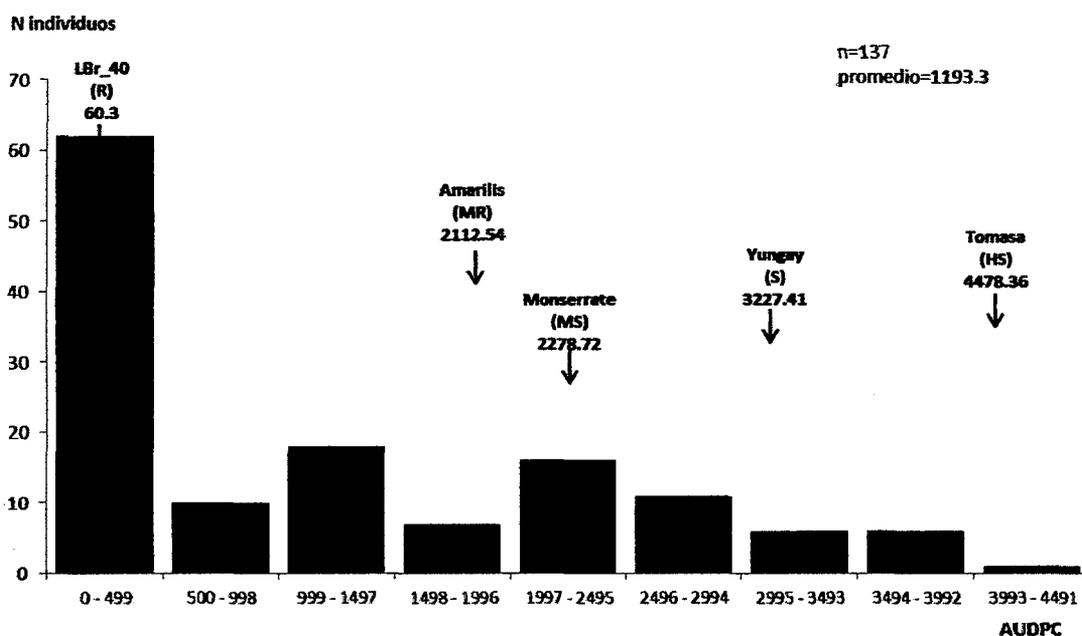


Figura 27. Distribución de frecuencias de los valores de AUDPC de las familias que tienen como donante a los híbridos de *S. chiquidenum*.

Con respecto a la distribución de los valores AUDPC para los híbridos provenientes del cruzamiento AdvClones × Hyb *pcs*, también se puede observar una distribución de los valores hacia la izquierda. Los valores de AUDPC estuvieron en el rango de 0 a 3916.9, con un valor promedio de 1558.05 ± 1116.6 . Si se analizan los intervalos de AUPDC, el que presenta el mayor número de híbridos es el rango 0 a 559.6, mientras que el menor número de híbridos está en el rango de 3358 a 3916, como lo refleja la Figura 28.

Con respecto a los híbridos provenientes del cruzamiento AdvClones × Hyb *cjm*, se observa una distribución de los valores de AUDPC desplazados ligeramente hacia la izquierda del gráfico. Los valores de AUDPC estuvieron en el rango de 0 a 3706.0, con un valor promedio de 1257.21 ± 1069.3 . Si se analizan los intervalos de AUPDC, el que presenta el mayor número de híbridos es el rango 0 a 529.4, mientras que el menor número de híbridos está en el rango de 3177 a 3706, como lo refleja la Figura 29.

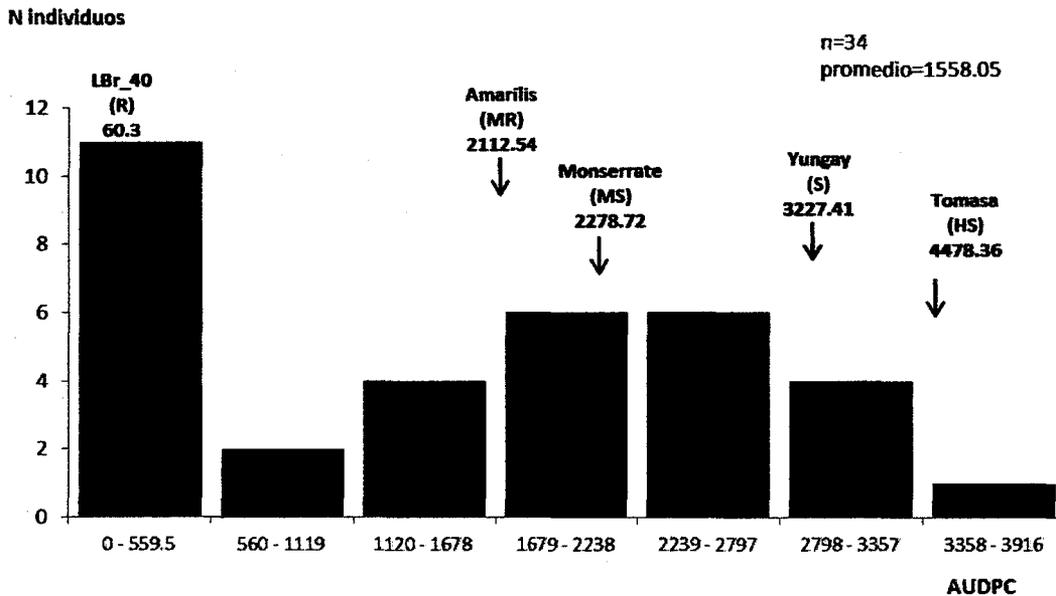


Figura 28. Distribución de frecuencias de los valores de AUDPC de las familias que tienen como donante a los híbridos de *S. paucissectum*.

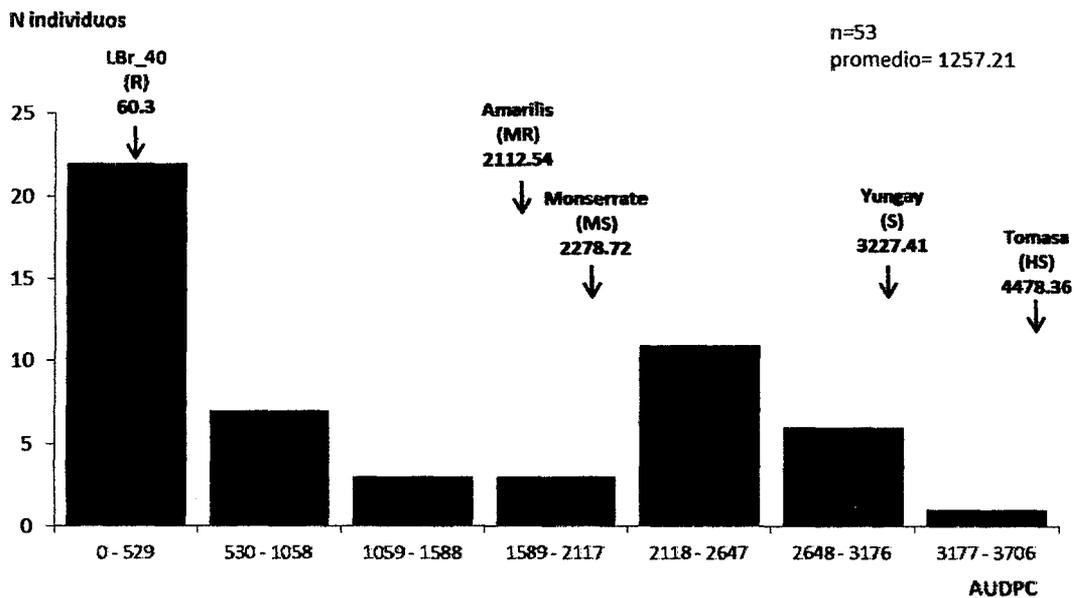


Figura 29. Distribución de frecuencias de los valores de AUDPC de las familias que tienen como donante a los híbridos de *S. cajamarquense*.

En cuanto a la distribución de los valores AUDPC para los híbridos provenientes del cruce AdvClones × Hyb *sgr*, se observa una distribución bimodal, como se refleja en la Figura 30, esto se explicaría por el número reducido de híbridos generados y evaluados. Los valores de AUDPC estuvieron en el rango de 0 a 2301.8, con un valor promedio de 827.6 ± 833.6 . Si se analizan los intervalos de AUPDC, el que presenta el mayor número de híbridos es el rango 0 a 575, mientras que el menor número de híbridos está en el rango de 576 a 1150.

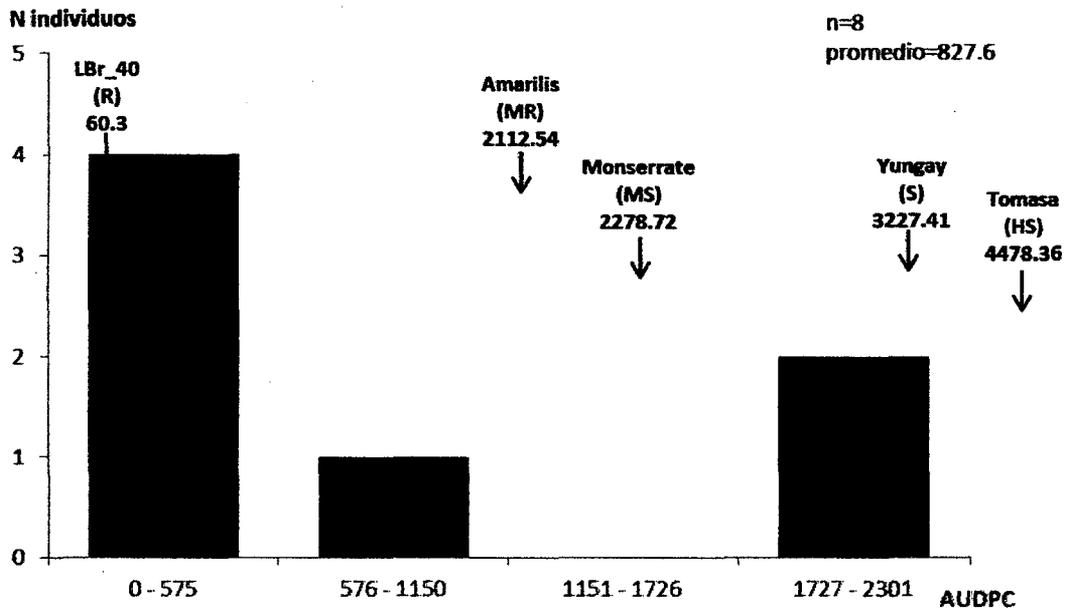


Figura 30. Distribución de frecuencias de los valores de AUDPC de las familias que tienen como donante a los híbridos de *S. sogarandinum*.

Como criterio de selección, el AUDPC de los clones es comparado al AUDPC de los controles susceptibles y resistentes (Forbes *et al.*, 2014). Así, para el tamizado en campo (Monobamba 2014), el AUDPC para Yungay fue de 3227.41, mientras que para los testigos Chucmarina, LBr_40 y Amarilis, los valores de AUDPC fueron 41.43, 60.27 y 728.42, respectivamente. Estos valores reflejan la resistencia de los clones mencionados en situación de alta presión de inóculo, el cual fue favorecido debido principalmente a períodos de bajas temperaturas y alta humedad relativa durante el ciclo de cultivo, así mismo se muestra que el testigo Tomasa (Altamente susceptible), fue seriamente afectado por la enfermedad con valores de 4478.36.

Es probable que las condiciones ambientales en las cuales se evaluaron estos clones favorezcan o no la expresión de su resistencia, especialmente si se toma en cuenta los valores ambientales (como temperatura, humedad relativa y precipitación). Para el caso de Monobamba 2014, el valor promedio de AUDPC del testigo susceptible de referencia (Yungay) fue de 3227.41, mientras que en Monobamba 2012, presentó un valor de 1877.04, esto nos indica que la enfermedad fue más severa en Monobamba 2014.

En base a los valores de AUDPC, RAUDPC y SAUDPC, de los 231 híbridos evaluados en campo, y siguiendo la recomendación de Yuen y Forbes (2009), se utilizó la escala de susceptibilidad basada en los valores de AUPDC para seleccionar a los híbridos resistentes, seleccionándose 155 híbridos que poseían valores de resistencia en el rango de altamente resistentes a moderadamente resistente (siguiendo la escala de AUDPC (SAUDPC)) aquellos que presentaron valores de 0 a 4.

De los 155 híbridos seleccionados, 95 pertenecían al cruzamiento AdvClones × Hyb *chq*, 19 al cruzamiento AdvClones × Hyb *pcs*, 36 al cruzamiento AdvClones × Hyb *cjm* y 5 a al cruzamiento AdvClones × Hyb *sgr* (Tabla 24).

Tabla 24. Resumen de los individuos seleccionados después de la evaluación en campo Monobamba 2014, agrupados por tipo de cruce.

Tipo de cruce	Nº individuos sembrados	Nº individuos seleccionados por resistencia (SAUDPC:0-5)	Nº individuos seleccionados por resistencia (SAUDPC:0-4)
AdvClones × Hyb <i>chq</i>	137	117 (85.4%)	95 (69.3%)
AdvClones × Hyb <i>pcs</i>	34	25 (73.5%)	19 (55.8%)
AdvClones × Hyb <i>cjm</i>	53	46 (86.8%)	36 (67.9%)
AdvClones × Hyb <i>sgr</i>	7	7 (100%)	5 (71.4%)
Total	231	195 (84.4%)	155 (67%)

Con respecto a la ploidía, de los 155 individuos seleccionados, 139 y 16 serían tetraploides y triploides, respectivamente. En relación a la viabilidad de polen, 51 serían altamente fértiles y 57 moderadamente fértiles. (Anexo I, Tabla 3).

A la fecha, este es el primer reporte exitoso de incorporación de resistencia a *P. infestans*, proveniente de especies silvestres filogenéticamente distantes, y además endémicas de regiones del Perú con alta presión del patógeno, de los grupos Piurana (*S.*

chiquidenum y *S. pauciseccum*), Tuberosa (*S. cajamarquense*) y Megistracroloba (*S. sogarandinum*), en el fondo genético cultivado, utilizando la poliploidización sexual unilateral.

Los programas de mejoramiento de papa de los diferentes centros de investigación de todo el mundo continúan buscando genes de resistencia de fuentes exóticas, que conduzcan a una resistencia duradera. Algunas de las fuentes muy bien identificadas han sido *S. bulbocastanum* y *S. cardiophyllum* (Naess *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2006). Adicionalmente, otra fuente de resistencia a tizón tardío, utilizada durante la última década es *S. microdontum* (Adillah Tan *et al.*, 2008; Bisognin *et al.*, 2005).

Es importante tener en cuenta que el enfoque de piramidación de genes debe ser combinado con un fondo genético de genes menores, para reducir aún más el riesgo de pérdida de la resistencia. Aun cuando el mejorador ha transferido con éxito los genes de interés de la especie donante a la papa cultivada, aún quedan importantes retos en el mejoramiento; pueden ser necesarios múltiples generaciones de cruzamiento y selección para lograr un clon con atributos fenotípicos aceptables y cada generación debe ser examinada para asegurar que el nuevo gen o genes de resistencia a la enfermedad han sido incorporados y se mantienen en el paso del tiempo (Aversano, 2007).

El objetivo del mejorador es obtener un tipo de resistencia independiente de los genes R y de naturaleza poligénica, que es más duradera que una resistencia de herencia monogénica de genes R; sin embargo, la resistencia parcial es dependiente de la duración del día y está fuertemente correlacionada con madurez tardía en condiciones de días largos (Turkensteen, 1993); aun cuando se logre el objetivo, algunos estudios de caso han reportado una erosión de la resistencia general (Flier *et al.*, 2003,) y esto se explicaría pues a menudo la resistencia introgresada se basa en dos o tres loci mayores de rasgos cuantitativos (QTLs) en posiciones del genoma que a menudo corresponden a los loci que albergan grupos de genes R. Esto sugeriría que la resistencia parcial tiene la misma base molecular que la de los genes R (Gebhardt y Valkonen, 2001; Grube *et al.*, 2000). Así, es importante continuar en la identificación de genes R mayores adicionales, que confieran una resistencia de amplio espectro contra el tizón tardío e introducirla en variedades modernas de papa.

Como parte de las nuevas técnicas, el aislamiento de genes objetivo de especies de *Solanum* y su transformación estable como genes *cis* en variedades modernas de papas,

es de lejos el medio más rápido para explotar una resistencia duradera al tizón tardío en el acervo genético de *Solanum* (van der Vossen *et al.*, 2005).

El aporte mediante la generación de productos intermedios o *pre-bred stocks* provenientes de fuentes novedosas de resistencia permite ampliar la base genética de la papa cultivada y es uno de los pasos más importantes en el mejoramiento genético, tanto hacia la comprensión de la utilidad potencial de las fuentes de resistencia exóticas, y también proporciona una base para elucidar los mecanismos de resistencia contra el tizón tardío.

V. CONCLUSIONES

- Este es el primer reporte de utilización exitosa de especies silvestres y filogenéticamente distantes de los grupos Piurana (*S. chiquidenum* y *S. paucisectum*), Tuberosa (*S. cajamarquense*) y Megistracroloba (*S. sogarandinum*) para la incorporación de resistencia en el fondo genético cultivado, utilizando la poliploidización sexual unilateral.
- El éxito en las hibridaciones confirmó la transferencia de grupos de genes o segmentos de cromosomas, a partir de híbridos interespecíficos diploides (Hyb *chq*, Hyb *cjm*, Hyb *pcs* e Hyb *sgr*) resistentes a tizón tardío a clones avanzados del programa de Mejoramiento del CIP. Se generaron 64 familias con 1978 semillas híbridas a partir de las cuatro combinaciones de cruzamientos, de las cuales 1812 germinaron exitosamente.
- Los resultados obtenidos sugieren que los híbridos generados en este estudio presentan un amplio rango de valores de AUDPC. De los 1039 híbridos evaluados en el primer tamizado en campo en Monobamba en el 2012, se seleccionaron 357 que poseían valores de resistencia en el rango de altamente a moderadamente resistentes. Se consideraron variables adicionales para incrementar la precisión de la selección.
- Las variables de número, longitud de estolones y rendimiento (kg/plt) presentaron diferencias significativas entre las distintas combinaciones de cruzamientos. La mayoría de los híbridos presentaron diferencias significativas en relación a las variables agronómicas evaluadas comparadas con los parentales tetraploides, aunque también se encontraron híbridos que poseían valores de rendimiento superiores dentro de todas las combinaciones.

- El efecto de la tetraploidización sexual en el rendimiento de la papa está acompañado de una disminución de fertilidad, pero este efecto está ligado al tipo de citoplasma pero este efecto está ligado al tipo de citoplasma que se hereda de forma materna. De los 357 híbridos seleccionados, solo 186 presentaron una alta a moderada viabilidad de polen y podrían ser utilizados como parentales masculinos en futuros cruzamientos.
- La existencia de gametos no reducidos en las plantas diploides se confirma además por la distribución de ploidías de los híbridos evaluados. Los resultados indican que de un total de 355 híbridos evaluados, 326, 91 por ciento, son tetraploides y 29, 9 por ciento son triploides.
- La prueba de hojas sueltas complementó la evaluación de resistencia en campo y los resultados de las reacciones de compatibilidad/incompatibilidad concuerdan con la elección de los dos aislamientos complejos para la validación de la resistencia a *P. infestans* y el descarte de la presencia de genes *R* conocidos en los híbridos evaluados.
- De los 231 híbridos evaluados en el segundo tamizado en campo, Monobamba en el 2014, se seleccionaron 155 híbridos que poseían valores de resistencia en el rango de altamente a moderadamente resistentes.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar los híbridos seleccionados por su potencial de resistencia a *P. infestans*, características agronómicas deseables y fertilidad de polen en diferentes ambientes.
- Realizar análisis de otras características útiles para los mejoradores, ejm: análisis de glicoalcaloides totales (TGA) en los híbridos seleccionados y pruebas sensoriales en diferentes ambientes y bajo condiciones de estrés.
- Realizar estudios cromosómicos moleculares (Hibridación Genómica *in situ* por fluorescencia (GISH), etc.) en los híbridos que presenten altos niveles de resistencia a *P. Infestans*, con la finalidad de caracterizarlos y obtener marcadores cromosómicos que permitan individualizar grupos de cromosomas, o cromosomas individuales, y obtener mapas físicos útiles en el programa de mejoramiento de papa, en estudios evolutivos y filogenéticos.
- Evaluar, a nivel molecular, si los clones seleccionados poseen regiones del cromosoma con nuevos alelos de resistencia diferentes a los ya estudiados.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADILLAH TAN M. Y., HUTTEN R. C. B., CELIS C., PARK T-H., NIKS R. E., VISSER R. G. F. and VAN ECK H. J. 2008. The *RPi-mcd1* locus from *S. microdontum* involved in resistance to *Phytophthora infestans*, causing a delay in infection, maps on potato chromosome 4 in a cluster of *NBS-LRR* genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 909-918.
- ADIWILAGA K. D., and BROWN C. R. 1991: Use of 2n pollen-producing triploid hybrids to introduce tetraploid Mexican wild species germplasm to cultivated tetraploid potato gene pool. *Theor. Appl. Genet.* 81: 645-662.
- AGRIOS .N. 1997. *Plant Pathology* 4th edition. Academic Press., London, p 274-278.
- ALBERINO S., CARPUTO D., CARUSO G., ERCOLANO M. R. and FUSCIANTE L. 2004. Field performance of families and clones obtained through unilateral sexual polyploidization in potato (*Solanum tuberosum*) Ad. *Hort Sci* 18(2): 47-52.
- AL-KHERB S. M., FININSA C., SHATTOCK R. C. and SHAW D. S. 1995. The inheritance of virulence of *Phytophthora infestans* to Potato. *Plant Pathology* 44: 552-562.
- ALMEKINDERS C. J. M., CHILVER A. S., and RENIA H. M. 1996. Current status of the TPS technology in the world. *Potato Res.* 39: 289-303.
- ANDERSSON B. 2007. Sexual reproduction in *Phytophthora infestans*—epidemiological consequences. Doctoral thesis no 2007:77, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences Swedish University of Agricultural Sciences. ISBN 978-91-576-7376-3.

- AVERSANO R., ERCOLANO M., FRUSCIANTE L., MONTI E. L., BRADEEN E. J. M., CRISTINZIO E. G., ZOINA E. A., GRECO N., VITALE E. S. and CARPUTO D. 2007. Resistance traits and AFLP characterization of diploid primitive tuber-bearing potatoes. *Genet Resour Crop Evol*: **54**: 1797-1806.
- BARBA-GONZALEZ B., LIM K. B., RAMANNA M. S., VISSER R. G. F. and VAN TUYL J. J. M. 2005. Occurrence of 2n gametes in the F1 hybrids of Oriental × Asiatic lilies (*Lilium*): Relevance to intergenomic recombination and backcrossing. *Euphytica* **143**: 67-73.
- BARBA-GONZALEZ R., LOKKER A. C., LIM K. B., RAMANNA M. S., and VAN TUYL J. J. M. 2004. Use of 2n gametes for the production of sexual polyploids from sterile Oriental × Asiatic hybrids of lilies (*Lilium*). *Theor. Appl. Genet.* **109** (6): 1125-1132.
- BASTIAANSEN H. J. M., VAN DEN BERG P. M. M. M., LINDHOUT P., JACOBSEN E., and RAMANNA M. S. 1998. Postmeiotic restitution in 2n egg formation of diploid potato. *Heredity* **81**: 20-27.
- BISOGNIN D. A., DOUCHES D. S., BUSZKA L., BRYAN G., and WANG D. 2005. Mapping Late Blight Resistance in *Solanum microdontum* Bitter. *Crop Sci.* **45**: 340-345.
- BRETAGNOLLE F and THOMPSON J. D. 1995. Gametes with the somatic chromosome Lumber: mechanism of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist* **129**: 1-22.
- BUDIN K.Z. and GAVRILENKO T.A. 1994. Genetic Basis of Remote Hybridization in Potato (Review). *Russ. J. Genet.* **30(10)**: 1225-1233.
- BUSO J. A., BOITEUX L. S and PELOQUIN S. J. 2003. Tuber yield and quality of 4x-2x (FDR) potato progenies derived from the wild diploid species *Solanum berthaultii* and *Solanum tarijense*. *Plant Breeding* **122**: 229-232.
- CALZADA G. J. 1981. Métodos estadísticos para la investigación. Editorial LIMUSA. Lima, Perú. 245p.

- CAMADRO E. L. 1986. Los gametos $2n$ en el origen y la evolución de los angiospermos poliploides. *Mendeliana* 7: 85-96.
- CAMADRO E. L., CARPUTO D, PELOQUIN. S. J. 2004. Substitutes for genome differentiation in tuber-bearing *Solanum*: interspecific pollen-pistil incompatibility, nuclear-cytoplasmic male sterility, and endosperm. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1369-1376.
- CAMADRO E. L., IWANAGA M, and ORTIZ R. 1993. Control genético de la producción de polen $2n$ por husos paralelos en papas. *Revista Latinoamericana de papa* 5/6: 20-29.
- CARA N., MARFIL C. F., and MASSUELLI R. W. 2013. Epigenetic patterns newly established after interspecific hybridization in natural populations of *Solanum*. *Ecology and Evolution* 3(11): 3764-3779.
- CARPUTO D and BARONE A. 2005. Ploidy level manipulations in potato through sexual hybridisation. *Annals of Applied Biology* 146: 71-79.
- CARPUTO D., BARONE A., SEBASTIANO A., FRUSCIANTE L and PELOQUIN S. J. 1997. Endosperm balance number manipulation for direct in vivo germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.) *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 12013-12017.
- CARPUTO D., FRUSCIANTE L and PELOQUIN S.J. 2003. The Role of $2n$ Gametes and Endosperm Balance Number in the Origin and Evolution of Polyploids in the Tuber-Bearing *Solanums*. *Genetics* 163: 287-294.
- CARPUTO D., GARREFFA P., MAZZEI M., MONTI L., and CARDI T. 1998: Fertility of somatic hybrids *Solanum commersonii* (2x, 1EBN) (+) *S. tuberosum* haploid (2x, 2EBN) in intra- and inter-EBN crosses. *Genome* 41: 776-781.
- CARPUTO D., MONTI L., WERNER J. E and FRUSCIANTE L. 1999. Uses and usefulness of endosperm balance number. *Theor Appl Genet* 98: 478-484.
- CHAUVIN J.E, SOUCHET C, DANTEC J. P and ELLISSECHE D. 2003. Chromosome doubling of 2x *Solanum* species by oryzalin: method development

and comparison with spontaneous chromosome doubling *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **73**: 65-73.

- CLAYTON R. C., and SHATTOCK R. C. 1995. Reduced fungicide inputs to control *Phytophthora infestans* in potato cultivars with high levels of polygenic resistance. *Potato Res.* **38**: 399-405.
- COSTANZO S., CHRIST B. J., and HAYNES K. G. 2004. Late blight resistance in a diploid full-sib potato family. *Plant Breeding* **123**(4): 377-381.
- COOPER-BLAND S., DE MAINE M. J., STEWART H. E., FLEMING M. L., PHILLIPS M. S. and KUMAR A. 1996. Intraspecific somatic and sexual hybridization between dihaploid lines of *Solanum tuberosum* L.: Evaluation of morphological traits and resistance to late blight *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the foliage. *Euphytica* **90**: 209-216.
- DARMO E and PELOQUIN S. J. 1991. Use of 2x *Tuberosum* haploid-wild species hybrids to improve yield and quality in 4x cultivated potato. *Euphytica* **53**: 1-9.
- DE HAAN S.; FORBES A.; AMOROS W.; GASTELO M.; SALAS E.; HUALLA V.; DE MENDIBURU F.; BONIERBALE M. 2014. Metodologías de Evaluación Estándar y Manejo de Datos de Clones Avanzados de Papa. Módulo 2: Evaluación del rendimiento de tubérculos sanos de clones avanzados de papa. Guía para Colaboradores Internacionales. Lima (Perú). Centro Internacional de la Papa. 44 p.
- DE STORME N and GEELEN D. 2013. Sexual polyploidization in plants – cytological mechanisms and molecular regulation. *New Phytologist* **198**(3): 670-84.
- DEWITTE A., VAN LAERE K, and VAN HUYLENBROECK J. 2012. Use of 2n gametes in Plant Breeding. In: Abdurakhmonov, I.Y. (Ed.) *Plant Breeding*. 60-89.

- DINU I. I., HAYES R. J., KYANST R. G., PHILLIPS R. L and THILL C. A. 2005. Novel inter-series hybrids in *Solanum*, section Petota. *Theor. Appl. Genet.* **110**: 403-415.
- EHLENFELDT M. K. and HANNEMAN R. E. Jr .1988. Genetic control of endosperm balance number (EBN): three additive loci in a threshold-like system. *Theor. Appl. Genet.* **75**: 825-832.
- EL-KHARBOTLY A., PEREIRA A., STIEKEMA W. J and JACOBSEN E. 1996. Race specific resistance against *Phytophthora infestans* in potato is controlled by more genetic factors than only R-genes. *Euphytica* **90**: 331-336.
- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization Statistical. 2013. FAO Statistical Database 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, Italy. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/home/index.html>.
- FLIER W. G., VAN DEN BOSCH G. B. M. and TURKENSTEEN L. J. 2003. Stability and partial resistance in potato cultivars exposed to aggressive strains of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* **52**: 326-337.
- FORBES G. A., ESCOBAR X. C., AYALA C. C., REVELO J., ORDOÑEZ M. E., FRY B. A., DOUCETT K., and FRY W. E. 1997. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology* **87**: 375-380.
- FORBES G.; PÉREZ W., y ANDRADE PIEDRA J. 2014. Procedimiento para Evaluación Estándar y Manejo de Datos de Clones Avanzados de Papa. Módulo 3: Evaluación de la resistencia en genotipos de papa a *Phytophthora infestans* bajo condiciones de campo. Guía para Colaboradores Internacionales. Lima (Perú). Centro Internacional de la Papa (CIP). 50 p.
- FORBES G. A., TRILLOS O., TURKENSTEEN L., HIDALGO O. 1993. Field inoculation of potatoes with *Phytophthora infestans* and its effect on the efficiency of selection for quantitative resistance in the plants. *Fitopatología* **28**: 117-120.

- FRY W. E., GOODWIN S. B., DYER A. T., MATUSZAK J. M., DRENTH A., TOOLEY P. W., SUJKOWSKI L. S., KOH Y. J., COHEN B. A., SPIELMAN L. J., DEAHL K. L., INGLIS D. A., and SANDLAN K. P. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications. *Plant Disease* **77**: 653-661.
- GARRY G., SALAS A., FORBES G. A., PEREZ W., CRUZ M. S., NELSON R. J. 2005. Host specialization not detected in isolates of *Phytophthora infestans* attacking wild and cultivated potatoes in Peru. *European Journal of Plant Pathology* **113**: 71-81.
- GEBHARDT C. and VALKONEN J. P. T. 2001. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**:79-102.
- GLASS J. R., JOHNSON K. B., and POWELSON M. L. 2001. Assessment of barriers to prevent the development of potato tuber blight caused by *Phytophthora infestans*. *Plant Dis.* **85**: 521-528.
- GONZALEZ M. E, ESTEVEZ A, CASTILLO J, SALOMON J, MORE O y HERNANDEZ M. M. 2002. La Calidad del polen: requisito indispensable del mejoramiento tradicional de la papa en Cuba. *Revista Latinoamericana de la Papa* **13(1)**: 75-94.
- GOTH R. W., and KEANE J .1997. A detached-leaf method to evaluate late blight resistance in potato and tomato. *American Potato Journal.* **74(5)**: 347-352.
- GRUBE R. C., RADWANSKI E. R., and JAHN M. 2000. Comparative genetics of disease resistance within the Solanaceae. *Genetics* **155**: 873-887.
- HANNEMAN R. E. Jr and PELOQUIN S. J. 1981. Genetic-cytoplasmic Male Sterility in Progeny of 4x-2x crosses in cultivated potatoes. *Theor. Appl. Genet.* **59**: 53-55.
- HARDON J. J and TAN G. Y. 1969. Interspecific hybrids in the genus *Elaeis* I. Crossability, cytogenetics and fertility of F1 hybrids of *E. guineensis* × *E. oleifera*. *Euphytica* **18**: 372-379.

- HAWKES J. G. 1992. Biosystematics of the potato. In Harris P.M (ed.) The Potato Crop; the scientific basis for improvement. 2da edition. Champan & Hal, Gran Bretaña. pp 13-60.
- HEŘMANOVÁ V., BÁRTA J and ČURN V. 2007. Wild potato species: Characterization and Biological Potential for Potato Breeding. Czech J. Genet. Plant Breed. **43(3)**: 73–81.
- HERMSEN J and TAYLOR L. 1979. Successful cross of non-tuberous *Solanum etuberosum* L. and tuber bearing *S. pinnatisectum* Dun. Euphytica **28**: 1-8.
- HIJMANS R. J.; FORBES G. A. and WALKER T. S., 2000. Estimating the global severity of potato late blight with a GIS-linked disease forecast model. Plant Pathology **49**: 697-705.
- HO I., WAN Y., WIDHOLM J. M and RAYBURN A. L. 2006. The Use of Stomatal Chloroplast Number for Rapid Determination of Ploidy Level in Maize. Plant Breeding **105**: 203-210.
- HOSAKA K. 1986. Who is the mother of the potato? — restriction endonuclease analysis of chloroplast DNA of cultivated potatoes. Theor. Appl. Genet. **72**: 606-618.
- HOSAKA K. and HANNEMAN R. E. Jr. 1988. The origin of the cultivated tetraploid potato based on chloroplast DNA. Theor. Appl. Genet. **76**: 172-176.
- HOSAKA K. and SANETOMO R. 2009. Comparative differentiation in mitochondrial and chloroplast DNA among cultivated potatoes and closely related wild species. Genes Genet. Syst. **84**: 371-378.
- HOSAKA K. and SANETOMO R. 2012. Development of a rapid identification method for potato cytoplasm and its use for evaluating Japanese collections. Theor Appl Genet **125(6)**: 1237-51.
- HUAMAN Z. 1995. Técnicas citológicas para determinar el número cromosómico y la fertilidad de las papas. Guía de Investigación CIP 10. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. 18p.

- HUAMAN, Z. y SPOONER D. M. 2002. Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* sect. *Petota*). *Amer. J. Bot.* **89**: 947-965.
- HUANG S., VLEESHOUWERS V. G. A. A., VISSER R., and JACOBSEN E. 2005. An Accurate in vitro Assay for High-Throughput Disease Testing of *Phytophthora infestans* in potato. *Plant Disease* **89**(12): 1263-1267pp.
- HUSBAND B. C. 2004. The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. *Biol J Linn Soc Lond* **82**: 537-546.
- ISPIZUA V., CAMADRO E. L., CLAUSEN A. M. 1999. Pre-zygotic breeding barriers between the wild diploid potato species *Solanum maglia* and *S. kurtzianum*. *Genet. Resour. Crop Evol.* **46**: 243-249.
- IWANAGA M., FREYRE R., and ORJEDA G. 1991. Use of *Ipomoea trifida* (HBK) G. Don Germplasm for sweet potato improvement. 1. Development of synthetic hexaploids of *I. trifida* by ploidy-level manipulations. *Genome* **34**: 201-208.
- JACKSON S. A and HANNEMAN J. R. 1999. Crossability between cultivated and wild tuber- and non-tuber-bearing *Solanums*. *Euphytica* **109**: 51-67.
- JANSKY S. 2006. Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breed.* **125**: 1-12.
- JANSKY S. H and PELOQUIN S. J. 2006. Advantages of wild diploid *Solanum* species over cultivated diploid relatives in potato breeding programs. *Genetic Resources and Crop Evolution* **53**: 669-674.
- JOHNSTON S. A. and HANNEMAN Jr. R. 1980. Support of the Endosperm Balance Number hypothesis utilizing some tuber-bearing *Solanum* species. *Am. Potato. Journal.* **57**: 7-14.
- JOHNSTON S. A. A. and HANNEMAN R. E. 1996. Genetic control of endosperm balance number (EBN) in the Solanaceae based on trisomic and mutation analysis. *Genome* **39**: 314-321.

- JOHNSTON S. A., NIJS T. P. M., PELOQUIN S. J., HANNEMAN R. E. Jr. 1980. The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theor Appl Genet* **57**: 5-9.
- KAMOUN S., VAN WEST P., and GOVERS F. 1998. Quantification of late blight resistance of potato using transgenic *Phytophthora infestans* expressing beta-glucuronidase. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 521-525.
- KAMOUN S. 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 41-60.
- KELLY J. K., RASCH A, and KALISZ S. 2002. A method to estimate pollen viability from pollen size variation. *American Journal of Botany* **89**: 1021-1023.
- KHAN N., BARBA-GONZALEZ R., RAMANNA M. S., ARENS P., VISSER R. G. F, VAN TUYL J. M. 2010. Relevance of unilateral and bilateral sexual polyploidization in relation to intergenomic recombination and introgression in *Lilium* species hybrids. *Euphytica* **171**: 157-173.
- KIRK W. W., ABU-EL SAMEN F. M., MUHINYUZA J. B., HAMMERSCHMIDT R., DOUCHES D. S., THILL C. A., GROZA H, and THOMPSON A. L. 2005. Evaluation of potato late blight management utilizing host plant resistance and reduced rates and frequencies of fungicide applications. *Crop Protection* **24**: 961-970.
- KÖHLER C., MITTELSTEN SCHEID O., ERILOVA A. 2010. The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploid plants. *Trends Genet* **26**: 142-148.
- KUBÍNOVÁ Z., JANÁČEK J., LHOTÁKOVÁ Z., KUBÍNOVÁ L and ALBRECHTOVÁ J. 2013. Unbiased estimation of chloroplast number in mesophyll cells: advantage of a genuine three-dimensional approach. *Journal of Experimental Botany* **12**: 1-12.
- KUMAR R., KANG G. S., and PANDEY S. K. 2007. Inheritance of resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in potato. *Euphytica* **155**: 183-191.

- LAMOUR K., WIN J., KAMOUN S. 2007. Oomycete genomics: new insights and future directions. *FEMS Microbiology Letters* **274**: 1-8.
- LANDEO J. A., GASTELO M., BELTRAN G, DIAZ L. 1999. Quantifying Genetic Variance for Horizontal Resistance to Late Blight in Potato Breeding Population B3C1. CIP Program Report 1999-2000 pp: 63-68.
- LASKOWSKA D and BERBÈC A. 2005. Cytology and fertility of viable hybrids of *Nicotiana tabacum* L. cv. TB-566 with *N. alata* Link and Otto. *J Appl Genet.***46**: 11-18.
- LEBECKA R. 2008. Host-pathogen interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum nigrum*, *S. villosum* and *S. scabum*. *Europ J. Plant Pathol.* **120**: 233-240.
- LESTER R., and KANG J. 1998. Embryo and endosperm function and failure in *Solanum* species and hybrids. *Annals of Botany* **82**: 445-453.
- LIEDL B. E., MCCORMICK S., MUTSCHLER M. A. 1996. Unilateral incongruity in crosses involving *Lycopersicon pennellii* and *L. esculentum* is distinct from self-incompatibility in expression, timing and location *Sex Plant Reprod* **9**: 299-308.
- LIM K. B., RAMANNA M. S., DE JONG J. H., JACOBSEN E., VAN TUYL J. M. 2001. Indeterminate meiotic restitution (IMR): a novel type of meiotic nuclear restitution mechanism detected in interspecific lily hybrids by GISH. *Theor Appl Genet* **103**: 219-230.
- LÖSSL A., GÖTZ M., BRAUN A, and WENZEL G. 2000. Molecular markers for cytoplasm in potato: male sterility and contribution of different plastid-mitochondrial configurations to starch production. *Euphytica* **116**: 221-230.
- LÖSSL A., ADLER N., HORN R., FREI U., and WENZEL G. 1999. Chondriome type characterization of potato: mt α , β , γ , δ , ϵ and novel plastid mitochondrial configurations in somatic hybrids. *Theor Appl Genet* **98**: 1-10.

- LOZOYA-SALDAÑA H. 2011. Evolution of vertical and horizontal resistance and its application in breeding resistance to potato late blight. *Potato Journal* **38**:1-8.
- LUSSER M., PARISI C., PLAN D., and RODRIGUEZ-CEREZO E. 2012. Development of new biotechnologies in plant breeding. *Nature Biotechnology* **30**: 231-239.
- MAFFEI M., QUINTERO I., ZAMBRANO J., MATERANO W., VALERA A., TORRES C y CAMACHO B. 2011. Comportamiento bajo cultivo de clones de papa resistentes a la candelilla tardía en Trujillo, Venezuela. *Rev. Fac Agron (LUZ)*. **28**(1): 468-477.
- MARFIL C. F., MASUELLI R. W., DAVISON J, and COMAI L. 2006. Genomic instability in *Solanum tuberosum* × *Solanum kurtzianum* interspecific hybrids. *Genome* **49**: 104-113.
- MATTHEIJ W. M. and PUIITE K. J. 1992. Tetraploid potato hybrids through protoplast fusions and analysis of their performance in the field. *Theor Appl Genet* **83**: 807-812.
- MASSUELLI R. W and CAMADRO E. 1997. Crossability relationships among wild potato species with different ploidies and Endosperm Balance Numbers (EBN) *Euphytica* **94**: 227-235.
- MOYLE L. C. 2007. Comparative genetics of potential prezygotic and postzygotic isolating barriers in a *Lycopersicon* species cross. *Journal of Heredity* **98**: 123-235.
- MUSSOLINO C. and CATHOMEN T. 2012. TALE nucleases: tailored genome engineering made easy. *Current Opin. Biotechnol.* **23**: 1-7.
- MUTHONI J., SHIMELIS H., MELIS R., and KABIRA J. 2012. Reproductive biology and early generation's selection in conventional potato breeding. *Australian Journal of Crop Science* **6**(3): 488-497.
- MYBURG A. A., VOGL C., GRIFFIN A. R., SEDEROFF R. R., and WHETTEN R. W. 2004. Genetics of postzygotic isolation in eucalyptus: whole-

genome analysis of barriers to introgression in a wide interspecific cross of *Eucalyptus grandis* and *E. globulus*. *Genetics* **166**: 1405-1418.

- NAESS S. K., BRADEEN J. M., WIELGUS S. M., HABERLACH G. T., McGRATH J. M., and HELGESON J. P. 2001. Analysis of the introgression of *Solanum bulbocastanum* DNA into potato breeding lines. *Mol Genet Genomics* **265**: 694-704.
- ÑÚSTEZ C. 2000. *Phytophthora infestans*. Situación en Latinoamérica. Boletín de la papa.
- OCHOA J. 2004. The potatoes of South America: Peru. Part I: The wild species. (translated by Donald Ugent) CIP, Lima, Peru. Gramps Corporación Gráfica. 1036 pp.
- OH S. K., KAMOUN S., and CHOI D. 2010. Oomycete *RXLR* effectors function as both activator and suppressor of plant immunity. *Plant Pathology Journal* **26**: 209-215.
- ORDOÑEZ B. 2008. Cultivo *in vitro* de embriones de *Solanum spp.* para selección de híbridos resistentes a *Phytophthora infestans*. Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología, Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, Perú. 122p.
- ORDOÑEZ B. 2014. Folleto sobre Determinación de la Viabilidad y Fertilidad del Polen. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 1-4p.
- ORTIZ R., and EHLENFELDT M. K. 1992. The importance of Endosperm Balance Number in potato breeding and the evolution of tuber-bearing *Solanum* species. *Euphytica* **105**: 105-113.
- ORTIZ R., IWANAGA M, and PELOQUIN S. J. 1994. Breeding potatoes for developing countries using wild tuber bearing *Solanum spp.* and ploidy manipulations. *J.Genetic & Breeding* **48**: 89-98.
- ORTIZ R., PELOQUIN S. J., FREYRE R., and IWANAGA M. 1991. Efficiency of potato breeding using FDR 2n gametes for multitrail selection and progeny testing. *Theor Appl Genet* **82**: 602-608.

- ORTIZ R., SIMON P., JANSKY S., and STELLY D. 2009. Ploidy manipulation of the gametophyte, endosperm and sporophyte in nature and for crop improvement: a tribute to Professor Stanley J. Peloquin (1921-2008). *Annals of Botany* **104**: 795-807.
- OSELEBE H. O., PILLA M., TEKOUANO A. 2006. Ploidy variation of *Musa* hybrids from crosses. *Afr J Biotechnol* **5**: 1048-1053.
- OVCHINNIKOVA A, KRYLOVA E, GAVRILENKO T, SMEKALOVA T, ZHUK M, KNAPP S and SPOONER D. 2011. Taxonomy of cultivated potatoes (*Solanum* section Petota: Solanaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **165**: 107-155.
- PARK T-H., VLEESHOUWERS V. G. A. A., HUTTENR R. C. B., VAN ECK H. J., VAN DER VOSSSEN E., JACOBSEN E, and VISSER R. G. F. 2005. High-resolution mapping and analysis of the resistance locus *Rpi-abpt* against *Phytophthora infestans* in potato. *Molecular Breeding* **16**: 33-43.
- PARK T-H., VLEESHOUWERS V. G. A. A., JACOBSEN E., VAN DER VOSSSEN E, and VISSER R. G. F. 2009. Molecular breeding for resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in potato (*Solanum tuberosum* L.): a perspective of cisgenesis. *Plant Breeding* **128**: 109-117.
- PELOQUIN S. J., YERK G. L., WERNER J. E., and DARMO E. 1989. Potato breeding with haploids and 2n gametes. *Genome* **31**: 1000-1004.
- PEREZ W., SALAS A., RAYMUNDO R., HUAMAN Z., NELSON R., and BONIERBALE M. 2001. International Potato Center (CIP), Lima (Peru). Scientist and farmer: Partners in research for the 21st century. Evaluation of Wild Potato Species for Resistance to Late Blight. Program Report, 1999-2000. Lima (Peru). CIP. 480 p.
- PEREZ-DE-CASTRO A. M., VILANOVA S., CAÑIZARES J., PASCUAL L., BLANCA J. M., DIEZ M. J., PROHENS J., PICO B. 2012. Application of genomic tools in plant breeding. *Curr Genomics*. **13**:179-195.

- QUIROGA M. P., VIDAL RUSSELL R., and PREMOLI A. C. 2005. Evidencia morfológica e isoenzimática de hibridación natural entre *Nothofagus antarctica* y *N. pumilio* en el noroeste patagónico. *Bosque* **26(2)**: 25-32.
- QUISPE J. L. 2009. Caracterización de híbridos interespecíficos de papa diploide (*Solanum spp.*) para su uso en cruzamientos 4x – 2x. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. 109p.
- RAIMONDI J. P. and CAMADRO E. L. 2003. Crossability relationships between the common potato, *Solanum tuberosum L. ssp. tuberosum* and its wild diploid relatives *S. kurtzianum* and *S. ruiz-lealii*. *Genet. Resour. Crop Evol.* **50**: 307-314.
- RAMANNA M. S and JACOBSEN E. 2003. Relevance of sexual polyploidization for crop improvement – a review. *Euphytica* **133**: 3-16.
- RAMON M., and HANNEMAN J. R. 2002. Introgression of resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) from *Solanum pinnatisectum* into *S. tuberosum* using embryo rescue and double pollination. *Euphytica* **127**: 421-435.
- RIESEBERG L. H, BAIRD S. J. E. and GARDNER K. A. 2000. Hybridization, introgression, and linkage evolution. *Plant Molecular Biology* **42**: 205-224.
- RIESEBERG L. H., DESROCHES A. M and YOUNG S. J. 1995. Interspecific pollen competition as a reproductive barrier between sympatric species of *Helianthus* (Asteraceae). *Am. J. Bot.* **82(4)**: 515-519.
- RIETMAN H., BIJSTERBOSCH G., CANO L., HEUBG-RYUL L., VOSSEN J. H., JACOBSEN E., VISSER R. G. F., KAMOUN S, and VLEESHOUWERS V. G. A. A. 2012. Qualitative and Quantitative Late Blight Resistance in the potato cultivar Sarpo Mira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**: 910-919.
- ROMMENS C. M., HARING M. A., SWORDS K., DAVIES H. V. and BELNAP W. R. 2007. The intragenic approach as a new extension to traditional plant breeding. *Trends Plant Sci.* **12**: 397-403.

- SAMITSU Y., and HOSAKA K. 2002. Molecular marker analysis of 24- and 25-chromosome plants obtained from *Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena* ($2n=4x=48$) pollinated with a *Solanum phureja* haploid inducer. *Genome* **45**: 577-583.
- SANETOMO R., and HOSAKA K. 2011. A maternally inherited DNA marker, descended from *Solanum demissum* ($2n=6x=72$) to *S. tuberosum* ($2n=4x=48$). *Breed Sci* **61**: 426-434.
- SCHORNACK S., HUITEMA E., CANO L.M., BOZKURT T.O., OLIVA R., VAN DAMME M., SCHWIZER S., RAFFAELE S., CHAPARRO-GARCIA A., FARRER R., SEGRETIN M. E., BOS J., HAAS B. J., ZODY M. C., NUSBAUM C., WIN J, THINES M., and KAMOUN S. 2009. Ten things to know about oomycete effectors. *Molecular Plant Pathology* **10(6)**: 795-803.
- SEIDLER-LOZYKOWSKA K. 2003; Determination of the ploidy level in chamomile (*Chamomilla recutita* (L.) Rausch.) strains rich in alpha-bisabolol. *J Appl Genet.* **44(2)**: 151-5.
- SHI, Y. Z., CHEN Q., LI H.Y., BEASLEY D., and LYNCH D. R. 2006. Somatic hybridization between *Solanum tuberosum* and *S. cardiophyllum*. *Can. J. Plant Sci.* **86**: 539-545.
- SINGSIT C., and HANNEMAN R. E. Jr. 1991: Rescuing abortive inter-EBN potato hybrids through double pollination and embryo culture. *Plant Cell Rep* **9**: 475-478.
- SINGSIT C, and VEILLEUS R. E. 1991. Chloroplast density in guard cells of leaves of anther derived potato plants grown *in vitro* and *in vivo*. *HortScience* **26**: 592-594.
- SMITH J. A and DESBOROUGH S. L 1986. Interpretation of genomic balance in seed formation in interspecific hybrids of *Solanum*. *Theor Appl Genet* **72**: 346-352.
- SPOONER D. M., NÚÑEZ J., TRUJILLO G., HERRERA M. R., GUZMÁN F y GHISLAIN M. 2007. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato

landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. PNAS **104**(49): 19398-19403.

- SPOONER D., RODRÍGUEZ F., POLGÁR Z., BALLARD H. E., and JANSKY S. H. 2008. Genomic origins of potato polyploids: GBSSI gene sequencing data. The plant genome. Crop Sci. **48** (1): 27-36.
- STAPLES R. C. 2004. Race nonspecific resistance for potato late blight. Trends in Plant Science **1**: 5-6.
- ŚWIEŻYŃSKI K. M., and ZIMNOCH-GUZOWSKA E. 2001. Breeding potato cultivars with tubers resistant to *Phytophthora infestans*. Potato Res. **44**: 97-117.
- ŚWIEŻYŃSKI K. M., DOMANSKI L., ZARZYCKA H., ZIMNOCH-GUZOWSKA E. 2000. The reaction of potato differentials to *Phytophthora infestans* isolates collected in nature. Plant Breeding **119**: 119-126.
- TAYLOR C. 1996. Inside Avirulence. The Plant Cell **8**: 1091-1093.
- TOWNSEND J. A., WRIGHT D. A., WINFREY R. J., FU F., MAEDER M. L., JOUNG J. K. and VOYTAS D. F. 2009. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. Nature **459**: 442-445.
- TURKENSTEEN L. J. 1993. Durable resistance of potatoes against *Phytophthora infestans*. In Durability of Disease Resistance (Jacobs, Th. and Parlevliet, J.E., eds), Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 115-124.
- TZFIRA T., WEINTHAL D., MARTON I., ZEEVI V., ZUKER A. and VAINSTEIN A. 2012. Genome modifications in plant cells by custom-made restriction enzymes. Plant Biotechnol. J. **10**: 373-389.
- ÜNAL M and ALP O. 2002. Cytological mechanisms of unreduced pollen formation in *Solanum tuberosum* L. cv. Morfana. J Cell Mol Biol **1**: 15-18.
- VAN DEN BERG R. G. and JACOBS M. J. 2007. Capítulo 4: Molecular Taxonomy. pp. 55-74. En: Vreugdenhil, D. (ed.). Potato biology and biotechnology advances and perspectives. Elsevier, Amsterdam.

- VAN DER VOSSSEN E. A. G., GROS J., SIKKEMA A., MUSKENS M., WOUTERS D., WOLTERS P., PEREIRA A and ALLEFS S. 2005. The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an *Mi-1* gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. *The Plant Journal* **44**: 208-222.
- VEILLEUX R. 1985. Diploid and polyploid gametes in crop plants: mechanisms of formation and utilization in plant breeding. *Plant Breeding Rev.* **3**: 253–288.
- VLEESHOUWERS V. G. A. A., VAN DOOLJEWEERT W., GOVERS F., KAMOUN S., and COLON L. T. 2000. The hypersensitive response is associated with host and non-host resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* **210**: 853-864.
- VLEESHOUWERS V. G. A. A, RIETMAN H., KRENEK P., CHAMPOURET N., YOUNG C., OH S. K., WANG M., BOUWMEESTER K., VOSMAN B., VISSER R. G., JACOBSEN E., GOVERS F., KAMOUN S. and VAN DER VOSSSEN E. A. 2008. Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. *PLoS ONE* **3**(8), e2875. doi:10.1371/journal.pone.0002875.
- WATANABE K., ARBIZU C., and SCHMIEDICHE P.E. 1992: Potato germplasm enhancement with disomic tetraploid *Solanum acaule*. *Genome* **35**: 53-57.
- WATANABE K. N., ORRILLO M and GOLMIRZAIIE A. M. 1995. Potato germ-plasm enhancement for resistance to biotic stresses at CIP. Conventional and biotechnology-assisted approaches using a wild range of *Solanum* species. *Euphytica* **85**: 457-464.
- WHITE S and SHAW D. 2010. Breeding for host resistance: the key to sustainable potato production. PPO-Special Report 14, pp 125-130.
- WIJNKER E., VAN DUN K., DE SNOO C. B., LELIVELT C. L. C., KEURENTJES J. J. B., NAHARUDIN N. S., RAVI M., CHAN S. W. L., DE JONG H. and DIRKS R. 2012. Reverse breeding in *Arabidopsis thaliana* generates homozygous parental lines from a heterozygous plant. *Nature Genetics* **44**: 467-470.

- YOON J. B., YANG D. C., DO J. W and PARK H. G. 2006. Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum* for introgression of anthracnose. *Breeding Science* **56**: 31-38.
- YUEN J. E and FORBES G. A. 2009. Estimating the level of susceptibility to *Phytophthora infestans* in potato genotypes. *Phytopathology* **99**: 782-786.
- ZHOU Y. H., YEN C., YANG J. L., and ZHENG Y. L. 1999: Cytogenetic studies of the interspecific hybrids between *Hystrix longearistata* in Japan and *Hystrix duthiei* in China. *Genetic Resources and Crop Evolution* **46**: 315-317.

VIII. ANEXOS

Anexo I

Tabla 1. Lista de los parentales femeninos utilizados.

Número CIP	Código	Población	Tipo Citoplasma	Resistente a	Viabilidad polen (%)	Observ.
CIP387164.4	LBr-40		D			
CIP392617.54	B3C1.1	B3	D	LB*	80.9	
CIP392650.12	B3C1.2		D		85.6	
CIP392657.171	B3C1.3		D		87.1	
CIP388611.22	C91.612 (REICHE)		D			
CIP388615.22	C91.640		W		0.0	tétradas estériles
CIP391562.6	LR-93.156		-			
CIP392745.7	92.187		T		77.8	
CIP392797.22	C92.140 (UNICA)	LTVR	D	PVX y PVY [†]	78.4	
CIP392820.1	C93.154		T		87.7	
CIP393613.2	TXY.2		T		79.6	
CIP393615.6	TXY.6		T		84.7	
CIP393617.1	TXY.11		W		0.0	tétradas estériles
CIP396311.1	C95.276		T		85.0	

*LB: *P. infestans*

[†] PVX : Virus X de la papa, PVY: Virus Y de la papa

Tabla 2. Lista de parentales masculinos utilizados

Número CIP	Código	Pedigree	Porcentaje de polen 2n	AUDPC promedio	
				Oxa_2007	Mono_2008
CIP 506093.9	ER-603.9	<i>gon</i> × <i>chq</i>	Alto	169.2	483.3
CIP 506095.6	ER-607.6	<i>gon</i> × <i>chq</i>	Moderado	145.8	412.5
CIP 506095.2	ER-607.2	<i>gon</i> × <i>chq</i>	Moderado	163.3	559.2
CIP 506017.22	ER-104.22	<i>phu</i> × <i>chq</i>	Moderado	233.3	318.3
CIP 506017.25	ER-104.25	<i>phu</i> × <i>chq</i>	Moderado	198.3	654.2
CIP 506021.2	ER-108.2	<i>phu</i> × <i>chq</i>	Moderado	204.2	270
CIP 506027.1	ER-128.1	<i>stn</i> × <i>chq</i>	Moderado	274.2	278.3
CIP 506027.9	ER-128.9	<i>stn</i> × <i>chq</i>	Moderado	256.7	286.7
CIP 506043.17	ER-175.17	<i>stn</i> × <i>chq</i>	Moderado	274.2	258.3
CIP 506104.1	ER-629.1	<i>stn</i> × <i>chq</i>	Alto	192.5	518.3
CIP 506059.1	ER-256.1	<i>phu</i> × <i>pcs</i>	Alto	175	1010
CIP 506059.2	ER-256.2	<i>phu</i> × <i>pcs</i>	Alto	169	628.3
CIP 506108.2	ER-682.2	<i>2xHyb</i> × <i>cjm</i>	Alto	530.8	1394.2
CIP 506106.7	ER-644.7	<i>stn</i> × <i>sgr</i>	Moderado	1120	895.8

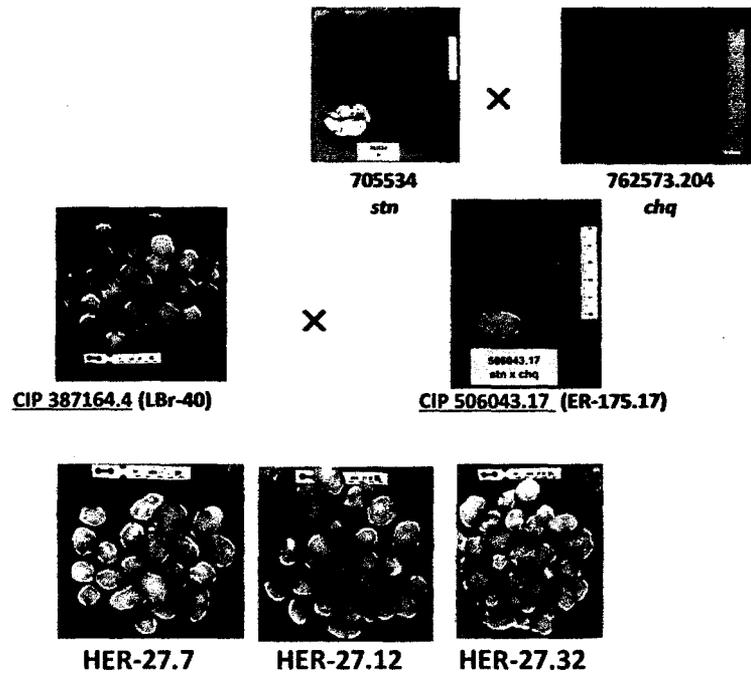


Figura 1. Pedigree de los híbridos tetraploides generados y seleccionados por resistencia a *P. infestans*, proveniente de la fuente *S. chiquidenum*.

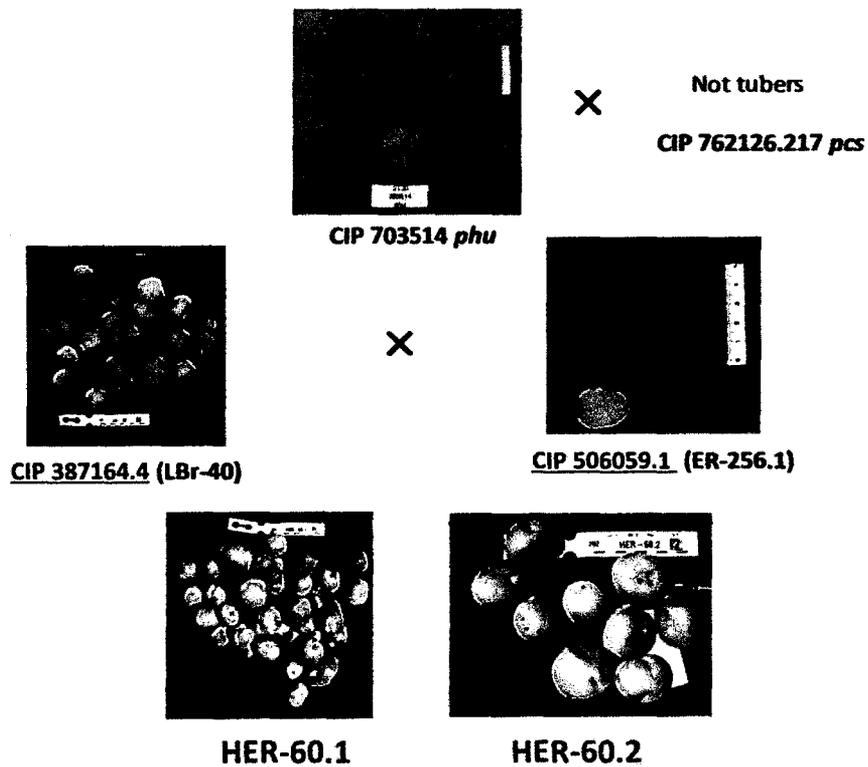


Figura 2. Pedigree de los híbridos tetraploides generados y seleccionados por resistencia a *P. infestans*, proveniente de la fuente *S. paucissectum*.

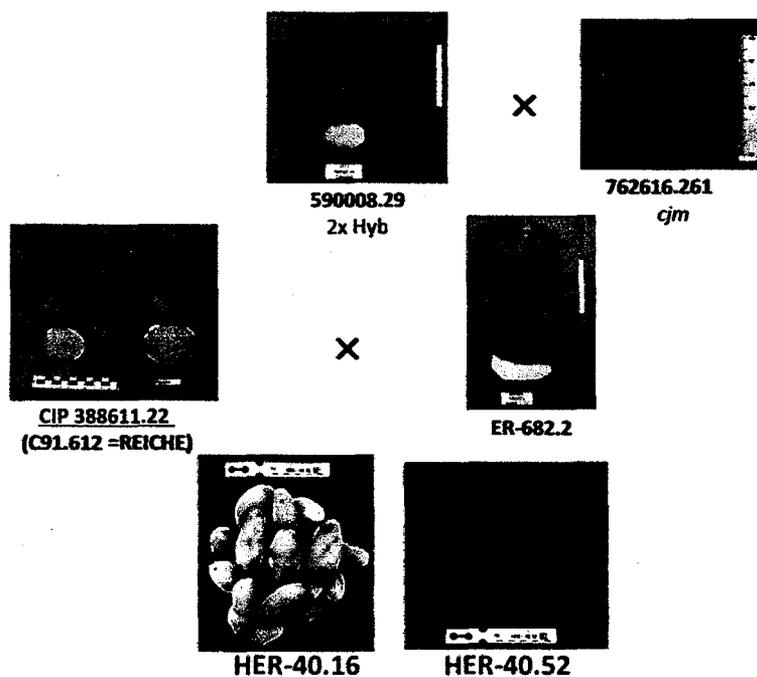


Figura 3. Pedigree de los híbridos tetraploides generados y seleccionados por resistencia a *P. infestans*, proveniente de la fuente *S. cajamarquense*.

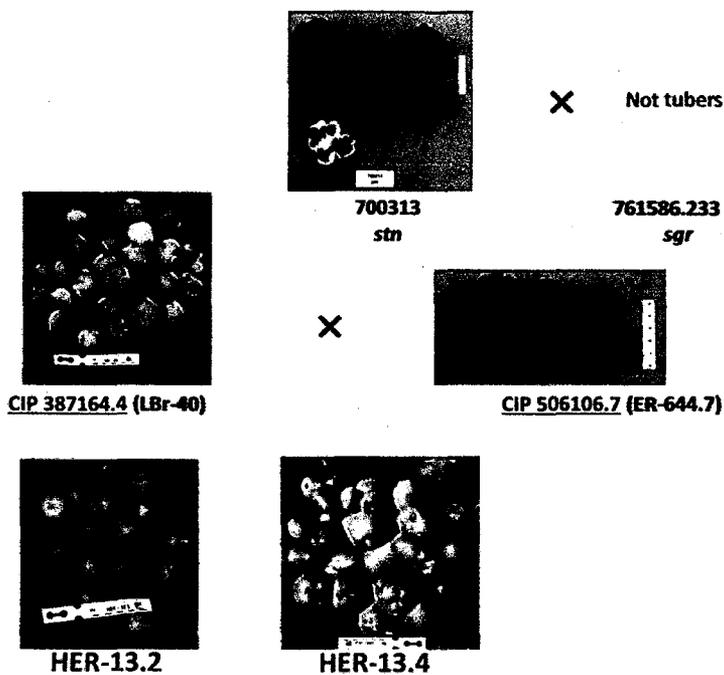


Figura 4. Pedigree de los híbridos tetraploides generados y seleccionados por resistencia a *P. infestans*, proveniente de la fuente *S. sogarandinum*.

Tabla 3. Listado de los híbridos seleccionados al final del experimento.

Código	Donante	AUDP C 2014	SAUDPC 2014	polen viable %	Ploidía	Rendimiento (kg/plt)	Probable tipo de citoplasma
HER-10.1	<i>sgr</i>	1812.3	3.33	-	4x	0.603	D
HER-12.1	<i>sgr</i>	436.02	0.96	-	4x	0.710	T
HER-13.2	<i>sgr</i>	396.33	1.07	55.80	4x	0.711	D
HER-13.3	<i>sgr</i>	28.40	0.00	49.30	4x	0.675	D
HER-13.4	<i>sgr</i>	97.48	0.03	78.85	4x	1.205	D
HER-14.9	<i>chq</i>	1691.7	3.30	94.34	4x	1.167	D
HER-15.17	<i>chq</i>	654.35	1.02	0.00	4x	0.814	W
HER-15.18	<i>chq</i>	1874.13	3.68	0.00	4x	1.450	W
HER-15.23	<i>chq</i>	1652.13	3.34	0.00	4x	0.896	W
HER-15.26	<i>chq</i>	1581.87	3.02	0.00	4x	0.533	W
HER-15.29	<i>chq</i>	1304.11	2.39	0.00	4x	0.704	W
HER-15.35	<i>chq</i>	1959.46	3.65	0.00	4x	0.993	W
HER-15.36	<i>chq</i>	1640.42	3.32	0.00	3x	1.045	W
HER-15.37	<i>chq</i>	1103.52	2.03	0.00	4x	1.022	W
HER-15.40	<i>chq</i>	918.42	1.93	0.00	4x	0.860	W
HER-15.48	<i>chq</i>	1430.2	2.68	0.00	4x	0.580	W
HER-15.57	<i>chq</i>	1452.52	2.98	0.00	4x	0.878	W
HER-15.62	<i>chq</i>	1198.09	2.33	0.00	3x	0.986	W
HER-15.65	<i>chq</i>	1232.89	2.31	0.00	4x	0.675	W
HER-15.66	<i>chq</i>	1170.68	2.34	0.00	4x	0.900	W
HER-15.69	<i>chq</i>	1710.03	3.37	0.00	4x	0.978	W
HER-15.72	<i>chq</i>	1508.57	2.64	0.00	4x	1.252	W
HER-15.80	<i>chq</i>	747.72	1.65	0.00	4x	0.971	W
HER-15.87	<i>chq</i>	1354.95	2.62	0.00	4x	0.906	W
HER-15.90	<i>chq</i>	2154.6	3.95	0.00	4x	0.640	W
HER-15.93	<i>chq</i>	2144.05	3.96	0.00	4x	0.786	W
HER-16.4	<i>chq</i>	1379.05	2.62	73.75	4x	0.822	-
HER-17.1	<i>chq</i>	45.36	0.00	75.99	4x	0.988	D
HER-17.2	<i>chq</i>	7.5704	0.00	81.17	3x	0.702	D
HER-17.9	<i>chq</i>	290.66	0.36	87.72	4x	1.111	D
HER-18.10	<i>chq</i>	228.99	0.62	86.51	4x	0.987	D
HER-18.12	<i>chq</i>	59.78	0.00	76.22	4x	0.552	D
HER-18.13	<i>chq</i>	54.31	0.00	89.29	4x	1.426	D
HER-18.21	<i>chq</i>	325.7	0.66	94.70	4x	0.768	D
HER-18.25	<i>chq</i>	108.27	0.03	83.61	4x	0.881	D
HER-18.3	<i>chq</i>	230.14	0.35	78.13	4x	1.047	D
HER-18.30	<i>chq</i>	118.74	0.10	91.24	4x	0.525	D
HER-18.31	<i>chq</i>	258.22	0.33	80.65	4x	0.738	D
HER-18.33	<i>chq</i>	392.82	0.66	86.51	3x	0.909	D
HER-18.34	<i>chq</i>	132.5	0.07	89.93	4x	0.860	D

Universidad Nacional Agraria
 Instituto Agrícola Nacional

Código	Donante	AUDP C 2014	SAUDPC 2014	polen viable %	Ploidía	Rendimiento (kg/plt)	Probable tipo de citoplasma
HER-18.39	chq	86.74	0.02	81.17	4x	1.557	D
HER-18.4	chq	96.38	0.00	78.37	4x	0.991	D
HER-18.40	chq	331.46	0.62	88.97	4x	1.417	D
HER-18.47	chq	104.92	0.07	83.33	4x	0.956	D
HER-18.48	chq	175.27	0.35	76.69	4x	1.159	D
HER-18.49	chq	184.02	0.27	85.91	4x	0.857	D
HER-18.50	chq	109.87	0.00	75.99	4x	1.103	D
HER-18.52	chq	261.56	0.72	88.03	4x	0.924	D
HER-18.53	chq	648.21	0.98	81.70	3x	1.439	D
HER-18.54	chq	124.09	0.00	89.29	4x	1.003	D
HER-18.55	chq	102.68	0.09	78.62	4x	0.770	D
HER-18.57	chq	254.01	0.69	82.24	4x	1.072	D
HER-18.60	chq	34.85	0.00	65.96	4x	0.760	D
HER-18.61	chq	171.41	0.39	77.40	3x	1.290	D
HER-18.62	chq	310.94	0.69	79.40	4x	0.974	D
HER-18.66	chq	13.09	0.00	66.67	3x	0.756	D
HER-18.7	chq	105.52	0.00	78.37	4x	0.752	D
HER-18.71	chq	79.80	0.02	73.96	4x	1.257	D
HER-18.73	chq	193.96	0.38	78.62	4x	0.886	D
HER-18.75	chq	59.91	0.05	73.31	4x	0.800	D
HER-18.76	chq	105.1	0.02	86.21	3x	1.173	D
HER-18.82	chq	168.51	0.01	78.86	4x	1.023	D
HER-18.83	chq	162.33	0.00	89.61	4x	1.108	D
HER-18.91	chq	57.48	0.06	70.60	4x	0.877	D
HER-18.94	chq	333.5	0.64	75.99	4x	0.700	D
HER-2.1	chq	32.06	0.00	0.00	3x	0.588	W
HER-20.33	chq	2092.79	3.99	0.00	4x	0.894	T
HER-23.2	chq	1963.03	3.71	80.91	4x	1.346	T
HER-24.111	chq	290.19	0.68	0.00	4x	1.034	W
HER-24.118	chq	354.26	0.58	0.00	4x	0.808	W
HER-24.120	chq	129.94	0.01	0.00	4x	0.797	W
HER-24.33	chq	123.74	0.32	0.00	4x	0.903	W
HER-24.40	chq	226.77	0.30	0.00	4x	0.928	W
HER-24.48	chq	284	1.02	0.00	4x	1.042	W
HER-24.52	chq	180.64	0.08	0.00	4x	1.195	W
HER-24.76	chq	146.18	0.00	0.00	4x	1.174	W
HER-24.83	chq	118.82	0.08	0.00	4x	0.587	W
HER-24.86	chq	186.71	0.29	0.00	4x	0.736	W
HER-27.12	chq	68.36	0.05	75.76	4x	0.899	D
HER-27.13	chq	104.82	0.05	88.03	4x	1.588	D
HER-27.21	chq	1454.66	2.77	78.13	4x	1.001	D

Código	Donante	AUDP C 2014	SAUDPC 2014	polen viable %	Flordia	Rendimiento (kg/plt)	Probable tipo de citoplasma
HER-27.24	chq	49.59	0.00	84.75	4x	0.836	D
HER-27.27	chq	188.31	0.30	82.78	4x	0.648	D
HER-27.31	chq	1901.12	3.33	86.21	4x	1.074	D
HER-27.32	chq	285.69	0.67	86.21	4x	1.520	D
HER-27.33	chq	1113.73	2.01	88.65	4x	0.694	D
HER-27.37	chq	215.99	0.33	73.75	3x	0.864	D
HER-27.38	chq	110.04	0.00	86.81	4x	1.100	D
HER-27.5	chq	2083.06	3.95	92.59	4x	1.156	D
HER-27.7	chq	182.13	0.31	86.51	4x	0.878	D
HER-27.8	chq	71.51	0.00	83.61	4x	0.825	D
HER-27.9	chq	33.10	0.01	78.25	4x	0.600	D
HER-30.2	chq	113.81	0.28	0.00	4x	0.777	W
HER-31.1	chq	398.73	0.94	-	4x	0.788	T
HER-35.3	chq	92.29	0.00	56.10	4x	0.765	T
HER-39.2	chq	348.81	0.69	0.00	3x	0.706	T
HER-39.3	chq	1205.11	2.38	0.00	4x	0.520	T
HER-4.1	chq	790.21	1.68	92.59	4x	0.710	-
HER-41.14	cjm	1893.96	3.54	80.95	4x	0.967	D
HER-41.17	cjm	1306.32	2.39	73.96	4x	1.502	D
HER-41.20	cjm	2067.11	3.67	73.75	4x	1.038	D
HER-41.32	cjm	2114.18	3.71	61.10	4x	1.371	D
HER-42.11	cjm	596.38	1.34	0.00	4x	0.720	W
HER-42.9	cjm	928.77	1.73	0.00	4x	1.320	W
HER-44.10	cjm	395.66	0.99	5.70	4x	0.680	D
HER-44.3	cjm	1828.51	3.41	54.35	3x	1.158	D
HER-44.4	cjm	456.05	0.92	67.57	4x	1.645	D
HER-44.5	cjm	1739.4	2.91	61.73	3x	1.039	D
HER-44.7	cjm	1377.74	2.58	75.76	4x	1.049	D
HER-44.8	cjm	10.26	0.00	82.24	4x	1.125	D
HER-44.9	cjm	1357.06	2.32	68.31	4x	0.760	D
HER-45.1	cjm	280.25	0.60	71.60	4x	1.040	D
HER-45.11	cjm	434.04	0.95	86.21	4x	1.366	D
HER-45.18	cjm	342.27	0.96	75.53	4x	1.027	D
HER-45.20	cjm	123.68	0.00	85.91	4x	0.540	D
HER-45.23	cjm	395.06	1.04	0.00	4x	0.511	D
HER-45.3	cjm	233.97	0.31	91.91	4x	1.147	D
HER-45.9	cjm	289.63	0.29	86.51	4x	0.702	D
HER-46.17	cjm	547.01	1.01	73.31	4x	1.328	D
HER-46.21	cjm	584.78	0.98	75.99	4x	0.657	D
HER-46.23	cjm	368.88	0.62	83.89	4x	1.240	D
HER-46.34	cjm	167.98	0.34	76.05	4x	1.150	D
HER-46.41	cjm	319.13	0.38	73.10	3x	1.060	D

Código	Donante	AUDP C 2014	SAUDPC 2014	polen viable %	Ploidía	Rendimiento (kg/plt)	Probable tipo de citoplasma
HER-46.5	<i>cjm</i>	294.1	0.98	81.97	4x	0.725	D
HER-46.6	<i>cjm</i>	488.46	0.98	74.18	4x	0.840	D
HER-5.2	<i>chq</i>	633.45	1.32	-	4x	0.698	T
HER-50.106	<i>cjm</i>	123.28	0.06	72.89	4x	1.080	D
HER-50.117	<i>cjm</i>	370.83	0.96	89.29	4x	0.800	D
HER-50.66	<i>cjm</i>	125.52	0.10	85.03	4x	0.998	D
HER-50.69	<i>cjm</i>	387.53	1.02	63.30	4x	0.980	D
HER-50.82	<i>cjm</i>	133.28	0.05	67.75	4x	0.780	D
HER-50.85	<i>cjm</i>	68.06	0.05	82.24	4x	0.903	D
HER-50.95	<i>cjm</i>	584.01	1.33	73.31	4x	1.096	D
HER-53.13	<i>cjm</i>	768.98	1.38	0.00	4x	1.342	W
HER-53.8	<i>cjm</i>	915.21	1.73	0.00	4x	1.000	W
HER-56.12	<i>pcs</i>	1731.87	3.25	73.10	4x	0.875	-
HER-56.13	<i>pcs</i>	1974.49	3.66	81.97	4x	0.918	-
HER-57.17	<i>pcs</i>	296.34	0.64	78.37	3x	0.912	D
HER-57.2	<i>pcs</i>	118.74	0.00	77.16	4x	0.973	D
HER-57.20	<i>pcs</i>	476.75	1.01	77.10	4x	0.960	D
HER-57.34	<i>pcs</i>	341.28	0.97	85.91	4x	0.583	D
HER-57.35	<i>pcs</i>	86.67	0.02	82.80	4x	0.675	D
HER-57.41	<i>pcs</i>	82.63	0.02	76.65	4x	0.640	D
HER-57.43	<i>pcs</i>	312.84	0.40	72.25	4x	0.997	D
HER-57.45	<i>pcs</i>	172.3	0.34	79.90	4x	0.582	D
HER-57.46	<i>pcs</i>	100.25	0.05	79.62	4x	0.852	D
HER-57.47	<i>pcs</i>	285.88	0.33	56.82	4x	0.570	D
HER-57.6	<i>pcs</i>	2146	3.67	82.78	3x	0.952	D
HER-59.1	<i>pcs</i>	2123.38	3.96	0.00	4x	0.859	T
HER-59.9	<i>pcs</i>	1916.61	3.59	-	4x	0.661	T
HER-60.1	<i>pcs</i>	41.42	0.00	83.89	4x	1.005	D
HER-60.14	<i>pcs</i>	1592.38	3.01	65.45	4x	0.658	D
HER-60.2	<i>pcs</i>	1601.64	3.03	77.16	4x	0.835	D
HER-62.1	<i>pcs</i>	566.25	1.02	83.89	4x	0.940	-
HER-8.1	<i>chq</i>	995.38	1.96	78.37	4x	0.799	D