

EL MILDIU

(Peronospora farinosa)

DE LA QUINUA

(Chenopodium quinoa)

EN LA ZONA ANDINA

Manual práctico para el estudio de la enfermedad y el patógeno

SOLVEIG DANIELSEN • TERESA AMES



EL MILDIU

(Peronospora farinosa)

DE LA QUINUA

(Chenopodium quinoa)

EN LA ZONA ANDINA

Manual práctico para el estudio de
la enfermedad y del patógeno

SOLVEIG DANIELSEN · TERESA AMES





CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP)



ROYAL DANISH MINISTRY OF FOREIGN AFFAIRS

KVL



THE ROYAL VETERINARY AND AGRICULTURAL UNIVERSITY

INDICE

	PÁGINA
INTRODUCCION	1
EL MILDIU DE LA QUINUA	3
1. EL PATOGENO	3
1.1. <i>Sistemática</i>	3
1.2. <i>Morfología</i>	3
1.3. <i>Ciclo de vida</i>	4
1.4. <i>Epidemiología</i>	6
1.5. <i>Variación genética de Peronospora farinosa</i>	6
2. LA PLANTA	7
2.1. <i>Síntomas</i>	7
2.2. <i>Fuentes de resistencia en quinua</i>	9
2.3. <i>Evaluación de la enfermedad</i>	10
3. GLOSARIO	12
4. LITERATURA CONSULTADA	15
PROTOCOLOS	17
Protocolo 1. Producción y mantenimiento de inóculo	18
Protocolo 2. Aislamientos monospóricos	20
Protocolo 3. Almacenamiento de aislamientos	21
Protocolo 4. Prueba de Floxina B para determinar la viabilidad de oosporas	22
Protocolo 5. Decoloración de tejido foliar para observación de oosporas	23
Protocolo 6. Detección de oosporas en semillas de quinua	24
Protocolo 7. Prueba de tipo de apareamiento (cruzamientos)	25
Protocolo 8. Prueba de virulencia en cámara de crecimiento	27
Protocolo 9. Evaluación del grado de esporulación y desarrollo de los síntomas	29
Protocolo 10. Evaluación del mildiu en el campo	31

INTRODUCCION

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) tiene su origen en los Andes centrales, alrededor del lago Titicaca, y ha sido cultivada por más de 7000 años en la región andina. Es una planta con alto poder nutritivo y constituye ancestralmente uno de los alimentos más completos en la dieta del poblador andino. A diferencia de muchos productos de la región, tiene la ventaja de poder almacenarse en condiciones naturales por mucho tiempo, constituyendo una reserva que se consume a lo largo de muchos meses.

La quinua es una planta rústica, crece a grandes altitudes, donde las condiciones ambientales son extremas y los suelos son poco fértiles, pero tiene una gran capacidad de adaptación a climas más benignos como los de la costa peruana. La quinua posee una gran variabilidad y plasticidad genética que le permite adaptarse a diferentes zonas agroecológicas.

La quinua tiene gran potencial para el mercado interno y externo tanto por la alta calidad protéica de su grano como por su alto nivel de tolerancia a condiciones adversas como sequía, heladas y suelos salinos. Durante los últimos años el interés por la quinua ha aumentado y hoy en día se cultiva quinua fuera de su zona de origen, en América del Norte, Colombia, Chile, Argentina y diferentes países de Europa.

La planta de quinua como cualquier especie vegetal y de acuerdo al ambiente donde se cultive, está expuesta al ataque de una serie de enfermedades con mayor o menor intensidad. La enfermedad más importante de la quinua es el mildiu, causado por *Peronospora farinosa*, que afecta principalmente el follaje (fig. 1) y puede causar una reducción considerable en el rendimiento. Aunque la enfermedad es muy conocida y ha sido estudiada por muchos años, existen muchos aspectos de la enfermedad y de la interacción hospedante-patógeno que todavía no son conocidos y requieren ser investigados. Por ello, se necesita contar con la metodología apropiada para manejar el patógeno y estudiar su interacción con el hospedante, el efecto del medio ambiente sobre el desarrollo de la enfermedad (epidemiología), la identificación de patotipos o razas, la identificación de factores de resistencia y tipos de apareamiento, estudios sobre la formación, germinación y sobrevivencia



Fig. 1. Planta de quinua atacada por mildiu (*Peronospora farinosa*)

de oosporas, etc, lo que permitirá entender cómo influyen estos factores en el proceso de la patogénesis.

El mildiu ha sido ampliamente estudiado en otros hospedantes (*Brassica*, *Arabidopsis*, *Pisum*, *Glycine*, *Trifolium*, *Spinacia*), pero en el caso de la quinua quedan todavía muchos detalles que no se conocen. Por ello se ha preparado el presente manual, donde se han recopilado técnicas y métodos fitopatológicos básicos provenientes de la experiencia personal de los autores, así como también de la de investigadores que han trabajado con esta enfermedad en otros cultivos y que por semejanza pueden servir como punto de partida para trabajar en quinua. El uso de métodos uniformizados y estandarizados facilita el estudio de la enfermedad y permite que los resultados sean comparables de un lugar a otro.

El presente manual contiene información que puede ser utilizada por investigadores interesados en el estudio de la enfermedad: mejoradores, fitopatólogos, agrónomos, técnicos, estudiantes y agricultores interesados en la materia.

La primera parte incluye información básica sobre las características del patógeno y el desarrollo de la enfermedad. La segunda parte contiene protocolos para el manejo del patógeno a nivel de laboratorio y escalas para evaluar la enfermedad en pruebas de laboratorio y campo.

Queremos agradecer a Judith Echezaray por su participación en el desarrollo de las técnicas descritas en el manual, a José Luis Reyes por sus contribuciones al glosario, a Víctor Mercado y Candelaria Atalaya por su ayuda en la toma de fotos, a Sven-Erik Jacobsen por proporcionar información general sobre el cultivo de quinua, y a Ed French y Luis Salazar por sus valiosos comentarios y correcciones al manuscrito. Por último, estamos agradecidos por el apoyo económico proporcionado por la Sección de Fitopatología, Instituto de Biología de Plantas, Universidad Real de Agricultura y Veterinaria de Dinamarca.

EL MILDIU DE LA QUINUA

1. EL PATOGENO

1.1. Sistemática

El mildiu de la quinua es causado por *Peronospora farinosa* f.sp. *chenopodii* (Fr.) Fr., un Oomicete, que pertenece a la familia Peronosporaceae, orden Peronosporales, cuyos miembros son parásitos obligados (biotróficos) altamente especializados que parasitan plantas vasculares causando mildiu en un rango limitado de especies.

P. farinosa ataca especies de la familia Chenopodiaceae a la cual pertenecen los géneros *Beta*, *Spinacia* y *Chenopodium*. Un aislamiento de *P. farinosa* sólo ataca al género del cual ha sido aislado. Debido a esta especialización fisiológica el patógeno está subdividido en 3 grupos según sus hospedantes: *P. farinosa* f.sp. *betae* en *Beta* spp., *P. farinosa* f.sp. *spinaciae* en *Spinacia* spp., y *P. farinosa* f.sp. *chenopodii* en *Chenopodium* spp.

Recientemente, los Oomicetes han sido excluidos del reino hongos verdaderos (Fungi) debido a diferencias en la composición de la pared celular y en su ploidía. Sin embargo, su ubicación taxonómica no está todavía bien definida. Algunos autores los incluyen en el reino Cromista y otros en el reino Stramenopila.

1.2. Morfología

La estructura vegetativa del patógeno está constituida por hifas en las cuales se forman esporangióforos y esporangios. Las hifas son cenocíticas (sin septa) y multinucleadas, se desarrollan en los espacios intercelulares de las hojas del hospedante y proyectan haustorios que les sirven como órganos de absorción dentro de las células. El patógeno ataca principalmente la hoja formando en la cara inferior esporangióforos que miden entre 167 y 227 μm de longitud y entre 11.0 y 14.8 μm de diámetro. Los esporangióforos son arborescentes, dicotómicamente ramificados 4 a 5 veces en ángulo agudo y terminan en 2 – 3 extremos flexuosos dispuestos en ángulo recto o agudo, en los que se insertan los esporangios (fig. 2).

Son de crecimiento determinado y cuando alcanzan el tamaño definido forman los esporangios, por esta circunstancia todos los esporangios son de la misma edad.

Los esporangios son deciduos (a la madurez se desprenden del esporangióforo), ovales, con una papila apical translúcida; miden entre 25.7 y 31.9 μm de largo y 19.3 a 24.3 μm de diámetro (fig. 3). Tienen la pared ligeramente rugosa y el protoplasma granuloso. Son de color castaño claro translúcido y germinan directamente formando un tubo germinativo (no producen zoosporas como ocurre con otros Oomicetes). Por esta forma de germinar se les designa indistintamente con los nombres de esporangio, espora o conidia.

Las oosporas son esporas sexuales que pueden sobrevivir períodos largos entre cultivos. En quinua las oosporas son transmitidas por semilla y suelo, sirviendo así como fuentes de inóculo primario para el inicio de epidemias.

El oogonio y el anteridio son los gametangios femenino y masculino respectivamente. Se



Fig. 2. Esporangióforo y esporangios de *Peronospora farinosa*



Fig. 3. Esporangios de *Peronospora farinosa*

encuentran generalmente en forma abundante en el tejido de la hoja en proceso de necrobiosis. El oogonio es hialino de forma esférica a subglobosa, de pared gruesa, densamente granulada. El anteridio es ovoide o irregularmente alargado, generalmente lobulado, translúcido, a menudo adosado al oogonio.

Después de la fecundación del oogonio se forma una oospora aplerótica que ocupa sólo la parte central de lo que fuera el oogonio. Cuando recién se forma la oospora la pared externa o episporio es gruesa, ondulada y hialina, pero a medida que la oospora madura y cambia a un color marrón dorado, la pared también se oscurece. El diámetro de la oospora varía entre 39 y 50 μm (fig. 4).

A diferencia de los organismos homotálicos que pueden formar las estructuras sexuales compatibles en el mismo talo, *P. farinosa* f.sp. *chenopodii* es un organismo heterotálico, por lo tanto para que se forme la oospora es necesaria la presencia de dos talos genéticamente distintos y sexualmente compatibles (tipos de apareamiento). En pruebas realizadas en el laboratorio se ha

logrado producir oosporas haciendo cruzamientos entre aislamientos colectados en diferentes lugares del Perú y Bolivia, lo que significa que en dichos países existen los dos tipos de apareamiento necesarios para que se produzca la estructura sexual. Además, se han encontrado oosporas en hojas viejas infectadas colectadas en campos de diferentes lugares (Huancayo, Puno, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, La Paz), lo que significa que los dos tipos de apareamiento, P1 y P2, están presentes en todas las zonas de mayor importancia para el cultivo de quinua. Sólo en Lima no se ha detectado oosporas en hojas de quinua colectadas en el campo, ni en especies silvestres (*C. album*, *C. murale*) infectadas con *P. farinosa*.

1.3 Ciclo de vida

Cuando un esporangio cae sobre una hoja de quinua, germina directamente produciendo un tubo germinativo, siempre que haya humedad relativa alta en el aire (>80%). El tubo germinativo

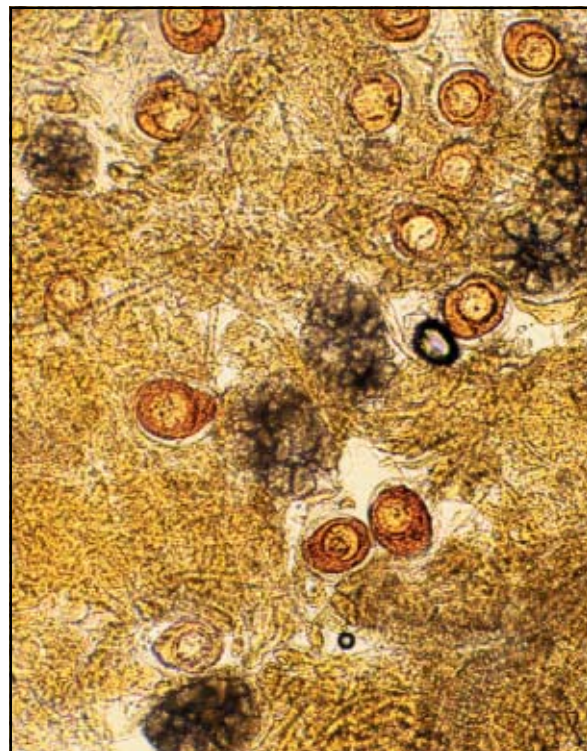


Fig. 4. Oosporas de *Peronospora farinosa* en tejido foliar

forma en su extremo un apresorio provisto de una hifa infectiva que perfora la epidermis y después de un periodo de latencia comienza a crecer formando micelio que se desplaza por los espacios intercelulares del mesófilo. Cinco a seis días después de la penetración, durante los cuales el patógeno se ha desarrollado vegetativamente dentro del hospedante, se inicia la producción de esporangióforos que se proyectan hacia la superficie inferior de la hoja a través de los estomas.

Los esporangióforos, una vez que alcanzan su desarrollo máximo, forman los esporangios, que son las estructuras propagativas del patógeno capaces de mantener la epidemia durante todo el ciclo en que la planta hospedante permanece en el campo. En este momento la zona afectada muestra los primeros síntomas de la enfermedad, que consisten en una ligera clorosis como prueba de que las células afectadas se están debilitando y perdiendo su capacidad de síntesis. Este estado coincide con el de esporulación plena por parte

del patógeno. Finalmente, la parte afectada se necrosifica al tiempo que también desaparece la parte vegetativa del patógeno.

Durante la época de cultivo se pueden producir varias generaciones durante las cuales el patógeno se reproduce asexualmente (esporangios) y produce infecciones sucesivas (policíclicas). Durante este tiempo se establece entre hospedante y patógeno una suerte de equilibrio que se rompe cuando el tejido foliar parasitado comienza a deteriorarse y por lo tanto ya no puede proporcionar al patógeno los nutrientes que necesita para seguir desarrollándose vegetativamente.

El parásito forma estructuras sexuales que aseguran su perpetuidad. Se forman anteridios y oogonios entre los cuales se realiza la fecundación y como resultado se forman las oosporas, que tienen la capacidad de mantenerse vivas por mucho tiempo dentro del tejido de la cubierta de la semilla, en la hojarasca que queda después de la cosecha o simplemente libres en el

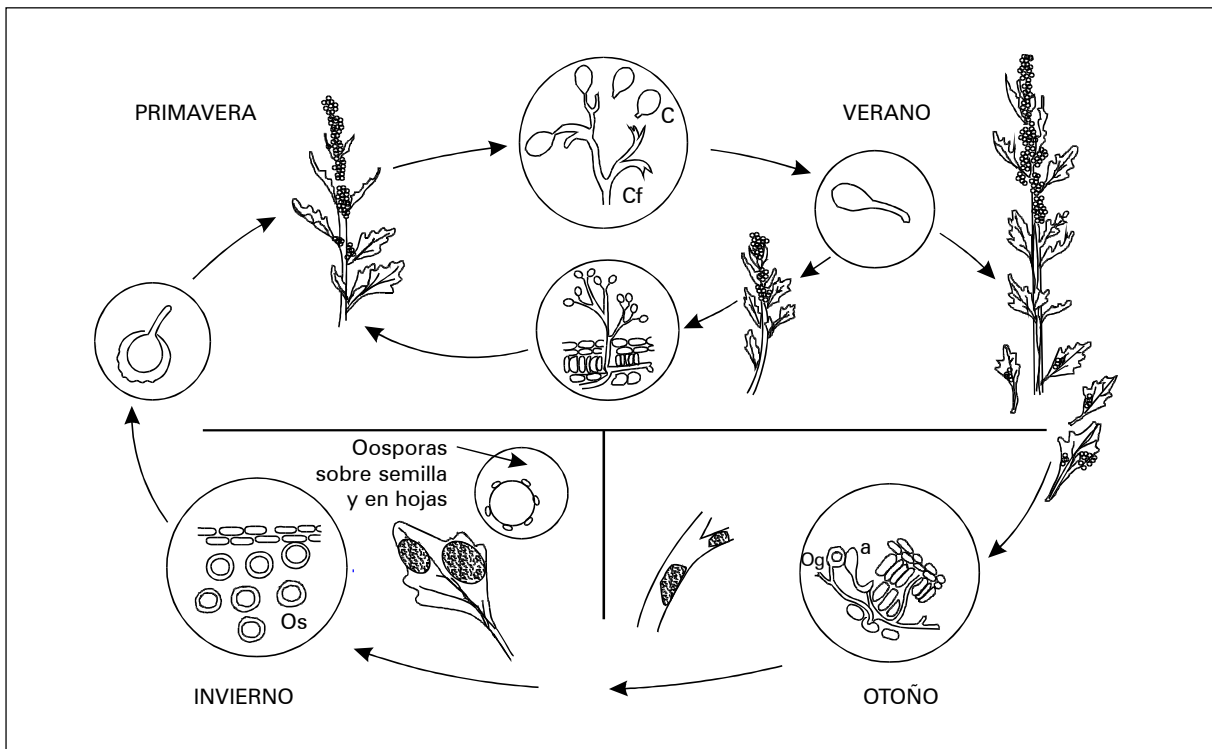


Fig. 5. Ciclo de vida de *Peronospora farinosa* en la zona andina. Cf: esporangióforo, C: esporangio, a: anteridio, Og: oogonio, Os: oospora (Cortesía Tapia et al., 1979)

suelo después que se haya descompuesto el tejido foliar. Las oosporas sirven como fuente primaria de inóculo en la siguiente campaña agrícola.

En presencia de un hospedante susceptible y suficiente humedad, las oosporas que han permanecido inactivas en estado latente, germinan e inician un nuevo ciclo de vida. Hay que tener presente que durante una campaña agrícola se pueden producir varios ciclos asexuales del patógeno pero sólo un ciclo sexual (fig. 5).

1.4. Epidemiología

El estudio de una enfermedad implica el conocimiento de los distintos factores que confluyen para que ésta se produzca. El hospedante y el patógeno son agentes activos en una enfermedad, pero ésta no se produciría si las condiciones del medio ambiente no fueran favorables para el patógeno o detrimentes para la planta. En el caso específico del mildiu de la quinua, temperaturas frescas y humedad alta (>80%) son factores determinantes para el crecimiento del patógeno y la diseminación de la enfermedad en el campo y dentro de una región.

La presencia de rocío al amanecer y la persistencia de éste hasta altas horas de la mañana permite que las esporas de *Peronospora* germinen y penetren el tejido de la hoja para continuar con los procesos epidemiológicos comunes. La germinación de los esporangios depende fundamentalmente de la presencia de humedad relativa alta y persistente, tanto así que en años con poca precipitación, la enfermedad no se presenta o no causa mayor daño.

La enfermedad puede iniciarse desde que la planta está pequeña, por el inóculo presente en el suelo o en la semilla infectada. En cámara de crecimiento se ha observado esta infección primaria como esporulación abundante en toda la superficie de las hojas cotiledonales (fig. 6). La infección primaria sirve en el campo como foco de infección, y la enfermedad se generaliza durante el periodo de cultivo por medio de esporangios que se desplazan por acción del viento y caen en plantas sanas o en hojas sanas de

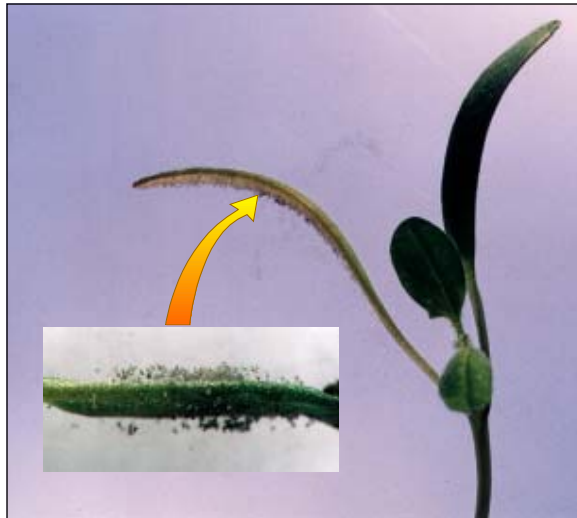


Fig. 6. Infección primaria de mildiu observada como esporulación abundante en hojas cotiledonales de quinua

la misma planta (infección secundaria). Los esporangios son estructuras propagativas por excelencia que se producen en forma policíclica a todo lo largo del periodo del cultivo, siempre y cuando haya suficiente humedad y una temperatura adecuada para su desarrollo. Se ha observado en el campo que cuando termina la estación lluviosa el patógeno deja de esporular. La quinua puede ser afectada por mildiu en cualquier momento de su desarrollo, pero el mayor daño en cuanto a defoliación y pérdida de rendimiento se produce con la infección temprana.

Se ha encontrado mildiu dondequiera se siembre quinua (Norte América, Sur América, Europa) siempre y cuando las condiciones climáticas lo permitan. En la mayor parte de la zona andina las condiciones ambientales son ideales para el desarrollo del mildiu durante los meses de lluvias fuertes (octubre a abril). Una excepción es el altiplano sur de Bolivia (los salares) donde la precipitación anual es tan baja que el mildiu generalmente no se presenta.

1.5. Variación genética de *Peronospora farinosa*

El conocimiento sobre la composición genética de poblaciones de un patógeno es importante para cualquier estrategia de control de

una enfermedad. La variación genética en poblaciones de patógenos se debe a diferentes factores, siendo los más importantes selección, recombinación sexual y parasexual, migración, mutación y fluctuación genética. La variación genética de *P. farinosa* en quinua ha sido muy poco estudiada, pero hay varias razones para suponer que existe una gran variabilidad dentro de las poblaciones de *P. farinosa*: 1) el hospedante tiene un alto nivel de diversidad y plasticidad genética, lo que causa un efecto de selección amplia sobre las poblaciones del patógeno, 2) *P. farinosa* ha sido detectado en quinua en zonas geográficas climáticamente muy distintas, lo que muestra la capacidad de adaptación del patógeno, y 3) la presencia del estado sexual de *P. farinosa* en todas las zonas de mayor importancia para el cultivo de quinua, le permite al patógeno expandir constantemente su diversidad genética.

P. farinosa es heterotálico, y la distribución geográfica de los dos tipos de apareamiento indica la probabilidad de que se forme el estado sexual y, como consecuencia, nuevos patotipos por medio de recombinación. La presencia de patotipos (o razas), su distribución y frecuencia son características importantes para una población. Varios programas de mejoramiento genético de quinua se basan únicamente en tamizados de campo para resistencia al mildiu. Si se desconoce la composición genética de la población en cuanto a la presencia de patotipos, se corre el riesgo de desarrollar variedades que son resistentes sólo en ciertas zonas y susceptibles en zonas donde prevalecen otros patotipos.

Los tipos de apareamiento y la virulencia son marcadores fenotípicos para la identificación de la variación genotípica dentro de una población. Otros marcadores fenotípicos son la resistencia a metalaxyl e isoenzimas. El uso de marcadores moleculares permite identificar diferencias genotípicas a nivel de ADN. Los métodos más comunes para detectar secuencias polimórficas de ADN son RAPD, RFLP y AFLP. En base al patrón de bandas ('fingerprint') es posible calcular la similaridad genotípica entre aislamientos. Para la identificación de genes específicos se usan

mayormente métodos basados en PCR y secuenciamiento de ADN.

2. LA PLANTA

2.1. Síntomas

El mildiu afecta principalmente al follaje de la planta. Se hace evidente inicialmente como ligeros puntitos cloróticos visibles en la cara superior de las hojas. Los puntos cloróticos crecen y forman áreas cloróticas grandes e irregulares que inicialmente se observan como clorosis en la cara superior y luego como necrosis. Simultáneamente, la zona clorótica en la cara inferior de la hoja se recubre de un afelpamiento de color gris violeta constituido por las estructuras esporulativas del patógeno (fig. 7). Generalmente al final de la época lluviosa sólo se encuentra hojas con manchas necróticas, pero no se observa la esporulación característica del patógeno en actividad.

Los distintos cultivares de quinua reaccionan de manera diferente a la enfermedad. La reacción de la planta ante el ataque de *Peronospora*, o sea la expresión de los síntomas, es influenciada por el genotipo de la planta, por el genotipo del patógeno y por las condiciones del medio ambiente. Así, en los cultivares resistentes puede haber una reacción de hipersensibilidad en cuyo caso sólo se observan pequeñas manchas similares a las causadas por picadura de insectos. En los cultivares más susceptibles en cambio, la



Fig. 7. Masas de esporangios de *Peronospora farinosa* en el envés de la hoja de quinua

mancha se agranda sucesivamente tomando una coloración amarillenta, rojiza o marrón, dependiendo del pigmento que predomina en la planta (figs. 8 a-f). En una misma hoja es posible encontrar varias manchas pequeñas, o pocas manchas grandes que comprometen íntegramente la lámina foliar.

Un efecto conocido del mildiu es la defoliación que causa en la planta. Entre más temprana es la infección, mayor es el grado de defoliación. Sin embargo, no se sabe hasta qué punto la defoliación observada en el campo es causada por mildiu. La planta de quinua se defolia por muchos factores, por ejemplo estrés abiótico producido por sequía y heladas, y por senescencia natural. A nivel de campo es difícil distinguir entre los diferentes factores que causan defoliación, pero se ha podido comprobar que en algunos cultivares altamente susceptibles (ej. Utusaya), el mildiu puede causar una defoliación de 100% (fig. 9) y como consecuencia, maduración

prematura. En otros cultivares la defoliación es menos pronunciada. En el cultivar La Molina 89, con resistencia mediana, la defoliación parece ser un mecanismo de defensa de la planta. Se ha podido ver en el campo que la infección temprana en las primeras hojas verdaderas provoca la caída de las mismas, lo cual reduce la diseminación del patógeno a las hojas nuevas.

En la semilla cosechada se observa a simple vista granos con una coloración ligeramente oscura. Estos granos generalmente contienen oosporas dentro de las células de la cubierta, aunque el oscurecimiento también puede ser causado por *Alternaria* sp.

En un campo afectado se observa a menudo la presencia de plantas con desarrollo limitado o completamente enanizadas, en algunos casos con las hojas distorsionadas y las inflorescencias pequeñas y retorcidas. Esto presumiblemente sea consecuencia de una infección sistémica que ocurre cuando la infección inicial se ha producido



Fig. 8. Síntomas de mildiu en diferentes cultivares de quinua



Fig. 9. Defoliación en cv. Utusaya causada por mildiu

en estado de plántula por inóculo proveniente del suelo o de la semilla.

2.2. Fuentes de resistencia en quinua

El método tradicional de control de mildiu en diferentes cultivos es la aplicación de fungicidas como metalaxyl (Ridomil®). Evidentemente, el uso de fungicidas presenta costos adicionales de producción y provoca desequilibrios en el medio ambiente. Además, existe el riesgo de que el patógeno desarrolle resistencia a metalaxyl, tal como se ha visto en el caso de *Phytophthora infestans* (tizón tardío) en papa. La mayoría de los productores de quinua son pequeños o medianos agricultores que tradicionalmente usan pocos insumos en su producción.

La resistencia genética ofrece la ventaja de ser un método de control menos costoso para el agricultor, nada nocivo para el medio ambiente y que asegura una producción sostenible. Dentro del germoplasma de quinua existe una amplia variabilidad con respecto a la resistencia al mildiu, pero hasta ahora no se conoce la base genética de esta resistencia, ni si es controlada por genes mayores (resistencia vertical) o por genes menores (resistencia horizontal). La

resistencia vertical ofrece una protección completa hacia ciertas razas del patógeno, pero este tipo de resistencia tiende a romperse relativamente rápido debido a cambios en el patógeno (mutación, selección). La resistencia horizontal da una protección incompleta pero duradera y es efectiva contra todas las razas del patógeno.

El proyecto PREDUZA (Proyecto de Resistencia Duradera para la Zona Andina) ha iniciado la evaluación de material genético en Perú y Bolivia para el desarrollo de variedades con un alto nivel de resistencia duradera. Los resultados preliminares muestran que la susceptibilidad a mildiu está asociada con la precocidad del material, siendo más susceptibles los cultivares precoces y más resistentes los tardíos. Sin embargo, hay observaciones contradictorias de lugar a lugar y de año a año, probablemente debido a diferencias en la presión de la enfermedad y en presencia de patotipos entre un lugar y otro. Un problema adicional es la falta de métodos estandarizados para la evaluación de la enfermedad. Una manera de superar estas dificultades puede ser el tamizado para resistencia bajo condiciones controladas de luz, temperatura, humedad, concentración de inóculo, y el uso de

plántulas u hojas separadas (fig. 10, protocolos 8 – 9). Este método, además de controlar el nivel de inóculo y las condiciones de crecimiento, es rápido, económico, permite probar un gran número de accesiones o líneas a la vez, y los datos son comparables de un año a otro. El tamizado en el campo debería hacerse en las últimas fases del mejoramiento en zonas con una presión alta de mildiu.

2.3. Evaluación de la enfermedad

Para estudiar la epidemiología de una enfermedad o identificar factores de resistencia y virulencia, es necesario contar con un método de evaluación confiable y reproducible. La evaluación consiste en darle un valor a los daños que causa la enfermedad en la planta. La resistencia o el efecto de un tratamiento se mide comparando la cantidad de patógeno o síntoma por planta, o por parte de planta con la cantidad presente en una planta susceptible (testigo).

La **incidencia** de una enfermedad indica el porcentaje de plantas afectadas, mientras que la **severidad** indica el grado de la enfermedad, generalmente expresado como el porcentaje del

área foliar afectada de todo o de una parte del follaje.

Debido a la manera de diseminación del mildiu de la quinua en el campo por medio del viento, la incidencia no es un parámetro apropiado para distinguir entre cultivares o tratamientos. En cultivares con alto nivel de resistencia, la incidencia de mildiu en años propicios para el desarrollo de la enfermedad frecuentemente alcanza el 100%. La severidad explica mejor el desarrollo de la enfermedad en términos de intensidad.

La mayoría de las escalas de evaluación del mildiu en quinua que existen, se basan en el porcentaje del área foliar afectada. Una escala de 0 a 10 (0 = ninguna infección, 1 = 1-10% área foliar afectada, 2 = 11-20% etc.) está basada en la evaluación del área foliar afectada de toda la planta, mientras otra escala de 0-5 (0 = sin infección, 1 = 1-20%, 2 = 21-40% etc.) está basada en la evaluación del área foliar afectada del tercio medio de la planta.

No existe un método estandarizado y por lo tanto los datos son poco comparables. En el caso de la quinua, este tipo de escala puede no ser

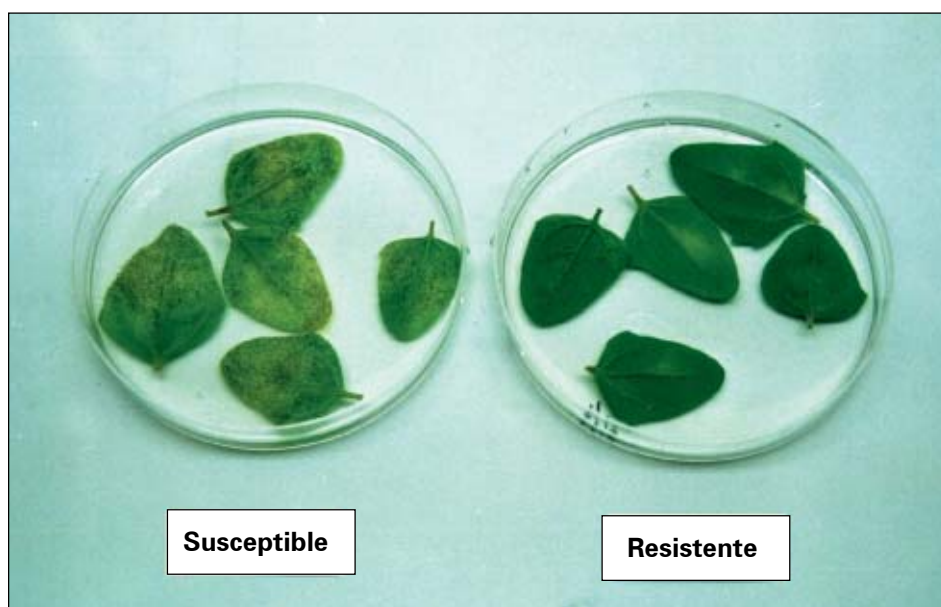


Fig. 10. Tamizado para resistencia al mildiu en placas petri con agar agua usando hojas de quinua. Se evalúa el grado de esporulación con una escala de 0 a 5

muy precisa, considerando el tamaño de la planta y el grado de error conectado a la evaluación, que varía mucho de persona a persona. Lo ideal en este caso es adoptar un método que se adapte a las necesidades de la investigación que se está realizando y que minimice los errores de evaluación. Cualquier método que se use, siempre va a estar sujeto a cierto error.

Un estudio realizado para comparar ocho métodos de evaluación de mildiu en quinua: 1) Severidad en toda la planta; 2) Severidad en el tercio inferior; 3) Severidad en el tercio medio; 4) Severidad en el tercio superior; 5) Severidad en tres hojas por planta; 6) Escala 0 – 10; 7) Escala 0 – 5; 8) incidencia, mostró que el nivel de mildiu medido como severidad con los métodos 1 a 5 estuvo correlacionado al rendimiento y que no hubo mucha diferencia entre éstos. Por el contrario, el nivel de mildiu medido con los métodos 6 a 8 estuvo menos correlacionado al rendimiento y no permitió distinguir claramente la resistencia entre cultivares.

Para disminuir el error y uniformizar los datos, hemos ideado el método de evaluación descrito en el protocolo 10, el cual está basado en el porcentaje de área afectada de tres hojas por planta (una de cada tercio, y escogidas al azar). El valor que se da por planta es el promedio de las tres hojas evaluadas.

Para describir el desarrollo de la enfermedad a lo largo de la época del cultivo e identificar diferencias entre cultivares se puede calcular un valor del área bajo la curva de progreso de la enfermedad, descrito originalmente en inglés como 'area under disease progress curve' (AUDPC), en base a mediciones de severidad.

Esto requiere un mínimo de 3 evaluaciones por campaña.

La fórmula general para el cálculo de (AUDPC) es:

$$AUDPC = \sum_{i=0}^{n-1} (y_i + y_{i+1})/2 \times (t_{i+1} - t_i)$$

donde n es el número de evaluaciones, y es la severidad y t es el número de días después de la siembra en que se hace la evaluación. Se incluye $(t, y) = (0, 0)$ como la primera evaluación (fig. 11).

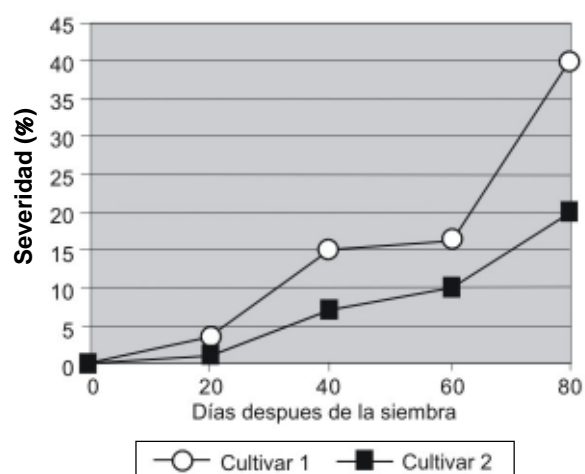


Fig. 11. Curvas de progreso de la enfermedad para calcular el AUDPC

El AUDPC es útil para comparar el desarrollo de la enfermedad bajo distintas condiciones climáticas y para evaluar la susceptibilidad/resistencia de germoplasma, incluyendo siempre un cultivar altamente susceptible como testigo.

3. GLOSARIO

Abiótico Inanimado. Ausencia de organismos vivos

ADN Acido desoxirribonucléico, componente básico de los genes

Afelpamiento Parecido a la felpa. Presencia de vello o pelusilla

AFLP ('Amplified Fragment Length Polimorphism') Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados

Anteridio Gametangio masculino

Apresorio Estructura formada en el extremo del tubo germinativo que se adhiere al hospedante antes de la penetración

Arborescente En forma de árbol

AUDPC ('Area Under Disease Progress Curve') Area bajo la curva de progreso de la enfermedad

Biótico Con vida. Presencia de organismos vivos

Biotrófico Organismo que depende íntegramente de otro organismo vivo, de donde extrae directamente sus nutrientes (sinónimo: parásito obligado)

Cenocítico Célula multinucleada, sin septa

Clorosis Amarillamiento del tejido debido a la pérdida de clorofila

Conidia Espora asexual producida en la punta de una hifa o en una esterigma

Deciduo Caedizo, que se desprende

Dicotómico Que se ramifica de dos en dos y en forma opuesta

Diversidad genética El número de alelos en un locus y su frecuencia

Epidemia Incremento de la incidencia y diseminación de una enfermedad en un área y tiempo determinados

Epidemiología Estudio sobre el origen, la incidencia y la diseminación de una enfermedad

Epidermis Una o varias capas de células externas que cubren y protegen el tejido vegetal

Espora Estructura aislada que queda libre y es capaz de dar origen a un nuevo individuo

Esporangio Estructura que contiene esporas

Esporangióforo Filamento que sostiene los esporangios

Fecundación Fusión de dos células sexuales

Fenotipo *a.* Características medibles (color, tamaño, virulencia, isoenzimas, resistencia a fungicida, etc.) resultantes de la interacción de genotipo y medio ambiente. *b.* Grupo de individuos que poseen las mismas características externas

Fluctuación genética Cambios al azar en la frecuencia de alelos debido a fluctuaciones naturales, no selectivas ej. heladas, incendios, inundaciones

Foco de infección Lugar u órgano a partir del cual se propaga el inóculo infeccioso

Gametangio Célula u órgano que produce células sexuales

Genotipo Constitución genética de un organismo

Germoplasma Células o tejidos a partir de los cuales se puede regenerar una planta, habitualmente se refiere a las semillas o cultivos *in vitro* en un banco de germoplasma

Haustorio Porción especializada del micelio capaz de perforar la membrana celular de su hospedante y absorber sustancias nutritivas

Heterotálico Organismos en los que cada talo es sexualmente autoestéril y requiere de la intervención de otro talo compatible para reproducirse sexualmente

Hialino Transparente, sin color

Hifa Filamento tubular que en conjunto constituye el micelio, el aparato vegetativo de hongos y Oomicetes

Hipersensibilidad Sensibilidad extrema al patógeno. Muerte de las células como respuesta a la infección de un patógeno. Se considera como un mecanismo de resistencia

Homotálico Organismo cuyo talo es autofértil y puede reproducirse sexualmente sin la intervención de otro talo

Incidencia Porcentaje de plantas infectadas

Infección sistémica Presencia difundida del patógeno dentro de la planta

Inóculo Propágulos, gérmenes, material infeccioso

Inóculo primario Propágulos que inician la infección en un campo de cultivo

Inóculo secundario Propágulos que causan infecciones repetidas durante el tiempo que el cultivo permanece en el campo

Isoenzima Una de varias enzimas que tienen la misma especificidad enzimática, pero que difieren en p.e. pl o peso molecular

Latencia a. Período en el cual el patógeno se encuentra inactivo. b. Período desde la infección hasta que se manifiesta la esporulación

Mesófilo Conjunto de tejidos que se encuentra entre ambas epidermis de las hojas

Micelio Conjunto de hifas que forman la estructura vegetativa de los hongos

Migración Movimiento masivo de un patógeno de una región a otra

Mutación Cambio espontáneo en el ADN

Necrosis Muerte de células o tejidos

Oogonio Gametangio femenino entre los Oomicetes

Oomicetes Una clase de Ficomycetes constituida por las algas biflageladas y los organismos que causan mildius

Oospora Espora sexual formada a través de la fertilización de dos gametangios, oogonio y anteridio

Papila Protuberancia superficial más o menos translúcida en un extremo del esporangio

Parásito obligado Ver biotrófico

Patógeno Organismo que causa enfermedad

Patotipo Una subdivisión de un patógeno caracterizada por su reacción patogénica en uno o varios hospedantes

PCR ('Polymerase Chain Reaction') Reacción en Cadena de la Polimerasa

Plasticidad genética La capacidad de cambiar por el estímulo debido a un alto nivel de heterogeneidad genética

Ploidía Número de juegos de cromosomas en una célula

RAPD ('Random Amplified Polymorphic DNA') ADN Polimórfico Amplificado al azar

Recombinación parasexual Intercambio de ADN entre cromosomas homólogos sin pasar por un proceso sexual.

Recombinación sexual Proceso durante la reproducción sexual (meiosis) en el cual hay intercambio de ADN entre cromosomas homólogos

Resistencia horizontal Resistencia no específica, activa contra muchas razas del patógeno, gobernada por genes menores (r)

Resistencia vertical Resistencia específica de alto grado, que sólo es efectiva contra algunas razas del patógeno. La resistencia vertical está gobernada por genes mayores (R)

RFLP ('Restriction Fragment Length Polymorphism') Polimorfismo en el Largo del Fragmento de Restricción

Secuenciamiento Análisis de la secuencia de nucleótidos en un gen o un fragmento de ADN

Selección Reproducción diferencial de ciertos genotipos del patógeno debido a ej. la interacción específica con las variedades del cultivo

Senescencia Proceso de envejecimiento

Septa Tabique transversal que individualiza dos células vecinas

Severidad El grado de la enfermedad medido como porcentaje de área afectada de toda la planta o una parte de la planta

Talo Conjunto de estructuras o de células que conforman el cuerpo de un microorganismo. Fase somática

Tamizado Pruebas que se realizan para determinar la resistencia o susceptibilidad de un cultivo

Tipos de apareamiento o grupos compatibles

Característica genética de un organismo heterotálico que determina su capacidad de unirse sexualmente con otros individuos de la población. Para formar una espora sexual (oospora en el caso de Oomicetes) deben aparearse dos aislamientos de diferentes tipos de apareamiento

Variación genotípica El número de genotipos y su frecuencia dentro de una población

Virulencia Grado de patogenicidad. Capacidad de producir enfermedad. Fuerza de ataque de un patógeno

Zoospora Espora asexual provista de uno o dos flagelos que facilitan su desplazamiento en un medio líquido

4. LITERATURA CONSULTADA

- Alandia, S., V. Otazú, B. Salas. 1979. Enfermedades. En: Quinoa y Kañiwa. M. Tapia, H. Gandarillas, S. Alandia, A. Cardozo, A. Mujica, R. Ortiz, V. Otazú, J. Rea, B. Salas and E. Sanabria, eds. Editorial IICA, Bogotá, Colombia, pp. 137-148.
- Alexopoulos, C.J., S.W. Mims, M. Blackwell. 1996. Introductory mycology. Wiley, New York. 868 pp.
- Aragón, L., W. Gutiérrez. 1992. El mildiu en cuatro especies de *Chenopodium*. Fitopatología 27:104-109.
- Bonifacio, A. 1999. Resistencia de la quinua al mildiu. First International Workshop on Quinoa. Lima, The International Potato Center.
- Bonifacio, A. & R. Saravia. 1999. Evaluación de la resistencia al mildiu en quinua. En: Tercer Taller de Preduza en Resistencia Duradera en Cultivos Altos en la Zona Andina, 27 - 29 de Septiembre de 1999. Cochabamba, Bolivia, pp. 49-59.
- Brown, J.K.M. 1996. The choice of molecular marker methods for population genetic studies of plant pathogens. New Phytologist 133:183-195.
- Burnouf-Radosevich, M. 1988. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): a potential new crop. Springer-Verlag, Berlin, pp. 386-404.
- Byford, W.J. 1967. Host specialization of *Peronospora farinosa* on *Beta*, *Spinacia* and *Chenopodium*. Trans. Br. Mycol. Soc. 50:603-607.
- Byford, W.J. 1981. Downy mildews of beet and spinach. En: The downy mildews. D.M. Spencer, ed. Academic Press, London, pp. 531-543.
- Campbell, C.L. & L.V. Madden. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley & Sons. New York. 532 pp.
- Davidse, L.C., D. Looijen, L.J. Turkensteen, D. van der Wal. 1981. Occurrence of metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields. Netherlands J. Pl. Path. 87:65-68.
- Edreva, A., R. Delon, J.C. Coussirat. 1998. Variability of *Peronospora tabacina* A. - An isoenzyme study. Beitrage zur Tabakforschung International 18:3-13.
- Francis, S.M., R.J. Williams, W.J. Byford, A.M. Berrie. 1983. *Peronospora farinosa* f.sp. *betae*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria.
- Frinking, H.D., J.L. Harrewijn, C.F. Geerds. 1985. Factors governing oospore production by *Peronospora farinosa* f.sp. *spinaciae* in cotyledons of spinach. Netherlands J. Pl. Path. 91:215-223.
- Gaag-DJ, v.d., H.D. Frinking, D.J. Van-der-Gaag. 1997. Survival characteristics of oospore populations of *Peronospora viciae* f.sp. *pisi* in soil. Pl. Path. 46:978-988.
- Gaag-DJ, v.d., H.D. Frinking, D.J. Van-der-Gaag. 1997. Extraction of oospores of *Peronospora viciae* from soil. Pl. Path. 46:675-679.
- Gamboa, S., W. Pérez, R. Nelson. 1999. Uso de marcadores moleculares en la caracterización de poblaciones de *Phytophthora infestans* en Perú. 10th Latinamerican Phytopathological Congress, Sep. 27 - Oct. 1, 1999, Guadalajara, Mexico.
- Grontoft, M. 1993. A rapid screening method for testing the resistance of cotyledons to downy mildew in *Brassica napus* and *B. campestris*. Plant Breeding 110:207-211.
- Gross, R., F. Koch, I. Malaga, A.D. Miranda, H. Schoeneberger, L.C. Trugo. 1989. Chemical composition and protein quality of some local Andean food sources. Food Chemistry 34:25-34.
- Hartmann, H., J.C. Sutton, R. Procter. 1983. Effects of atmospheric water potential, free water, and temperature on production and germination of sporangia in *Peronospora parasitica*. Can. J. Pl. Path. 5:70-74.
- Inaba, T., & T. Hino. 1981. Influence of water and humidity on oospore formation of several

- downy mildew fungi. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 47:694-696.
- Inaba, T., K. Takahashi, T. Morinaka. 1983. Seed transmission of spinach downy mildew. Pl. Dis. 67:1139-1141.
- Jacobsen, S.E., & O. Stolen. 1993. Quinoa - morphology, phenology and prospects for its production as a new crop in Europe. European J. Agron. 2:19-29.
- Lee, T.v.d. 1997. AFLP linkage map of the oomycete *Phytophthora infestans*. Fungal Gen. Biol. 21:278-291.
- McDonald, B.A., J.M. McDermott. 1993. Population genetics of plant pathogenic fungi. BioScience 43:311-319.
- Nutter, F.W., P.S. Teng, F.M. Shokes. 1991. Disease assessment terms and concepts. Pl. Dis. 75:1187-1188.
- Ochoa, J., H.D. Frinking, Th. Jacobs. 1999. Postulation of virulence groups and resistance factors in the quinoa/downy mildew pathosystem using material from Ecuador. Pl. Path. 48:425-430.
- Otazú, V., P.C. Aguilar, A. Canahua. 1976. Resistencia en quinua (*Chenopodium quinoa*) al mildiu (*Peronospora effusa*). Fitopatología 11:47-49.
- Parker, S.R., M.J. Whelan, D.J. Royle. 1995. Reliable measurement of disease severity. Aspects Appl. Biol. 43:205-214.
- Risi, C.J., & N.W. Galwey. 1984. The Chenopodium grains of the Andes: Inca crops for modern agriculture. Adv. Appl. Biol. 10:145-216.
- Roongruangsree, U.T., J.C. Kjerulf, L.W. Olson, L. Lange. 1988. Viability tests for thick walled fungal spores (ex: oospores of *Peronospora manshurica*). J. Phytopath. 123:244-252.
- Schwinn, F.J. 1981. Chemical control of downy mildews. En: The downy mildews. D.M. Spencer, ed. Academic Press, London, New York, San Francisco, pp. 305-320.
- Stegmark, R. 1990. Variation for virulence among Scandinavian isolates of *Peronospora viciae* f.sp. *pisi* (pea downy mildew) and responses of pea genotypes. Pl. Path. 39:118-124.
- Stegmark, R. 1991. Selection for partial resistance to downy mildew in peas by means of greenhouse tests. Euphytica 53:87-95.
- Stegmark, R. 1999. Comparison of different inoculation techniques to screen resistance of pea lines to downy mildew. J. Phytopath. 133:209-215.
- Tapia, M., H. Gandarillas, S. Alandia, A. Cardozo, A. Mujica, R. Ortiz, V. Otazú, J. Rea, B. Salas, E. Sanabria (eds.) 1979. Quinua y Kañiwa. Editorial IICA, Bogotá, Colombia. 227 pp.
- Tewari, J.P., & S.M. Boyetchko. 1990. Occurrence of *Peronospora farinosa* f.sp. *chenopodii* on quinoa in Canada. Can. Pl. Dis. Survey 70:127-128.
- Vulsteke, G., D. Callewaert, P. Meeus, P. Bosman. 1997. Control by seedcoating of primary infection of downy mildew, *Peronospora viciae* Berk. (de Bary) on peas. Parasitica 53:15-23.
- Yerkes, W.D., & C.G. Shaw. 1959. Taxonomy of the *Peronospora* species on Cruciferae and Chenopodiaceae. Phytopath. 49:499-507.
- Zimmer, R.C., W.E. McKeen, C.G. Campbell. 1992. Location of oospores in buckwheat seed and probable roles of oospores and conidia of *Peronospora ducometi* in the disease cycle on buckwheat. J. Phytopath. 135:217-223.

PROCOLOS



PRODUCCION Y MANTENIMIENTO DE INOCULO

Consideraciones

La producción y mantenimiento del inóculo es una práctica rutinaria en todo laboratorio y permite tener inóculo disponible para las pruebas que sean necesarias, por ejemplo para pruebas de resistencia del huésped, para realizar estudios sobre las características morfológicas y fisiológicas del patógeno, tipos de apareamiento, así como para investigar lo concerniente a las diferencias a nivel molecular.

Si no se dispone de una cámara de crecimiento, se puede producir y mantener el inóculo de *P. farinosa* bajo condiciones de invernadero o cobertor, siempre que las temperaturas no sean extremas.

Procedimiento

Colección de aislamientos

- Colectar en el campo hojas que tengan preferiblemente una sola lesión con esporulación reciente y colocarlas en placas petri con papel filtro húmedo o con agar agua
- Si no fuera posible encontrar hojas con una sola lesión, cortar la parte de la hoja que contiene una lesión
- Si la lesión presenta esporulación abundante se puede iniciar la propagación inmediatamente (Paso 1), en caso contrario hay que incubarla en cámara húmeda por un día o por el tiempo que sea necesario, hasta 7 días

Paso 1 (partiendo de pocos esporangios)

- Cortar la hoja por el perímetro de la lesión y extraer los esporangios del tejido foliar usando un chorro de agua destilada (1 – 5 ml) o agitándola en un tubo de ensayo con agua destilada
- Centrifugar a 3000 × g por 5 – 10 min
- Resuspender el sedimento en 0.5 – 1 ml de agua y vertir la suspensión en una placa conteniendo agar agua al 1%
- Colocar 10 – 15 hojas de quinua encima del agar agua con la cara superior hacia abajo. Si el inóculo es escaso (< 0.5 ml) se puede usar el método de la gota (ver abajo)
- Cubrir las placas con un plástico negro por 20 - 30 h
- Mantener las placas en cámara climática por 7 – 10 días a 15 – 20°C con un fotoperíodo de 12h

Paso 2 (partiendo de esporangios abundantes)

- Cosechar esporangios frescos (7-10 días) colocando las hojas con esporulación fresca dentro de un vaso o de un tubo que contenga agua destilada (en cantidad arbitraria). Los esporangios deben cosecharse dentro de los 10 días siguientes a la inoculación, debido a que el tejido de la hoja comienza a descomponerse después de este tiempo
- Agitar la mezcla suavemente y pasarla por 4 capas de gasa. Centrifugar a 3000 × g por 5 - 10 minutos
- Descartar cuidadosamente el sobrenadante (dejar 1 – 2 ml en el tubo ya que el sedimento no siempre es visible)

- Lavar los esporangios con agua dos veces más en el tubo y volver a centrifugar con el objeto de eliminar sustancias inhibidoras de la germinación (opcional)
- En caso necesario ajustar la concentración de los esporangios. Para simple mantenimiento, la concentración no es crítica
- Inocular (ver abajo) plántulas de quinua u hojas sueltas (4 – 6 semanas de edad). La suspensión de esporangios no debe conservarse por más de unas pocas horas
- En caso de plántulas, cubrirlas con plástico transparente con el objeto de mantener la humedad y evitar la indeseada diseminación de los esporangios. Para las hojas sueltas, el agar agua mantiene la humedad conveniente
- Dejar las macetas/placas petri cubiertas con un plástico negro durante 20 - 30 horas.
- Quitar el plástico negro e incubar por 7 – 10 días a 15 – 20°C con un fotoperíodo de 12 horas.
- Después de la incubación en oscuridad, las placas conteniendo las hojas se colocan una sobre otra (opcional), se aseguran entre sí con una cinta adhesiva y se ponen en una bandeja alineadas lateralmente para que el agua que se condensa dentro de la placa no inhiba la esporulación en la superficie inferior de las hojas (ver fig. 12)

Opciones para la inoculación

- 1) Colocar gotas (20-50 μ l) de la suspensión de esporangios en una placa petri con agar agua al 1%. Encima de cada gota se coloca una hoja de quinua con la cara superior hacia abajo, 10 – 15 hojas por placa (ver fig. 13)
- 2) Distribuir 1 ml de la suspensión de esporangios en una placa con agar agua al 1% y encima colocar las hojas de quinua con la cara superior hacia abajo
- 3) Asperjar las hojas de plántulas de quinua con la suspensión de esporangios hasta que goteen. En este caso se agrega como adherente Tween 20 al 0.1% a la suspensión

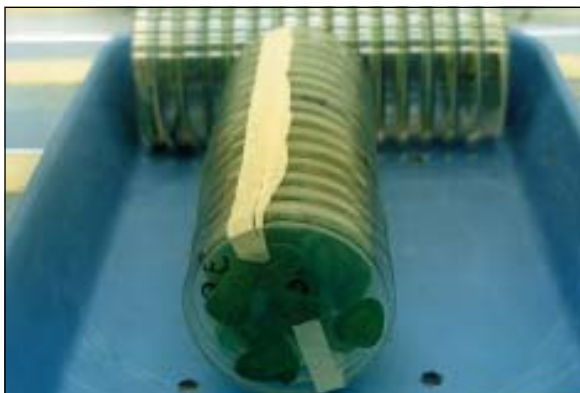


Fig. 12. Posición de placas petri con agar agua para la propagación de inóculo de *Peronospora farinosa*



Fig. 13. Propagación de inóculo de *Peronospora farinosa*. Placa petri con hojas mostrando esporulación del patógeno

AISLAMIENTOS MONOSPORICOS

Consideraciones

Cuando se recoge material infectado en el campo es probable que contenga más de un genotipo del patógeno por lo que es necesario hacer aislamientos monospóricos con el objeto de individualizarlos y purificar el inóculo. Generalmente se consigue aislamientos puros usando el método descrito en el protocolo 1 (1 lesión = 1 aislamiento), pero puede haber casos de mezcla de aislamientos que requieren pasar por un proceso de purificación haciendo aislamientos monospóricos.

El procedimiento es bastante tedioso, así que para evitar cargas de trabajo innecesarias, el investigador debe considerar si éste es un requisito indispensable para su investigación.

Procedimiento

- Dejar caer una gota de una suspensión de esporangios sobre una lámina portaobjetos recubierta de una película de agar agua al 5%
- Usando un microscopio compuesto (objetivo 10 ×) coger un solo esporangio con una aguja de laboratorio y transferirla a una hoja colocada con la superficie inferior hacia arriba en una placa petri conteniendo agar agua al 1%
- Dejar las hojas inoculadas en incubación bajo condiciones estándar (ver protocolo 1) hasta que se produzca esporulación evidente
- Se puede contar con una eficiencia de infección de 10 – 40%

ALMACENAMIENTO DE AISLAMIENTOS

Consideraciones

Para conservar el material colectado en el campo por tiempo indefinido, hay que seguir ciertas pautas, porque siendo *Peronospora* un parásito obligado (biotrófico) que sólo puede vivir y desarrollarse en tejido vivo hay que mantenerlo ya sea en plantas vivas o en congelación. El mantenimiento en plantas vivas o en hojas desglosadas se usa sobre todo para trabajos inmediatos, en cambio cuando se trata de colecciones en las que hay que mantener viable el material por mas tiempo, la única forma de conservarlo es en congelación o en nitrógeno líquido.

Procedimiento

Alternativa 1: Almacenamiento de hojas infectadas a -20°C

- Colocar las hojas con esporangios frescos en tubo plástico, bolsa plástica, o dentro de una placa petri conteniendo agar agua o papel filtro húmedo y almacenar a -20°C. Es preferible que el enfriamiento se haga lentamente
- Para preparar inóculo a partir del material almacenado, descongelar las hojas lentamente, ponerlas en agua destilada y luego extraer los esporangios por lavado de acuerdo al procedimiento estándar (protocolo 1)
- Los esporangios pueden ser congelados y descongelados por una sola vez
- Cuando la temperatura de almacenamiento es constante, sin fluctuaciones, los esporangios se mantienen viables hasta por 6 meses

Alternativa 2: Almacenamiento de esporangios en nitrógeno líquido

- Cosechar y lavar los esporangios siguiendo el procedimiento estándar (protocolo 1)
- Para evitar contaminación bacteriana, lavar los esporangios con abundante agua estéril y destilada en un microfiltro (2 – 10 µm) conectado a una bomba de vacío
- Diluir los esporangios en DMSO (dimetil sulfóxido 15% en agua destilada v/v) y transferirlos a tubos de plástico
- Enfriar los tubos lentamente durante 2 horas hasta alcanzar -70°C antes de colocarlos en nitrógeno líquido
- Los esporangios se mantienen viables por varios años

Alternativa 3: Mantenimiento en plantas vivas

- Cuando no se dispone de una congeladora a -20°C o de un tanque de nitrógeno líquido, los aislamientos de *Peronospora* se pueden mantener en plántulas o en hojas sueltas de quinua por medio de inoculaciones secuenciales semanales o bisemanales
- Seguir los procedimientos de rutina para la propagación del inóculo
- Las hojas con esporangios frescos se pueden guardar por períodos cortos de tiempo a 5°C (1 – 2 semanas)

PRUEBA DE FLOXINA B PARA DETERMINAR LA VIABILIDAD DE OOSPORAS

Consideraciones

Las oosporas son estructuras de sobrevivencia del patógeno y pueden mantenerse viables por mucho tiempo en el tejido de la cubierta de la semilla de quinua y en los restos de tejido foliar que quedan en el suelo después de la cosecha. La prueba de viabilidad de las oosporas usando floxina es aplicable únicamente para suspensiones purificadas de oosporas.

Cuando se quiere iniciar una infección controlada o cuando se quiere saber la cantidad de inóculo efectivamente infeccioso es necesario conocer primero la cantidad de oosporas viables presentes en el inóculo inicial. Este método es útil para estudios sobre la sobrevivencia de las oosporas.

Procedimiento (Roongruansree *et al.*, 1988)

- Suspender el material en estudio en una solución de Floxina B al 1% (cantidad arbitraria) y dejarlo a la temperatura del laboratorio por 20 minutos
- Centrifugar la suspensión a 3000 x g por 1 minuto y descartar el sobrenadante
- Resuspender o lavar el sedimento en una cantidad adecuada de agua destilada y examinar al microscopio compuesto
- Las oosporas muertas se tiñen de rojo, mientras que las que están viables no se colorean

DECOLORACION DE TEJIDO FOLIAR PARA OBSERVACION DE OOSPORAS

Consideraciones

El tejido parasitado puede contener oosporas si es que proviene de lugares donde ambos tipos de apareamiento se encuentran presentes, pero para observarlas, especialmente en las hojas, hay que macerar el tejido afectado o decolorarlo. La maceración o desintegración del tejido permite que las células se separen y junto con ellas se individualicen las oosporas. Otra forma de observar las oosporas es decolorando el tejido de la hoja hasta dejarlo transparente.

Procedimiento

Alternativa 1

- Cortar el tejido foliar necrótico en tiritas de 1 mm y ponerlas en un vaso conteniendo una cantidad arbitraria de NaOH 0.1N
- Hervir el líquido por 1 – 2 min hasta que las tiritas de tejido precipiten
- Transferir las tiritas a una gota de lactofenol en un portaobjetos y cubrirlo con un cubreobjetos. Presionar ligeramente para que el tejido se desintegre
- Observar las oosporas en un microscopio compuesto (objetivo 10x) (ver fig. 4)

Alternativa 2

- Colocar dos capas de papel filtro en una placa petri y saturarlas con una mezcla de etanol 96% y ácido acético glacial (3:1 v/v)
- Colocar las hojas de quinua sobre el papel humedecido y dejarlas por 24 h para que el tejido se decolore
- Observar las oosporas en un microscopio compuesto (objetivo 10x)

DETECCION DE OOSPORAS EN SEMILLAS DE QUINUA

Consideraciones

Las semillas de quinua pueden ser portadoras del inóculo inicial para que se desarrolle la enfermedad en una siguiente campaña agrícola, por lo tanto para estar seguro que se está iniciando una investigación con material completamente exento de infección es necesario analizar la semilla para presencia de oosporas. Por otro lado, la detección de oosporas en semillas forma parte de estudios sobre la importancia de las oosporas en el inicio y desarrollo de la enfermedad.

Procedimiento

Detección directa

En la superficie de la semilla

- Agitar en un erlenmeyer por 30 min, 5 g de semillas suspendidas en 50 ml de agua destilada
- Pasar el contenido del erlenmeyer a través de 4 capas de gasa y centrifugarlo por 2 min a $3000 \times g$
- Descartar el sobrenadante y disolver el sedimento en 5 ml de Floxina B (ver protocolo 4)
- Examinar repetidamente en un microscopio compuesto (objetivo 10x) una gota de la solución para detectar la presencia de oosporas

Dentro de la semilla

- Macerar las semillas lavadas de acuerdo con el método de hervido en NaOH (ver protocolo 5). El hervido hace que la cubierta de la semilla se desprenda
- Examinar al microscopio compuesto 100 cubiertas y 100 semillas procesadas para detectar la presencia de oosporas. Alternativamente, fijar en parafina semillas enteras con el fin de hacer cortes al micrótopo para observar la existencia de oosporas en el interior de la semilla
- Calcular el porcentaje de semillas infectadas con oosporas

Detección indirecta

- Sembrar en el invernadero 100 semillas de cada muestra en macetas conteniendo suelo estéril y cubrirlas con bolsas de plástico
- Observar diariamente las plantas después de la germinación para detectar presencia de esporangios en las hojas cotiledonales (ver fig. 6)
- Registrar y eliminar las plántulas que presentan esporulación. El periodo de observación dura alrededor de tres semanas
- Calcular el porcentaje de plántulas infectadas

PRUEBA DE TIPO DE APAREAMIENTO (CRUZAMIENTOS)

Consideraciones

Dos aislamientos son compatibles cuando al juntarlos son capaces de formar gametangios (anteriorio y oogonio) y después de la fecundación formar oosporas. En pruebas de laboratorio es posible inducir la producción de oosporas cuando se logran juntar aislamientos compatibles de diferentes tipos de apareamiento.

Procedimiento

- Ajustar la suspensión de esporangios de cada aislamiento en estudio a 10^5 esporangios/ml de agua
- Preparar para cada prueba (cruzamiento) 3 placas con agar agua al 1%
- 1) cuando **no se dispone de aislamientos probadores**, las hojas en dos de las placas se inoculan separadamente cada una con uno de los aislamientos a probar (testigos) y las hojas de la tercera placa se inoculan con una mezcla de los dos aislamientos. Se hacen cruzamientos en todas las combinaciones posibles. Para 10 aislamientos se hacen 55 combinaciones incluyendo los testigos. Se anotan los resultados de compatibilidad e incompatibilidad en el siguiente esquema, como + o -, respectivamente:

Aisl.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
2	■									
3	■	■								
4	■	■	■							
5	■	■	■	■						
6	■	■	■	■	■					
7	■	■	■	■	■	■				
8	■	■	■	■	■	■	■			
9	■	■	■	■	■	■	■	■		
10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	

- 2) cuando **se dispone de aislamientos probadores**, las hojas de una placa se inoculan con el aislamiento en prueba solo (testigo) y las hojas de una segunda y tercera placa con el aislamiento en prueba en combinación con cada uno de los probadores (P1 y P2) separadamente. Para 10 aislamientos son 33 combinaciones incluyendo los testigos:

Aisl.	P1	P2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
P1												
P2	■											
Solo	■	■										

Protocolo 7

- Vertir 1 ml de inóculo en placas conteniendo agar agua al 1% y colocar 10 hojas de plántulas de quinua de una variedad susceptible, con la cara superior hacia abajo (ver protocolo 1)
- Decolorar las hojas (ver protocolo 5) y examinarlas con un microscopio compuesto después de 9 – 14 días de incubación bajo condiciones estándar (ver protocolo 1) para observar las oosporas (ver fig. 4)
- Se define como reacción compatible cuando se observan oosporas por lo menos en una hoja
- Cuando se identifica por primera vez una reacción compatible, los dos aislamientos involucrados se usarán en lo sucesivo como probadores estándar

Alternativa

Si no se dispone de agar, se pueden colocar las hojas inoculadas sobre un papel de filtro esterilizado y húmedo dentro de una placa que luego se debe sellar con parafilm. Las condiciones de incubación son las mismas que se mencionan párrafos arriba.

PRUEBA DE VIRULENCIA EN CAMARA DE CRECIMIENTO

Consideraciones

Cuando se hacen trabajos de mejoramiento y selección es importante conocer la virulencia de las poblaciones de *P. farinosa* en las áreas de utilización de las variedades mejoradas.

Para identificar factores de virulencia se necesita un conjunto de líneas o de cultivares diferenciales que permite distinguir entre aislamientos por su reacción a los diferenciales.

Las técnicas propuestas aquí para la prueba de virulencia, se pueden utilizar igualmente para hacer tamizado para resistencia en germoplasma de quinua o en líneas mejoradas.

Procedimiento

Alternativa 1. Prueba de virulencia usando hojas sueltas

- Cortar hojas de plántulas de quinua de 4-6 semanas de edad, colocarlas en una placa petri con papel filtro humedecido y mantenerlas hasta su uso. Seleccionar hojas de tamaño similar
- Incluir en la prueba como testigo positivo un cultivar altamente susceptible
- Cosechar esporangios de un aislamiento de *P. farinosa* (ver protocolo 1). Ajustar la concentración a 1×10^5 esporangios/ml
- Incluir en cada placa petri con agar agua 4 – 6 hojas como unidad experimental y considerar 3 – 4 repeticiones para cada combinación genotipo – aislamiento (a criterio de cada investigador)
- Inocular las hojas según el procedimiento descrito para propagación de inóculo (protocolo 1, opción 1 ó 2)
- Mantener las placas en oscuridad las primeras 20 horas después de la inoculación
- Distribuir las placas al azar y colocarlas lateralmente (opcional) (ver fig. 12) en cámara de crecimiento a 15 – 20°C con 12 h de fotoperíodo
- Incubar por 7 – 10 días
- Evaluar la severidad de la enfermedad usando el índice de esporulación de 0 – 5 (ver protocolo 9) y/o contando el número de esporangios por área afectada. Calcular el promedio para cada unidad experimental
- Medir el período de latencia, de ser posible (número de horas a las que la esporulación se hace visible)

Alternativa 2. Prueba de virulencia usando plántulas

- Preparar macetas con sustrato estéril y dejar crecer 2 plántulas de quinua por maceta
- Cada maceta constituye una unidad de prueba y cada prueba incluye 3 – 4 repeticiones
- Asperjar plántulas de 4 – 6 semanas con una suspensión de esporangios preparada como en el caso anterior
- Cubrir las macetas con plástico y colocarlas en forma totalmente al azar en una cámara de crecimiento a 15 – 20°C con fotoperíodo de 12 horas
- Mantener las macetas en oscuridad durante 20 horas después de la inoculación
- Incubar las plántulas durante 7 – 10 días

Protocolo 8

- Evaluar la severidad de la enfermedad en las dos primeras hojas permanentes de cada plántula usando el índice de síntomas de 1 – 5 (ver protocolo 9). Calcular el promedio para cada unidad de prueba

Interpretación de los resultados

- Un aislamiento se define como virulento a un cultivar/genotipo de quinua cuando alcanza un grado > 2 después del período de incubación. Un aislamiento se define como no virulento si tiene un grado < 2 después del período de incubación. Los grados de virulencia están entre estos límites
- Igualmente, un cultivar/genotipo de quinua se define como susceptible a un aislamiento si el grado es > 2 después del período de incubación. Un genotipo se define como resistente si alcanza un grado < 2 después del período de incubación. Los grados de resistencia están entre estos límites (fig. 10)

EVALUACION DEL GRADO DE ESPORULACION Y DESARROLLO DE LOS SINTOMAS

Consideraciones

El grado de esporulación es una respuesta inequívoca en pruebas de resistencia del hospedante y virulencia del patógeno. En los cultivares susceptibles la esporulación es abundante, mientras que en los cultivares resistentes la esporulación es mínima o no se produce. En el caso de los mildius el signo de la presencia del patógeno y el síntoma o daño que se produce se evidencian juntos. De esta manera tanto la esporulación visible como la clorosis/necrosis, sirven como parámetros para describir la interacción.

Procedimiento

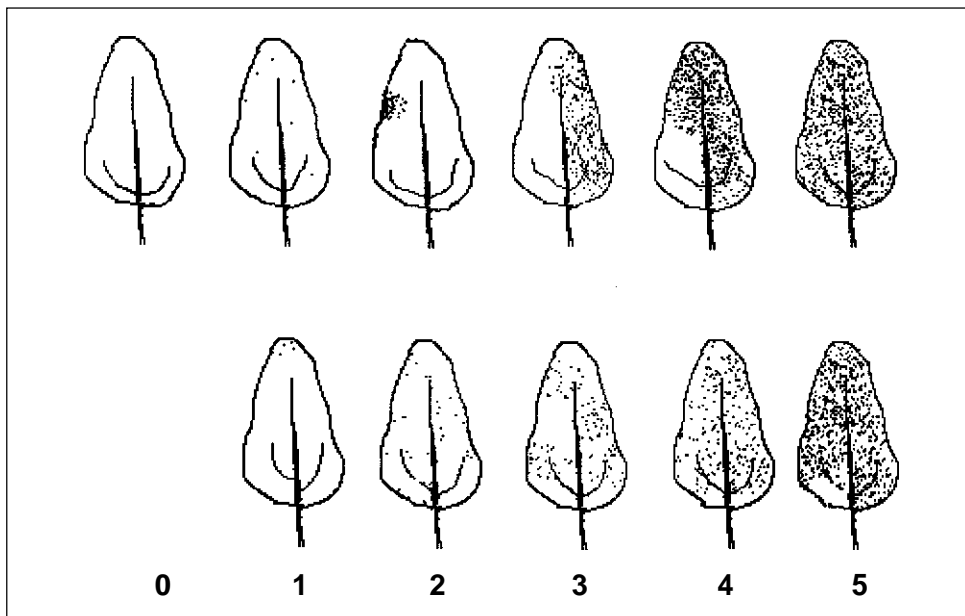
Contaje de esporangios

- Cortar una fracción de hoja con un área definida del centro de una lesión (por ejemplo con un sacabocado) y extraer los esporangios lavándolos con una suspensión de CuSO_4 (0.04M CuSO_4 /0.2M acetato de sodio, pH 5.4 con ácido acético, diluir en agua 1:1) en un tubo con 10 ml del líquido y agitar suavemente
- Colocar las fracciones de hoja de una unidad experimental (por ejemplo 4) juntas en un tubo. Los esporangios que se han extraído pueden guardarse en refrigeración por varios meses
- Contar los esporangios y calcular la concentración por área de hoja empleando una cámara de contaje

Índice de esporulación de *P. farinosa* en quinua en la prueba de hoja separada

- 0 = ausencia de esporulación
- 1 = uno a pocos esporangióforos simples, esporulación escasamente visible
- 2 = unos pocos esporangióforos agrupados o diseminados. Esporulación visible
- 3 = esporulación difusa en toda la hoja o esporulación densa en menos del 50% de la hoja
- 4 = esporulación moderada en toda la hoja o esporulación densa en más del 50%, pero menos del 90% de la hoja
- 5 = esporulación densa en más del 90% de la hoja

Protocolo 9



0 – 2 = Resistente; 3 – 5 = Susceptible

- Se calcula el promedio de cada unidad experimental

Índice de síntomas del mildiu de la quinua en prueba de plántulas (Ochoa *et al.*, 1999):

- 0 = ausencia de síntomas evidentes, ausencia de necrosis
- 1 = lesiones pequeñas clorótico-necróticas (2-5 mm) con micelio truncado en el mesófilo de la hoja
- 2 = lesiones cloróticas pequeñas (4-8 mm) con poca esporulación
- 3 = lesiones esporulantes, cloróticas definidas de tamaño mediano. Esporulación principalmente en la superficie inferior de la hoja
- 4 = lesiones cloróticas grandes no claramente definidas pero con esporulación. Esporulación principalmente en la superficie inferior de la hoja
- 5 = clorosis suave con abundante esporulación en ambas superficies de la hoja

0 – 2 = Resistente; 3 – 5 = Susceptible

- Se calcula el promedio de cada unidad experimental

EVALUACION DEL MILDIU EN EL CAMPO

Consideraciones

Evaluar una enfermedad en el campo es una tarea complicada y depende mucho de la persona que hace la evaluación. Se han ideado muchas escalas de evaluación de acuerdo a la enfermedad. Varias escalas proponen valores de 0 a 5 ó de 0 a 10 por ejemplo, pero en el caso de mildiu en quinua, es aconsejable determinar el porcentaje de área foliar afectada, el cual proporciona valores de mayor grado de discriminación. Sin embargo, el tamaño y follaje abundante de la planta de quinua dificulta severamente la determinación del porcentaje de área afectada en la planta entera. La evaluación es muy subjetiva y los datos poco comparables.

El método que aquí se propone para evaluar el mildiu en plantas de quinua en el campo elimina muchas fuentes de error porque está basado en la evaluación de la severidad (porcentaje de área afectada) en hojas individuales y no en plantas enteras.

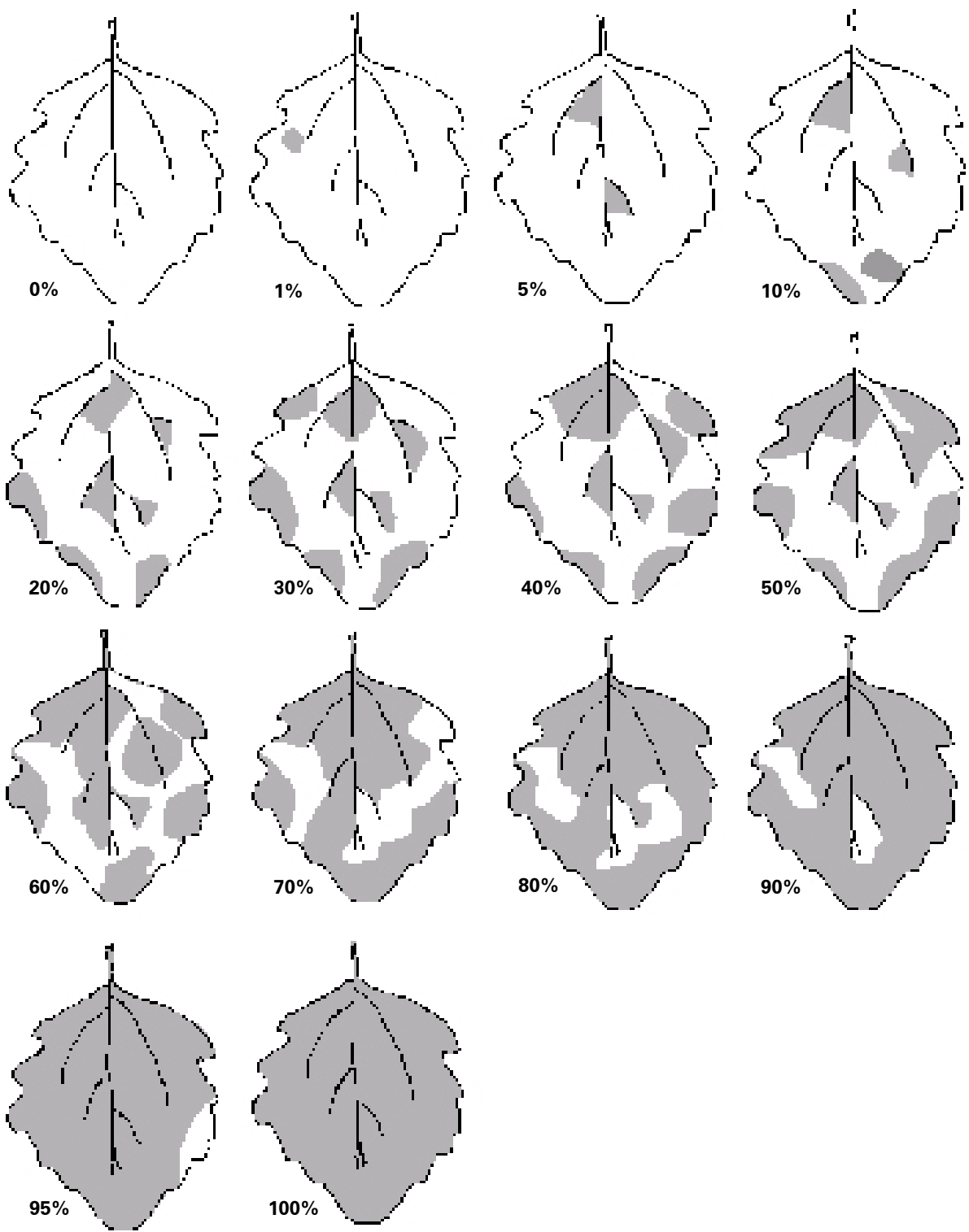
La escala propuesta no es una escala rígida, sino que los porcentajes intermedios (15%, 25% etc.) son igual de aplicables. El valor mínimo que indica presencia de la enfermedad es 1% por definición.

Si se realiza varias evaluaciones (mínimo 3) durante la campaña, los valores de severidad pueden ser utilizados para calcular el AUDPC (ver página 11) que es un parámetro útil para comparar resistencia/susceptibilidad entre diferentes cultivares de quinua y el comportamiento de cultivares bajo diferentes ambientes climáticos. Para el tamizado en el campo siempre se debe incluir un testigo positivo (un cultivar altamente susceptible) para tener un indicador del nivel de inóculo en el campo.

Procedimiento

- De cada parcela se escoge al azar el número de plantas que se considera necesario para obtener un valor representativo. Generalmente entre 6 y 10 plantas por parcela son suficientes
- De cada planta se escoge 3 hojas al azar, una de cada tercio
- Se evalúa el porcentaje de área afectada de cada hoja usando la escala adjunta. El promedio de las 3 lecturas equivale al valor de la severidad de cada planta

Porcentaje de área afectada por mildiu en quinua





FUTURE
HARVEST

El Centro Internacional de la Papa (CIP) busca reducir la pobreza y alcanzar la seguridad alimentaria sobre bases sustentables en los países en desarrollo, mediante la investigación científica y actividades relacionadas en papa, camote y otras raíces y tubérculos y un mejor manejo de los recursos naturales en los Andes y otras zonas de montaña.

El CIP pertenece a Future Harvest (Cosecha del Futuro), un grupo de centros que recibe la mayor parte de su financiamiento de los 58 gobiernos, fundaciones privadas y organizaciones internacionales y regionales que conforman el Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (CGIAR). Future Harvest promueve el reconocimiento y el apoyo a la investigación alimentaria y medioambiental como medio para lograr un mundo con menos pobreza, una comunidad humana más sana, niños bien alimentados y mayor salud ambiental. Future Harvest apoya la investigación, promueve la colaboración y auspicia proyectos para poner al servicio de las comunidades rurales, agricultores y familias de África, América Latina y Asia los resultados de la investigación.



ROYAL DANISH MINISTRY OF FOREIGN AFFAIRS



THE ROYAL VETERINARY AND AGRICULTURAL UNIVERSITY