UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

Identificación de la especie de nematodo (*Globodera spp.*) mediante PCR y resistencia de 49 accesiones de papa nativa (*Solanum spp.*) a 3,379 m.s.n.m. Campanayocc - Ayacucho

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERA AGRÓNOMA

PRESENTADO POR:

Susan Milagros Alarcón Romaní

Ayacucho - Perú

2017

DEDICATORIA

A Dios que me ha dado la vida, fortaleza y salud para terminar este proyecto de investigación

A la madre tierra, por darnos todas las bondades, diversidad y todos los recursos.

A familia que los amo porque me enseñaron a salir adelante, afrontando retos y vencer dificultades que se presentan en cada etapa de mi vida.

A mis maestros, gracias por su tiempo, paciencia, su apoyo, así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional

AGRADECIMIENTO

A la universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Alma Mater de mi formación profesional. A mis profesores de la Facultad de Ciencias Agrarias, quienes me brindaron sus sabios conocimientos y enseñanzas en mi formación profesional.

Al M.Sc. Germán De La Cruz Lapa, gestor y asesor del presente trabajo de investigación, por la guiarme en la ejecución de la tesis, por sus sugerencias impartidas y culminación de este trabajo.

Los evaluadores de esta investigación, Ing. M.Sc. José A. Quiste Tenorio, Ing. Walter A. Mateu Mateo, Ing. Eduardo Robles García, por cada uno de los aportes brindados para que esta investigación sea presentada con la calidad necesaria.

Mi sincero agradecimiento a la comunidad de Campanayocc, por prestarnos el campo de cultivo, acogerme y permitirme realizar los trabajos de campo.

A mis amigos y compañeros tesistas del Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal por su apoyo incondicional durante la ejecución del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria……i
Agradecimiento……ii
Índice general……..iii
Índice de tablas……iv
Índice de figuras……...v
Resumen……vii
Introducción……..……..1

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO…….……3
1.1. Origen de la papa…….5
1.2. Clasificación taxonómica de la papa……...……5
1.3. Diversidad de especies de papa nativa cultivada……..6
1.4. Requerimientos edafoclimaticos……..9
1.5. Características del nematodo quiste de la papa……..10
1.6. Ciclo de vida y biología……..19
1.7. Hospedante……21
1.8. Patogenicidad y magnitud del daño……21
1.9. Síntomas y daños causados por el nematodo……..22
1.10. Reacción a factores bióticos ……..……23
1.11. Reacciones a factores abióticos……..24
1.12. Fuentes de resistencia a nematodos……..…….…….24
1.13. Interacción genética patógeno-hospedero…....……25
1.14. Identificación molecular de la especie ……...…….……..26

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA……..……35
2.1. Lugar del experimento…..……...……..35
2.2. Material genético…..……..……..……39
2.3. Diseño experimental…….……..……..……..40
2.4. Instalación y conducción del experimento……42

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN……..57
3.1. Análisis de la temperatura (T°C) y la humedad relativa (HR%) en la dinámica poblacional del nematodo del quiste (*Globodera pallida*)……..……57
3.2. Evaluar la resistencia, susceptibilidad y tolerancia…..……...58

CONCLUSIONES……..75
RECOMENDACIONES…….76
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA……..77
ANEXO……...80

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1.1 Distribución geográfica de *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* en todos los continentes…….. 11

Tabla 1.2 Distribución mundial del nematodo de la papa (*G. rostochiensis*)… 15

Tabla 1.3 Principales diferencias entre *G. rostochiensis* y *G. pallida*..…… 17

Tabla 2.1 Datos meteorológicos de la Estación Experimental Agraria Canaán. 37

Tabla 2.2 Resultados del análisis de suelo del campo experimental. Campanayocc (3379 m.s.n.m.), Carmen Alto–Ayacucho……. 39

Tabla 2.3 Las 49 accesiones de papa nativa con su respectivo nombre común... 40

Tabla 2.4 Parámetros de Niveles de infestación para *Globodera spp*……. 50

Tabla 2.5 Calificación de la tasa de multiplicación…… 54

Tabla 2.6 Condiciones de amplificación en PCR con iniciadores para la identificación de *Globodera pal*lida y *Globodera rostochiensis*…… 55

Tabla 3.1 Cantidad de huevos y/o juveniles por alícuota de 1 cc de suspensión. 58

Tabla 3.2 Categorías de resistencia al nematodo (*Globodera spp*.) de 49 accesiones de papa nativa (*Solanum spp*.) Campanayocc, 3379 msnm – Ayacucho……. 60

Tabla 3.3 Análisis de variancia del número de quistes de nematodo (*Globodera spp*.) (raíz cuadrada del número de quistes + 1.5) en 49 accesiones de papa nativa (*Solanum spp*.) Campanayocc, 3379 msnm – Ayacucho……. 63

Tabla 3.4 Prueba de Tukey (0.05) del número de quistes de nematodo (*Globodera spp*.) en 49 accesiones de papa nativa (*Solanum spp.*) Campanayocc, 3379 msnm – Ayacucho……..... 64

Tabla 3.5 Análisis de variancia de la tasa de multiplicación de nematodo (*Globodera spp*.) (raíz cuadrada de la tasa de multiplicación + 0.5) en 49 accesiones de papa nativa (*Solanum spp*.) Campanayocc, 3379 msnm – Ayacucho……. 66

Tabla 3.6 Prueba de Tukey (0.05) de la tasa de multiplicación de quistes de nematodo (*Globodera spp*.) en 49 accesiones de papa nativa (*Solanum spp*.) Campanayocc, 3379 msnm – Ayacucho…… 67

Tabla 3.7 Datos obtenidos en el biofotometro……... 70

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.1	Ciclo de vida y biología…….	20
Figura 1.2	Familia multigénica del ADN ribosomal (ADNr)…….	33
Figura 2.1	Temperaturas (Máxima, Mínima, Promedio), Precipitación y Balance Hídrico promedio mensual de Setiembre 2013 - Agosto 2014, Estación Meteorológicas INIA CANAAN – Huamanga…….	38
Figura 2.2	"Bloque I" Distribución de las accesiones……	41
Figura 2.3	"Bloque II" Distribución de las accesiones……..	42
Figura 2.4	Muestra de suelo secándose y en un posterior lavado por método de Fenwick…….	43
Figura 2.5	Separación de quistes por método de rodamiento…….	44
Figura 2.6	Prueba de Viabilidad……..	46
Figura 2.7	Preparación del inoculo…….	47
Figura 2.8	Siembra de tubérculo-semilla…….....	48
Figura 2.9	Proceso de inoculación……..	49
Figura 2.10	Separación de quiste y restos orgánicos utilizando gasolina 84 octanos……	53
Figura 3.1	Extracción de DNA nematodo, 1% de agarosa, 90v, por 80min……	72
Figura 3.2	Identificación molecular mediante PCR de las poblaciones de Globodera spp utilizando primer ITS5, PITSp4 y PITSr3. Corrido con 90 v por 1hora y 30 minutos…….	73

ÍNDICE DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1	Número y tasa d multiplicación de quistes de nematodo (*Globodera spp*.) en 49 accesiones de papa nativa (*Solanum spp*.) en el Diseño Latice Simple 7*7 Campanayocc 3379 m.s.n.m. Ayacucho……..	81
Anexo 2	Análisis de variancia del número de quistes de nematodo (*Globodera spp*.) (raíz cuadrada del número de quistes + 1.5) en 49 accesiones de papa nativa (*Solanum spp*.), en Látice Simple 7*7. Campanayocc, 3379 msnm – Ayacucho……	83
Anexo 3	Análisis de variancia de la tasa de multiplicación de nematodo (Globodera spp.) (raíz cuadrada de la tasa de multiplicación + 0.5) en 49 accesiones de papa nativa (Solanum spp.) en Látice Simple 7*7. Campanayocc, 3379 msnm – Ayacucho…….	84
Anexo 4	Panel fotográfico del trabajo de investigación……...	85
Anexo 5	Ubicación del lugar de siembra…….	86
Anexo 6	Proceso de Electroforesis……...	87
Anexo 7	Obtención de la fotografía de las bandas de PCR……..	88
Anexo 8	Preparación de los reactivos……...	89
Anexo 9	Protocolo de extracción de ADN de quistes de nematodos de papa…	92
Anexo 10	Costo de un PCR……	93

RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó en los terrenos de la comunidad de Campanayocc, distrito de Carmen Alto, desde diciembre 2013 a mayo 2014, y el trabajo en laboratorio se realizó desde junio 2014 a Julio 2015.

El nematodo *Globodera spp.* es una de las principales plagas en el cultivo de la papa *Solanum tuberosum* a nivel mundial. El objetivo de la investigación fue Identificar clones de papas nativas, en la Región de Ayacucho, con características de resistencia al ataque del nematodo *Globodera spp*. para incorporarlos en un plan de mejoramiento genético.

Se trabajó con 49 accesiones de papa nativa del Banco de Germoplasma del Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal-EPA-FCA-UNSCH, identificando resistencia en 94% al nematodo *Globodera spp.* y 6% de tolerancia a la mencionada. Con respecto al estudio de Identificación de especie de *Globodera spp.* se utilizó la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), utilizando primers específicos (pITSr3, pITSp4 y ITS5), identificando *Globodera pallida* en las muestras de la Región de Ayacucho y Junín y la muestra de Apurímac tuvo como resultado a las dos especies de globodera que son *Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis.*

INTRODUCCIÓN

El Nematodo es un endoparásito sedentario que ocasiona problemas a nivel mundial en solanáceas, destacando en relevancia el cultivo de papa *Solanum tuberosum L.* (Nuñez et al., 2003).

El nematodo de la especie *Globodera spp*. se encuentra en muchas zonas productoras de papa en la sierra de Perú, produciendo varios problemas como reducción de los rendimientos en la interferencia de la actividad fisiológica de la raíz de la papa, lesiones en las raíces y estolones.

Para control genético se han identificado como estrategia el uso de la resistencia y la tolerancia. La resistencia, es la capacidad de la planta para reducir el crecimiento y/o desarrollo del parasito después de que este se ha iniciado o establecido en contacto íntimo con el hospedero, la resistencia se mide comparando la cantidad del patógeno por planta. Mientras que la tolerancia es un mecanismo de la planta, en el que el parasito después de su establecimiento no afecta al rendimiento significativamente.
Las técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), permitió realizar la identificación de la especie con exactitud y en menor tiempo, en comparación a un análisis morfológico.

Debido que los nematodos no pueden ser eliminados totalmente, la única salida para ello es reduciendo y manteniendo su densidad de población lo más bajo como sea posible y evitar el enfrentamiento entre plantas susceptibles y la especie patógena mediante medidas que no afecten la producción agrícola, el ambiente, economía y salud de los agricultores y consumidores.

Con estas consideraciones, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Evaluar la resistencia, susceptibilidad y tolerancia de 49 accesiones de papa nativa de Pampa-Cangallo (Ayacucho), al ataque de nematodo *Globodera spp.* procedente de Huancayo, en la comunidad de Campanayocc.
- Identificar la especie de *Globodera spp*. predominante en las zonas de muestreo de Ayacucho (Seccelambras, Chontaca y Manallasac), Apurímac (Andahuaylas) y Junín (Huancayo), utilizando técnicas moleculares basados en PCR.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. ORIGEN DE LA PAPA

Las primeras papas cultivadas fueron seleccionadas entre 6.000 y 10.000 años atrás en las montañas de los Andes, donde sucesivas generaciones de agricultores produjeron una gran cantidad de variantes cultivadas (Spooner y Hetterscheid, 2005 citado por Laura, 2013).

Se demostró que la papa cultivada tuvo un origen único en una vasta región al norte del lago Titicaca, a partir de miembros del complejo norte de *S. brevicaule* (Van den Berg y Jacobs, 2007 citados por Laura, 2013).

Relata que la mayor diversidad genética de papa (*Solanum tuberosum* L.) cultivada y silvestre se encuentra en las tierras altas de los Andes de América del Sur. La primera crónica conocida que menciona la papa fue escrita por Pedro Cieza en 1538. Cieza encontró tubérculos que los indígenas llamaban "papa", primero en la parte alta del valle del Cuzco, Perú y posteriormente en Quito, Ecuador. El centro de domesticación del cultivo se encuentra cerca de la frontera actual entre Perú y Bolivia. Existe evidencia arqueológica del cultivo de la papa en los Andes (Andrade, 2002 citado por Laura, 2013).

1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA PAPA

Clasifica taxonómicamente a la papa (Terranova, 1995; Cruz, 2006 citados por Torres, 2015).

Reino : Plantae
Clase : Angiospermae
Subclase : Dicotiledónea

Orden : Tubiflorales
Familia : Solanaceae
Género :*Solanum*
Especie : Tuberosum

1.3. DIVERSIDAD DE ESPECIES DE PAPA NATIVA CULTIVADA

a) Solanuman digenum

Afirma que es un autotetraploide, que se cree se originó de *Solanum stenotomum*a través del doblamiento de los cromosomas por hibridación con otra especie silvestre *Solanum sparsipilum*. Esto produjo semillas fértiles (Popenoe, 1989 citado por Gutiérrez, 2013).

Menciona que el cultivo presenta un amplio rango de adaptación en la región andina, extendiéndose desde Venezuela hasta el norte de argentina; desde los 2000 hasta los 4000 m.s.n.m.; el periodo vegetativo es de 5 a7 meses y presenta buenos rendimientos bajo condiciones de día medio (12 horas). Tienen alrededor de 2500 genotipos (Popenoe, 1989 citado por Gutiérrez, 2013).

Señala que las plantas generalmente son altas y muy vigorosas, las hojas son muy diseccionadas e insertadas en el tallo en ángulo agudo; las hojuelas son poco estrechas y generalmente pecioladas. Los peciolos son delgados en la parte apical y permiten apreciar la base del cáliz. Las flores al igual que los frutos son abundantes cuando es llevada a fotoperiodo largo (Huamán, 1984 citado por Gutiérrez, 2013).

Menciona que los tubérculos son numerosos, de tamaño mediano a pequeño, formas alargadas, ojos de profundidad media a superficiales y con un largo periodo de dormancia bajo condiciones de fotoperiodo largo. Presentan pigmentos que van desde al amarillo hasta el negro (Popenoe, 1989 citado por Gutiérrez, 2013).

b) Solanum phureja

Menciona que esta especie diploide probablemente se originó de *Solanum stenotomum* (Popenoe, 1989 citado por Gutiérrez, 2013).

Afirma que se extiende desde Venezuela bajando hacia el sur hasta el norte de Bolivia, en altitudes de 2000 y 3500 m.s.n.m. pero en Colombia, Ecuador y Perú (Huamán, 1984 citado por Gutiérrez, 2013).

Menciona que la planta de papa posee hojas con poca pubescencia, brillantes y de hojuelas estrechas; son pequeñas y con cáliz bastante irregular lobulado. Los tubérculos poseen un periodo de reposo muy corto antes de iniciar la brotación (Huamán, 1984 citado por Gutiérrez, 2013).

Manifiesta que tiene tubérculos redondos, delgados o con formas especiales, ojos profundos, piel y pulpa amarilla (yema de huevo), peso generalmente no mayor a 30g (Popenoe, 1989 citado por Gutiérrez, 2013).

c) Solanum x chaucha

Manifiesta que es un hibrido natural probablemente entre *Solanum stenotomum y Solanumandigenum* (Popenoe, 1989 citado por Gutiérrez, 2013).

Menciona que este cultivo se extiende ampliamente desde Colombia hasta el noroeste de Argentina en altitudes que van desde los 3000 hasta los 3900 m.s.n.m. (Huamán, 1984 citado por Gutiérrez, 2013).

Plantas con hojas moderadamente diseccionadas con 3 a 6 pares de hojuelas laterales. Las flores son medianas con lóbulos de los pétalos más anchoa que largos. Los tubérculos presentan formas más alargadas que otras especies, tienen buen sabor y no presentan dormancia.

Afirma que es un triploide estéril, las plantas no producen semilla y la propagación es exclusivamente vegetativa (Popenoe, 1989 citado por Gutiérrez, 2013).

d) Solanum juzepczukii Bukasov.

Menciona que se distingue por su hábito semi-arrosetado, hojas rectas, pedúnculo corto (2 a 4 cm de longitud), pedicelos con articulación muy alta y poco distinguible,

corola azul pequeña (de 2.5 cm de diámetro) con lóbulos muy cortos y acúmenes muy pequeños (Hawkes, 1990 citado por Gutiérrez, 2013).

***e) Solanum tuberosum* subsp.*tuberosum*.**

Menciona que es de periodo vegetativo corto de 3 a 4 meses, floración escasa y por corto tiempo, polen estéril en muchas variedades, escasa o nula producción de bayas. Los tubérculos son regulares y de buena forma, con ojos superficiales, de gran tamaño y escasos. Se distribuye principalmente en la región sur de Chile (Hawkes, 1990 citado por Gutiérrez, 2013).

f) *Solanum curtilobum* Juz. et Buk

Afirma que se distingue por su hábito semi-arrosetado, hojas rectas y rígidas, articulaciones del pedicelo muy altas y corola azul, larga de 30 a 35 mm de diámetro, con lóbulos muy cortos y acuminados. (Hawkes, 1990 citado por Gutiérrez, 2013).

Menciona que estos cultivares originalmente están distribuidos a lo largo de las regiones altas alrededor de 3800 m.s.n.m, desde el norte de Perú al centro de Bolivia y muy raramente en el norte de Argentina (Huamán, 1984 citado por Gutiérrez, 2013).

g) *Solanum ajanhuiri* Juz. et Buk

Menciona que esta especie es muy similar a *S. stenotomum.* Difiere, sin embargo, en el cáliz regular pequeño, flores azules y muy pequeñas, articulación muy alta del pedicelo y hojas rígidas. Hojas con 5, 6 o 7 pares de foliolos laterales y numerosos foliolos interpuestos. Hay dos grupos, Ajawiri y Yari, este último con mucho más foliolo decurrente que el anterior (Hawkes, 1990 citado por Gutiérrez, 2013).

h) *Solanum stenotomum* Juz. et Buk

Relata que se distingue de S. phureja por la mayor densidad de la pubescencia en la hoja, lo cual no es brilloso en el estado viviente, produce tubérculos de 5 a 6 meses con un periodo definido de dormancia. Es una especie muy variable y posiblemente ance ancestro de todas las demás papas cultivadas (Hawkes, 1990 citado por Gutiérrez, 2013).

Afirma que S. stenotomum se subdivide en dos subespecies, subespecie stenotomum y subespecies goniocalyx (Ochoa, 1964 citado por Gutiérrez, 2013).

i) Subespecie *stenotomum*

Incluye formas con flores más pequeñas y cáliz sin costilla, cáliz muy pequeño, regular o irregular en el sur del Perú y norte de Bolivia, formas más grandes al norte. Distribuido en la parte central del Perú y Bolivia a elevadas altitudes.

j) Subespecies *goniocalyx*

Menciona que es una subespecie norteña de S. stenotomum, con flores grandes blancas o rosadas y con cáliz con base angulosa, tubérculos con carne amarilla luminosa. Distribuido en la parte norte y centro del Perú, a elevada altitudes (Hawkes, 1990 citado por Gutiérrez, 2013).

1.4. REQUERIMIENTOS EDAFOCLIMATICOS

La humedad relativa moderada (menor a 75%) es muy importante para el éxito del cultivo; la humedad ambiental muy alta (superior a 90%), incrementa la posibilidad de ataque de mildiu. La humedad excesiva en el momento de la germinación del tubérculo y en el periodo desde la aparición de las flores hasta la maduración del tubérculo resulta nociva porque facilita el ataque de hongos (Martínez, 2007 citado por Gutiérrez, 2013). Cita que la luz tiene una incidencia directa sobre el fotoperiodo, ya que induce la tuberización, los fotoperiodos cortos son más favorables a la tuberización y los largos inducen el crecimiento vegetativo e influyen sobre el rendimiento final de la cosecha, incrementando la producción de tubérculos (Martínez, 2007 citado por Gutiérrez, 2013).

Relata que la papa crece en clima templado-frío; con temperaturas entre 13 ºC y 18ºC. Al momento de la siembra, la temperatura del suelo debe ser superior a 7ºC y la temperatura nocturna, relativamente fresca (superior a 2ºC); durante la germinación y en fases tempranas de crecimiento, las temperaturas altas superior a 18ºC favorecen el crecimiento vegetativo. Debe haber alternancia de temperaturas diurnas y nocturnas para una buena tuberización. La temperatura media óptima para la tuberización es de 20°C, si la temperatura se incrementa por encima de este valor, la fotosíntesis

disminuye y aumenta la respiración lo cual afecta la formación de los tubérculos y favorece el desarrollo de plagas y enfermedades. Las zonas productoras de papa en la región Ayacucho se ubican entre los 2800 y 3800 msnm con una biotemperatura media anual máxima de 10,2ºC. Los meses de mayor temperatura son de octubre a marzo donde se puede llegar a temperaturas de 28ºC mientras que en las épocas de menor temperatura se puede llegar a – 10ºC. La época crítica para la papa son la temporada de lluvias (enero-marzo) y el frio (mayo-junio) (Martínez, 2007 citado por Gutiérrez, 2013).

1.5. CARACTERÍSTICAS DEL NEMATODO QUISTE DE LA PAPA

1.5.1. Nematodo Quiste de la Papa

Considera que el Nematodo Quiste de la papa, son una peste severa, que causa considerable reducción del rendimiento en algunas zonas paperas y se encuentra distribuido en el Perú desde los 2000 – 4000 msnm. Más de setenta especies de nematodos han sido señaladas en el cultivo de la papa, sin embargo, los formadores de quistes, *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens y *Globodera pallida (Stone) Behrens*, son considerados los más dañinos que afectan el rendimiento de este cultivo en la mayoría de las zonas paperas del mundo (Laura, 1980 citado por Laura, 2013).

En el suelo una población del Nematodo Quiste de la papa, puede incrementarse diez veces en un año, mientras que los daños sólo se hacen visibles cuando el nivel de infestación supera a 20 huevos y segundos estadios juveniles por gramo de suelo (Laura, 1980 citado por Laura, 2013).

1.5.2. Origen y Distribución del Nematodo

Ames (1980) menciona que el Nematodo Quiste de la Papa, se encuentra presente en la mayoría de los países del Norte y Centro de Europa, en menor proporción en el Sur de Europa, Islanda, Grecia, Israel, República África del Sur, Nueva Zelanda y Japón.

En el siguiente cuadro se presenta la distribución de la presencia del nematodo *Globodera rostochiensis y Globodera pallida* a nivel de los 5 continentes.

Tabla 1.1. Distribución geográfica de *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* en los cinco continentes.

EUROPA					
Países	***G. rostochiensis***	***G. pallida***	**Países**	***G. rostochiensis***	***G. pallida***
Albania	B	NP	Islas Faeroe	X	X
Alemania	A	B	Irlanda	B	B
Austria	A	B	Italia	A	B
Belarus	X	NP	Latvia	A	NP
Bélgica	B	B	Liechtenstein	A	NP
Bulgaria	B	NP	Lituania	B	NP
Channel Islands	X	X	Luxemburgo	B	X
Dinamarca	A	NP	Malta	B	B
Eslovaquia	B	B	Noruega	A	B
España	B	B	Polonia	B	B
Estonia	B	NP	Portugal	B	B
Finlandia	B	NP	República Checa	B	NP
Francia	B	B	Reino Unido)	B	B
Grecia	B	B	Inglaterra	X	**X**
Creta	X	X	Escocia	B	NP
Holanda	B	B	Rusia	B	B
Hungría	B	NP	Suecia	A	B
Islandia	A	B	Suiza	B	NP
			Ucrania	B	NP
ASIA					
Países	***G. rostochiensis***	***G. pallida***	**Países**	***G. rostochiensis***	***G. pallida***
Armenia	X	NP	Líbano	X	NP
Chipre	B	B	Pakistán	X	B
Filipinas	X	NP	Sri Lanka	B	NP

EUROPA					
Países	***G. rostochiensis***	***G. pallida***	**Países**	***G. rostochiensis***	***G. pallida***
Albania	B	NP	Islas Faeroe	X	X
Alemania	A	B	Irlanda	B	B
Austria	A	B	Italia	A	B
Belarus	X	NP	Latvia	A	NP
Bélgica	B	B	Liechtenstein	A	NP
Bulgaria	B	NP	Lituania	B	NP
Channel Islands	X	X	Luxemburgo	B	X
Dinamarca	A	NP	Malta	B	B
Eslovaquia	B	B	Noruega	A	B
España	B	B	Polonia	B	B
Estonia	B	NP	Portugal	B	B
Finlandia	B	NP	República Checa	B	NP
Francia	B	B	Reino Unido)	B	B
Grecia	B	B	Inglaterra	X	**X**
Creta	X	X	Escocia	B	NP
Holanda	B	B	Rusia	B	B
Hungría	B	NP	Suecia	A	B
Islandia	A	B	Suiza	B	NP
			Ucrania	B	NP
ASIA					
Países	***G. rostochiensis***	***G. pallida***	**Países**	***G. rostochiensis***	***G. pallida***
Armenia	X	NP	Líbano	X	NP
Chipre	B	B	Pakistán	X	B
Filipinas	X	NP	Sri Lanka	B	NP

AFRICA					
Países	***G. rostochiensis***	***G. pallida***	**Países**	***G. rostochiensis***	***G. pallida***
Algeria	B	B	Sierra Leona	X	NP
Egipto	X	NP	Sur Africa	B	X
Libia	X	NP	Tunesia	B	B
AMERICA					
Países	***G. rostochiensis***	***G. pallida***	**Países**	***G. rostochiensis***	***G. pallida***
Argentina	X	B	Ecuador	B	B
Bolivia	X	B	Estados Unidos	B	NP
Brasil	X	NP	-New York	B	NP
Canadá	B	B	México	B	NP
British Columbia	B	NP	Panamá	X	B
Newfoundland	X	X	Perú	X	A
Chile	B	B	Venezuela	X	X
OCEANIA					
Países	***G. rostochiensis***	***G. pallida***	**Países**	***G. rostochiensis***	***G. pallida***
Australia	B	NP	Nueva Zelandia	A	A
Islas Norfolk	X	NP			

A= Presente, ampliamente distribuido B = Presente, distribución limitada X = Presente, sin detalles de distribución NP= No presente. EPPO (2000), Smith (1997), CABI (2000).

La papa ha sido cultivada en los valles interandinos por miles de años, el cual era completamente desconocida fuera de Sudamérica y el alimento más importante del Imperio Incaico; donde los agricultores Incas, cultivaron tradicionalmente la papa y por lo tanto el lugar oriundo del Nematodo Quiste de la Papa de la especie *Globodera* (Franco 1993 citado por Gutiérrez, 2013).

Las dos especies, *Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis*, se originaron en la zona andina de Américas del Sur y co-evolucionaron con su hospedero preferido, el cultivo de la papa (*S. tuberosum Subs. Tuberosum* y *S. tuberosum Subs. andigena*).

En el 1973, se descubre la *Globodera pallida* (Stone) Behrens, como una nueva especie del género *Globodera*, hasta que en 1975 se confirma que la mayoría de Nematodos Quiste de los Andes, pertenecen al género *Globodera pallida* .

Posteriormente, los nematodos formadores de quistes fueron agrupados en seis géneros incluyendo en el género *Globodera*, a las especies con quistes esféricos como eran *H. rostochiensis* y *H. pallida*.

En el Perú se han identificado seis razas de *Globodera pallida* (P_1A a P_6A) y tres razas de *Globodera rostochiensis* (R_1A a R_3A).

Manifiesta que en Huasahuasi (Tarma), se halla la más alta infestación del nematodo Quiste de la papa en el Perú, con un contenido de 2500 Huevos + J2/gr. de suelo (Gonzales, 1983; Pocco, 2006 citado por Laura, 2013).

Reporta Laura (2013), un nivel de infestación de 0- 152 huevos + J2/gr. Suelo en 5 distritos: Cerro colorado, Sachaca, Chiguata, Tiabaya, y Paucarpata en la provincia de Arequipa, departamento de Arequipa, así mismo reporta la presencia de ambas especies de *Globodera spp.*

Menciona que, de las 13 provincias del Departamento de Cusco, 12 provincias muestreadas tenían diferentes grados de infestación del nematodo quiste de la papa *Globodera spp.,* por otro lado, estudios morfométricos del segundo estadio juvenil y el patrón perineal del quiste indican la presencia de *Globodera pallida* en 11 provincias y la presencia de una mezcla de *G. pallida y G. rostochiensis.* En el distrito de Maranganí, provincia de Canchis (Delgado y Jalata, 1991 citado por Laura, 2013).

Reporta que los campos de cultivo de los distritos: San Jerónimo, Pacucha, Kishuara, Huancarama, Andahuaylas, Chicmo y Talavera de la provincia de Andahuaylas presenta un nivel de infestación de 0- 1328 huevos+J2/gr. de suelo (Palomino, 2001 citado por Laura, 2013).

Reporta que los distritos: Tambo, Chungui y Anco de la provincia La Mar del departamento de Ayacucho, presentan un nivel de infestación de 0 – 509 huevos + J2/gr. Suelo, así mismo reporta la presencia de la especie *Globodera pallida* en los campos muestreados de la provincia (Ruiz 2005 citado por Laura, 2013).

Tabla 1.2. Distribución mundial del nematodo de la papa *(Globodera rostochiensis).*

Países y zonas con reportes de *Globodera rostochiensis*	
Suramérica	Argentina, Bolivia, Brasil, New Foundland y recientemente en Quebec), México, EE. UU. (Delaware, Maine, Nueva York).
Europa	Albania, Austria, Bielorusia, Bulgaria, Croacia, Chipre, República Checa, Dinamarca,Estonia, Islas Faroe, Filandia, Francia, Alemania, Grecia(Creta), Hungria, Islandia, Irlanda, Italia, Latvia, Reino de Lichtenstei, Lituania, Luxemburgo, Malta, Holanda, Noruega, Polonia, Portugal(Azores, Madeira), Rumania, Federación Rusa(Rusia Central, Siberia del Este, Norte de Rusia, Rusia del Este, Sur de Rusia, Oeste de Siberia), Serbia y Montenegro, Eslovaquia, Eslovenia, España, Suecia, Suiza, Reino Unido (Islas del Canal, Inglaterra y Gales, Irlanda del Norte, Escocia).
Asia	Armenia, India (Keralta, Tamil Nadu), Indonesia (Java), Israel, Japón (Hokkaido, Kyushu), Líbano, Malasia, Omán, Pakistán, Filipinas, Sri Lanka, Tayikistán, Turquía.
África	Argelia, Egipto, Libia, Marruecos, Sierra Leona, Sudáfrica, Túnez y Zimbawe.
Norteamérica	Canadá (Columbia Británica, New Foundland y recientemente en Quebec), México, EE.UU. (Delaware, Maine, Nueva York).
América central	Costa Rica, Panáma
Oceanía	Australia (Victoria- Australia del Oeste), Nueva Zelanda, Isla de Norfolk.

Fuente: EPPO, 2004

1.5.3. Características Morfológicas y Anatómicas del Nematodo de la Papa

Agrios (2004) afirma que su largo oscila entre los 300 a 1,000 μm por 15 a 35 μm de ancho. Tienen generalmente forma de anguila con cuerpos lisos no segmentados, sin apéndices. Algunas hembras se hinchan en la madurez con forma de pera o cuerpos esferoides. Son más o menos transparentes, con una cutícula incolora, que a menudo poseen estrías u otros detalles, esta despliega la muda a través de sus distintas etapas larvarias. Poseen un sistema digestivo que está formado por un tubo hueco que se extiende desde la boca pasando por el esófago hasta el intestino, recto y ano, Por lo regular existen seis labios que rodean la boca. Los nematodos fitoparasíticos poseen un estilete hueco o lanza que utilizan para perforar las células vegetales.

El sistema reproductor se ha desarrollado en las hembras, poseen uno o dos ovarios seguidos por un oviducto y un útero que termina en la vulva. El macho posee un testículo, una vesícula seminal y termina en un orificio común con el intestino; existe un par de espículas copulatorias que sobresalen.

1.5.4. Ubicación Taxonómica del Nematodo

El nematodo quiste de la papa, está comprendido dentro de las siguientes categorías taxonómicas (Stone, 1973 citado por Laura, 2013).

Reino	: Animal
Sub-Reino	: Metazoos
Sección	: Pseudocelomados
Phylum	: Nematoda
Clase	: Phasmidea
Orden	: Tylenchida
Sub-Orden	: Tylenchina
Super orden	: Tylenchoidea
Familia	: Heteroderidae
Género	: Globodera
Especie	: *Globodera rostochiensis*
Nombre común	: Nematodo dorado de la papa
Especie	: *Globodera pallida*
Nombre común	: Nematodo quiste blanco de la papa

1.5.5. Identificación del nematodo *Globodera sp.*

Ames (1980) menciona que la diferencia más evidente entre ambas especies es el color de las hembras; *Globodera rostochiensis* se desarrollan pasando por una fase amarillo-dorado antes de tomar una coloración castaña, de donde proviene el nombre común de Nematodo dorado y las hembras de *Globodera pallida* son de color blanco o crema. Pero ambos al final forman quistes marrones.

Menciona que la preparación de los cortes perineales de los quistes, colectados en las raíces de la planta de papa y el conteo de las estrías cuticulares presentes entre el ano y la vulva, constituyen una manera simple de diferenciar las dos especies entre *G. rostochiensis* posee un promedio de 21.6 estrías y *G. pallida* 12. A veces, el número promedio puede ser de 15, lo cual causa confusión; en este caso, si es necesario identificar la especie, se deben medir otros parámetros, especialmente de hembras, quistes y segundos estados juveniles y hacer comparaciones con los valores reportados en la literatura (Tabla 3). Tal es así como la configuración de la región bucal, características del estómago estilete (Stone, 1973 citado por Laura, 2013).

La identificación con técnicas modernas y sofisticadas como son las basadas en reacciones serológicas, punto isoeléctrico, separación de proteínas, enzimas y pruebas de ADN, también es posible. Ames (1980) menciona que las razas se diferencian por su patogenecidad o por la habilidad que tienen de multiplicarse en los clones con resistencia proveniente ya sea de *S. tuberosum Subs. andigena, S. multidissectum, S. verniey S. kurtzianum.*

Tabla 1.3. Principales diferencias entre *G. rostochiensis* y *G. pallida*. distancia ano-fenestra/diámetro fenestra.

Característica	*G. rostochiensis*	*G. pallida*
Hembra		
Largo del estilete (µm)	22.9	27.4
Diámetro zona vulvar (µm)	22.4	24.8
Largo vulva (µm)	9.2	11.5
Coloración	Amarillo	crema

Característica	*G. rostochiensis*	*G. pallida*
Hembra		
Largo del estilete (µm)	22.9	27.4
Diámetro zona vulvar (µm)	22.4	24.8
Largo vulva (µm)	9.2	11.5
Coloración	Amarillo	crema
Quiste		
Diámetro fenestra (µm)	18.8	24.5
Distancia ano-fenestra (µm)	66.5	49.9
Relación Granek's(1)	3.6	2.04
Número de estrías cuticulares entre el ano y la vulva	21.6	12.5

Característica	*G. rostochiensis*	*G. pallida*
Hembra		
Largo del estilete (µm)	22.9	27.4
Diámetro zona vulvar (µm)	22.4	24.8
Largo vulva (µm)	9.2	11.5
Coloración	Amarillo	crema
Quiste		
Diámetro fenestra (µm)	18.8	24.5
Distancia ano-fenestra (µm)	66.5	49.9
Relación Granek's(1)	3.6	2.04
Número de estrías cuticulares entre el ano y la vulva	21.6	12.5

Juveniles de segundo estado		
Largo del estilete (µm)	21.8	23.8
Forma de las protuberancias basales del estilete	Redondeadas y apuntando hacia atrás	En forma de ancla apuntando hacia adelante
Distancia entre la válvula del bulbo medio y el poro excretor (µm)	31.3	39.9

Fuente: Laura (2013)

1.6. CICLO DE VIDA Y BIOLOGIA

Agrios (2014) los nematodos generalmente pasan el invierno o superan los huevos en el suelo y como huevos o nematodos en las raíces de las plantas o en restos de plantas. Algunos nematodos producen juveniles etapas o adultos que pueden permanecer latentes en las semillas o en bombillas por muchos meses o años. Finalmente, parásito más alto las plantas sobreviven como semillas, generalmente en el suelo, o como su forma vegetativa infecciosa en su huésped.

La *Globodera rostochiensis y Globodera pallida* son nematodos endoparásitos sedentarios, que permanecen normalmente en el suelo por 5-6 años y a veces hasta por 20 años. Cada quiste joven contiene 200-600 huevos (Greco, 1992 citado por Laura, 2013).

El ciclo de vida del nematodo quiste tiene una duración, entre 38 - 48 días, empieza cuando el huevo se halla dentro del quiste; cada quiste en promedio tiene 300 huevos, los quistes puede conservarse durante 15 años viables en ausencia del hospedero (Lázaro, 1986 citado por Laura, 2013).

El proceso de embriogénesis comienza dentro del Quiste y se produce sin la intervención directa del huésped. Antes de salir del huevo, se produce la primera muda y se convierte en segundo estadio juvenil. Este puede salir del Quiste por estímulos del exudado radicular de la papa, para lo cual rompe la pared del huevo y sale del quiste, para penetrar a la raíz del hospedero, movilizándose y alimentándose dentro de la planta.

Luego se produce la segunda muda para convertirse en el tercer estadio juvenil, donde aún no existe diferencia sexual. Cuando se produce la tercera muda se convierte en el cuarto estadio juvenil donde sí hay diferencia sexual, dependiendo de la cantidad de alimento que haya disponible. En este estadio la hembra se ensancha algo más, y el macho se enrolla dentro de su cutícula del tercer estadio juvenil. Seguidamente se produce la cuarta muda dentro de las raíces, para ser adultos, en los que la hembra se vuelve sedentaria y se adhiere a la raíz del tejido de la corteza. Su cuerpo crece y rompe las células de la raíz y llega a ser visible fuera de ella, aunque su cabeza permanece

dentro del tejido radicular. El macho que conserva su forma alargada, abandona la cubierta del tercer estadio juvenil y se moviliza dentro de la raíz hasta salir de ella a buscar a la hembra para aparearse. La hembra puede ser fertilizada por varios machos que luego mueren. La hembra blanca se vuelve crema o amarillenta, luego marrón para después morir y caer al suelo convirtiéndose en Quiste marrón y duro, resistente a las condiciones ambientales desfavorables para ellas. Cada huevo está protegido por una membrana vitelina resistente a la penetración de sustancias químicas o desecaciones.
Los quistes no se alimentan y se desprenden fácilmente de las raíces o de los tubérculos. Los huevos, al final del desarrollo embrionario, aproximadamente después de 2-3 semanas, contienen juveniles de segundo estado. En países de clima templado, al final del ciclo de la papa (otoño) la mayoría de los huevos permanecen en estado de latencia y eclosionan en la primavera siguiente.

Las condiciones más favorables son una temperatura de 20-25 °C y una humedad del suelo con pH de 2.6 - 4. Cuando las condiciones ambientales son desfavorables, como en casos de alta temperatura (28°C) y sequías, cuando la planta se aproxima al final del ciclo o bien las raíces están muy dañadas, las hembras se transforman temprano en quiste y el ciclo se acorta, mientras que, cuando la temperatura del suelo es menor de 20°C, se alarga. Estudios comparativos han demostrado que *G. pallida* se desarrolla mejor que *G. rostochiensis* a bajas temperaturas. Generalmente ocurre una sola generación por cada ciclo de cultivo de la papa. Una segunda generación puede empezar, pero difícilmente es completada; sin embargo, existen datos de que sí es posible.

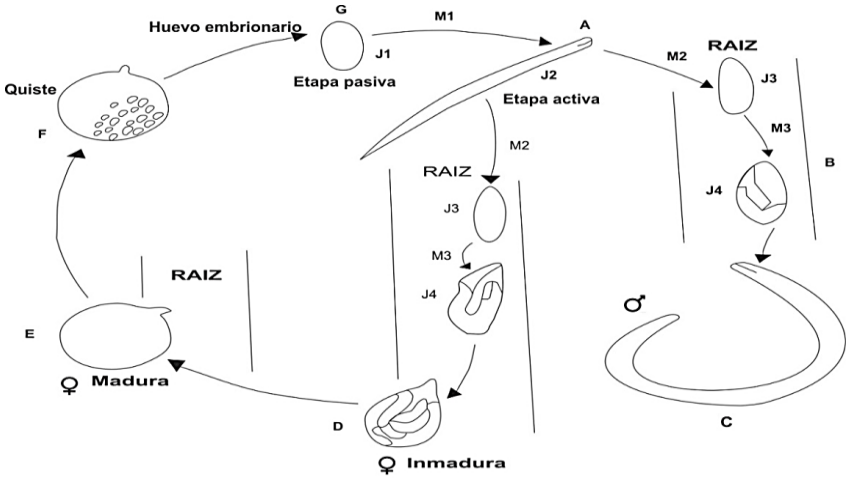


Figura 1.1. Ciclo de vida y biología

1.7. HOSPEDANTE

El nematodo del quiste ataca al cultivo de papa (*Solanum tuberosum L.)*, tomate (*Lycopersicum esculentum mil*), Berenjena (*Solanum melongena L*.), así como también diversas malezas del grupo de solanáceas.

1.8. PATOGENICIDAD Y MAGNITUD DEL DAÑO

El nivel histológico el daño es representado por necrosis de las células de las raíces atravesadas por los juveniles de segundo estado. Cuando éstos se detienen en el lugar definitivo de alimentación, las células alrededor de la cabeza del nematodo sufren una profunda transformación. De 3 a 10 células alrededor de la cabeza de cada nematodo se funden, la pared celular engrosa, el citoplasma se torna denso y se origina el sincitio multinucleado de alta actividad metabólica, el cual es indispensable para la alimentación del nematodo. La formación del sincitio ocasiona una interrupción de los vasos cribosos y leñosos limitando notablemente la funcionalidad de las raíces. Debido a esto, las plantas de papa atacadas por el nematodo presentan crecimiento y rendimiento reducidos, la senectud se anticipa, a veces en suelos muy infestados, el follaje presenta un ligero amarillamiento. Las reducciones de rendimiento dependen del nivel poblacional del nematodo al momento de la siembra (Greco, 1992 citado por Laura, 2013).

Cita que los ensayos realizados en Europa y Chile han determinado que el límite de tolerancia de la papa a los nematodos formadores de quistes es de aproximadamente 1.9 huevos/gramo de suelo. El rendimiento de la papa puede ser reducido entre 20 y 50% cuando el nivel poblacional del nematodo en el suelo alcanza 16 y 32 huevos/gramo de suelo, respectivamente. También se han determinado pérdidas de hasta dos toneladas por hectárea cuando la infestación supera a los 20 huevos/gramo y reducciones proporcionales similares al aumento de la población, el cultivo puede ser destruido completamente cuando la población inicial del nematodo es de 64 huevos/gramo de suelo (Greco, 1992 citado por Laura, 2013).

La magnitud del daño ocasionado por estos patógenos también depende del patotipo. A nivel mundial han sido identificados cinco patotipos de *G. rostochiensis* (Ro1, Ro2, Ro3, Ro4, Ro5) y seis de *G. pallida:* tres en Europa (Pa1, Pa2, Pa3) y tres en la zona

andina (P4A, P5A, P6A). La identificación de los patotipos se hace basándose en la tasa de reproducción de las distintas poblaciones en una serie estandar de clones de *Solanum spp.* Métodos basados en separación de proteínas, enzimas y pruebas de ADN, hasta ahora, no han dado resultados satisfactorios (Kort, 1977, citado por Laura, 2013).

1.9. SINTOMAS Y DAÑOS CAUSADOS POR EL NEMATODO

Agrios (2004) Algunas bacterias y los nematodos causan agallas en la raíz o nudos en la raíz, que interfieren con la absorción normal de agua y nutrientes por las raíces. La lesión de raíz afecta la cantidad de raíces funcionales directamente y disminuye proporcionalmente la cantidad de agua absorbida por las raíces.

Ames (1980) menciona que el Nematodo Quiste no causa síntomas específicos en la parte aérea de la planta que puedan tener valor para la diagnosis, pero los daños causados en las raíces hacen que la planta enferma muestre síntomas similares a los provocados por deficiencia de agua o de elementos minerales. La sintomatología se caracteriza por una disminución en el desarrollo de las plantas que se visualiza focalizadamente. Estos focos se agrandan cada vez que se cultiva una variedad susceptible.

Lázaro (1986) menciona los síntomas de plantas infestadas es el crecimiento retardado, en uno o más parches del campo, los cuales se agrandan, cada vez que se realiza el monocultivo de cultivo de papa, causando así el amarillamiento y marchites de la planta. En la parte subterránea, el síntoma característico es la disminución del sistema radicular, producción de tubérculos pequeños, ello se traduce en una disminución en el rendimiento.

El síntoma específico del Nematodo Quiste, es el signo que se observa cuidadosamente en las raíces luego de ocho semanas después de la siembra.

En bajas densidades el Nematodo Quiste de la Papa no causa síntomas visibles y pueden permanecer por años en el suelo sin que se detecte su presencia. Cuando las densidades son altas se observan síntomas parecidos a los que causa la deficiencia de

agua o nutrientes, reducción del crecimiento, tendencia al marchitamiento durante las horas más calurosas y secas del día, reducción de la masa radicular y finalmente reducción en el rendimiento del cultivo.

1.10. REACCIÓN A FACTORES BIÓTICOS

a.- Inmunidad:

Cuando un organismo no sufre infección por una plaga o agente patógeno determinado (UPOV, 2009 citados por Mejía *et al*., 2013).

b.- Resistencia:

Es la capacidad de una planta de papa de impedir en forma total o parcial la multiplicación del nematodo y así reducir la infestación del campo. La resistencia permite acortar los periodos de rotación y disminuir las perdidas.

Es el carácter o caracteres, de una planta que inhibe la reproducción de un nematodo (UPOV, 2009 citados por Mejía *et al*., 2013).

Para una evaluación más completa de la respuesta de las plantas al ataque de nematodos, es necesario medir los parámetros reproducción del nematodo y el daño causado a la planta por el nematodo.

Es la capacidad de una variedad vegetal de restringir el crecimiento y desarrollo de una plaga o agente patógeno específico y / o el daño que éstos puedan causar, cuando se comparan con variedades vegetales susceptibles de sufrirlas en similares condiciones medioambientales y de intensidad de plaga o de elementos patógenos. Las variedades resistentes pueden mostrar algunos síntomas de la enfermedad o algunos daños en condiciones de intensa presencia de plaga o del agente patógeno.

c.-Tolerancia:

Capacidad de una planta de limitar los efectos negativos de una plaga o agente patógeno específico. Dichos efectos deberán estar relacionados con aspectos como la pérdida de rendimiento (UPOV, 2009 citados por Mejía *et al*., 2013).

d.-Susceptibilidad:

Capacidad de una variedad vegetal de restringir el crecimiento y desarrollo de una plaga o agente patógeno específico (UPOV, 2009 citados por Mejía *et al*., 2013).

1.11. REACCIONES A FACTORES ABIÓTICOS

a.- Tolerancia: es la capacidad de una variedad vegetal de soportar el estrés abiótico sin que se produzcan consecuencias importantes para el crecimiento, aspecto o rendimiento (UPOV, 2009 citados por Mejía *et al*., 2013).

b.- Sensibilidad: es la incapacidad de una variedad vegetal de soportar el estrés abiótico sin que se produzcan consecuencias importantes en el crecimiento, aspecto o rendimiento (UPOV, 2009 citados por Mejía *et al*., 2013).

1.12. FUENTES DE RESISTENCIA A NEMATODOS

Posiblemente las civilizaciones preincaicas seleccionaron consciente o inconscientemente papa resistente y así contribuyeron al desarrollo de la especie cultivada de *Solanum tuberosum ssp. andigena,* la cual es una fuente básica de resistencia a nematodos. Adicionalmente, algunas especies silvestres de Solanum pueden aportar genes de resistencia útiles en mejoramiento El cultivo de la papa es atacado por varios patógenos, entre los que se encuentran virus, hongos, bacterias y nematodos (Scurrah, 1981 citado por Mejía *et al*., 2013).

Agrios (2004) en general, patógenos con un alto nivel de flujo de genes o flujo de genotipo son mucho más efectivos y plantean una mayor amenaza para la agricultura que los patógenos con un bajo nivel de flujo de genes.

La papa se han encontrado dos tipos de resistencia genética a patógenos: la de hipersensibilidad, cualitativa o monogénica y la resistencia cuantitativa, de campo o poligénica . La resistencia monogénica involucra dos procesos básicos: percepción del ataque del patógeno y una respuesta para limitar la enfermedad. La percepción implica receptores específicos para cepas patogénicas, que son decodificadas por genes de resistencia (Bormann, 2004 citado por Laura, 2013).

Durante el desarrollo siguiente, las hembras se vuelven sedentarias en las raíces (Scurrah, 1981 citados por Mejía *et al.,* 2013).

En cuanto a la naturaleza de la tolerancia a los nematodos se percibe como un proceso defensivo que se ha desarrollado por la presión de selección de los factores abióticos y no de los nematodos en sí mismos (Wallace,1992 citados por Mejia *et al.,* 2013).

1.13. INTERACCIÓN GENÉTICA PATOGENO-HOSPEDERO

Bajo el estímulo de un exudado de la raíz, el segundo estadio juvenil de los nematodos del quiste de la papa eclosiona, y emerge de los quistes (Mulder *et al*., 1996 citados por Mejía *et al.,* 2013).

Recientemente, la fórmula de uno de estos exudados o gradientes ha sido identificado y es un pequeño agente molecular (M - 498) producido por las raíces de la papa, el cual se denomina *Solano eclepin A*, con la fórmula C27H30O9 además de otros gradientes como el de dióxido de carbono (CO2), aminoácidos, iones, pH y los gradientes de azúcar (Perry, 1998 citados por Mejía *et al.,* 2013).

Las células radiculares que rodean a la cabeza de cada hembra se agrandan y forman las células de transferencia multinucleadas (síncitos) desarrolladas por la digestión parcial de la pared celular y la fusión posterior de protoplasma de las células que les dan una forma alargada y muestran remanentes de las paredes celulares parcialmente digeridas, un síncito puede incorporar más de 200 células en últimas instancias (Williamson *et al.,*1996 citados por Mejía *et al.,* 2013).

La respuesta de la planta al ataque de la plaga es la producción de calosa (polisacárido común de la pared de las células de las áreas cribosas y puede observarse también en las células parenquimatosas como consecuencia de lesiones) la infestación dentro de los niveles tolerables de daño). Los síncitos no se forman cuando se presenta una interacción controlada genéticamente entre los nematodos y la planta de papa, a este fenómeno se le conoce como incompatibilidad. Esta interacción es específica para cada patotipo. La eficiencia de la resistencia depende de los patotipos existentes en un área

y debe ser evaluada mediante experimentación (González,1986 citados por Mejía *et al.*, 2013).

En cuanto a la naturaleza de la tolerancia a los nematodos se percibe como un proceso defensivo que se ha desarrollado por la presión de selección de los factores abióticos y no de los nematodos en sí mismos. Se sugiere que los nematodos no causan peculiar efecto que destaca en las plantas, por lo tanto, la planta sólo responde a las consecuencias de sus actividades perturbadoras. Aunque la mayoría de las plantas nativas son probablemente tolerantes y susceptibles a los nematodos con las que están asociadas, muchas plantas agrícolas han perdido esta capacidad durante la selección artificial para rendimiento y calidad. Se sugiere además que las plantas que son tolerantes a determinadas agresiones causadas por factores abióticos también pueden ser resistentes a los nematodos que causan las mismas tensiones.

Agrios (2004) los nematodos atacan a las plantas al penetrar mayormente en la raíz células a través de su estilete. Secretan saliva que remueve los contenidos de las células que absorben y se mueven.

Se sospecha que las secreciones de nematodos contienen sustancias que los nematodos usan para atacar a sus plantas hospedantes y provocar una infección exitosa. Estas sustancias están supuestamente involucradas en la eclosión, en defensa propia, en movimiento a través del tejido vegetal, y en el establecimiento y mantenimiento de un sitio de alimentación.

1.14. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA ESPECIE

Bates et al, (2002) mencionan que, a pesar de las diferencias morfológicas entre ambas especies, la identificación y diferenciación entre ellas a partir de características morfológicas y fisiológicas de los quistes requiere de un alto grado de habilidad y especialización, ya que las diferencias son muy pequeñas, además de que es una técnica que requiere de mucho tiempo.

Debido a la cercanía morfológica de *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*, se han desarrollado otro tipo de técnicas para separar estas dos especies. Recientemente, los métodos de análisis basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se han convertido en el método de escogencia para la identificación de especies.

1.14.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, es una técnica desarrollada en 1986 por KaryMullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde. Es indispensable la presencia de un ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa o PfuI), imprimadores que flanquean la región de ADN patrón que se desea amplificar, dNTPs (A, C, G, T) para la síntesis de las cadenas complementarias, cofactores como el Mg2+ y un amortiguador de reacción que optimizan la actividad del ADN polimerasa (Madriz,2005 citado por García, 2006).

García (2006) menciona que PCR consiste en un método que permite multiplicar exponencialmente un pequeño fragmento de ADN, con el objetivo de incrementarlo hasta niveles detectables, es un procedimiento experimental que reproduce en el laboratorio un proceso esencial en la vida de la célula; la replicación del material genético. Requiere de un molde de ADN (material de partida) que contiene la región a amplificar, iniciadores o cebadores que flanquean la región de ADN patrón que se desea amplificar, el ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa o PfuI) y cuatro trifosfatos desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), para la síntesis de las cadenas complementarias, cofactores como el Mg2+ y un amortiguador de reacción que optimizan la actividad del ADN polimerasa.

Bates et al. (2002) menciona que, en una comparación de las técnicas para la detección y determinación de nematodos de quistes de la papa en muestras de campo, demostraron que los métodos de PCR tienen una mayor sensibilidad y habilidad de identificar poblaciones de especies mixtas.

Un iniciador está formado por una pequeña secuencia de oligonucleótidos (15-30 nucleótidos), que se utiliza en la síntesis de ADN en la PCR. Esta secuencia encuentra y se une a su complemento en una de las bandas molde, lo cual permite que el ADN polimerasa encuentre un lugar en donde iniciar la extensión o elongación de la molécula de ADN. Los iniciadores pueden ser específicos a una secuencia de ADN o pueden ser universales. Los iniciadores universales son complementarios a secuencias de nucleótidos que son muy comunes en un grupo particular de moléculas de ADN, de este modo, son capaces de unirse con una variedad de ADN de diferentes especies. Los iniciadores correspondientes sólo a determinadas especies son llamados iniciadores específicos. Cuando las secuencias de las regiones del fragmento amplificado se desconocen, la técnica puede ser aplicada con iniciadores degenerados, conteniendo una serie de opciones en varias posiciones en la secuencia que permite la amplificación de una variedad de secuencias relacionadas (Veilleux,2004; Subbotin, 2006 y Moens, 2006 citado por García, 2006).

Técnica como tal consiste en varios pasos. En el primer ciclo, primero, la doble banda de ADN es desnaturalizada a una temperatura de 94°C por un período aproximado de un minuto; segundo, se necesita inducir a la unión de los imprimadores a cada una de las bandas simples de ADN. En este punto la temperatura puede variar significativamente ya que va a depender de la temperatura de recocido (annealing temperature) de los imprimadores que se estén usando; y tercero, se utiliza una temperatura de extensión (72°C) en la cual el ADN polimerasa va a producir bandas complementarias a partir de los imprimadores hasta que la polimerización sea interrumpida (cuando empieza el segundo ciclo con 94°C). En el segundo ciclo, cuando se esté en el paso de desnaturalización, se van a generar cuatro bandas simples de ADN. En cada una de estas bandas se van a unir los imprimadores (temperatura de recocido) y al incrementar la temperatura a 72°C (temperatura de extensión) el ADN polimerasa nuevamente empezará a polimerizar nucleótidos. Dos de las cuatro extensiones (las de banda simple original) serán idénticas a las obtenidas en el primer ciclo por lo que finalizarán la polimerización cuando nuevamente se inicie otro ciclo. Las otras dos (bandas nuevas que derivan de la banda simple original de ADN) finalizarán la polimerización justo donde el otro imprimador está unido. Los ciclos

siguientes generarán dos bandas nuevas largas y dos bandas nuevas cortas (Dale, 2002 citado por García, 2006)

Globodera rostochiensis y Globodera pallida pueden ser diferenciadas de varias maneras. Una de éstas consiste en el uso de enzimas de restricción que pueden digerir diferencialmente la región del Espaciador Transcrito Interno (ITS, por sus siglas en inglés) del ADN ribosomal. Otra manera de diferenciación corresponde al uso de imprimadores específicos que se diseñan a partir de secuencias de la misma región ITS (Internal Transcribed Spacer), mencionada anteriormente. Ésta es una región variable del ADN ribosomal que ha sido examinada ampliamente en estudios de poblaciones (Bulman y Marshall, 1997; Fullaondo et al, 1999; Power, 2004 citado por García, 2006).

En un estudio se utilizó un imprimador universal ITS-5 (5'-GGAAGTAAAA GTCGTAACAAGG-3'), y también imprimadores específicos: para G. pallida el PITSp4 (5'-ACAACAGCAATCGTCGAG-3'), que resulta en una banda de 265 pb y para G. rostochiensis el PITSr3 (5'-AGCGCAGACATGCCGCAA-3'), resultando en una banda de 434 pb. Los imprimadores también pueden utilizarse en una mezcla, resultando en productos de amplificación de los mismos tamaños (Bulman y Marshall, 1997 citado por García, 2006).

1.14.2. Extracción de DNA de Nematodo

Las células vegetales pueden lisarse con el detergente iónico bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), que forma un complejo insoluble con los ácidos nucleicos en medio hiposalino. De ese modo, los polisacáridos, los compuestos fenólicos y los demás contaminantes permanecen en el sobrenadante y pueden eliminarse por lavado. El complejo de ADN se solubiliza aumentando la concentración salina y se precipita con etanol o isopropanol. La extracción tiene tres etapas: la lisis de la membrana celular, la extracción del ADN genómico y su precipitación. A este procedimiento se adiciono el uso de la proteinasa k.

a.-Lisis de la membrana celular.- La primera etapa de la extracción del ADN es la rotura de la membrana celular y nuclear, para lo cual la muestra homogeneizada se trata primero con el tampón de extracción, que contiene EDTA, Tris-HCl , CTAB y proteinasa k. Todas las membranas biológicas presentan la misma estructura general, integrada por moléculas de lípidos y de proteínas, unidas por interacciones no covalentes, las moléculas lipídicas están ordenadas en una doble capa continua, en la que las moléculas proteínicas están disueltas. Las moléculas lipídicas están formadas por extremos hidrófilos, denominados cabezas, y extremos hidrófobos, denominados colas. En este método, el detergente (CTAB), contenido en el tampón de extracción provoca la lisis de la membrana. Dado que la composición de los lípidos y del detergente es similar, el componente de CTAB del tampón de extracción captura los lípidos que integran la membrana celular y nuclear.

Cuando el detergente captura los lípidos y las proteínas al entrar en contacto con la membrana celular y el tampón de extracción con CTAB. Con una concentración salina (NaCl), determinada, el detergente forma un complejo insoluble con los ácidos nucleicos. El EDTA es un componente quelante, que se une al magnesio, entre otros metales. El magnesio es un cofactor de la desoxirribonucleasa. Al unir el magnesio al EDTA, la actividad de la desoxirribonucleasa presente disminuye. El Tris-HCl confiere a la solución la capacidad de amortiguar el pH (un pH inferior o superior daña el ADN). Es importante señalar que, como los ácidos nucleicos se degradan fácilmente en estafase de la purificación, debe reducirse al mínimo el tiempo transcurrido entre la homogeneización de la muestra y la adición de la solución tampón con CTAB. Una vez que se han roto las membranas de la célula y de los orgánulos (como los que se encuentran alrededor de las mitocondrias y los cloroplastos), se purifica el ADN.

a.1. Proteinasa k.- es una proteasa muy activa del tipo subtilisina que se obtienen a partir de *Tritirachium álbum*; esta proteína libera el DNA nuclear al medio y digiere las proteínas. Permite facilitar la lisis y degradar todas las proteínas, de esta forma queda limpia la solución (las proteínas quedan reducidas a peptidos pequeños) y se obtiene la muestra mucho más pura.

b.- Extracción.- En esta etapa, se separan los complejos formados por los ácidos nucleicos y el CTAB de los polisacáridos, los compuestos fenólicos, las proteínas y los demás lisados celulares disueltos en la solución acuosa. Es especialmente importante eliminar los polisacáridos y los compuestos fenólicos, pues pueden inhibir numerosas reacciones enzimáticas. En concentraciones hiposalinas (NaCl< 0,5 M), los contaminantes de los complejos de ácidos nucleicos no precipitan y pueden eliminarse extrayendo la solución acuosa con cloroformo. El cloroformo desnaturaliza las proteínas y facilita la separación de las fases acuosa y orgánica. La fase acuosa suele constituir la fase superior. No obstante, si dicha fase es densa debido a la concentración salina (> 0,5 M), formará la fase inferior. Además, si el pH de la solución acuosa no se ha equilibrado debidamente (pH 7,8 – 8,0), los ácidos nucleicos tenderán a repartirse en la fase orgánica. Si es preciso, la extracción con cloroformo se realizará dos o tres veces, con objeto de eliminar por completo las impurezas de la capa acuosa. Para perfeccionar la extracción de los ácidos nucleicos, puede retro extraerse la fase orgánica con una solución acuosa, que se añade a continuación al extracto anterior. Una vez purificados los complejos de ácidos nucleicos, puede procederse a la precipitación, última etapa del procedimiento.

c.- Precipitación.- En esta última etapa se separan los ácidos nucleicos del detergente, para lo cual la solución acuosa se trata primero con una solución de precipitación compuesta por una mezcla de CTAB y NaCl en concentración elevada (NaCl>0,8 M). Una alta concentración salina es necesaria para que se forme un precipitado de ácidos nucleicos. Puede ser preferible emplear acetato de sodio en lugar de NaCl por su capacidad tampón. En estas condiciones, el detergente, que es más soluble en alcohol que en agua, puede eliminarse por lavado, mientras que los ácidos nucleicos precipitan. El posterior tratamiento con etanol al 70 % permite una mayor purificación o elución de los ácidos nucleicos de la sal residual.

1.14.3. Visualización de DNA: Electroforesis

La electroforesis en gel es una técnica crucial tanto para el análisis como para la purificación de los ácidos nucleicos. Cuando una molécula cargada se coloca en un campo eléctrico, migrará hacia el electrodo con la carga opuesta; los ácidos nucleicos son moléculas cargadas negativamente, debido a la presencia de grupos fosfato en su

estructura, por lo que migrarán hacia el polo positivo (ánodo). Este campo eléctrico se aplica a geles o matrices, que consisten en una red compleja de poros, sobre los cuales las moléculas de ácidos nucleicos migrarán (Dale y Von Schantz, 2002 citado por García, 2006).

La electroforesis en gel es una técnica crucial tanto para el análisis como para la purificación de los ácidos nucleicos. Cuando una molécula cargada se coloca en un campo eléctrico, migrará hacia el electrodo con la carga opuesta; los ácidos nucleicos son moléculas cargadas negativamente, debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura, por lo que migrarán hacia el polo positivo (ánodo). Este campo eléctrico se aplica a geles o matrices, que consisten en una red compleja de poros, sobre los cuales las moléculas de ácidos nucleicos migrarán (Dale y Von Schantz, 2002 citado por García, 2006).

Madriz (2005) menciona que el polímero utilizado para el análisis electroforético de ácidos nucleicos de gran tamaño (100pb-10kb) es la agarosa. En la agarosa el rango de concentración oscila entre el 0,5 %, que puede separar moléculas del orden de 1 a 30 Kb, y el 2% que puede separar ácidos nucleicos de 0,1 a 2 Kb. Sin embargo, algunos tipos de agarosa de alto grado de resolución pueden separar moléculas de ADN que se diferencian hasta en 10 bases.

1.14.4. Región Espaciadora ITS

Devran (2002) menciona que el estudio de regiones específicas del genoma resulta ser muy útil para la realización de análisis moleculares. Una de estas regiones es la familia multigénica del ADN ribosomal (ADNr), la cual está conformada por muchas copias de genes que codifican para tres componentes ribosomales: 28S, 5.8S y 18S. En la mayoría de los eucariotas, la organización 5' a 3' de esta familia de genes consiste en un espaciador transcrito externo (ETS), el gen 18S (SSU), un espaciador transcrito interno (ITS1), el gen 5.8S, un ITS2, el gen 28S (LSU) y el espaciador intergénico (IGS), la cual se puede observar en la Figura 1A. La región IGS es seguida por otra copia de la familia génica.

El gen 18S consiste en la subunidad ribosomal pequeña (SSU), mientras que el gen 28S consiste en la subunidad ribosomal grande (LSU). La SSU nuclear del ADNr es una de las regiones de ADN más conservadas, por lo cual han resultado útiles en la reconstrucción de ramas filogenéticas, incluyendo reinos, filos, clases y órdenes. El grado de conservación nucleotídica del gen 5.8S, el más pequeño de la familia de ADNr, es similar al de la SSU, pero su tamaño es muy pequeño como para contener información filogenética de peso. Por esta razón no es recomendable utilizar este gen para análisis moleculares.

Powers (2004) manifiesta que la LSU nuclear del ADNr es mucho más larga y muestra más variación, comparándola con el gen 18S, sin embargo, ha demostrado ser útil en el estudio de relaciones filogenéticas en niveles bajos de categoría, como órdenes o familias.

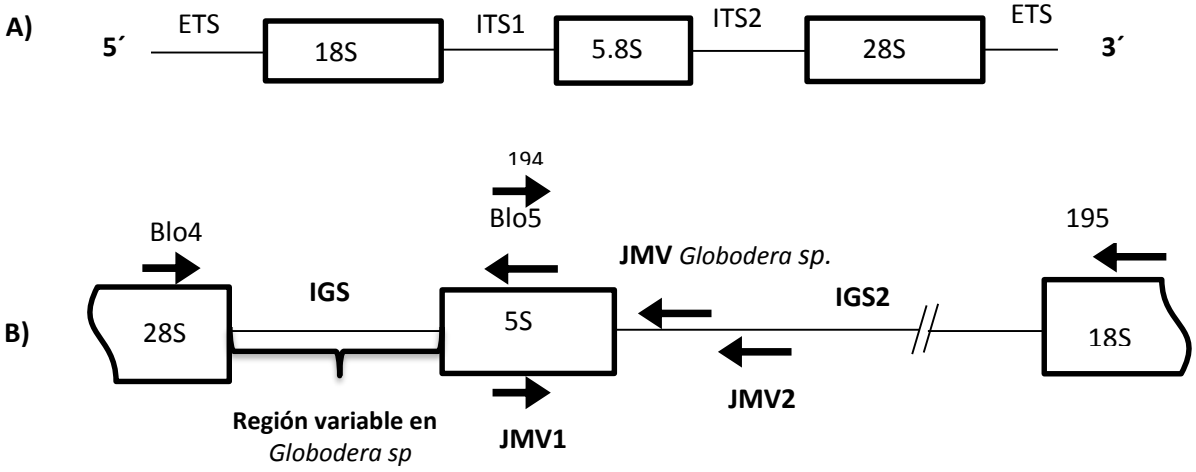


Figura 1.2. Familia multigénica del ADN ribosomal (ADNr).

A) La figura esquemática de la familia multigénica del ADN ribosomal (ADNr) (Modificado de: Jobes y Thien, 1997). B) Diagrama esquemático del ADNr, mostrando el gen 5S dentro de la región IGS (Wishart et al, 2002).

Las regiones espaciadoras del ADNr nuclear evolucionan mucho más rápido que las regiones codificantes, ya que las sustituciones en las regiones espaciadores no muestran efectos letales para los organismos. Por otro lado, las variaciones en las regiones codificantes del ARNr son mucho más conservadas, ya que una mutación en

alguna de estas regiones podría evitar la construcción efectiva de los ribosomas, lo cual afectaría de forma negativa la maquinaria de la síntesis proteica (Subbotin, 2005; Hwang,1999 citado por García, 2006).

El arreglo de genes muy conservados y regiones espaciadoras menos conservadas es lo que ha hecho de estos genes un objetivo muy popular, ya que permite el diseño de imprimadores universales en secciones de secuencias conservadas, y estos imprimadores pueden utilizarse para amplificar fragmentos homólogos, tanto de especies distantes como de especies estrechamente relacionadas. La utilización de la técnica PCR-RFLP de la región ITS, ha permitido distinguir diferentes especies de nematodos (Wang et al. 2003 citado por García, 2006).

CAPÍTULO II
METODOLOGÍA

2.1. LUGAR DEL EXPERIMENTO

2.1.1. Ubicación del Experimento

El presente trabajo se realizó en la comunidad de Campanayocc, del Distrito de Carmen Alto, Provincia de Huamanga, Departamento de Ayacucho. La mencionada comunidad se encuentra en:

Latitud : 13° 12´ 19.84´´S

Longitud : 74° 14´18.30°´´O

Altitud : 3379msnm.

2.1.2. Antecedentes del Campo Experimental

El terreno destinado para la instalación del presente experimento fue utilizado en la campaña (2013 -2014), con cultivo anterior al cultivo de haba, este terreno es propiedad de la Comunidad de Campanayocc.

2.1.3. Condiciones Climáticas

Para el análisis de las condiciones climáticas del lugar donde el experimento fue conducido, se tomó los datos meteorológicos de la estación meteorológica más cercana en este caso fue Estación Experimental Agraria Canaán.

Tabla Temperaturas (Máxima, Mínima, Promedio), Precipitación y Balance Hídrico promedio mensual de Setiembre 2013 - agosto 2014.

Estación : CANAAN

Distrito : Andrés Avelino Cáceres Dorregaray

Provincia : Huamanga

Departamento : Ayacucho

Altitud : 2750.00 m.s.n.m.

Sus coordenadas son: Latitud: 13°10'0.54"S, Longitud: 74°12'22.84"O

Tabla 2.1. Datos meteorológicos de la Estación Experimental Agraria Canaán

AÑO	**2013**				**2014**								**ANUAL**	**MEDIA**
MESES	**SET**	**OCT**	**NOV**	**DIC**	**ENE**	**FEB**	**MAR**	**ABR**	**MAY**	**JUN**	**JUL**	**AGO**		
Tº Max. media mensual (ºC)	27	22.4	24.2	22.9	23	24	25	25	25	25.1	24	26.5		24.6
Tº Min. media mensual (ºC)	9.1	9.6	13	13.6	12.6	12.8	12.7	8.3	7.3	7	6.4	5.7		9.35
Tº media mensual (ºC)	**18.05**	**18.55**	**17.7**	**18.25**	**17.8**	**18.4**	**18.85**	**16.65**	**16.15**	**16.05**	**15.2**	**16.1**		17.75
Factor	4.8	4.96	4.8	4.96	4.96	4.48	4.96	**4.8**	**4.96**	**4.8**	**4.96**	**4.96**		
ETP (mm)	86.64	92.008	84.96	90.52	88.288	82.432	93.496	79.92	80.104	77.04	75.4	79.856	1010.7	0.56
Precipitación (mm)	8.1	39.9	48.8	107.8	106.2	136.8	57	46.4	12	0.05	2.04	0.05	565.14	
ETP Ajust. (mm)	48.9	52	48	52.9	49.7	47	51.5	45.4	43.8	39.6	41.2	45.1		
Humedad del suelo	-41.5	-12.7	0.21	54.18	55.85	89.16	4.8	0.42	-32.4	-40.1	-34.1	-43.9		
Exceso (mm)			0.21	54.18	55.85	89.16	4.8	0.42						
Déficit (mm)	41.45	12.72							32.4	40.08	34.1	43.87		

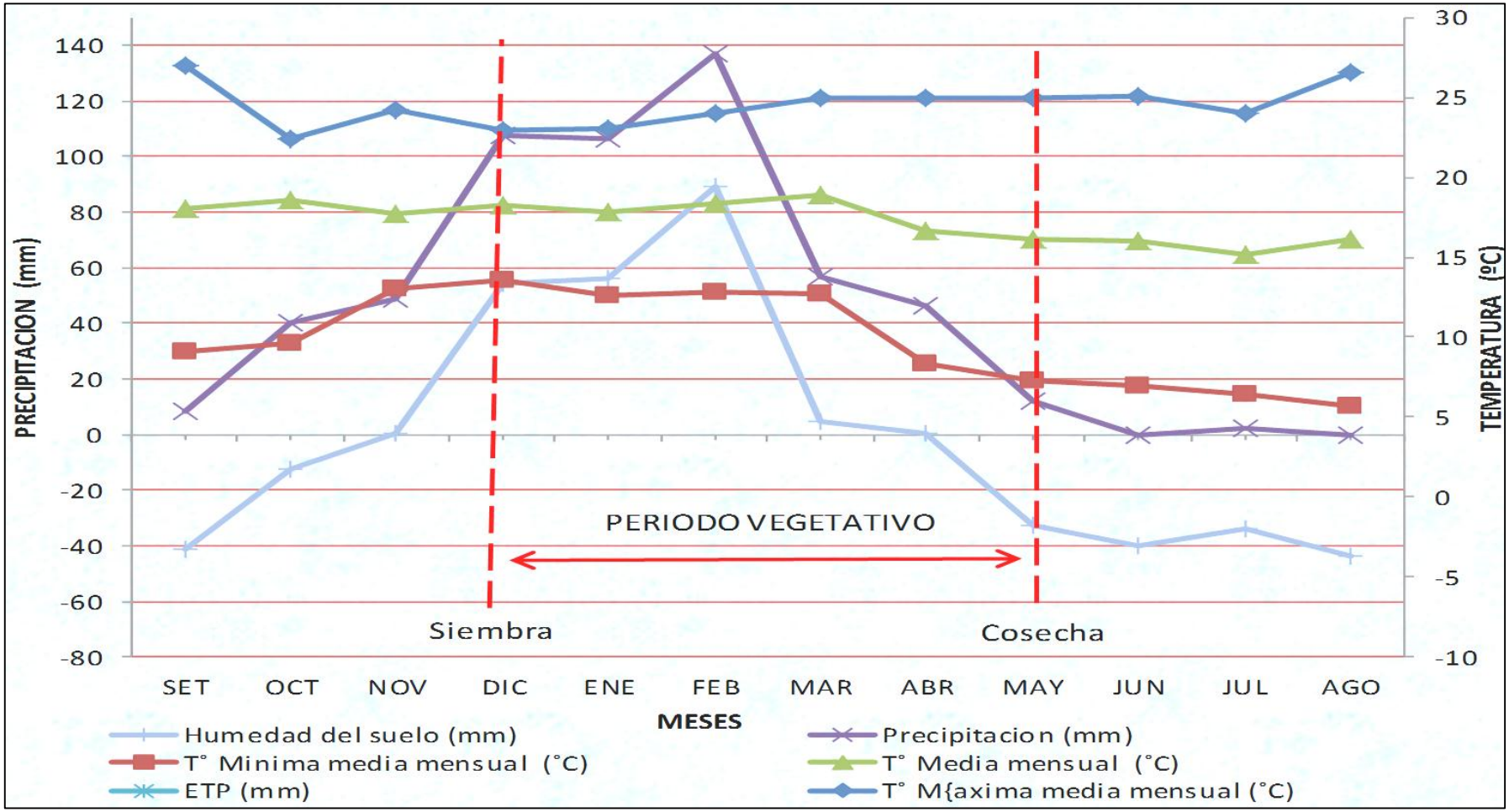


Figura 2.1. Temperaturas (Máxima, Mínima, Promedio), Precipitación y Balance Hídrico promedio mensual de Setiembre 2013 - agosto 2014, Estación Meteorológicas INIA CANAAN – Huamanga.

38

Las precipitaciones máximas se dieron en mes de febrero durante el periodo vegetativo del cultivo, aproximadamente a dos meses después de la siembra, donde la humedad del suelo fue suficiente para el inicio de la tuberización del cultivo con temperaturas medias aproximadamente de 17.75°C. En los meses siguientes las precipitaciones fueron reduciéndose y las temperaturas descendieron.

2.1.4. Análisis de Suelo

Para realizar el análisis de suelo se tomaron las muestras del campo experimental a una profundidad de 20 cm, recorriendo el campo en forma de zig zag obteniendo así muestras de varios puntos y luego las muestras fueron homogenizadas para obtener una muestra compuesta representativa para su respectivo análisis.

Los resultados se muestran en el Cuadro 5 y su interpretación.

Tabla 2.2. Resultados del análisis de suelo del campo experimental. Campanayocc (3379 m.s.n.m.), Carmen Alto–Ayacucho.

Textura	**pH**	**C.E.**	**$CO^{=}_3$**	**Nt**	**MO**	**P**	**K**	**CIC**	**% Sat.**
	(1:2.5)	**$dS.m^{-1}$**	**%**	**%**	**%**	**ppm**	**ppm**		**Bases**
Franco-Arcillo-Arenoso	5.75	0.05	0	0.195	4.185	19.45	93.5	17.05	67
Interpret.	Acido	Muy ligera			Alto	Alto	Medio	Medio	

Según. AGROLAB (2013).

2.2. MATERIAL GENÉTICO.

Se trabajó con 49 accesiones de papa nativa (*Solanum spp.)* colectados de la zona de Pampa-cangallo, y conservados en el Banco de Germoplasma del Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal-EFPA-FCA-UNSCH.

Tabla 2.3. Las 49 accesiones de papa nativa con su respectivo nombre común

N°		ACCESIÓN	NOMBRE COMÚN	N°		ACCESIÓN	NOMBRE COMÚN
T	1	UNSCHLGBV60405SSP16-13	Huencco	T	26	UNSCHLGBV60405SSP03-13	Soyo caputo
T	2	UNSCHLGBV60405SSP02-13	Puca runtus	T	27	UNSCHLGBV60405SSP33-13	Marquina
T	3	UNSCHLGBV60405SSP42-13	Victor	T	28	UNSCHLGBV60405SSP24-13	Camotillo
T	4	UNSCHLGBV60405SSP14-13	Maco	T	29	UNSCHLGBV60405SSP04-13	Limeña
T	5	UNSCHLGBV60405SSP49-13	Yanacuhipa runtun	T	30	UNSCHLGBV60405SSP20-13	Pucavacapa chuñun
T	6	UNSCHLGBV60405SSP63-13	P63	T	31	UNSCHLGBV60405SSP46-13	Amarilla
T	7	UNSCHLGBV60405SSP23-13	Alcarraza	T	32	UNSCHLGBV60405SSP13-13	Yuraq sisa
T	8	UNSCHLGBV60405SSP62-13	P62	T	33	UNSCHLGBV60405SSP70-13	P70
T	9	UNSCHLGBV60405SSP25-13	Yuraq millcco	T	34	UNSCHLGBV60405SSP58-13	Royacc Halle
T	10	UNSCHLGBV60405SSP27-13	Ucca huayro	T	35	UNSCHLGBV60405SSP60-13	Ritipa sisan
T	11	UNSCHLGBV60405SSP12-13	Azul ñahui	T	36	UNSCHLGBV60405SSP50-13	Puca suyto
T	12	UNSCHLGBV60405SSP40-13	Yuraq suyto	T	37	UNSCHLGBV60405SSP54-13	Yana huaña
T	13	UNSCHLGBV60405SSP61-13	P61	T	38	UNSCHLGBV60405SSP51-13	Peruanita
T	14	UNSCHLGBV60405SSP19-13	Leona - Añil	T	39	UNSCHLGBV60405SSP34-13	Negra
T	15	UNSCHLGBV60405SSP35-13	Tambina	T	40	UNSCHLGBV60405SSP45-13	Huayro Hembra
T	16	UNSCHLGBV60405SSP47-13	Yana rosilla	T	41	UNSCHLGBV60405SSP06-13	Allcca cambro
T	17	UNSCHLGBV60405SSP30-13	puca ñahui	T	42	UNSCHLGBV60405SSP11-13	Huayro
T	18	UNSCHLGBV60405SSP22-13	Yutupa runtun	T	43	UNSCHLGBV60405SSP37-13	Cuchipa acan
T	19	UNSCHLGBV60405SSP73-13	P73	T	44	UNSCHLGBV60405SSP17-13	Cceccorani
T	20	UNSCHLGBV60405SSP01-13	Capcas	T	45	UNSCHLGBV60405SSP44-13	Runtus
T	21	UNSCHLGBV60405SSP15-13	Duraznilla	T	46	UNSCHLGBV60405SSP48-13	Durasnillo 2
T	22	UNSCHLGBV60405SSP65-13	P65	T	47	UNSCHLGBV60405SSP41-13	Muro suyto
T	23	UNSCHLGBV60405SSP67-13	P67	T	48	UNSCHLGBV60405SSP18-13	Sangre de toro
T	24	UNSCHLGBV60405SSP57-13	Yuraq Chikñas	T	49	UNSCHLGBV60405SSP68-13	P68
T	25	UNSCHLGBV60405SSP10-13	Chiquibonita				

Fuente: Base de datos del banco de germoplasma del LGBV-EFPA-FCA-UNSCH.

2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento fue conducido bajo el Diseño Experimental Látice Balanceado Simple de 7x7 con dos repeticiones. Se instaló de acuerdo al croquis, randomización y características de la parcela.

El Modelo Aditivo Lineal es:

$$Y_{ijk=}\mu + R_j + T_i + \beta_{ik(j)} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Observación realizada en la Unidad Experimental

μ= Medio general

R_j= Efecto de la repetiónj $-$ $esima$

T_i = Efecto de$l$ i $-$ $esimo$ Tratamiento

$\beta_{ik(j)}$ = Efecto Aleatorio del Bloque $_{ik}$ en Repeticion j $-$ $esima$

E_{ijk} = Efecto Aleatorio o asociado a la $i$jk $-$ $esima$Observación

Unidad experimental

-Maceteros de un 1kg de capacidad con suelo propio del lugar.

-Cada macetero tuvo un tubérculo-semilla.

Croquis del campo experimenta

En la siguiente figura se observa el bloque I y II que fue la forma como se distribuyeron las macetas:

UNSCHLGBV 60405 SSP016-13	UNSCHLGBV 60405 SSP002-13	UNSCHLGBV 60405 SSP042-13	UNSCHLGBV 60405 SSP014-13	UNSCHLGBV 60405 SSP049-13	UNSCHLGBV 60405 SSP063-13	UNSCHLGBV 60405 SSP023-13
1	2	3	4	5	6	7
UNSCHLGBV 60405 SSP062-13	UNSCHLGBV 60405 SSP025-13	UNSCHLGBV 60405 SSP027-13	UNSCHLGBV 60405 SSP012-13	UNSCHLGBV 60405 SSP040-13	UNSCHLGBV 60405 SSP061-13	UNSCHLGBV 60405 SSP019-13
8	9	10	11	12	13	14
UNSCHLGBV 60405 SSP035-13	UNSCHLGBV 60405 SSP047-13	UNSCHLGBV 60405 SSP030-13	UNSCHLGBV 60405 SSP022-13	UNSCHLGBV 60405 SSP073-13	UNSCHLGBV 60405 SSP001-13	UNSCHLGBV 60405 SSP015-13
15	16	17	18	19	20	21
UNSCHLGBV 60405 SSP065-13	UNSCHLGBV 60405 SSP067-13	UNSCHLGBV 60405 SSP057-13	UNSCHLGBV 60405 SSP010-13	UNSCHLGBV 60405 SSP003-13	UNSCHLGBV 60405 SSP033-13	UNSCHLGBV 60405 SSP024-13
22	23	24	25	26	27	28
UNSCHLGBV 60405 SSP004-13	UNSCHLGBV 60405 SSP020-13	UNSCHLGBV 60405 SSP046-13	UNSCHLGBV 60405 SSP013-13	UNSCHLGBV 60405 SSP070-13	UNSCHLGBV 60405 SSP058-13	UNSCHLGBV 60405 SSP060-13
29	30	31	32	33	34	35
UNSCHLGBV 60405 SSP050-13	UNSCHLGBV 60405 SSP054-13	UNSCHLGBV 60405 SSP051-13	UNSCHLGBV 60405 SSP034-13	UNSCHLGBV 60405 SSP045-13	UNSCHLGBV 60405 SSP006-13	UNSCHLGBV 60405 SSP011-13
36	37	38	39	40	41	42
UNSCHLGBV 60405 SSP037-13	UNSCHLGBV 60405 SSP017-13	UNSCHLGBV 60405 SSP044-13	UNSCHLGBV 60405 SSP048-13	UNSCHLGBV 60405 SSP041-13	UNSCHLGBV 60405 SSP018-13	UNSCHLGBV 60405 SSP068-13
43	44	45	46	47	48	49

Figura 2.2. "Bloque I" Distribución de las accesiones

UNSCHLGBV 60405 SSP016-13	UNSCHLGBV 60405 SSP062-13	UNSCHLGBV 60405 SSP035-13	UNSCHLGBV 60405 SSP65-13	UNSCHLGBV 60405 SSP004-13	UNSCHLGBV 60405 SSP050-13	UNSCHLGBV 60405 SSP037-13
1	8	15	22	29	36	43
UNSCHLGBV 60405 SSP002-13	UNSCHLGBV 60405 SSP025-13	UNSCHLGBV 60405 SSP047-13	UNSCHLGBV 60405 SSP067-13	UNSCHLGBV 60405 SSP020-13	UNSCHLGBV 60405 SSP054-13	UNSCHLGBV 60405 SSP017-13
2	9	16	23	30	37	44
UNSCHLGBV 60405 SSP042-13	UNSCHLGBV 60405 SSP027-13	UNSCHLGBV 60405 SSP030-13	UNSCHLGBV 60405 SSP57-13	UNSCHLGBV 60405 SSP046-13	UNSCHLGBV 60405 SSP51-13	UNSCHLGBV 60405 SSP044-13
3	10	17	24	31	38	45
UNSCHLGBV 60405 SSP014-13	UNSCHLGBV6 0405 SSP012-13	UNSCHLGBV 60405 SSP022-13	UNSCHLGBV 60405 SSP010-13	UNSCHLGBV 60405 SSP013-14	UNSCHLGBV 60405 SSP34-15	UNSCHLGBV 60405 SSP048-16
4	11	18	25	32	39	46
UNSCHLGBV 60405 SSP049-13	UNSCHLGBV6 0405 SSP040-13	UNSCHLGBV 60405 SSP073-13	UNSCHLGBV 60405 SSP003-13	UNSCHLGBV 60405 SSP070-13	UNSCHLGBV 60405 SSP045-13	UNSCHLGBV 60405 SSP041-13
5	12	19	26	33	40	47
UNSCHLGBV 60405 SSP063-13	UNSCHLGBV6 0405 SSP061-13	UNSCHLGBV 60405 SSP001-13	UNSCHLGBV 60405 SSP033-13	UNSCHLGBV 60405 SSP058-13	UNSCHLGBV 60405 SSP006-13	UNSCHLGBV 60405 SSP018-13
6	13	20	27	34	41	48
UNSCHLGBV 60405 SSP023-13	UNSCHLGBV6 0405 SSP019-13	UNSCHLGBV 60405 SSP015-13	UNSCHLGBV 60405 SSP024-13	UNSCHLGBV 60405 SSP060-13	UNSCHLGBV 60405 SSP011-13	UNSCHLGBV 60405 SSP068-13
7	14	21	28	35	42	49

Figura 2.3. "Bloque II" Distribución de las accesiones

2.4. INSTALACIÓN Y CONDUCCIÓN DEL EXPERIMENTO

2.4.1. Actividades en Laboratorio

a. Extracción de quistes

Se trabajó con muestras del suelo de Huancayo, utilizando el método modificado de Fenwick (Laura, 2013).

La muestra de suelo se secó aproximadamente por un mes, posteriormente se lavó el suelo con agua a presión que pasó por un tamiz de 2.0 mm. para eliminar partículas grandes, y por otro tamiz de 1 mm para retener partículas pequeñas.

Los quistes y los restos orgánicos que floten son llevados por el agua hacia el collar del aparato de Fenwick y finalmente colectados en un tamiz de 60 mesh (0.1mm).

Paralelamente se instaló un soporte de metal que contiene un aro de 10 cm. de diámetro, sobre el aro se colocó un embudo con un papel filtro; luego se transfirió los

quistes y el material orgánico del tamiz de 60 mesh, quedando retenida el material orgánico y los quistes en el papel filtro. Las muestras debidamente etiquetadas fueron puestas a secar bajo sombra, aproximadamente por un mes. Se realizó en el invernadero de Genética y Biotecnología Vegetal-EFPA-FCA-UNSCH.

Figura 2.4. A la izquierda se observa la muestra de suelo seca y a la derecha muestra de suelo lavado por el método de Fenwick (quistes con restos orgánicos).

b. Separación de quiste

Cuando los quistes y restos orgánicos se secaron aproximadamente por un mes se procedió a separar los quistes, utilizando el principio de rodamiento inclinando un papel bon aproximadamente 70°, dejando rodar los restos orgánicos y los quistes, en donde van quedando por fricción los restos orgánicos existente, mientras que los quistes por la forma globosa van descendiendo hacia el colector de la parte inferior del papel.

Figura 2.5. Separación de quistes por método de rodamiento.

c. Determinación de la viabilidad de los quistes

Se realizó en el laboratorio de biotecnología y genética vegetal, permitiendo determinar la cantidad de "individuos infectivos potenciales" para dosificar la cantidad de inóculo en las unidades experimentales. Esta cantidad de inóculo resultado del procedimiento para este tipo de pruebas dio la cantidad de quistes a dosificar.

Se tomó 20 quistes al azar, los cuales se colocaron sobre un recipiente de porcelana y se agregó una gota de agua para después triturarlos, teniendo cuidado de no dañar los huevos y/o juveniles. Lo obtenido en la trituración se transfirió con una piseta a un vaso de precipitado con 20 ml de agua, mientras está en suspensión es homogenizada por un agitador magnético, se tomaron cuatro alícuotas de 1 cc. cada una. Cada alícuota se colocó en un cuadrante de una placa de conteo y bajo el estereoscopio se procedió a contar el número de huevos y juveniles en cada centímetro cubico de agua.

Franco et al. (1990) menciona que la viabilidad total (VT) se expresa como el contenido de huevos y juveniles, que se hallan presentes en los quistes.

Franco et al. (1985) menciona que la prueba de viabilidad nos permitió conocer el número de huevos y/o juveniles por quiste, en base a esos resultados se calculó la cantidad de quiste a inocular por macetero, el cual deberá ser una población inicial mínima de 20 huevos y/o juveniles viables por gramo de suelo.

Franco et al. (1990) propone la fórmula de hallar viabilidad total de huevos por quiste de la siguiente manera:

$$VT = \frac{(X^{o}cc\ )\ (\text{Vol. de agua})}{N^{o}Q}$$

Donde:

VT = Viabilidad Total

$X^{o}cc$= Promedio de huevos y larvas en las cuatro alícuotas

N^{o} Q = Número de quistes triturados

Vol de agua = Volumen de agua utilizada

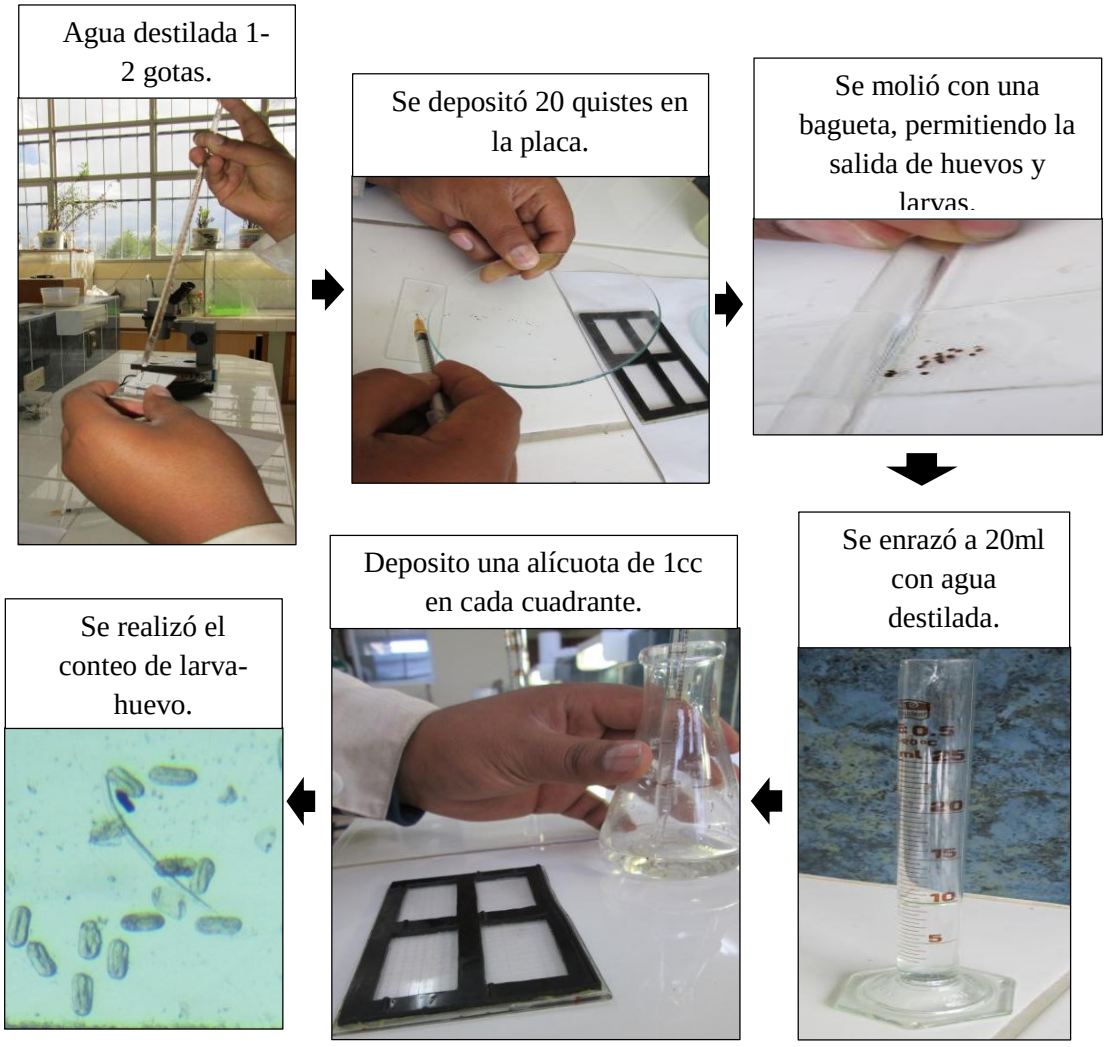


Figura 2.6. Prueba de Viabilidad.

d. Preparación del Inóculo

El inóculo se preparó en el laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal. Se siguió los siguientes pasos: en pequeños cuadrados de tela nylon, se depositó la cantidad de quiste calculado que varío entre 20-26 quistes, se amarro con alambre de cobre, formando pequeños paquetes.

Figura 2.7. Preparación del inóculo

2.4.2. Actividades en Campo

a. Siembra

Se sembró en la Comunidad de Campanayocc, utilizando maceteros con suelo propio del lugar en una cantidad de 0.5Kg, siendo el 75% de su capacidad. Teniendo listos los maceteros con la tierra, se procedió a sembrar un tubérculo.

Figura 2.8. Siembra de tubérculo-semilla

b. Inoculación

En los maceteros con plantas de dos semanas, se depositó el inóculo cerca de las raíces, después se cubrió con la capa superior de suelo. Durante el crecimiento de la planta, la raíz elimina un exudado como acción estimulante, permitiendo que los nematodos en la segunda fase larvaria emerjan del huevo y penetren por la raíz para alimentarse.

Ubicación de las macetas

Se retiró una porción de suelo a un costado, para depositar el inóculo cerca de la raíz de la planta en crecimiento.

Se cubrió con el suelo que se había retirado.

Figura 2.9. Proceso de inoculación

c. Conducción del cultivo y cosecha

Se realizó visitas semanales para monitorear y evitar alguna perturbación que altere el normal crecimiento y desarrollo de la planta.

El periodo vegetativo de la planta de papa duro 6 meses aproximadamente, cuando llegaron a su madurez fisiológica donde las hojas estuvieron en estado de senescencia,

se realizó la cosecha y traslado de las macetas al Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal-EFPA-FCA-UNSCH.

2.4.3. Identificación De Severidad

Se determinó a través del nivel de infestación del suelo, que a su vez corresponde a la densidad de población de nematodos, esto se logró a través del número de huevos y estadios juveniles/gr. de suelo. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$NI = \frac{Q \times H}{100}$$

Donde:

NI = Nivel de infestación (huevos /cc de suelo)

Q = Nº de quistes/100 cc. de suelo

H = Nº de huevos/quiste

Parámetros de Niveles de infestación para *Globodera spp.* y pérdidas de rendimiento en base al número de huevos y J2 por gramo de suelo.

Tabla 2.4. Parámetros de Niveles de infestación para *Globodera spp*

Grado de infestación	Huevos + J2/cc de suelo	Pérdidas de rendimiento (%)
Limpio	0	0
Incipiente	1 - 5	5
Media	5.1 – 15	13
Población alta	15.1 – 35	45
Población muy alta	> 35	58

Fuente: Laura, 2013

2.4.4. Población Final (Pf)

Para evaluar esto, necesitamos conocer la viabilidad total (VT) por quiste. Se utiliza la siguiente formula:

$$Pf = \frac{(N° \text{ de quistes/maceta}) \times (VT/\text{quiste})}{\text{gr suelo/maceta}}$$

2.4.5. Evaluación de Resistencia, Susceptibilidad y Tolerancia de Papa Nativa.

La extracción de los quistes y su conteo se realizó en el laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal-EFPA-FCA-UNSCH.

a. Extracción de quistes y conteo

Los tratamientos tuvieron el mismo procedimiento descrito anteriormente adicionado un segundo lavado por el método de gasolina 84 octanos.

Después se realizó el conteo de quistes con ayuda del estereoscopio, así se conoció la cantidad de quiste por tratamiento.

a.1. Determinación del incremento de la población

La población final del nematodo se determinó mediante el siguiente procedimiento:
-Se homogenizo el suelo de cada tratamiento considerada como unidad experimental (UE) pre inoculada, que contiene aproximadamente 500 gr de suelo. Después se utilizó el método modificado de Fenwick para extraer los quistes de nematodo.

- Una vez extraídos los quistes de cada unidad experimental se secó al ambiente bajo sombra.
- Estando secas las muestras se procedió a la separación de quistes de la materia orgánica en gasolina 84 octanos, metodología propuesta por Canto (1993).

a.1.1. Segundo lavado por "método del uso de gasolina 84 octanos"

Se lavó las 196 muestras de suelo de papas nativas que contienen el inóculo *Globodera spp*, utilizando el método modificado de Fenwick , quedando restos orgánicos en una cantidad regular, para reducir esto y facilitar la separación de quistes, se realizó el segundo lavado utilizando gasolina 84 octanos, metodología propuesta por (Canto et al. 1993).

Cuando los quistes y restos orgánicos estuvieron secos, fueron transferidos a una fiola de 250 cc utilizando un embudo.

Después en la fiola se agregó gasolina de 84 octanos hasta antes de los 10mm del borde superior. Se dejó reposar por 5 minutos para que los quistes floten y la materia orgánica se precipite. Pasado el tiempo se colocó un embudo conteniendo un papel filtro sobre un vaso descartable. Se vacío toda la parte superior flotante (quistes y algunos restos orgánica) sobre el papel filtro, después las muestras debidamente etiquetadas fueron puestas a secar bajo sombra aproximadamente por un mes. La gasolina restante se recuperó del Erlenmeyer, para luego ser reutilizada. Así se procedió con todas las muestras. Este procedimiento se realizó en el invernadero de Genética y Biotecnología Vegetal-EFPA-FCA-UNSCH.

Canto et al. (1993) menciona que los quistes de *G. pallida* al ser extraidas por flotación en acetona o gasolina de 84 y 95 octanos, no afecta la infectividad de los juveniles. También que los solventes mencionados tampoco tienen efecto en la embriogénesis de huevos o viabilidad de J2.

Figura 2.10. Separación de quiste y restos orgánicos utilizando gasolina 84 octanos

b. Tasa de Multiplicación de la Población de Nematodos(TMPN)

Se define como el número de veces una densidad de nematodos conocida es capaz de multiplicarse sobre un hospedero en un determinado periodo. Esta tasa está dada por la relación:

TMPN= Pf/Pi

Dónde:

Pf: densidad de nematodos determinados al final del ciclo vegetativo de la planta de papa.

Pi: densidad inicial de nematodos, que es igual al inóculo más la población natural del lugar.

Este parámetro modificado se emplea para definir con precisión el grado de resistencia del material genético (papa nativa) que se está investigando y siempre se debe determinar en huevos y/o estados juveniles por gramo de suelo.

Tabla 2.5. Calificación de la tasa de multiplicación

Tasa de multiplicación de quistes cPf /cPi	
Resistente	$> 0 \leq 0.5$
Tolerante	$>0.5 \leq 1.00$
Moderadamente susceptible (MS)	$>1.00 \leq 2.00$
Susceptible (S)	>2.0

Fuente: Parámetros modificado. Franco (1990)

2.4.6. Identificación de la Especie de *Globodera spp*.

Se trabajó con muestras representativas de la: Región de Ayacucho (Manallasac, Chontaca y Seccelambras), Región Apurímac (Andahuaylas) y Región de Junín (Huancayo), estos lugares son zonas de alta producción de papa.

a. Extracción de ADN de nematodos

El ADN genómico se extrajo utilizando el procedimiento de extracción del amortiguador de lisis nuclear (CTAB). Donde se utilizó 100 quistes de nematodo adicionando la Proteinasa K al método CTAB.

b. PCR con imprimadores para *Globodera spp.*

Para lograr identificar las especies de *Globodera spp*, se utilizó los primers para la detección y amplificación de la región ITS (espacio intergénico) propuestos por la investigación de García (2006). Las reacciones de PCR en la distinción *Globodera*

rostochiensis y *Globodera pallida* se llevó acabo utilizando los primers pITSr3 (5´-AGCGCAGACATGCCGCAA- 3´) y pITSp4 (5´-ACAACAGCAATCGTCGAG- 3´) como primers reverse en combinación con el primer forward ITS5 (5´-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG- 3´). El perfil térmico aplicado constó de: a) 94°C, 10 min., b) 94°C, 30 s; 54°C, 30 s; 72°C, 2min (30 ciclos) y c) 72°C, 10 min.

Condiciones de amplificación en PCR con iniciadores para la identificación de *Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis*.

Tabla 2.6. Condiciones de amplificación en PCR con iniciadores para la identificación de *Globodera pallida y Globodera rostochiensis*

COMPONENTES	**1 RxN**	**8 Rxn**
NFW	**3.6**	28.8
Buffer 5X	2	16
Mg 2+ (25mM)	**0.6**	4.8
dNTP (10mM)	0.2	1.6
F (10µM)	0.2	1.6
R1/R2 (10µM)*	0.2	1.6
Taq	0.2	1.6
DNA	3	
Vol Final	10	

Donde F: primer forward, R1: primer reverse pITSr3 para la identificación de *Globodera rostochiensis* y R2: primer reverse pITSp4 (para la identificación de *Globodera pallida* .

c. Electroforesis

El producto de PCR se separó por medio de electroforesis en gel de agarosa, al 1%.

Para la preparación del gel, se pesó la agarosa 1.1gr y se adicionó 110ml baffer 1X, adicionando 2 µl de bromuro de etidio. Se vacío a una cámara de electroforesis, colocando el peine sin hacer burbujas, para luego dejar solidificar por 40 minutos.

Una vez que el gel solidificó, se removió cuidadosamente el peine, llenando la cámara con baffer de corrida TBE hasta cubrir un poco el gel. Luego se colocó el producto PCR en cada pocillo. Para ver el producto PCR se corrió a 90V por 2horas y 5 minutos.

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. ANÁLISIS DE LA TEMPERATURA (T°C) Y LA HUMEDAD RELATIVA (HR%) EN LA DINÁMICA POBLACIONAL DEL NEMATODO DEL QUISTE (*Globodera pallida)*

De la Figura 2.1. Las precipitaciones máximas se dieron en el mes de febrero durante el periodo vegetativo del cultivo, aproximadamente a dos meses después de la siembra, donde la humedad del suelo fue suficiente para el inicio de la tuberización del cultivo con temperaturas medias aproximadamente de 18.4°C, la temperatura media óptima para la tuberización es de 20°C, si la temperatura se incrementa por encima de este valor, la fotosíntesis disminuye y aumenta la respiración lo cual afecta la formación de los tubérculos y favorece el desarrollo de plagas y enfermedades.

En la fase inicial (L ini**.**) la temperatura máxima fue de 22.9 °C, la media de 18.3 °C y la mínima de 13.6°C, considerados como normales para el desarrollo del nematodo, en función del hospedante y la temperatura del suelo, el ciclo de vida de *G. pallida* dura entre de 90 a 100 días y produce una generación por ciclo de cultivo de papa a 10 ºC , en el interior del quiste las larvas pueden pasar por una fase de reposo, en la cual la capacidad de eclosión o emergencia de las mismas se ve disminuida o interrumpida, en función de las condiciones ambientales: temperatura (> 30 – 35 °C quedan inactivos) .

En la fase de desarrollo (L des**.**) la temperatura máxima fue de 24 °C, la media de 18.4°C y la mínima de 12.8 °C, que igualmente pueden considerarse como normales para el desarrollo del nematodo.

En la fase media (L med.) la temperatura máxima fue de 25 °C, la media de 18.9°C y la mínima de 12.7 °C, que son temperaturas que no afectan el desarrollo normal del nematodo. Por último en la fase final (L fin.) tuvo una temperatura máxima 25ºC, una media de 16.7 °C y una mínima de 8.3 °C, permitiéndole al nematodo completar su ciclo de vida en la fase fenológica de desarrollo del cultivo (L des).

3.2. EVALUAR LA RESISTENCIA, SUSCEPTIBILIDAD Y TOLERANCIA

3.2.1. Identificación de Severidad del Suelo A Utilizar

Se utilizó la siguiente formula:

$$NI = \frac{Q \times H}{100}$$

Obteniendo el nivel de infestación:

$$NI = (0x0)/100 = 0$$

Según el cuadro, el grado de infestación es 0 huevos +j2/cc de suelo, que representa 0% en pérdidas de rendimiento. Concluyendo que el suelo usado de Campanayocc está limpio de nematodos.

3.2.2. Calculo de Número de Quiste a Inocular

a. Prueba de Viabilidad

La prueba de viabilidad nos permitió conocer el número de huevos y/o juveniles por quiste, en base a esos resultados se calculó la cantidad de quiste a inocular por macetero, los resultados fueron:

Tabla 3.1. Cantidad de huevos y/o juveniles por alícuota de 1 cc de suspensión.

CONCEPTO	**ALÍCUOTA**			
N° huevo/juveniles	**A1**	**A2**	**A3**	**A4**
	376	383	371	381
Total Promedio	**378 huevos y/o juveniles/quiste**			

Alícuota: muestra de solución (agua – nematodos) tomada con pipeta.

Se utilizó la fórmula:

$$VT = \frac{(X^{o}cc\ )\ (Vol.\ de\ agua)}{N^{o}\ Q}$$

$$VT = \frac{(378\ huevo\ y/o\ juveniles)\ (20ml)}{20\ quistes}$$

$$VT = 378\ huevo\ y/o\ juveniles/quiste$$

b. Determinación de cantidad de quiste que se utilizó para preparar el inóculo

Conociendo la viabilidad total de 378 huevo y/o juvenil por quiste, la prueba de viabilidad, se determinó:

- Se calculó gramos de suelo/huevo y/o juvenil:

1 gr de suelo ----------> 20 huevo y/o juvenil (Franco y Scurra, 1985).

X ----------> 378 huevo y/o juvenil/quiste

X = 19 gr de suelo/quiste

- Se calculó el número de quiste para 500gr de suelo:

19 gr de suelo ----------> 1 quiste

500gr de suelo ----------> X

X = 26 quistes/500gr de suelo

El resultado de los cálculos, determino que se utilizara 26 quistes para 500gr de suelo.

3.2.3. Resistencia a Nematodo

Tabla 3.2. Categorías de resistencia al nematodo (*Globodera spp*.) de 49 accesiones de papa nativa (*Solanum spp.*) Campanayocc, 3379 msnm – Ayacucho

Accesión	Número de quistes Y1	Tasa de multiplicación Y2	Categoría de resistencia
26	0.8	0.02	resistente
20	1	0.03	resistente
10	1.3	0.04	resistente
16	2	0.06	resistente
47	2	0.06	resistente
30	2.3	0.07	resistente
37	2.3	0.07	resistente
40	2.3	0.07	resistente
7	3	0.09	resistente
18	3.3	0.09	resistente
39	3.3	0.09	resistente
19	3.5	0.1	resistente
28	3.8	0.11	resistente
22	3.8	0.11	resistente
48	4	0.12	resistente
5	4.5	0.13	resistente
29	4.5	0.13	resistente
35	4.5	0.13	resistente
46	4.8	0.14	resistente
14	5	0.15	resistente
31	5	0.15	resistente
36	5	0.15	resistente
42	5.3	0.15	resistente
3	6	0.17	resistente
34	6	0.17	resistente
44	6.3	0.18	resistente
21	6.5	0.19	resistente

21	6.5	0.19	resistente
41	6.5	0.19	resistente
17	7	0.2	resistente
1	7.8	0.23	resistente
45	7.8	0.23	resistente
13	8	0.23	resistente
43	8	0.23	resistente
9	8.3	0.24	resistente
32	8.3	0.24	resistente
4	8.8	0.25	resistente
24	8.8	0.25	resistente
6	9.5	0.28	resistente
25	9.5	0.28	resistente
11	9.5	0.28	resistente
38	9.8	0.28	resistente
33	10	0.29	resistente
8	10.3	0.3	resistente
15	11.5	0.33	resistente
12	13.5	0.39	resistente
2	15	0.44	resistente
27	19.8	0.57	tolerante
23	21.8	0.63	tolerante
49	22.3	0.65	tolerante

Los tratamientos 27, 23 y 49 resultaron como tolerante.

Franco et al. (1985) manifiesta que es la capacidad de una planta de papa para producir, encontrarse en un suelo infestado por nematodos, ya que tiene la particularidad de recuperarse del daño que causa estos. Es un mecanismo de acción que reduce la cantidad de daño o síntomas por la unidad de parásitos presentes.

Del mismo modo los demás tratamientos resultaron como resistentes.

Franco et al. (1985) menciona que es la capacidad de una planta de papa de impedir en forma total o parcial la multiplicación del nematodo y así reducir la infestación del campo.

Mejía, M. et al. (2013) evaluó 24 accesiones de papa (nativas, comerciales y clones promisorios) al parasitismo de *Globodera pallida* en Pichincha – Quito, resultando ser resistentes las variedades nativas Mula Chaqui, Huagrasinga, Tandapapa, Roja acha, Corazón lila, del género (*Solanum tuberosum ssp*. andigena), Ratona – Lagartija del género (*Solanum phureja*), las variedades comerciales I – Fripapa, I – Gabriela (del cruzamiento *S. tuberosum* x *S. andigena*), I – Natividad [del cruzamiento (*S. tuberosum x S. andigena) x (S. phureja x S. pausissectum)], Súper Chola (S. andigena),* INIAP – Cecilia (del cruzamiento *S. vertifolium x S. andigena*) y los clones promisorios 99 – 18 – 9, 05 – 24 – 3, 08 – 20 – 19 (Posible cruce *S. tuberosum x S. andigena*). También evaluó tolerancia y tuvo como resultado las variedades nativas Uva, Huagrasinga, Leona negra del norte, Tandapapa, Roja acha, Corazón lila, Cuchiisma del género (*Solanum tuberosum ssp. andigena*), Ratona – Lagartija, Sta. Rosa Blanca, Sta. Rosa Amarilla del género (*Solanum phureja*), las variedades comerciales I – Fripapa (del cruzamiento S. *tuberosum x S. andigena*), I – Natividad [del cruzamiento (*S. tuberosum x S. andigena*) x (*S. phureja x S. pausissectum)],* Súper Chola (*S. andigena*), I – Cecilia (del cruzamiento *S. vertifolium x S. andigena*), I – Pan (Posible *cruce S. tuberosum x S. andigena*), I – Suprema (del cruzamiento *S. acaule x S. bulbocastanum*), y los clones promisorios 98 – 2 – 6 [del cruzamiento (*S. tuberosum x S. andigena) x S. andigena]*, 05 – 24 – 3, 05 – 28 – 3, 06 – 92 – 1, 08 – 20 – 19 (Posible cruce *S. tuberosum x S. andigena*). Concluyendo que el 46 % de las accesiones de papa evaluadas resultaron Resistentes Tolerantes, el 41 % resultaron Susceptibles Tolerantes, el 13% resultaron Resistentes No tolerantes y 0% Susceptibles no tolerantes. Comparando con nuestros resultados de las 49 accesiones de papa nativa se obtuvo un 94% con resistencia y 6% con tolerancia.

Milla et al. (2004), Realizo una investigación para detectar accesiones de papa (*Solanum tuberosum L.*) resistentes al nematodo dorado (*Globodera rostochiensis Woll*), utilizando 49 clones y dihaploides correspondientes a tres orígenes diferentes.

Encontrando que el 18% presentó un comportamiento de resistente. El 62% resultó parcialmente resistente y el 20% restante presentó moderada susceptibilidad.

Franco et al. (1990) menciona que las variedades nativas de papa por la diversidad y la persistencia en el tiempo podrían ser fuentes de genes de resistencia a *Globodera pallida.*

a. Número de quistes de nematodo

Tabla 3.3. Análisis de variancia del número de quistes de nematodo (*Globodera spp.)* (raíz cuadrada del número de quistes + 1.5) en 49 accesiones de papa nativa (*Solanum spp.)* Campanayocc, 3379 msnm – Ayacucho

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F-Valor	Pr > F
Bloque	1	0.217	0.217	0.27	0.6079 ns
Accesiones	48	53.768	1.120	1.38	0.1353 ns
Error	48	39.031	0.813		
Total	97	93.016			

CV (%) 32.83

Promedio 6.99 (sin transformar)

En la tabla 3.3**.** Se observa los Cuadrados Medios del ANVA de 49 accesiones de Papa nativa (*Solanum spp.).* En el parámetro de número de quistes. No hay diferencia significativa por que poseen la misma cantidad de quiste. Además, no se justifica el ajuste de los promedios por el diseño látice simple tomando en cuenta que las fuentes del componente B es menor a la fuente del error, entonces el experimento puede ser analizado en el DBCR.

El coeficiente de variación (C.V.) es 32.83% (número de quiste) lo cual indica que los datos tomados son aceptables. Estos valores nos permiten tener una buena confianza en los resultados obtenidos.

Tabla 3.4. Prueba de Tukey (0.05) del número de quistes de nematodo (*Globodera spp.*) en 49 accesiones de papa nativa (*Solanum spp.)* Campanayocc, 3379 msnm – Ayacucho

Accesiones	n	Media Y1	Media raíz (Y1+1.5)	Tukey
23	2	21.75	4.813	a
49	2	22.25	4.532	a
27	2	19.75	4.351	a
2	2	15	4.014	a
12	2	13.5	3.828	a
15	2	11.5	3.572	a
38	2	9.75	3.349	a
8	2	10.25	3.336	a
11	2	9.5	3.316	a
25	2	9.5	3.259	a
4	2	8.75	3.19	a
24	2	8.75	3.16	a
32	2	8.25	3.122	a
33	2	10	3.102	a
6	2	9.5	3.086	a
9	2	8.25	3.078	a
43	2	8	3.043	a
45	2	7.75	3.041	a
1	2	7.75	3.041	a
13	2	8	2.965	a
17	2	7	2.883	a
41	2	6.5	2.823	a
44	2	6.25	2.775	a
34	2	6	2.739	a
21	2	6.5	2.628	a

31	2	5	2.548	a
36	2	5	2.542	a
14	2	5	2.5	a
42	2	5.25	2.486	a
46	2	4.75	2.458	a
3	2	6	2.45	a
35	2	4.5	2.447	a
5	2	4.5	2.414	a
29	2	4.5	2.366	a
28	2	3.75	2.275	a
22	2	3.75	2.258	a
48	2	4	2.154	a
39	2	3.25	2.141	a
7	2	3	2.121	a
18	2	3.25	2.076	a
19	2	3.5	2.07	a
30	2	2.25	1.935	a
40	2	2.25	1.935	a
37	2	2.25	1.927	a
16	2	2	1.871	a
47	2	2	1.866	a
10	2	1.25	1.657	a
20	2	1	1.581	a
26	2	0.75	1.478	a

Riera (2008) evaluó la resistencia y/o tolerancia de 24 variedades de papa nativas al parasito (*Globodera pallida)* en un invernadero de Cutuglahua, Pichincha - Quito. Inoculando con 20 quistes (población inicial), obtuvo como resultado que las variedades chaucha amarilla, coneja blanca, violeta, poluya, milagrosa, coneja negra, presentan los incrementos bajos (2.64, 3.88, 5.02, 5.07, 5.20, 5.32 quistes /maceta), al contrario de los mayores incrementos observados en las variedades leona negra del

norte, chaucha colorada, uvilla, puca huairo, carrizo cotopaxi y gabriela (37.52, 26.25, 22.67, 20.88, 19.26, 18.07 quistes/maceta respectivamente). Menciona también que las variedades de papa nativa tienen un gran potencial genético con niveles de tolerancia al parasito del nematodo del quiste de la papa (*Globodera pallida*) y que el ensayo se realizó en condiciones climáticas controladas las cuales fueron favorables para el desarrollo del nematodo. En el trabajo realizado en la Comunidad de Campanayocc, se encontró valores bajos comprendidos entre 0.02 quistes/maceta hasta 0.44 quistes/maceta y valores altos comprendidos en los valores de 0.57 quistes/maceta hasta 0.65 quistes /maceta. El experimento estuvo ubicado a 3379 m.s.n.m. donde las condiciones climáticas fueron favorables tanto para el nematodo *Globodera sp.* y para la papa nativa.

b. Tasa de Multiplicación de nematodo *(Globodera spp.)*

Tabla 3.5. Análisis de variancia de la tasa de multiplicación de nematodo *(Globodera spp.)* (raíz cuadrada de la tasa de multiplicación + 0.5) en 49 accesiones de papa nativa (*Solanum* spp.) Campanayocc, 3379 msnm – Ayacucho

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F-Valor	Pr > F
Bloque	1	0.0016	0.0016	0.18	0.6742 ns
Accesiones	48	0.5808	0.0121	1.33	0.1645ns
Error	48	0.4374	0.0091		
Total	97	1.0198			

CV (%) 11.47

Promedio 0.20 (sin transformar)

En el Tabla 3.5. se observa los Cuadrados Medios del ANVA de 49 accesiones de Papa nativa (*Solanum spp.).* Para el parámetro de tasa de multiplicación de nematodo. No hay diferencia significativa por que poseen la misma cantidad de quiste. Además, no se justifica el ajuste de los promedios por el diseño látice simple tomando en cuenta que las fuentes del componente B es menor a la fuente del error, entonces el experimento puede ser analizado con el DBCR.

Los coeficientes de variación (C.V.) es 11.47% (número de quiste) lo cual indica que los datos tomados son aceptables. Estos valores nos permiten tener una buena confianza en los resultados obtenidos.

Tabla 3.6. Prueba de Tukey (0.05) de la tasa de multiplicación de quistes de nematodo (*Globodera spp.)* en 49 accesiones de papa nativa (*Solanum* spp.) Campanayocc, 3379 msnm – Ayacucho.

Accesiones	**n**	**Media Y2**	**Media raíz(Y2+0.5)**	**Tukey**
23	2	0.63	1.0629	a
49	2	0.65	1.0469	a
27	2	0.57	1.0191	a
2	2	0.44	0.9646	a
12	2	0.39	0.9422	a
15	2	0.33	0.9117	a
8	2	0.3	0.8892	a
38	2	0.28	0.8849	a
11	2	0.28	0.881	a
25	2	0.28	0.8785	a
33	2	0.29	0.878	a
6	2	0.28	0.8721	a
4	2	0.25	0.8681	a
24	2	0.25	0.8669	a
32	2	0.24	0.8602	a
9	2	0.24	0.8584	a
43	2	0.23	0.8544	a
13	2	0.23	0.8517	a
1	2	0.23	0.8517	a
45	2	0.23	0.8517	a
17	2	0.2	0.8376	a
41	2	0.19	0.8299	a

44	2	0.18	0.8254	a
21	2	0.19	0.8244	a
34	2	0.17	0.8213	a
3	2	0.17	0.8142	a
42	2	0.15	0.805	a
31	2	0.15	0.8033	a
36	2	0.15	0.8032	a
14	2	0.15	0.8021	a
46	2	0.14	0.7978	a
35	2	0.13	0.7942	a
5	2	0.13	0.7934	a
29	2	0.13	0.7923	a
48	2	0.12	0.7815	a
28	2	0.11	0.7801	a
22	2	0.11	0.7797	a
19	2	0.1	0.7729	a
39	2	0.09	0.7703	a
18	2	0.09	0.7693	a
7	2	0.09	0.7663	a
30	2	0.07	0.7519	a
40	2	0.07	0.7519	a
37	2	0.07	0.7518	a
16	2	0.06	0.7471	a
47	2	0.06	0.747	a
10	2	0.04	0.7323	a
20	2	0.03	0.7274	a
26	2	0.02	0.7222	a

Todos los tratamientos evaluados para la tasa de multiplicación son estadísticamente similares. No se encontró variación entre los tratamientos, pudiendo asociar este

resultado a la resistencia que se encontró en 96% y la tolerancia en 4% de las accesiones de papa nativo mostrado en el cuadro 8.

Franco et al, (1990) menciona que los mecanismos de resistencia se explican de dos maneras. Una es que las raíces pueden no estimular la emergencia del segundo estado juvenil, es decir, pueden reducir la emergencia. Y la otra que se restringe el desarrollo de los sincitos (o células de transferencia) de los cuales toman las hembras su alimento. Esta restricción no evita que emerjan los nematodos en su segundo estado juvenil, ni que invadan las raíces y causen daños. Pero la restricción de alimentos rompe el ciclo de vida y los estados juveniles mueren o se desarrollan como machos. Esto conduce a una disminución más rápida de la población de nematodos y es más efectivo que la reducción de la emergencia. Estas mismas causas pudieron haber ocurrido con la población inicial de nematodos depositadas en las macetas al momento de la inoculación (26 quistes), el cual los resultados fueron reportados en la tabla 3.2.

Riera (2008) evaluó la resistencia y/o tolerancia de 24 variedades de papas nativas al parasito (*Globodera pallida)* en un invernadero de Cutuglahua, Pichincha - Quito. Realizo la prueba de Tukey al 5%, determinando 14 rangos de significación estadística, en donde 12 variedades presentaron incrementos superiores al promedio (13.39), el mejor incremento lo produjo la variedad leona negra del norte con un incremento promedio de 37.52 ubicada en el primer rango, los menores incrementos promedio fue de la variedad chaucha amarilla con un incremento de 2.64 ubicada en el último rango, concluyendo que la variedad leona negra del norte es la más susceptible y la variedad chaucha amarilla es la menos susceptible. Para la investigación realizada en la comunidad de Campanayocc en la prueba de tukey al 5% determinando 49 rangos de significación estadística, en donde todos presentaron incrementos superiores al promedio (0.20), el mejor incremento lo produjo la accesión P67 con (1.0629) ubicada en el primer rango, el menor incremento fue la accesión soyo caputo con (0.7222) ubicada en el último rango.

3.3. IDENTIFICACION DE LA ESPECIE DE *Globodera spp.*

3.3.1. Extracción de ADN de Nematodo

Se realizó la estandarización de la extracción de ADN utilizando el protocolo del método CTAB, variando en una cantidad de 20 a 100 quistes.

Se realizaron 3 repeticiones para cada muestra, procedentes de tres regiones: Región de Ayacucho (Manallasac, Chontaca y Seccelambras), Región Apurímac (Anadhuaylas) y Región Junín (Huancayo).

La calidad e integridad se observaron a través de electroforesis en el gel de agarosa al 1%, mientras que la cantidad se mide en el biofotometro.

Tabla 3.7. Datos obtenidos en el biofotometro

Muestra		**ng/ul**	**A26/280**
Código	**Procedencia**		
M1	Manallasac	181.1	1.79
M2	Manallasac	111.9	1.89
M3	Manallasac	111.7	1.69
J1	Huancayo	144.7	1.75
J2	Huancayo	84.1	1.59
J3	Huancayo	88.9	1.64
S1	Seccelambras	42.7	2.92
S2	Seccelambras	290.0	2.09
S3	Seccelambras	450.4	1.98
Ch1	Chontaca	431.7	2.03
Ch2	Chontaca	253.4	2.05
Ch3	Chontaca	459.4	2.03
A1	Andahuaylas	424.6	1.84
A2	Andahuaylas	232.2	1.69
A3	Andahuaylas	193.0	1.62

García (2006) realizo su trabajo de investigación identificando especie de nematodo Fito patógenos de genero *Globodera spp.* por medio de dos técnicas moleculares, el método que utilizo para la extracción de DNA de nematodo fue CTAB, donde utilizo de entre 1 a 100 quistes por extracción de ADN.

La calidad podemos observar en la tabla 3.7 y la integridad se observa en la figura 3.1. El cual reportaron que las muestras extraídas son muy buenas en todas las repeticiones a excepción de S1 (muestra de Seccelambras).

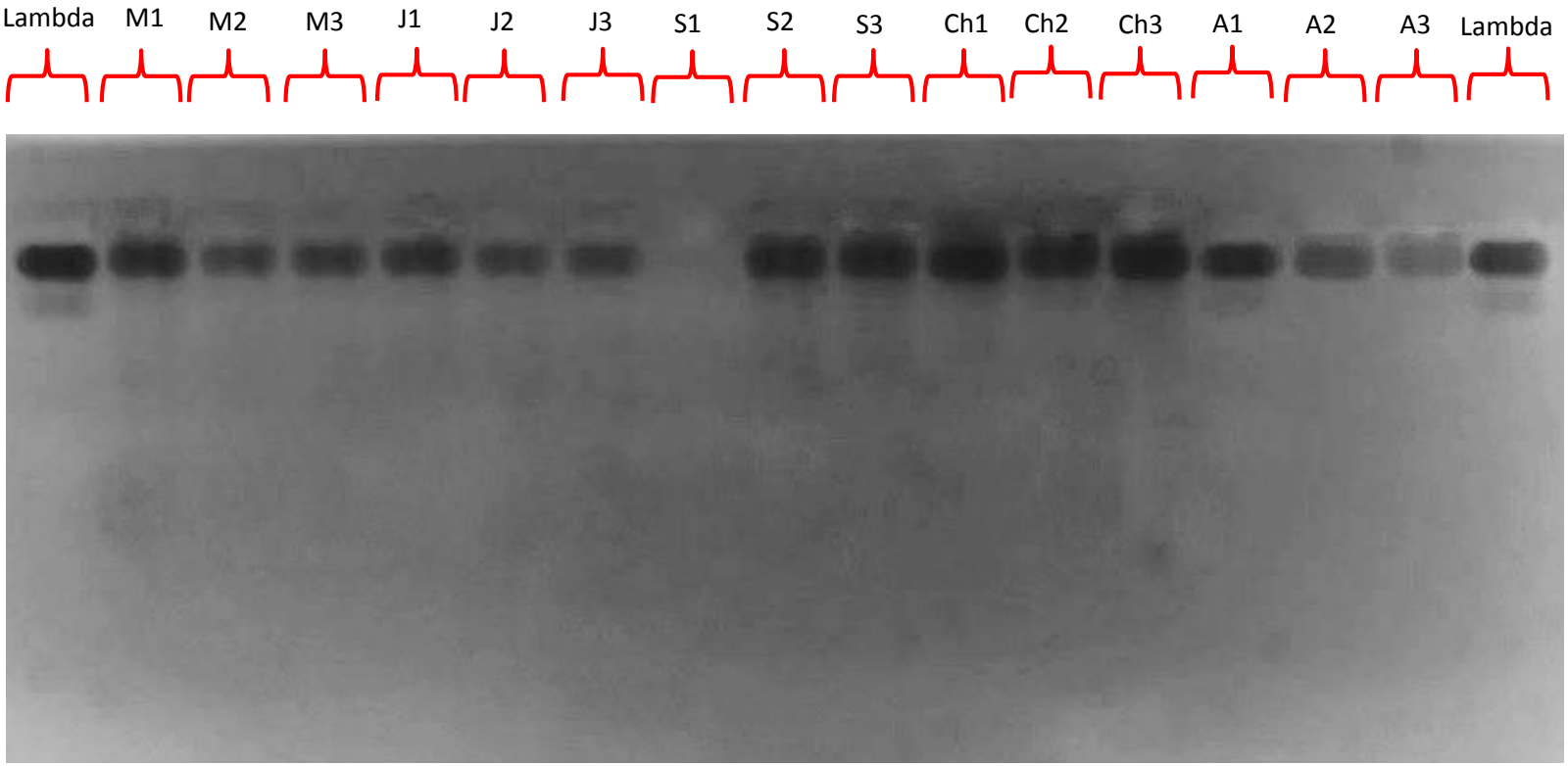


Figura 3.1. Extracción de DNA nematodo, 1% de agarosa, 90v, por 80min

3.2.2. PCR con Primer

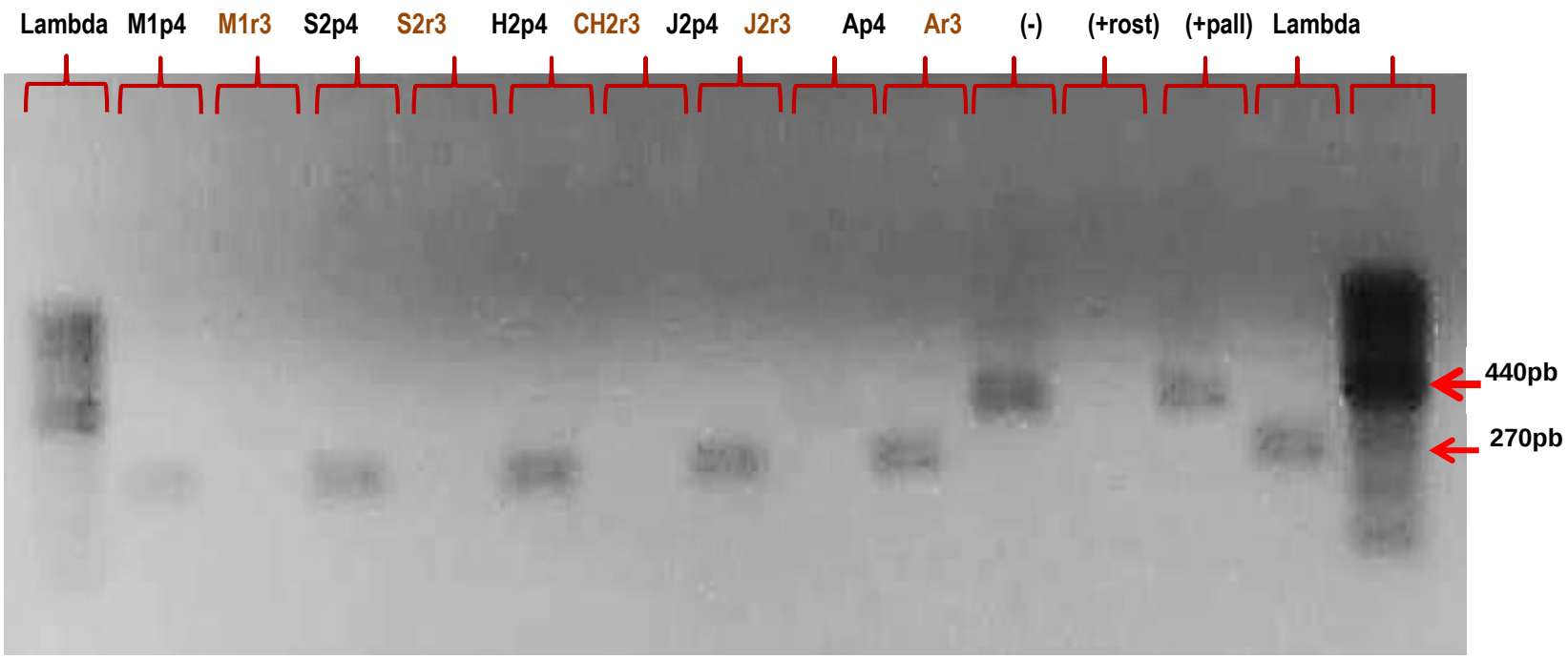


Figura 3.2. Identificación molecular mediante PCR de las poblaciones de *Globodera spp* utilizando primer ITS5, PITSp4 y PITSr3. Corrido con 90 v por 1hora y 30 minutos.

Se encontró amplificación para cada muestra analizada y también se observa la amplificación de bandas correspondientes al control positivo (*Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis*) y negativo (sin ADN).

En la diferenciación entre *Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis* de las muestras de nematodos procedentes de tres regiones Ayacucho, Junín y Apurímac. Los códigos M1p4, S2p4, Ch2p4, J2p4, Ap4 amplifico con el primer para *Globodera pallida*, de aproximadamente 270 pb. La especie *Globodera rostochiensis* presentó una sola banda de aproximadamente 440 pb con el código Ar3.

García (2006) realizo la identificando especie de nematodo *Globodera spp.* donde realizo PCR utilizando imprimadores PITSr3, PITSp4 e ITS5, el cual observó la amplificación de todas las muestras, excepto de aquellas en las cuales la extracción de ADN no fue exitosa. Utilizaron marcador de 50pb, con sus respectivos controles positivos y negativos. En el cual obtuvieron amplificaciones con PCR Simple logrando identificar muestras locales de *Globodera rostochiensis y Globodera pallida.*

Bulman et al. (1997) citado por García (2006) en su investigación menciona que utilizó imprimadores específicos PITSp4 (5'-ACAACAGCAATCGTCGAG-3') y PITSr3 (5'-AGCGCAGACATGCCGCAA-3') en combinación con el imprimador universal ITS5 (5’-GGAAGTAAAA GTCGTAACAAGG-3’). Encontrando diferencias en G. *pallida* con la banda de 265 pb y para *G. rostochiensis* el resultando en una banda de 434 pb.

En la XX Reunión anual del grupo de trabajo de laboratorios de Diagnóstico y prospecciones fitosanitarias. Pontevedra-España 2004. Publicaron que para la identificación mediante PCR de *Globodera spp.* se siguió el método descrito por Bulman y Marshall.

CONCLUSIONES

1. De las 49 accesiones de papa nativa *Solanum spp*. resultaron tolerantes a *Globodera spp.* marquina, P67 y P 68 en un 6%; mientras que el 94% resultaron resistentes al nematodo *Globodera spp*. entre ellos huencco, puca runtus, victor,maco, yanacuchioa runtun, P63, alcarraza, P62, yuraq millcco, ucca huayro, azul ñahui, yuraq suyto, P61, leona añil, tambina, yana rosilla, puca ñahui, yutupa runtun, P73, capcas, duraznilla, P65, yuraq chikñas, chiquibonita, soyo caputo, camotillo, limeña, pucavacapa chuñun, amarilla, yuraq sisa, P70, royacc halle, ritipa sisan, puca suyto, yana huaña, peruanita, negra, huayro hembra, allcca cambro, huayro, cuchipa acan, cceccorani, runtus, durasnillo2, muru suyto y sangre de toro.
2. En la identificación molecular por PCR, las muestras tomadas de la Región Ayacucho (Manallasac, Chontaca y Seccelambras) pertenecen a la especie de *Globodera Pallida,* la muestra tomada de Junín (Huancayo) pertenecen a la especie de *Globodera Pallida* y la muestra tomada de Apurimac (Andahuaylas) tuvo como resultado pertenecer a la especie *Globodera Pallida y Globodera rotochiensis*.

RECOMENDACIONES

1. Promover investigaciones con nematodo *Globodera spp.* Utilizando el germoplasma de papa nativa (*Solanum spp.)* de otras comunidades de la región de Ayacucho, ya que debido a los resultados es probable que existan accesiones de papas nativas con alta resistencia al nematodo y ser candidatas para trabajos de mejoramiento genético.
2. Georreferenciar los lugares de muestreo, con el fin de identificar lugares con alta población de quistes, que podría servir como cantera para trabajos de investigación.
3. Para mejorar la extracción de ADN de los nematodos se recomienda evaluar otros protocolos de extracción e incluir proteinasa K.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Agrios G. (2004). Plant pathology. 5th edition. Elsevier Academic Press, Nueva York. 102-150p.
2. Ames T. (1980). Compendio de enfermedades de la papa. Lima: Centro Internacional de la Papa. 4-130 p.
3. Bates J.; Taylor, E.; Gans, P. y Thomas, J. (2002). Determination of relative proportions of Globodera species in mixed populations of potato cyst nematodes using PCR product melting peak analysis. Molecular Plant Pathology. Cambridge, United Kingdom. 153–161p.
4. Canto M. y González A. (1993). Uso de gasolina para la separación de quistes de *Globodera pallida* y materia orgánica en muestras extraídas de suelo. Lima, Perú. 57-58p
5. CIP-Centro internacional de la papa (1986). Nematodos del Quiste de la Papa (*Globodera spp.*) Lima, Perú. 12-14p.
6. Delgado R. y Jatala P. (1991). Identificación de razas del nematodo quiste de la papa (*Globdera spp.*) en el departamento de Cusco, Perú. 217-221p.
7. Devran Z.; Gozel U.; Sogut M.; Yildiz S.; Elekcioglu I. (2002). Identification of Root-Knot Nematodes in the Mediterranean Region of Turkey by Using rDNA and mtDNA Markers. Turk J Agric For. Citrus and Greenhouse Crops Research Institute. Antalya, Turkey. 26: 337 – 341p.
8. EPPO-European And Mediterranean Plant Protection Organization (2004). Diagnostic protocols for regulated pests. EPPO Bulletin. Paris, France.
9. Franco J. Gonzales, A. y Matos A. (1990). Evaluación de Resistencia de la Papa al Nematodo del Quiste *Globodera pallida.* 15-20p.
10. Franco J. y Scurrah M. (1985). Evaluación de clones del CIP mejorados por resistencia al nematodo quiste de la papa (*Globodera pallida*).25-30p.
11. Franco J. (1986). Nematodo quiste de la papa *Globodera spp.* Boletín de información técnica 9, Lima-Perú. 10-12p
12. García A. (2006). Identificación de Especie de Nematodo Fitopatógenos de los géneros *Globodera spp. Y Meloidoyne spp.* Por medio de dos técnicas moleculares, Cartago, Costa Rica. 6-18p

13. García D. (2009). Morphological and molecular identificacion of potato cyst – forming nematode *Globodera pallida* in soil samples from Costa Rica. Revista Latinoamericana de la Papa. 38-45p.
14. Gutierrez G. (2013). Caracterización morfológica, evaluación agronómica y ploidia de 60 colecciones de papa nativa (*Solanum* spp), en Marcaya a 3660 m.s.n.m., los Morochucos – Cangallo. 04-13p.
15. Jobes D. y Thien L. (1997). A Conserved Motif in the 5.8S Ribosomal RNA (rRNA) Gene is a Useful Diagnostic Marker for Plant Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequences. Plant Molecular Biology Reporter. Tulane University, Department of Cell and Molecular Biology. New Orleans, USA. 15: 326 – 334p.
16. Laura J. (2013). Distribución y Nivel de Infestación del Nematodo Quiste de La Papa (*Globodera spp.*), En Tres Comunidades De La Provincia De Andahuaylas - *2900 m.s.n.m.* Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. 7-18p.
17. Madriz, k et al. (2005). Manual de laboratorio biología molecular. Escuela de biología, Laboratorio de biología molecular. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 49 p
18. Mansilla J.; Abelleira A.; Pintos C.; Aguín O.; Pérez R.; Loureiro B.; Montenegro. (2004). Método de extracción de ADN en nematodos para su aplicación en el diagnostico por técnicas moleculares. XX Reunión anual del grupo de trabajos de laboratorios de Diagnóstico y prospecciones fitosanitarias-Pontevedra – España.
19. Mejía M. et al. (2013). Comportamiento de 24 accesiones de papa (nativas, comerciales y clones promisorios) al parasitismo del nematodo del quiste de la papa (G*loboder pallida*) en invernadero. Cutuglagua-Pichincha.23-25p
20. Milla A. y Krausz C. (2004). Detección de resistencia al nematodo dorado (*Globodera rostochiensis woll)* en accesiones pertenecientes al germoplasma chileno de papa (*Solanum tuberosum L.).* Pag. 28-34.
21. Power T. (2004). Nematode Molecular Diagnostics: From Bands To Barcodes. Annual Reviews Phytopathology. Department of Plant Pathology, University of Nebraska. Lincoln, Nebraska, USA. 42: 367 – 83p.
22. Riera W. (2008). Evaluación de la resistencia y/o tolerancia de variedades de papas nativas al parasitismo del nematodo del quiste de la papa (*Globodera*

pallida) en invernadero. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP. Universidad Politécnica Salesiana UPS ed. Cutuglagua – Ecuador.10-25p.

23. Scurrah M. (2008). Manual de Manejo de Nematodos en campos de papa en el Perú. SENASA. Lima – Perú. 12 – 37p.
24. Torres T. 2015, Colecta, Caracterización Fenotípica, Productividad de Papas Nativas *(Solanum tuberosum ssp andígena Juz. et Buk.)* de Zonas Andinas En El Centro Del País. 3 p.
25. UPOV-Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales, Gi. (2009). Introducción General al Examen de la Distinción, la Homogeneidad y la Estabilidad (DHE) y a la elaboración de descripciones armonizadas de las Obtenciones Vegetales.20-30p
26. Vejl P.; Skupinová S.; Sedlák P. y Domkářová J. (2002). Identification of PCN species (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*) by using of ITS-1 region's polymorphism. Czech University of Agriculture in Prague, Czech Republic.4-15p.

ANEXOS

ANEXO 1.

Número y tasa d multiplicación de quistes de nematodo *(Globodera spp.)* en 49 accesiones de papa nativa *(Solanum spp.)* en el Diseño Latice Simple 7*7 Campanayocc 3379 m.s.n.m. Ayacucho.

Obs	Bloque B	Bloque incompleto I	Accesión A	Número de quistes Y1	Tasa de multiplicación Y2	Raiz(Y1+1.5) X1	Raiz(Y2+0.5) X2
1	1	1	1	7.5	0.22	3.000	0.847
2	1	1	2	10.0	0.29	3.391	0.889
3	1	1	3	12.0	0.35	3.674	0.921
4	1	1	4	10.5	0.31	3.464	0.897
5	1	1	5	2.5	0.07	2.000	0.757
6	1	1	6	2.0	0.06	1.871	0.747
7	1	1	7	3.0	0.09	2.121	0.766
8	1	2	8	15.5	0.45	4.123	0.975
9	1	2	9	5.0	0.15	2.550	0.803
10	1	2	10	1.0	0.03	1.581	0.727
11	1	2	11	9.0	0.26	3.240	0.873
12	1	2	12	18.0	0.52	4.416	1.012
13	1	2	13	13.0	0.38	3.808	0.937
14	1	2	14	7.5	0.22	3.000	0.847
15	1	3	15	15.0	0.44	4.062	0.968
16	1	3	16	2.0	0.06	1.871	0.747
17	1	3	17	9.5	0.28	3.317	0.881
18	1	3	18	6.0	0.17	2.739	0.821
19	1	3	19	0.0	0.00	1.225	0.707
20	1	3	20	1.0	0.03	1.581	0.727
21	1	3	21	12.0	0.35	3.674	0.921
22	1	4	22	2.0	0.06	1.871	0.747
23	1	4	23	24.5	0.71	5.099	1.101
24	1	4	24	5.5	0.16	2.646	0.812
25	1	4	25	13.5	0.39	3.873	0.945
26	1	4	26	1.5	0.04	1.732	0.737
27	1	4	27	33.0	0.96	5.874	1.208
28	1	4	28	5.0	0.15	2.550	0.803
29	1	5	29	1.5	0.04	1.732	0.737
30	1	5	30	2.0	0.06	1.871	0.747
31	1	5	31	5.5	0.16	2.646	0.812
32	1	5	32	8.0	0.23	3.082	0.856
33	1	5	33	1.5	0.04	1.732	0.737
34	1	5	34	6.0	0.17	2.739	0.821
35	1	5	35	4.0	0.12	2.345	0.785
36	1	6	36	6.0	0.17	2.739	0.821
37	1	6	37	1.5	0.04	1.732	0.737
38	1	6	38	8.5	0.25	3.162	0.864
39	1	6	39	1.5	0.04	1.732	0.737
40	1	6	40	2.0	0.06	1.871	0.747
41	1	6	41	5.5	0.16	2.646	0.812
42	1	6	42	9.0	0.26	3.240	0.873
43	1	7	43	5.0	0.15	2.550	0.803
44	1	7	44	7.5	0.22	3.000	0.847
45	1	7	45	7.5	0.22	3.000	0.847
46	1	7	46	7.0	0.20	2.915	0.839
47	1	7	47	2.5	0.07	2.000	0.757
48	1	7	48	8.0	0.23	3.082	0.856
49	1	7	49	6.0	0.17	2.739	0.821

Obs	Bloque B	Bloque incompleto I	Accesión A	Número de quistes Y1	Tasa de multiplicación Y2	Raiz(Y1+1.5) X1	Raiz(Y2+0.5) X2
50	2	1	1	8.0	0.23	3.082	0.856
51	2	1	8	5.0	0.15	2.550	0.803
52	2	1	15	8.0	0.23	3.082	0.856
53	2	1	22	5.5	0.16	2.646	0.812
54	2	1	29	7.5	0.22	3.000	0.847
55	2	1	36	4.0	0.12	2.345	0.785
56	2	1	43	11.0	0.32	3.536	0.905
57	2	2	2	20.0	0.58	4.637	1.040
58	2	2	9	11.5	0.33	3.606	0.913
59	2	2	16	2.0	0.06	1.871	0.747
60	2	2	23	19.0	0.55	4.528	1.025
61	2	2	30	2.5	0.07	2.000	0.757
62	2	2	37	3.0	0.09	2.121	0.766
63	2	2	44	5.0	0.15	2.550	0.803
64	2	3	3	0.0	0.00	1.225	0.707
65	2	3	10	1.5	0.04	1.732	0.737
66	2	3	17	4.5	0.13	2.449	0.794
67	2	3	24	12.0	0.35	3.674	0.921
68	2	3	31	4.5	0.13	2.449	0.794
69	2	3	38	11.0	0.32	3.536	0.905
70	2	3	45	8.0	0.23	3.082	0.856
71	2	4	4	7.0	0.20	2.915	0.839
72	2	4	11	10.0	0.29	3.391	0.889
73	2	4	18	0.5	0.01	1.414	0.717
74	2	4	25	5.5	0.16	2.646	0.812
75	2	4	32	8.5	0.25	3.162	0.864
76	2	4	39	5.0	0.15	2.550	0.803
77	2	4	46	2.5	0.07	2.000	0.757
78	2	5	5	6.5	0.19	2.828	0.830
79	2	5	12	9.0	0.26	3.240	0.873
80	2	5	19	7.0	0.20	2.915	0.839
81	2	5	26	0.0	0.00	1.225	0.707
82	2	5	33	18.5	0.54	4.472	1.019
83	2	5	40	2.5	0.07	2.000	0.757
84	2	5	47	1.5	0.04	1.732	0.737
85	2	6	6	17.0	0.49	4.301	0.997
86	2	6	13	3.0	0.09	2.121	0.766
87	2	6	20	1.0	0.03	1.581	0.727
88	2	6	27	6.5	0.19	2.828	0.830
89	2	6	34	6.0	0.17	2.739	0.821
90	2	6	41	7.5	0.22	3.000	0.847
91	2	6	48	0.0	0.00	1.225	0.707
92	2	7	7	3.0	0.09	2.121	0.766
93	2	7	14	2.5	0.07	2.000	0.757
94	2	7	21	1.0	0.03	1.581	0.727
95	2	7	28	2.5	0.07	2.000	0.757
96	2	7	35	5.0	0.15	2.550	0.803
97	2	7	42	1.5	0.04	1.732	0.737
98	2	7	49	38.5	1.12	6.325	1.273

ANEXO 2.

Análisis de variancia del número de quistes de nematodo (*Globodera spp*.) (raíz cuadrada del número de quistes + 1.5) en 49 accesiones de papa nativa (*Solanum spp*.), en Látice Simple 7*7. Campanayocc, 3379 msnm – Ayacucho.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios
Bloques	1	0.217	0.217
Bloques incompletos (eliminando tratamientos)	12	7.543	0.629
Componente B	12	7.543	0.629
Accesiones (Ignorando bloques incompletos)	48	53.768	1.120
Error (Intrabloque bloque incompleto)	36	31.488	0.875
Error de bloque completo randomizado	48	39.031	0.813
Total	97	93.016	0.959

ANEXO 3.

Análisis de variancia de la tasa de multiplicación de nematodo (*Globodera spp*.) (raíz cuadrada de la tasa de multiplicación + 0.5) en 49 accesiones de papa nativa (*Solanum spp*.) en Látice Simple 7*7. Campanayocc, 3379 msnm - Ayacucho

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios
Bloques	1	0.0016	0.0016
Bloques incompletos (eliminando tratamientos)	12	0.0870	0.0073
Componente B	12	0.0870	0.0073
Accesiones (Ignorando bloques incompletos)	48	0.5808	0.0121
Error (Intrabloque bloque incompleto)	36	0.3504	0.0097
Error de bloque completo randomizado	48	0.4374	0.0091
Total	97	1.0198	0.0105

ANEXO 4.

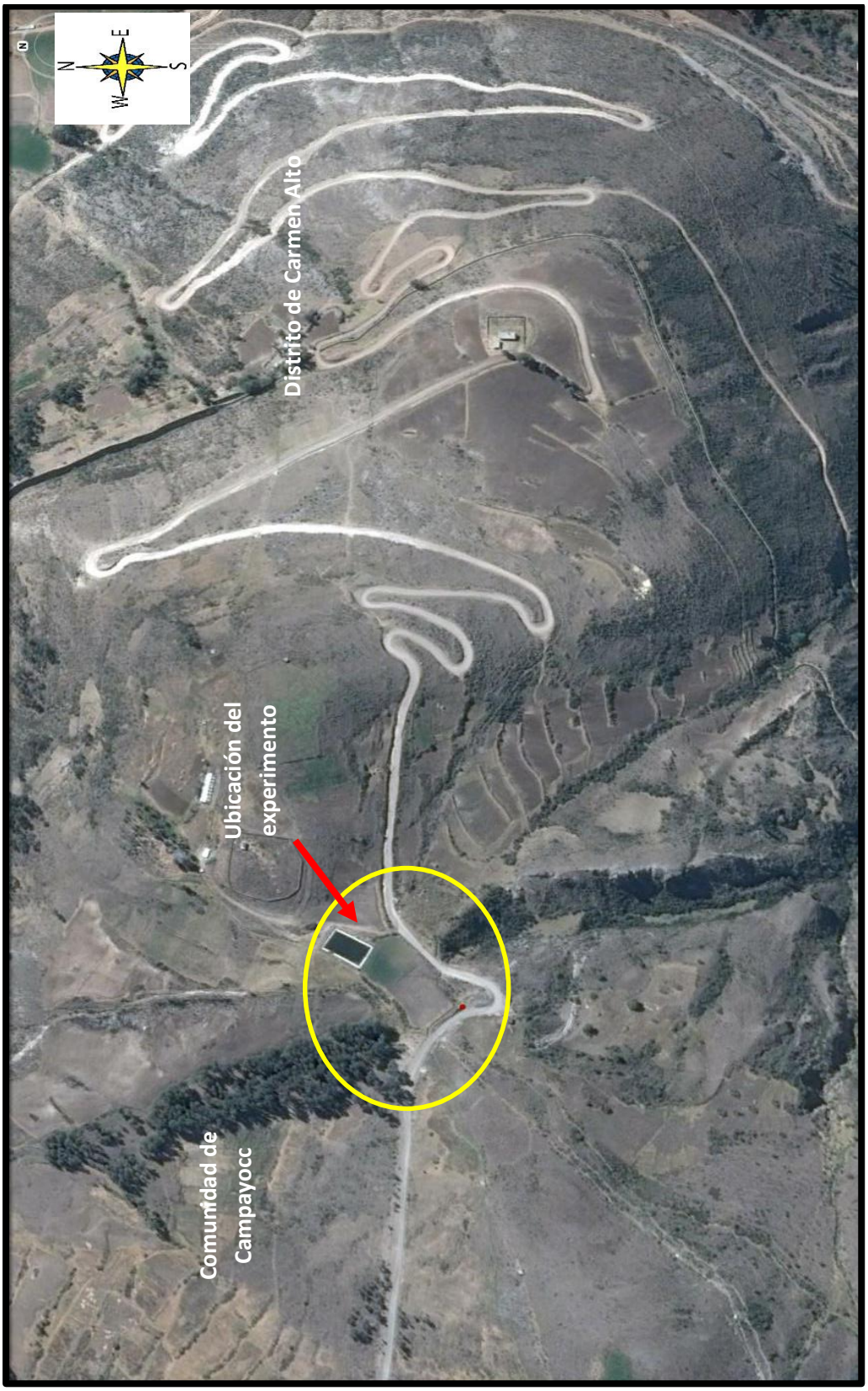
Panel fotográfico del trabajo de investigación

Cosecha de las accesiones de papa nativa

Transporte de las accesiones de papa nativa

ANEXO 5.

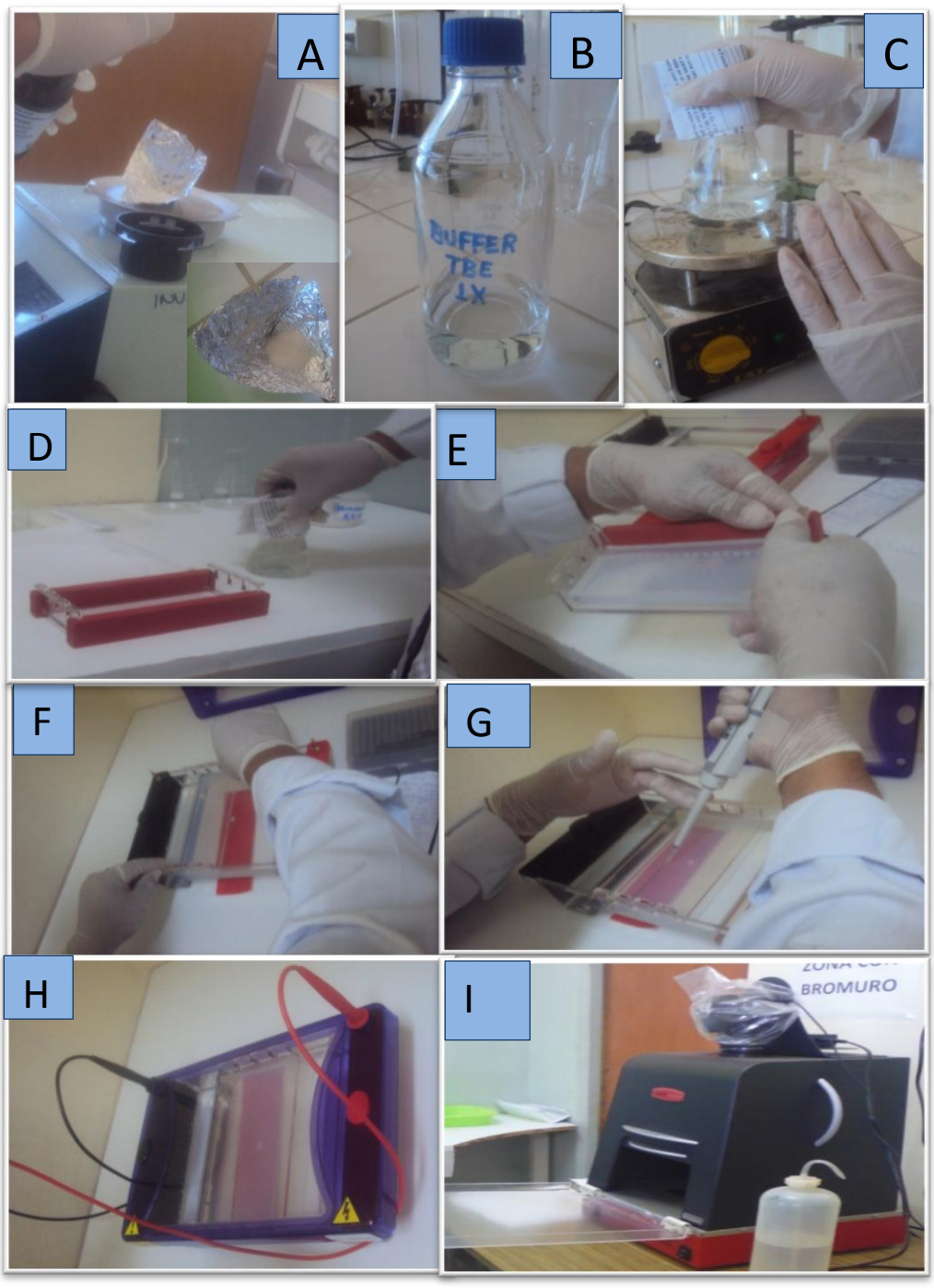
Ubicación del lugar de siembra



Fuente: Foto satelital de Google Earh

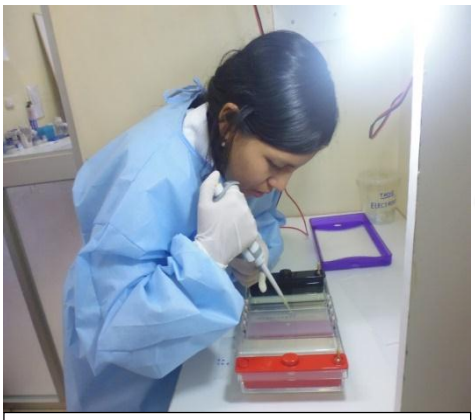
ANEXO 6.

Proceso de Electroforesis

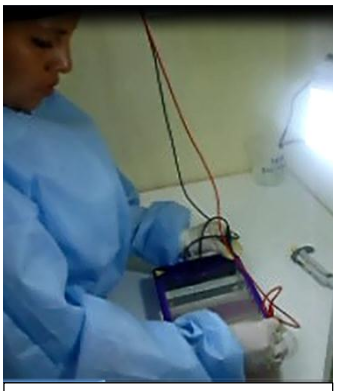


ANEXO 7.

Obtención de la fotografía de las bandas de PCR

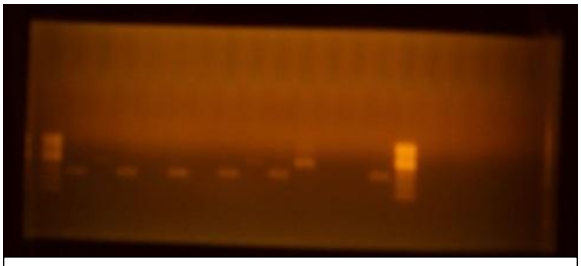


Se sirvió el producto PCR en el gel de agarosa.



Se conectó a una fuente de poder para que inicie la corrida en el tiempo establecido.

Se utilizó el programa “BIOMETRA”, para tomar la foto.



La foto se observa de esta manera.

ANEXO 8.

Preparación de los reactivos:

CTAB 2% del Lab:

Reagent	Concentración Final		
CTAB	1 g	2 g	10%
NaCl	4.09 g	8.18 g	1.4 M
EDTA (0.5 M)	2 mL	4 mL	20 mM
Tris-HCl 1M pH 8.0	5 mL	10 mL	100 mM
PVP	0.5 g	1 g	1%
H_2O (completar para)	50 mL	100 mL	

CTAB 10%

Reagent	Concentración Final		
CTAB	5 g	10 g	10%
NaCl	2.05 g	4.09 g	0.7 M
EDTA (0.5 M)	2 mL	4 mL	20 mM
Tris-HCl 1M pH 8.0	5 mL	10 mL	100 mM
H_2O (completar para)	50 mL	100 mL	

(*) El CTAB se adiciona cuando la solución este caliente, luego de haber agregado las demás soluciones excepto el PVP, evitar que alcance el punto de ebullición, luego cuando ya esté disuelto el CTAB se agrega el PVP manteniendo la solución caliente (sin ebullición). Se recomienda almacenar este buffer a 37°C para evitar que forme precipitaciones.

El CTAB es un compuesto catiónico, que ayuda a la precipitación de ácidos nucleicos y polisacáridos de soluciones de baja fuerza ionica.
Esterilizar en autoclave.

EDTA (0.5M) pH 8

EDTA (ethylenediamenetetraacetic acid)

NaOH

(*) To prepare EDTA at 0.5 M (pH 8.0): Add 186.1 g of disodium EDTA•$2H_2O$ to 800 mL of H_2O. Stir vigorously on a magnetic stirrer. Adjust the pH to 8.0 with NaOH (~20 g of NaOH pellets). Dispense into aliquots and sterilize by autoclaving. The disodium salt of EDTA will not go into solution until the pH of the solution is adjusted to ~8.0 by the addition of NaOH. Store atroom temperature.

Tris-HCl (1M) pH 8

Tris base

HCl

(*) To prepare a 1 M solution, dissolve 121.1 g of Tris base in 800 mL of H_2O. Adjust the pH to the desired value by adding concentrated HCl.

pH	**HCl**
7.4	70 mL
7.6	60 mL
8.0	42 mL

(*) Allow the solution to cool to room temperature before making final adjustments to the pH. Adjust the volume of the solution to 1 L with H_2O. Dispense into aliquots and sterilize by autoclaving.

If the 1 M solution has a yellow color, discard it and obtain Tris of better quality. The pH of Tris solutions is temperature-dependent and decreases ~0.03 pH units for each 1°C increase in temperature. For example, a 0.05 M solution has pH values of 9.5, 8.9, and 8.6 at 5°C, 25°C, and 37°C, respectively.

$T_{10}E_1$ (Buffer de Resuspensión):

Reagent	**Quantity (for 100 mL)**	**Final concentration**
EDTA (0.5 M, pH 8.0) 8.0)	0.2 mL	1 mM
Tris-Cl (1 M, pH 8.0)	1 mL	10 mM

Reagent	Quantity (for 100 mL) Final concentration
H_2O	to 100 mL

(*) Sterilize by autoclaving and store at 4°C

TBE Electroforesis Buffer (10X):

Reagent	Quantity (for 1 L)	Final concentration
Tris base	121.1 g	1 M
Boricacid	61.8 g	1 M
EDTA (disodiumsalt)	7.4 g	0.02 M

(*) Prepare withRNase-free H_2O. Dilute 100 mL to 1 L tomake gel running buffer (1X). Storefor up to 6 mo at roomtemperature.

Solución Cloroformo :AlcoholIsoamílico (24:1)

Reagent	Quantity (For 250mL)
Cloroformo	240mL
Alcohol Isoamilico	10mL

(*) Preparar la solución en una campana y guante (cloroformo es potencialmente cancerígeno). Preparar en una botella esteril y luego forrarla con papel aluminio o de lo contrario usar una botella ambar. Almacenar a 4°C.

ANEXO 9.

Protocolo de extracción de ADN de quistes de nematodos de papa.

1. Coger 100 quistes de nemátodos y ponerlo en un tubo de 1.5 mL.
2. Agregar 50uL de buffer de extracción (CTAB 2X, recientemente preparado y agregando 0.2% de β-mercaptoetanol).
3. Con ayuda de una punta de plástico triturar los quistes durante 2-5 minutos.
4. Agregar al tubo 550uL de buffer de extracción (CTAB 2X), tratando de limpiar todos los restos pegados a la punta de plástico. Luego, mezclar bien los componentes con la ayuda de un vortex.
5. Agregar 20uL de proteinasa K (Qiagen).
6. Colocar los tubos a 65°C durante 2 horas (invertir cada 15 minutos). Luego de las 2 horas dejar enfriar a temperatura ambiente.
7. Agregar 600uL de cloroformo:alcohol isomamílico (24:1) a cada tubo. Mezclar suavemente e invertir los tubos varias veces (mínimo 10 veces).
8. Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos.
9. Transferir la parte acuosa superior a un tubo de microcentrifuga nuevo de 2mL.
10. Agregar a cada tubo 50uL de CTAB 10X. Mezclar por inversión y repetir los pasos 7 y 8.
11. Transferir la parte acuosa superior a un tubo de 1.5mL
12. Agregar un volumen igual de isopropanol (500uL) a cada tubo. Invertir los tubos varias veces y dejar a 4°C durante toda la noche.
13. Centrifugara 14000rpm por 20 minutos y descartar el sobrenadante.
14. Lavar por inversión el pellet con 1mL de etanol 80% por 1 minuto y centrifugar a 14000rpm por 20 minutos. Cuidadosamente descartar el etanol.
15. Lavar por inversión el pellet con 1mL de etanol 90% por 1 minuto y centrifugar a 14000 por 10 minutos. Cuidadosamente descartar el etanol. Con ayuda de una pipeta retire el máximo de líquido posible, luego dejar secar los tubos sobre un papel toalla.
16. Resuspender el pellet de ADN en 30uL de TE.
17. Agregar 1.5uL de RNAsa(10mg/mL). Incubar a 37°C por 1 hora.

ANEXO 10.

Costo de un PCR

El costo de realizar un PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), para 10 muestras de DNA de nematodo 4000.00 nuevos soles.

ITEM	Descripción	Cantidad	U.M.	P. Unitario (s/.)	Total (s/.)
1	Análisis molecular de 10 muestras de nematodo, mediante el uso de marcadores.	1	Unidad	4000.00	4000.00

Fuente: Instituto Nacional de Innovación Agraria.