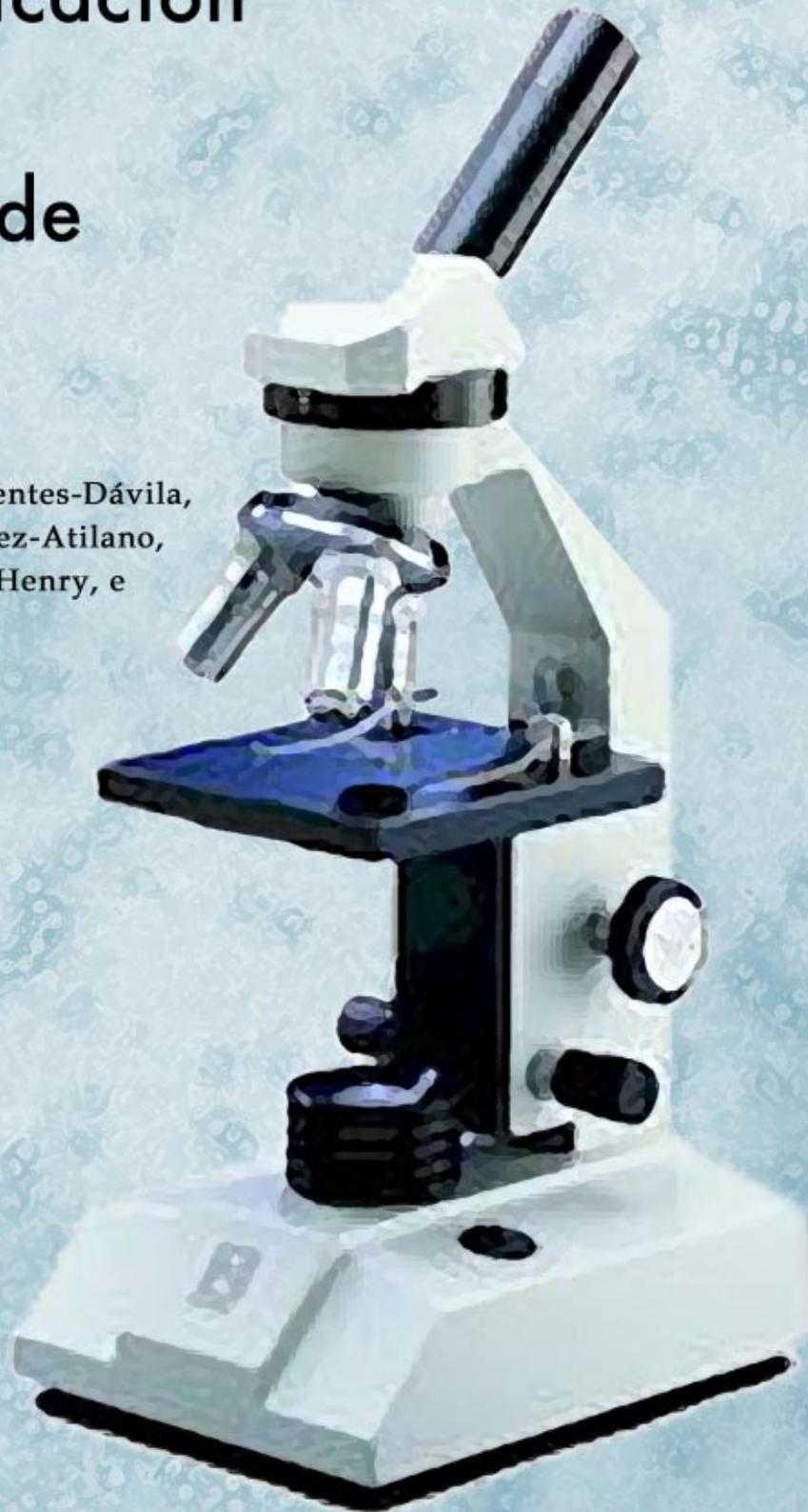


Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada

L. Gilchrist-Saavedra, G. Fuentes-Dávila,
C. Martínez-Cano, R.M. López-Atilano,
E. Duveiller, R.P. Singh, M. Henry, e
I. García A.

SEGUNDA EDICIÓN



Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada

L. Gilchrist-Saavedra, G. Fuentes-Dávila,
C. Martínez-Cano, R.M. López-Atilano, E. Duveiller,
R.P. Singh, M. Henry e I. García A.

SEGUNDA EDICIÓN

El Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT®) (www.cimmyt.org) es un organismo internacional, sin fines de lucro, que se dedica a la investigación científica y la capacitación relacionadas con el maíz y el trigo en los países en desarrollo. Basados en la solidez de nuestra ciencia y en nuestras asociaciones colaborativas, generamos, compartimos y aplicamos conocimientos y tecnologías con el objeto de incrementar la seguridad alimentaria, mejorar la productividad y la rentabilidad de los sistemas de producción agrícola, y conservar los recursos naturales. El CIMMYT recibe fondos para su agenda de investigación de varias fuentes, entre ellas, del Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (CGIAR) (www.cgiar.org), gobiernos nacionales, fundaciones, bancos de desarrollo e instituciones públicas y privadas.

© Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) 2005. Derechos reservados. Las designaciones empleadas en la presentación de los materiales incluidos en esta publicación de ninguna manera expresan la opinión del CIMMYT o de sus patrocinadores respecto al estado legal de cualquier país, territorio, ciudad o zona, o de las autoridades de éstos, o respecto a la delimitación de sus fronteras. El CIMMYT autoriza el uso razonable de este material, siempre y cuando se cite la fuente.

Cita correcta: Gilchrist-Saavedra, L., G. Fuentes-Dávila, C. Martínez-Cano, R.M. López-Atilano, E. Duveiller, R.P. Singh, M. Henry e I. García A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México, D.F.: CIMMYT.

ISBN: 968-6923-50-0

Descriptores AGROVOC: Trigo; cebada; enfermedades de plantas; enfermedades fungosas; epidemiología; identificación; métodos

Códigos de categorías AGRIS: H20

Clasificación decimal Dewey: 633.1194

Edición: Alma McNab

Diseño y formateo: Marcelo Ortiz S.

Impreso en México.

Contenido

Prólogo	vi
Capítulo 1. Aspectos generales	
Recolección de muestras	1
Conservación de muestras	1
Requerimientos básicos de un laboratorio de fitopatología	3
Aparatos básicos	3
Asepsia	5
Esterilización	5
Desinfección	6
Medios de cultivo	7
Tipos de medios	7
Determinación del medio de cultivo	7
Preparación de medios de cultivo	8
Preparación de cámaras húmedas	10
Preparación de especímenes para observación al microscopio	11
Obtención de cultivos monospóricos	13
Cálculo de la concentración de inóculo	13
Inoculación en invernadero	17
Capítulo 2. Basidiomycetes	
Introducción	19
Las royas	19
Monitoreo de una población de roya de la hoja	20
Preguntas	21
Carbones	23
Identificación de carbón volador (<i>Ustilago tritici</i>) y carbón parcial (<i>Tilletia indica</i>)	23
Aislamiento	24
Incremento del inóculo	24
Métodos de inoculación	24
Capítulo 3. Ascomycetes	
Introducción	26
Identificación del tizón o mancha foliar causada por <i>Cochliobolus sativus</i> (anam. <i>Bipolaris sorokiniana</i>) (sin. <i>Helminthosporium sativum</i>)	26
Sintomatología y aislamiento del patógeno	27
Incremento del inóculo	27
Conservación de las cepas	27
Identificación del tizón foliar, mancha amarilla o mancha bronceada causada por <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> (anam. <i>Drechslera tritici-repentis</i>)	28
Sintomatología y aislamiento del patógeno	28
Incremento del inóculo e inoculación	28

Identificación de manchas causadas por <i>Pyrenophora</i> en cebada	30
Sintomatología y aislamiento del patógeno	30
Incremento, preparación del inóculo e inoculación	30
Identificación del tizón foliar causado por <i>Mycosphaerella graminicola</i> (anam. <i>Septoria tritici</i>) y tizón de las glumas causado por <i>Phaeosphaeria nodorum</i> (anam. <i>Stagonospora nodorum</i>) [ex. <i>Septoria nodorum</i>]	31
Sintomatología y aislamiento del patógeno	31
Incremento del inóculo e inoculación	31
Identificación de fusariosis o roña de la espiga causada por <i>Fusarium</i> spp.	33
Sintomatología y aislamiento del patógeno	33
Preparación del inóculo e inoculación en campo	33
Conservación de las cepas	34
 Capítulo 4. Deuteromycetes	
Introducción	36
Identificación de punta negra causada por <i>Alternaria alternata</i>, <i>A. triticina</i> y/o <i>Bipolaris sorokiniana</i>	36
Sintomatología y aislamiento del patógeno	33
Identificación de escaldadura de la cebada causada por <i>Rhynchosporium secalis</i>	33
Sintomatología y aislamiento del patógeno	37
Incremento del inóculo e inoculación	37
 Capítulo 5. Hongos del suelo, la corona y las raíces	
Introducción	39
Sintomatología de <i>Fusarium</i> y <i>Bipolaris sorokiniana</i> (sin. <i>Helminthosporium sativum</i>)	39
Aislamiento e identificación de <i>Fusarium</i>	39
Preparación del inóculo e inoculación en raíces	41
Aislamiento e identificación de <i>Bipolaris sorokiniana</i>	42
Sintomatología de <i>Pythium</i>, <i>Gaeumannomyces</i> y <i>Rhizoctonia</i>	43
<i>Pythium</i>	43
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> (sin. <i>Ophiobolus graminis</i>), mal del pie	43
<i>Rhizoctonia</i>	43
Aislamiento de <i>Pythium</i> , <i>Gaeumannomyces</i> y <i>Rhizoctonia</i>	43
Identificación de <i>Pythium</i>	45
Método para inducir la producción de zoosporas	46
Identificación de <i>Gaeumannomyces</i>	46
Identificación de <i>Rhizoctonia</i>	46
Identificación de <i>Sclerotium rolfsii</i>	46

Capítulo 6. Nematodos

Introducción	48
Nematodos fitopatógenos del suelo: Identificación de especies parásitas y saprófitas	48
Esquemas de muestreo	48
Métodos para extraer nematodos de muestras de suelo o de tejido vegetal	50
Comparación de dos métodos para extraer nematodos de muestras de suelo o	51
de tejido vegetal	
Identificación de especies del género <i>Meloidogyne</i>	51
Metodología para obtener cortes perineales en hembras del género <i>Meloidogyne</i>	51
Metodología para obtener cultivos puros, y mantener e incrementar nematodos	52

Capítulo 7. Bacterias

Introducción	53
Identificación de una enfermedad bacteriana	53
Prueba de patogenicidad	54
Pruebas bioquímicas y fisiológicas	56

Capítulo 8. Virus

Introducción	58
Virus del enanismo amarillo de la cebada (BYDV)	58
Identificación de los áfidos vectores del BYDV-CYDV	59
Transmisión del BYDV-CYDV	59
Detección mediante la técnica ELISA	60
Virus del mosaico estriado de la cebada (BSMV)	60
Transmisión del BSMV	60
Detección de la transmisión del virus por semilla	61
Virus del mosaico estriado del trigo (WSMV)	61
Detección mediante la técnica ELISA	61
Mosaico del trigo transmitido por el suelo (SbWMV) y mosaico estriado ahusado del trigo (WSSMV)	62

Apéndice 1

Medios sintéticos y naturales	63
Medios que se utilizan para la conservación o multiplicación de hongos	66

Apéndice 2

Medios de cultivo para el aislamiento, incremento y conservación de varios patógenos de cereales	68
---	----

Prólogo

Un aspecto fundamental de los programas de fitomejoramiento –en este caso, de trigo y cebada– es la selección de germoplasma con resistencia a enfermedades. Para cumplir con sus objetivos, el programa de trigo del CIMMYT continúa, de forma sistemática y constante, con la tarea de producir epifitias artificiales para la selección de materiales resistentes a distintos patógenos. Con ese fin se trabaja intensamente en el laboratorio en desarrollar e incrementar las estructuras patogénicas que se aplicarán en campo. Al mismo tiempo, se continúa buscando y adaptando metodologías prácticas y eficientes para realizar esta tarea.

Esta guía práctica puede servir de herramienta para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada, y de sus agentes causales; asimismo, puede ser útil para aprender a manipular esos patógenos, tanto en el laboratorio como en el campo y el invernadero. Los autores no pretendieron elaborar una obra exhaustiva, sino que trataron de incluir los patógenos más importantes que afectan estos cereales en los países en vías de desarrollo.

Cabe señalar que esta guía está orientada hacia investigadores que trabajan en el área de la fitopatología en apoyo a programas de mejoramiento genético de cereales menores que buscan generar germoplasma con resistencia a enfermedades.

El objetivo principal de esta guía revisada es proveer información sobre la metodología para reconocer algunas de las principales enfermedades de trigo, cebada y triticale, y también describir protocolos prácticos de laboratorio específicamente para facilitar el incremento del inóculo que se usa en los programas de mejoramiento. La intención es que sea utilizada por técnicos, estudiantes, maestros y personal del mismo CIMMYT. Sin embargo, será también de gran utilidad para técnicos y extensionistas agrícolas quienes generalmente no cuentan con el apoyo de un fitopatólogo que identifique los problemas de enfermedades que enfrentan.

Capítulo 1 Aspectos generales

Recolección de muestras

Las colecciones de muestras de material enfermo son bastante útiles en el conocimiento y estudio de la sintomatología de enfermedades, así como en la formación de poblaciones representativas del patógeno. Estos aislamientos se usarán posteriormente para inocular poblaciones del hospedero, reproducir los síntomas y seleccionar germoplasma resistente.

Al recolectar el material en el campo, deben tomarse en consideración varios aspectos importantes, como son el estado fenológico de la planta al momento de la recolección, la parte de la planta que se va a tomar, el desarrollo de la lesión y las condiciones ambientales en ese momento. Para cada muestra deben anotarse los datos de recolección, como localidad, fecha, rotación de cultivos y sistema de manejo del suelo (convencional, labranza mínima o cero labranza), cultivo y variedad, junto con una descripción de los síntomas.

Conservación de muestras

Al recolectar muestras en el campo, éstas se pueden colocar en bolsas de papel, o de plástico, a menos que el ambiente esté muy caliente y húmedo, ya que esto estimula el desarrollo de hongos saprófitos. Tan pronto como se tenga oportunidad, las muestras deben ponerse a secar. En general, el uso de bolsas de plástico se recomienda sólo en caso de emergencia o si no se cuenta con otro tipo de material.

Para el secado puede utilizarse (si se tiene) una prensa (véanse las instrucciones para su elaboración) en donde la hoja se acomoda de tal forma que los síntomas sean fácilmente visibles. Cuando se trata de hojas y hay diferencia entre haz y envés, se recomienda poner dos hojas, una con el haz hacia arriba y la otra con el envés. Si no se cuenta con una prensa, se puede utilizar papel periódico o secante, acomodando de igual forma las muestras y colocando un peso sobre ellas.

Una vez seca la muestra, se transfiere y se adhiere a una hoja de diagnóstico en donde se anotan todos los datos correspondientes. Si se cuenta con un laboratorio, se procede a realizar observaciones al microscopio o aislamientos con el fin de identificar el agente causal de la enfermedad. Todo lo observado durante el proceso de identificación (síntomas, signos, morfología) debe añadirse a la hoja de diagnóstico (Figura 1; Zillinsky, 1983). De esta manera se forma un muestrario de las enfermedades más importantes de la región, con datos que ayudarán a realizar identificaciones posteriores y a entender la problemática fitosanitaria del área de trabajo.

Construcción de una prensa. La prensa consta esencialmente de dos bases de un material fuerte y durable (por ejemplo, madera) (Figura 2 a, b). Se acomodan y se clavan tiras de madera de 1.5 pulgadas de ancho para formar un rectángulo de 30.5 cm (12") x 46 cm (18"), como se muestra en la Figura 2 b (las medidas pueden ajustarse a las necesidades). Entre estas dos bases se coloca papel periódico que servirá para el secado de las muestras. Para hacer presión y mantenerla durante el tiempo requerido, se necesita un par de correas de aproximadamente 2.54 cm (1") de ancho, que se aprietan como se muestra en la Figura 2 b.

Si las muestras se van a utilizar como base para iniciar una colección de la población del patógeno, es necesario secar cada muestra durante 48 horas, cuidando que esté bien identificada. Después se guardan las muestras en los sobres de papel correspondientes. Se aconseja introducir estos sobres en una bolsa de plástico que luego se sella para que no penetre la humedad del refrigerador. Conservar en refrigeración a 4 °C.

Requerimientos básicos de un laboratorio de fitopatología

Una de las actividades más importantes de la fitopatología es el trabajo en el laboratorio; ahí se realiza investigación básica, se aíslan e identifican patógenos y se produce inóculo para inducir epifitias en forma artificial en campo o invernadero, en apoyo a los programas de mejoramiento genético.

Aparatos básicos

Entre los aparatos indispensables y/o convenientes en un laboratorio figuran esterilizadores, autoclaves (eléctricos o de gas) y estufas, cámaras de aislamiento, incubadoras, microscopios, estereoscopios y un baño maría.

Autoclave. Consiste primordialmente en una cámara de esterilización por medio de calor húmedo. El vapor en su interior alcanza una temperatura de 120 °C y una presión de 18 lb/pulgada² (1.4 kg/cm²). El calor puede provenir de una fuente eléctrica o de un mechero de gas, como es el caso de la olla de presión. Esta puede funcionar como un autoclave grande y tiene la ventaja de ser de bajo costo. Ambos aparatos se usan preferentemente para esterilizar medios de cultivo, pero también se pueden utilizar para esterilizar tierra, arena, vermiculita o cualquier otro sustrato usado para el crecimiento de plantas o microorganismos.

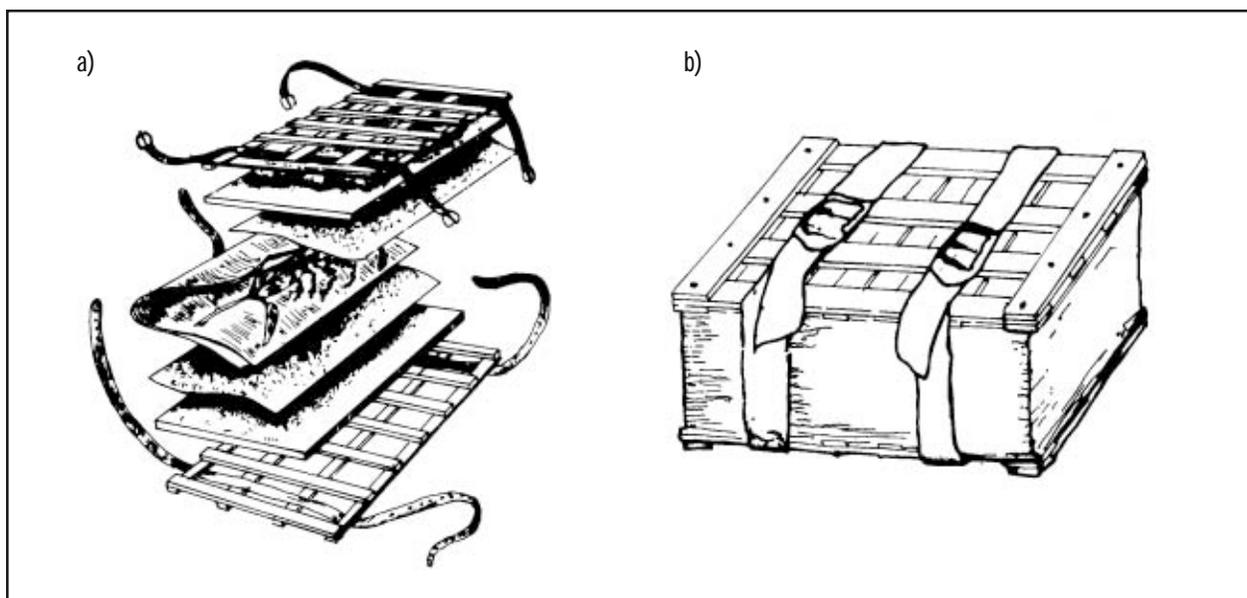


Figura 2 a. Partes de una prensa. b. Prensa construida.

Estufa. Con ella se pueden obtener, por medio de calor seco, diferentes temperaturas que se utilizan para distintos propósitos –por ejemplo, para secar material vegetal o tierra a una temperatura constante o esterilizar materiales de vidrio a altas temperaturas.

Cámaras de aislamiento. Entre éstas figuran las cámaras de flujo laminar con un mecanismo que permite que el aire fluya hacia afuera a través de filtros, a fin de crear condiciones de esterilidad y prevenir la contaminación. Si no se cuenta con este tipo de cámara, existen otras pequeñas (*microvoids*) que funcionan con un mecanismo similar, o bien, puede acondicionarse un cuarto pequeño sin corrientes de aire y, con la ayuda de un mechero, evitar la contaminación.

Incubadoras. Estas pueden ser calibradas a diferentes rangos y combinaciones de luz y temperatura, a fin de lograr las condiciones óptimas para el crecimiento de los diferentes organismos con que se esté trabajando. Si no existen los medios para adquirir una incubadora, se puede construir una de madera, agregando tubos fluorescentes que generen luz con longitud de onda cercana al UV y controlando las horas luz/obscuridad con un reloj control (Figura 3 a y b). Estas incubadoras tienen el inconveniente de no tener control de temperatura. Por tanto, es aconsejable ubicarlas en lugares donde la temperatura fluctúe entre los 15 y 22 °C, rango en que se desarrolla una gran proporción de los patógenos de plantas.

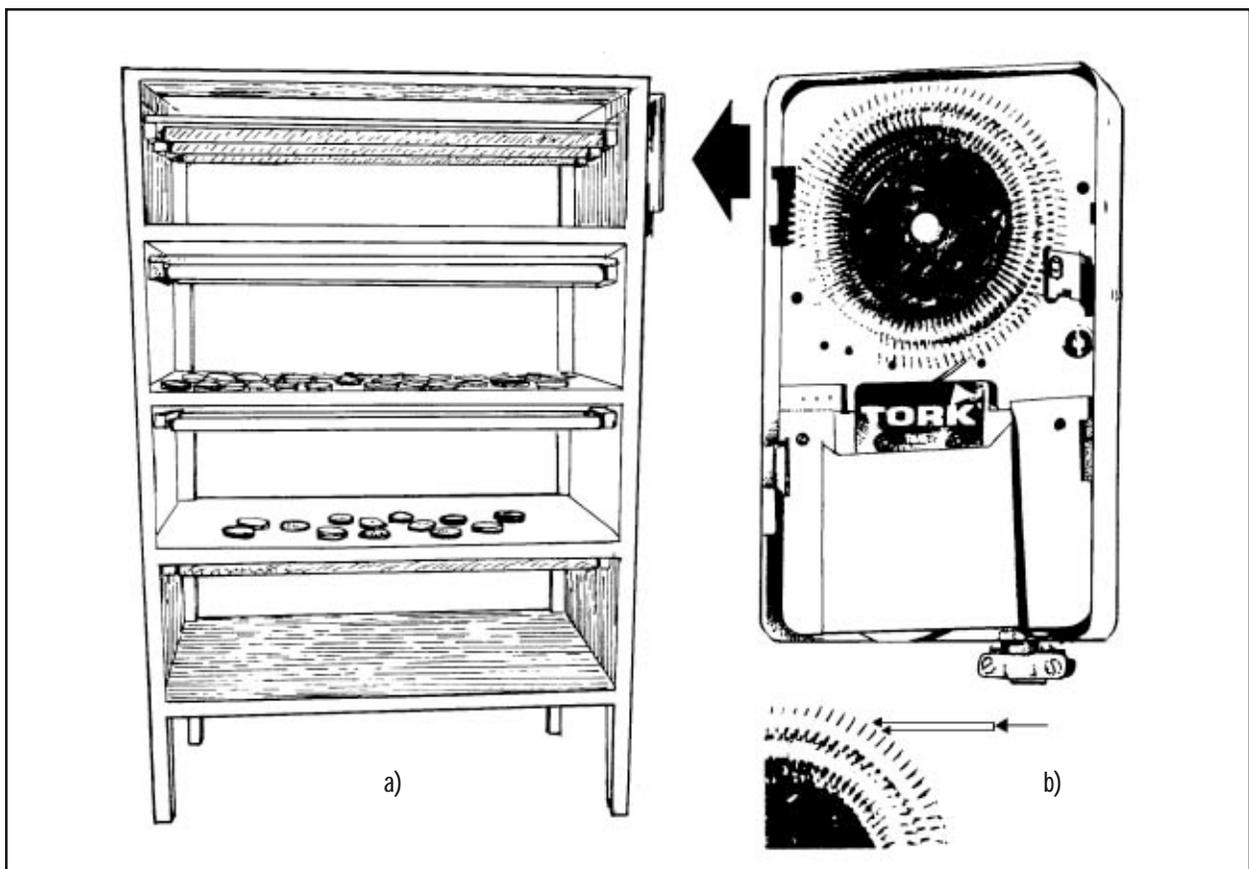


Figura 3 a. Cámara de crecimiento de construcción artesanal. b. Reloj control para regular la iluminación.

Refrigeradores. Estos son esenciales principalmente para el almacenamiento de muestras vegetales, cultivos, reactivos, etc.

Baño maría. Este aparato consta de un recipiente en el que el agua se puede mantener a temperaturas constantes. El baño maría tiene varios usos. Por ejemplo, se pueden colocar en él (a una temperatura de 46 °C) matraces con medios de cultivos recién esterilizados antes de vaciarlos en las cajas Petri. El baño maría es indispensable en experimentos para medir el crecimiento de algunos organismos en medios líquidos en condiciones de temperaturas exactas, y estudios en virología y bacteriología, entre otros.

Microscopios y estereoscopios. Son indispensables para la identificación y clasificación de patógenos, la observación de síntomas y diferentes tipos de daño, así como la evaluación de experimentos.

Asepsia

En un laboratorio de fitopatología la asepsia es primordial, ya que en la mayoría de los casos se debe trabajar en ambientes lo más estériles posible. Por esta razón es importante contar con cuartos de aislamiento y/o cámaras de flujo laminar (o similares) en las que se pueda trabajar con el patógeno sin riesgos de contaminación. Los riesgos de contaminación pueden provenir de diversos factores, como los utensilios de trabajo y las mismas manos del laboratorista. Los utensilios de trabajo (pinzas, navajas, asas, etc.) deben ser esterilizados cada vez que se usan, pasándolos por alcohol y subsecuentemente flameándolos. En cuanto a las manos, es recomendable lavarlas y limpiarlas con alcohol cada vez que se vaya a trabajar en condiciones estériles.

Algunos hongos que se encuentran como saprófitos en la mayoría de las muestras vegetales y en el ambiente del laboratorio, o donde se trabaje la muestra, tienen gran capacidad de crecimiento y reproducción, por lo que es muy importante tener cuidado al trabajar. Al laboratorio debe introducirse la menor cantidad de material vegetal posible (las muestras deben limitarse al mínimo) y, sobre todo, no manejarlo como inóculo dentro del laboratorio. En esta forma se evita la contaminación del área de trabajo del laboratorio, que es muy difícil de controlar una vez que ha ocurrido.

La contaminación por ácaros también es común, sobre todo en cajas Petri de vidrio que se han deformado como consecuencia de la esterilización con calor seco. Los ácaros pueden invadir cajas o tubos mal sellados y contaminar los cultivos; esta contaminación es muy difícil de erradicar. Por lo tanto, es necesario desinfectar el material vegetal proveniente del campo, tomar precauciones con cultivos procedentes de otros laboratorios, sellar bien los tubos y cajas, fumigar las incubadoras, etc. Si se tiene contaminación con ácaros, se recomienda sacar todo el contenido de las incubadoras y estufas, elevar la temperatura por sobre los 50 °C durante un par de horas y repetir el procedimiento dos días después.

Para evitar estos problemas, no se debe introducir material vegetal sin control. Se recomienda, además, limpiar regularmente los mesones de trabajo con alcohol o con hipoclorito de sodio.

Esterilización

Dado que las técnicas de aislamiento, identificación y multiplicación de inóculo, así como los estudios biológicos y fisiológicos de patógenos, requieren de cultivos puros, las condiciones estériles son esenciales. Para esterilizar materiales, aparatos y zonas de trabajo se debe eliminar o inactivar toda célula viviente (microorganismos). La esterilización se logra exponiendo los materiales a agentes físicos letales que destruyan irreversiblemente la estructura protoplasmática de los microorganismos y los eliminan. Se elige el método de esterilización según la eficiencia y seguridad que se requiera, tomando en cuenta la toxicidad, la disponibilidad y el costo, así como también el efecto del agente esterilizante sobre las propiedades del objeto que será esterilizado.

Los métodos físicos más comunes para la esterilización son el calor y las radiaciones iónicas y, en el caso de algunos líquidos, la ultrafiltración. La esterilización por calor es utilizada cuando el material a esterilizar no es dañado por las temperaturas altas, que pueden obtenerse en condiciones secas o húmedas.

Calor seco. Es utilizado para la esterilización de instrumentos de vidrio, metal y algunos plásticos. Este tipo de esterilización requiere de una mayor temperatura y un período más largo de exposición que aquélla con calor húmedo. Se necesitan, además, estufas y hornos de aire caliente que suministren calor en forma uniforme. Comúnmente el tiempo requerido para la esterilización es inversamente proporcional a la temperatura utilizada: 1 h a 180 °C, 2 h a 170 °C, 4 h a 150 °C y 12 ó 16 h a 120 °C. El tiempo de esterilización debe tomarse a partir del momento en que los objetos hayan alcanzado la máxima temperatura establecida. Para esterilizar materiales de vidrio, es necesario que éstos estén completamente secos, de lo contrario pueden quebrarse. No deben esterilizarse materiales graduados con este método, ya que el calor puede alterar sus dimensiones. Una vez alcanzado el tiempo de esterilización, es conveniente dejar el material en el horno o estufa y esperar a que regrese a la temperatura ambiente para evitar que se quiebre.

Calor húmedo. Este se logra por medio de presión de vapor de agua en un autoclave. Es el método de esterilización más conveniente para la mayoría de los materiales, por ser más rápido y tener mayor poder de penetración en un tiempo y temperatura menores que cuando se usa calor seco. Para la mayoría de los propósitos de esterilización, el tiempo y la temperatura son 20 min a 121 °C o 30 min a 115 °C. Es importante desalojar todo el aire contenido dentro de la cámara antes de cerrar la válvula; de lo contrario, la temperatura no subirá. El tiempo de esterilización debe comenzar a considerarse una vez que se ha alcanzado la temperatura y presión deseadas (18 lb/pulgada² ó 1.4 kg/cm²). Se recomienda usar calor húmedo para materiales líquidos, plásticos (precaución: no todos lo soportan), tierra, arena y vermiculita.

Luz ultravioleta. Se utiliza en la esterilización porque resulta letal para los microorganismos. Es recomendable para esterilizar material de plástico, pero no de vidrio, dado que los rayos son demasiado débiles para penetrarlo. Este sistema debe utilizarse en cámaras cerradas, teniendo cuidado de no entrar cuando esté prendido, ya que causa daño a los ojos.

Ultrafiltración. Se utiliza especialmente cuando se desea preservar intactas las proteínas que sufren desnaturalización o descomposición de algunos azúcares por las temperaturas de esterilización. Los filtros que se usan en estos casos son de diferente consistencia, con dimensiones específicas para evitar el paso de microorganismos contaminantes. Se utiliza este método durante el proceso de identificación de bacterias.

Desinfección

Cuando se desea eliminar microorganismos contaminantes de objetos que no se pueden someter a esterilización, lo más conveniente es la desinfección mediante sustancias como cloruro de mercurio, hipoclorito de sodio, alcohol o bromuro de etileno. Las sustancias de uso más común son el hipoclorito de sodio y el alcohol, a diferentes concentraciones, dependiendo del objeto que se desee desinfectar. En el aislamiento de organismos patógenos, estos compuestos son útiles para eliminar los contaminantes presentes en las muestras; por ejemplo, el hipoclorito se usa al 1% para material vegetal (hojas, raíces) y del 3 al 5% para semillas. El alcohol al 70% es muy utilizado, principalmente para desinfectar superficies e incluso material vegetal.

Medios de cultivo

Al identificar las enfermedades de plantas, es recomendable aislar los microorganismos que son posibles agentes patógenos. Para lograr este objetivo, los microorganismos (principalmente hongos y bacterias) se aíslan en medios de cultivo artificiales, con el fin de poder purificarlos y estimular su esporulación para la producción de inóculo. Éste se utiliza en la inoculación de plantas para reproducir síntomas, paso necesario en la identificación de patógenos (postulados de Koch). En el apéndice 2 (p. 68) se resume toda la información acerca de los medios de cultivo que se utilizan para el crecimiento y conservación de los distintos patógenos que atacan los cereales.

Tipos de medios

Los medios de cultivo son combinaciones de sustancias o soluciones que permiten el crecimiento de uno o más organismos. Pueden ser sólidos o líquidos; la única diferencia es que los sólidos contienen agar, se preparan en frascos, cajas Petri o tubos de cultivo, y se utilizan para aislar y mantener hongos y bacterias. Los medios líquidos se usan principalmente para incrementar las poblaciones de hongos y bacterias, y determinar sus propiedades fisiológicas, ya sea en condiciones estáticas o en agitación. Esta última permite una mayor aireación, que, a su vez, ayuda a lograr un crecimiento uniforme y mantener la patogenicidad. Los medios se pueden agrupar, según su composición, en:

Carentes de nutrientes, o de nutrición muy pobre. Estos son utilizados para obtener cultivos monospóricos, aislar patógenos que se encuentran en el tejido vegetal del cual tomarán los nutrientes, y también para forzar la esporulación de algunos hongos. El más común de estos medios es el llamado agar-agua.

Nutritivos. Entre éstos figuran los naturales, los semi-sintéticos y los sintéticos. Los naturales contienen únicamente tejidos vegetales (como hojas, raíces, vainas y granos), en trozo o macerados, que han sido esterilizados. Los semi-sintéticos contienen sustancias naturales (extractos de animales y extractos o preparados vegetales, como harina de maíz y hojuelas de avena) y elementos sintéticos. Todo el contenido de los sintéticos está químicamente definido, y pueden ser reproducidos en forma específica cuando son requeridos.

Algunos medios sintéticos y semi-sintéticos vienen en forma deshidratada y sólo se les agrega agua.
Todo medio de cultivo debe elaborarse con agua destilada.

Determinación del medio de cultivo

Se determina el medio de cultivo que debe utilizarse dependiendo de la tarea a realizar: aislamientos, estudios biológicos y fisiológicos de un hongo (para los que hay que producir estructuras sexuales o asexuales), o bien, la producción de inóculo. El tipo de medio es de suma importancia, ya que de él depende que el organismo mantenga su patogenicidad y capacidad de producir propágulos de reproducción. Otro factor importante en los medios de cultivo es el pH que, en el caso de los hongos, debe ser de 5.8 a 6.5, según las necesidades del organismo en cuestión.

Algunos factores físicos (como la aereación, luz, humedad y temperatura) afectan el crecimiento y la esporulación de los patógenos. El nivel máximo y el mínimo de estos factores, así como el punto óptimo para la esporulación y el crecimiento, varían según el organismo en estudio. La esporulación generalmente requiere de condiciones que son adversas para el crecimiento vegetativo.

Preparación de medios de cultivo

Durante la práctica de laboratorio de un curso básico, se recomienda elaborar dos medios de cultivo, papa dextrosa agar (PDA) y agar-agua (AA), considerados los más importantes por su uso tan frecuente. En cuanto a los demás medios, en la sección correspondiente a cada patógeno se indica cual (o cuales) medio(s) conviene usar; su proceso de elaboración aparece en el apéndice 1 (p. 63).

Al preparar medios de cultivo, vale la pena tomar en cuenta algunos detalles que facilitan el trabajo. Conviene, por ejemplo, tomar la precaución de ocupar sólo la mitad de la capacidad del matraz, para evitar que el contenido, al saltar en el interior durante la esterilización, ensucie el tapón. La boca del matraz se cubre con un tapón de algodón o papel aluminio, o bien con ambos. Una vez esterilizado, el medio no debe ser destapado si no se tienen condiciones estériles o un mechero cerca; se recomienda ponerlo en baño maría a 46 °C durante 30 min. Si no se cuenta con el baño, es conveniente esperar a que el medio se enfríe un poco antes de vaciarlo en las cajas Petri. (Una forma práctica de saber en qué momento se debe vaciar es tocar con el dorso de la mano el matraz que contiene el medio; cuando la piel detecta un calor agradable es el momento de vaciar.) Con esto se evita que se forme condensación en las cajas, pues ésta puede fomentar la contaminación. El medio debe vaciarse dentro de una cámara estéril o cuarto sin corrientes de aire, utilizando un mechero como auxiliar para prevenir la contaminación. Se recomienda flamear la boca del matraz, no abrir demasiado la caja Petri y tratar de reducir al mínimo la distancia entre el matraz y la caja (Figura 4).

Es conveniente vaciar el medio 24 a 48 horas antes de utilizarlo a fin de permitir que seque la condensación producida durante el proceso de vaciado. Para evitar que se forme parte de esta condensación, se recomienda apilar las cajas al ir las llenando (Figura 4).

Cuando el medio se va a utilizar en tubos, matraces u otros recipientes, es posible homogeneizarlo mediante calor, como sigue: se coloca el medio en los recipientes (Figura 5 a); éstos se tapan, se esterilizan y se dejan enfriar en la posición deseada. Los tubos de cultivo generalmente se ponen en posición inclinada a fin de incrementar el área donde crecerá el organismo (Figura 5 b).

Medios de cultivo que se utilizan para el aislamiento y crecimiento de hongos. A fin de identificar y estudiar los patógenos, es necesario aislar y cultivarlos. Por tanto, se recomienda practicar la preparación de algunos de los medios de cultivo más utilizados, como los dos que se describen a continuación.

Agar-agua (AA). Suele utilizarse para aislar y hacer germinar esporas, obtener cultivos monospóricos y verificar la viabilidad del inóculo.

Componentes:	
Agar	15-20 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: en el matraz, diluir el agar en agua destilada (ocupar sólo la mitad de la capacidad del matraz) y esterilizar.

Papa-dextrosa-agar (PDA). Este medio es el más utilizado para el aislamiento, crecimiento y almacenamiento de hongos, pues es apropiado para numerosas especies.

Componentes:	
Papas partidas	250 g
Dextrosa	10 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: se hierven las papas en 500 a 750 ml de agua destilada durante 15 a 20 minutos. La suspensión se filtra y se pasa por una gasa. Este filtrado se coloca en un matraz, se le agrega la dextrosa y el agar, y luego se afora con agua destilada hasta 1000 ml. Se sella el matraz con un tapón de algodón o papel de aluminio y se esteriliza. Se deja enfriar un poco y se vacía la suspensión en cajas de Petri (llenando a la mitad). Conforme se van llenando, las cajas se apilan para evitar la condensación.

En muchos países se vende en el mercado PDA deshidratado que se prepara agregando agua destilada en la proporción señalada por el fabricante y esterilizando como sigue. Pesar 9.75 g de PDA preparado y deshidratado en un matraz de 500 ml; agregar 250 ml de agua destilada. La suspensión se calienta hasta homogeneizarla; luego se colocan 4 a 5 ml de medio en cada tubo de ensayo utilizando una jeringa. Los tubos se cierran y esterilizan, y se ponen a enfriar en posición inclinada hasta que el medio se solidifica (Figura 5 b). Si no se tiene una jeringa dosificadora para llenarlos, se usa un embudo sostenido en una plataforma de metal. Ajustar un pedazo de manguera flexible en la parte terminal del embudo, controlando la salida con una pinza Mohr. La cantidad deseada de medio se mide en un tubo que se usa en forma constante como patrón de medida durante el proceso de llenado (Figura 5 a).

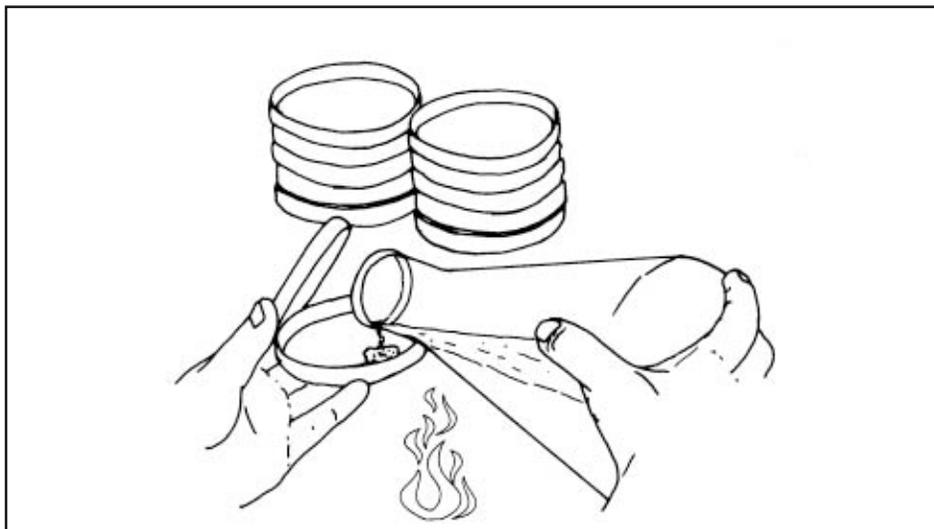


Figura 4. Forma de vaciar un medio de cultivo y evitar la condensación.

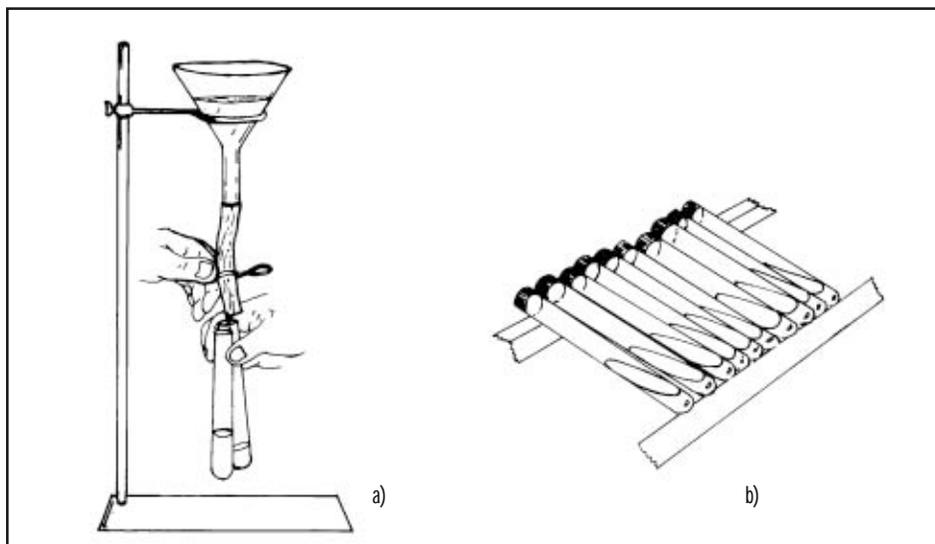


Figura 5 a. Proceso de llenado de tubos de ensayo con medio de cultivo. b. Posición de enfriado de los tubos con medio de cultivo, que permite obtener una mayor área de crecimiento.

Bibliografía

- Barnes, E.H. 1968. *Atlas and Manual of Plant Pathology*. New York: Plenum Press.
- French, E.R. y T.H. Teddy. 1982. *Métodos de investigación fitopatológica*. Primera edición. Primera reimpresión. San José: IICA.
- Tuite, J. 1969. *Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria*. Department of Botany and Plant Pathology, Purdue University. Lafayette, Indiana.
- Waller, J.M., Lenne, J.M. y Waller, S.J. 2001. *Plant Pathologist's Pocketbook*. Tercera edición. CABI Publishing, Wallingford, Reino Unido. 516 p.

Preparación de cámaras húmedas

Las cámaras húmedas son un medio rápido y directo para obtener esporulación y ayudar a identificar los agentes causales de algunas enfermedades. Son de especial utilidad con microorganismos que crecen rápidamente sobre el hospedero y compiten bien con los saprófitos dentro de la cámara húmeda.

Preparación: Cortar las hojas, tallos, etc., en pedazos pequeños y, con la ayuda de cinta scotch, acomodarlos sobre un portaobjeto estéril. Esterilizar los pedazos con hipoclorito al 5% durante 30 a 60 segundos; pasar las muestras por agua estéril para eliminar el exceso de hipoclorito y secar el material vegetal sobre toalla de papel. Algunos patógenos son muy sensibles a la esterilización y, por esta razón, se dejan trozos sin tratar. Se recomienda escoger tejido que no esté demasiado dañado o con lesiones muy avanzadas para evitar la presencia de saprófitos. En una caja Petri, colocar papel filtro humedeciéndolo con agua estéril (Figura 6 a), poner el portaobjeto sobre el papel (Figura 6 b) y sellar la caja con cinta o parafilm para mantener la humedad (Figura 6 c). Incubar la caja a 18-22 °C y exponerla a luz y oscuridad en forma alterna (10 h de luz / 14 h de oscuridad) (sin esta alternancia muchos hongos no desarrollan la fase reproductiva).

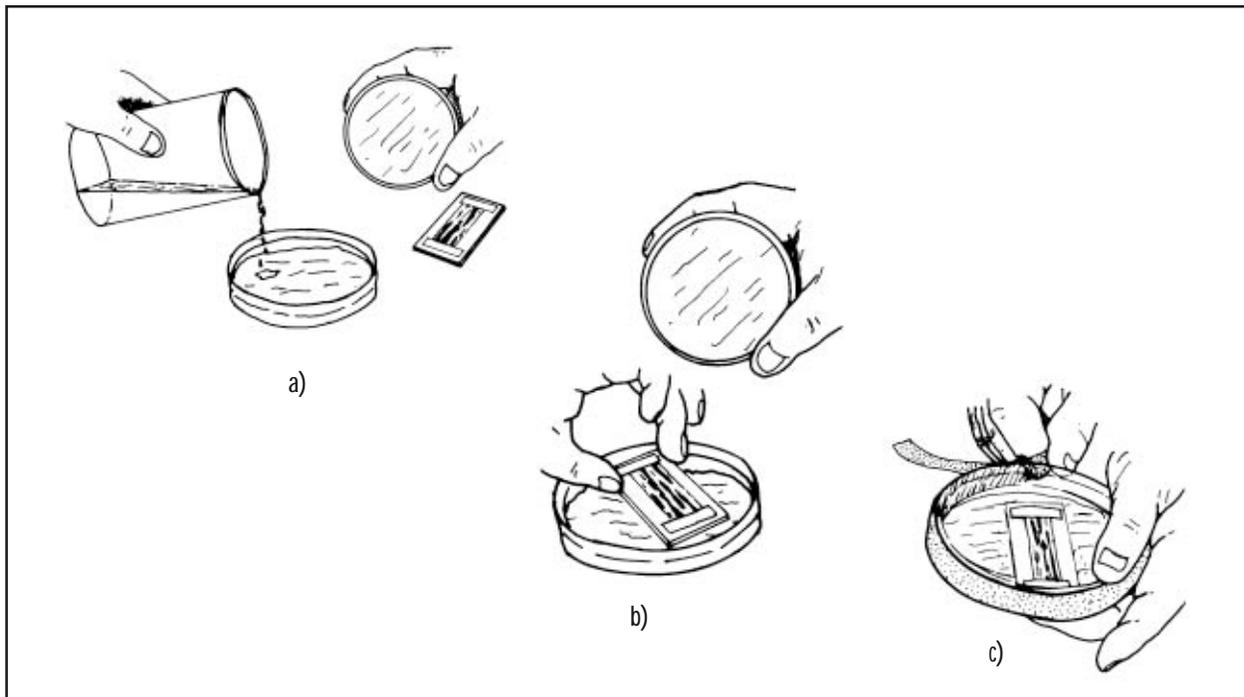


Figura 6 a, b, c. Secuencia de la preparación de una cámara húmeda.

Al completar 24, 48 y 72 horas de incubación, abrir la caja y observar en el estereoscopio las estructuras formadas en la lesión; de ser necesario, utilizar una aguja de disección para tomar un poco del crecimiento saliente de la lesión y colocarlo en un portaobjeto con una gota de agua. Cubrir con un cubreobjetos, dejándolo caer de manera que no se formen burbujas de aire (ayudarse con la aguja de disección). Observar bajo el microscopio micelio, conidióforos y conidios o cualquier otra estructura desarrollada por el hongo. Si no hay desarrollo visible, cuidar que la caja no pierda humedad y continuar observando. Dibujar toda estructura que se observe.

Preparación de especímenes para observación al microscopio

Para el diagnóstico y estudio de enfermedades, en la mayoría de los casos es necesario aislar y cultivar el patógeno a fin de identificarlo. Una práctica muy útil es la observación del agente causal en preparaciones microscópicas tomadas directamente del material enfermo o del aislamiento del patógeno.

Montaje de preparaciones. Coloque la muestra del espécimen en estudio en un portaobjetos limpio, sobre una gota de solución de montaje que debe ser, de preferencia, agua destilada estéril o un colorante para la tinción de las estructuras fungosas que se desean observar con mayor contraste. Entre los colorantes más comunes se encuentran el lactofenol, la safranina y el algodón azul.

La obtención de una preparación puede realizarse de diferentes formas dependiendo del material de que se trate: Si el material vegetal presenta un aspecto algodonoso o indicios de estructuras del patógeno (signos), tomar la muestra con una aguja de disección o con la punta de una navaja, raspando ligeramente el tejido enfermo (Figura 7 a). Colocar cuidadosamente este raspado sobre el portaobjetos dentro de la gota de agua o colorante según sea el caso (Figura 7 b). Cubrir suavemente con un cubreobjetos con la ayuda de una aguja para que no queden burbujas de aire (Figura 7 c). Para lograr este objetivo, ponga la aguja debajo del cubreobjetos y retírela suavemente de tal forma que se eliminen las burbujas de aire durante el proceso.

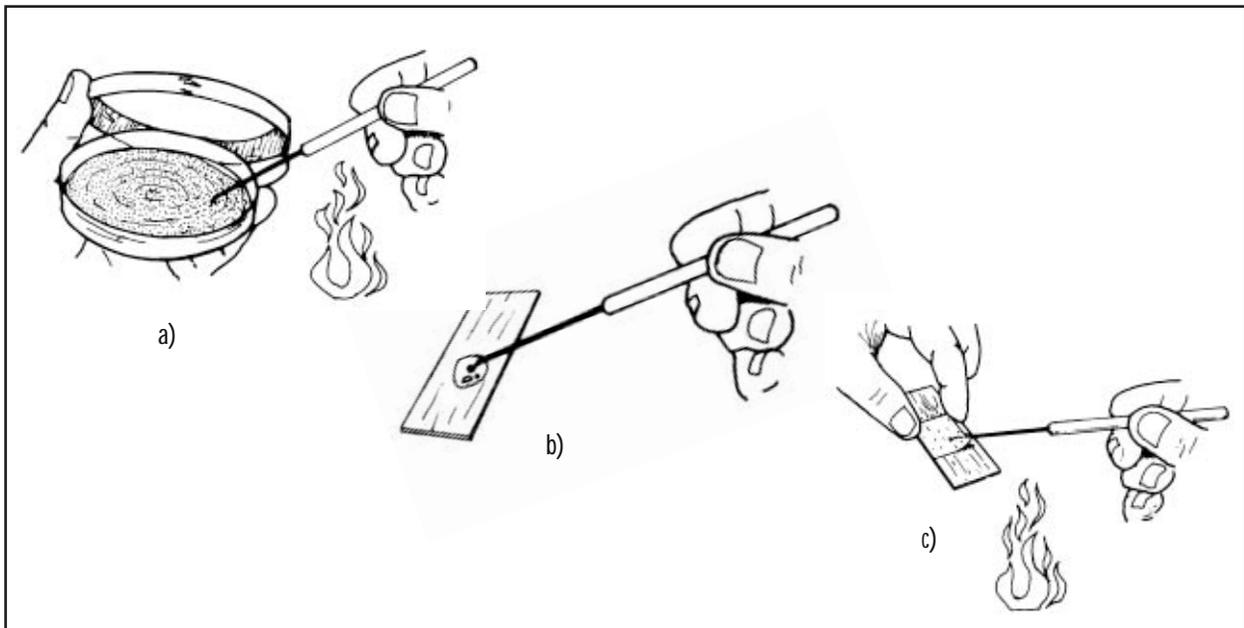


Figura 7 a, b, c. Cómo hacer una preparación para observar al microscopio.

Se utiliza cinta scotch transparente para hacer preparaciones rápidas no permanentes a partir de crecimientos en medio de cultivo. Este método se recomienda para observar las estructuras en su estado y posición normales (cadenas de esporas o conidios pegados al conidióforo), lo cual generalmente es muy difícil de lograr con las preparaciones antes descritas, ya que las estructuras se separan al ser tomadas con la aguja.

Tomar un pedazo de cinta scotch y, con el lado que tiene el pegamento, tocar “ligeramente” la muestra o el cultivo de la caja Petri o del tejido enfermo (Figura 8 a); enseguida colocarlo sobre una gota de agua estéril en un portaobjetos (Figura 8 b, c).

Cuando se desea hacer observaciones más detalladas (por ejemplo, de estructuras dentro del tejido enfermo), tomar la muestra y hacer cortes finos con la ayuda de una navaja de afeitar (“Gilette”) o un bisturí. En el caso de hojas, tallos, tubérculos, raíces, etc., la estructura puede ser colocada entre los dedos con la punta sobresaliendo un poco (Figura 9 a). Los cortes obtenidos de esta forma son tanto o más finos que los efectuados con un micrótomos, instrumento diseñado para este propósito pero que, por su alto costo, no siempre está disponible. Colocar los cortes obtenidos en la gota de la solución de montaje. Cuando se trata de tejido más suave y flexible, se puede utilizar como sostén un trozo de madera o una zanahoria partida longitudinalmente y de igual forma con la punta de la muestra saliendo hacia arriba se realizan los cortes lo más fino posible (Figura 9 b). Con esta técnica se pueden obtener cortes de estructuras fungosas (picnidios, peritecios, etc.) claras y completas, así como también una imagen más clara en tejidos oscuros por naturaleza.

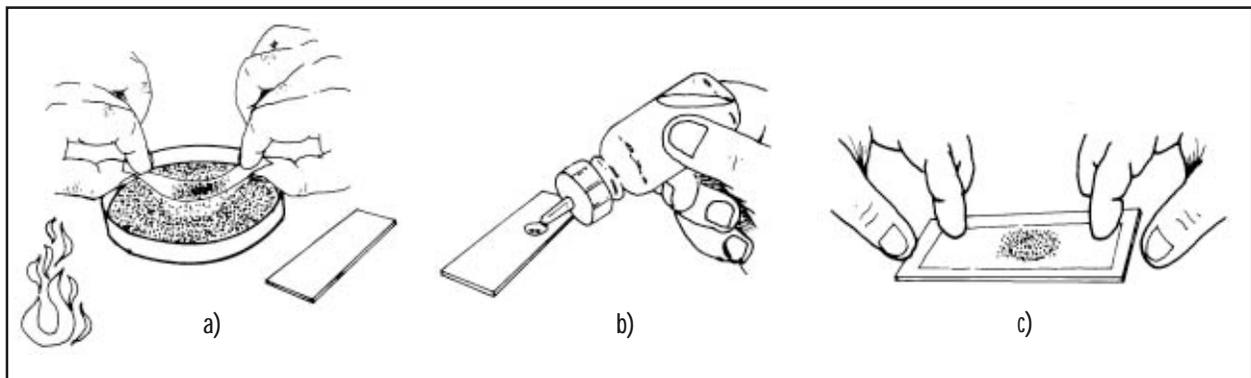


Figura 8 a, b, c. Indicaciones para hacer una preparación utilizando cinta scotch.

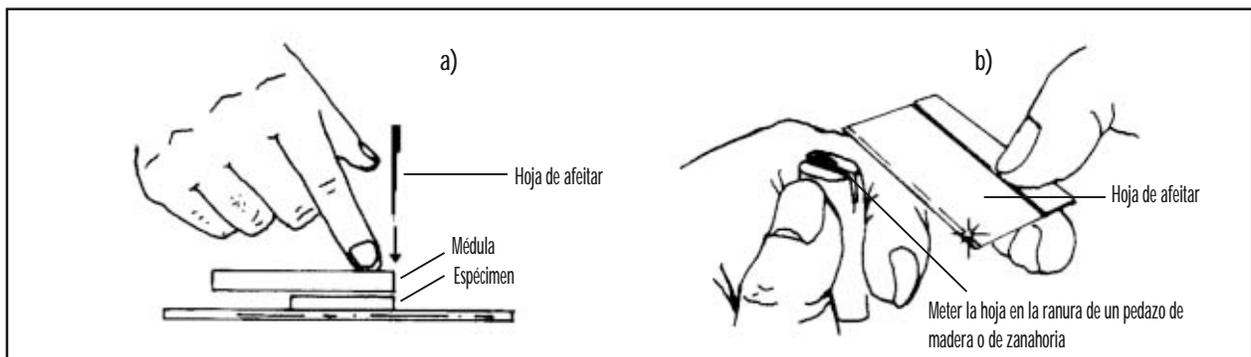


Figura 9 a y b. Secuencia para hacer cortes finos de estructuras fungosas.

Una vez colocada la muestra en la gota de la solución de montaje, utilizar una aguja de disección para acomodar el espécimen como se desee. Enseguida se coloca el cubreobjetos con la ayuda de la aguja, comenzando por un extremo, dejándolo caer cuidadosamente y asegurándose que el corte esté completamente cubierto y que no queden burbujas de aire porque distorsionan la imagen. Es común que las personas de poca experiencia confundan las burbujas con estructuras morfológicas del espécimen. Si fuera necesario, presionar suavemente para eliminar el exceso de solución y luego absorberlo con papel filtro o papel secante.

Para realizar preparaciones semipermanentes, se fija la muestra pasando el portaobjetos por encima de una flama por algunos segundos, hasta ver hervir la gota (para eliminar las burbujas de aire); con papel filtro, eliminar el exceso fuera del área del cubreobjetos.

Para sellar la muestra, se pone esmalte de uñas transparente en las cuatro orillas del cubreobjetos y se deja secar.

Obtención de cultivos monospóricos

Una vez aislado el patógeno causante de una enfermedad, es necesario obtener aislamientos formados por varios individuos de la misma especie. Los trabajos de investigación o de aplicación práctica en los programas de mejoramiento genético requieren que se cuente con un grupo de individuos que sean representativos de la población del patógeno con que se desea trabajar. Para cumplir con el objetivo de tener aislamientos puros generados a partir de una sola espora, se deben seguir los siguientes pasos bajo condiciones asépticas:

Obtenga una suspensión de baja concentración de conidios en agua estéril de la especie en estudio a partir del cultivo inicial. Tome 0.5 ml de dicha suspensión, viértala en una caja Petri con medio agar-agua y dispérsela con una varilla de vidrio estéril. Observe la germinación de los conidios bajo el estereoscopio a intervalos de tiempo regulares (24, 48 y 72 horas). Cuando éstos inicien su germinación, tome una aguja previamente esterilizada a la flama, ubique los conidios que germinan en forma aislada y tome el pedacito del agar donde se encuentran éstos. Transfiera uno por uno los conidios en germinación a cajas Petri individuales. Use el medio de cultivo recomendado para el crecimiento del patógeno en estudio. Continúe vigilando el crecimiento de cada colonia obtenida. Descarte aquellas que muestren un crecimiento concéntrico doble o triple, ya que este patrón indica que fue transferida más de una espora durante el trabajo con la aguja bajo el estereoscopio. Esto es común cuando hay poca experiencia.

Cálculo de la concentración de inóculo

Cuando se trata de evaluar la resistencia de las plantas a enfermedades o efectuar estudios específicos (epidemiológicos) del patógeno, muchas veces es necesario recurrir a la inoculación artificial, ya sea en invernadero o en campo. Para esto se utiliza inóculo a una concentración específica (es decir, un número determinado de esporas por mililitro), según el patógeno y hospedero en estudio, con la finalidad de obtener una buena infección que permita observar las diferencias entre los materiales evaluados.

Para determinar la concentración se usa un hemacitómetro, con el cual se hacen conteos de esporas en campos de dimensiones conocidas, que darán el número de esporas por ml de la suspensión inicial. De esta forma, por medio de diluciones se obtiene el inóculo en la concentración deseada.

En el presente ejemplo se explica la forma de uso de dos cámaras de conteo que pueden utilizarse para calcular la concentración de esporas: la cámara Neubauer (American Optical Co.) de 0.1 mm de profundidad y la cámara de conteo Fuchs-Rosenthal.

Procedimiento para el uso de la cámara Neubauer: Raspar los cultivos del hongo en las cajas y mezclar este raspado con un volumen conocido de agua destilada. Una vez homogeneizada, la suspensión se filtra a través de una malla o gasa para eliminar el agar o restos de micelio que podrían obstruir el paso de la suspensión a través del aspersor durante la inoculación, y se lleva a un volumen conocido.

Tomar una gota con una pipeta Pasteur y colocarla en el centro del hemacitómetro, o bien colocar una gota en cada extremo, según el tipo de hemacitómetro con el que se esté trabajando; enseguida colocar el cubreobjetos cuidando que no queden burbujas y que la gota no se derrame ni se salga de los campos de conteo. Esto daría un dato erróneo, ya que el excedente arrastraría las esporas.

El hemacitómetro consta de dos campos de conteo, cada uno con nueve cuadros que, a su vez, están divididos en cuadros más pequeños (Figura 10). Tanto los cuadros grandes como los pequeños tienen dimensiones conocidas, de tal modo que por medio de fórmulas se puede obtener el número de esporas por ml.

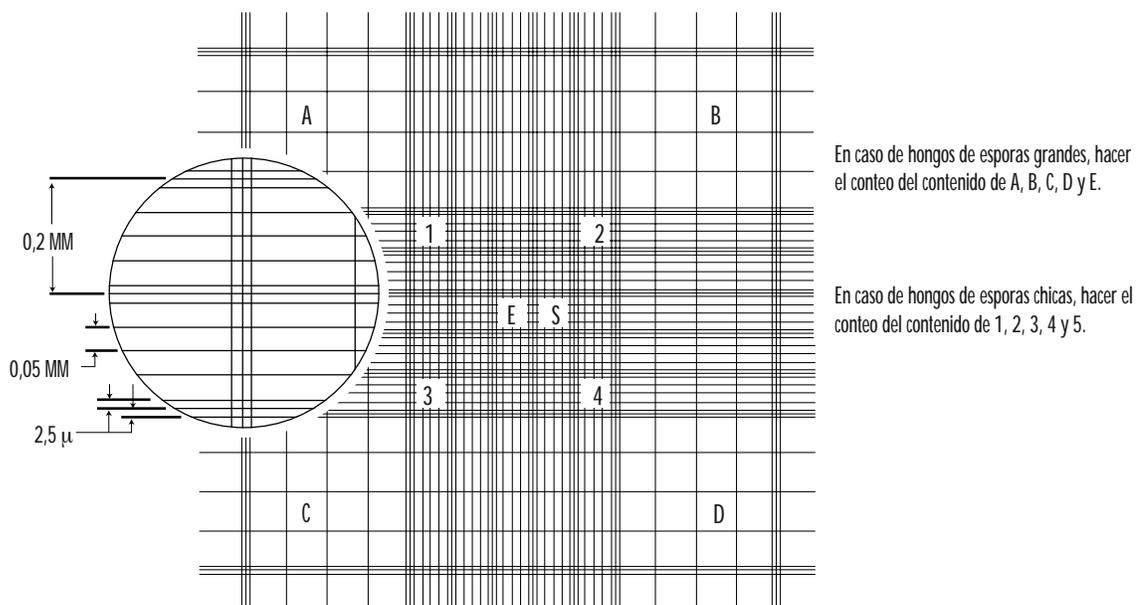


Figura 10. Rayado del hemacitómetro que muestra los campos de conteo (A, B, C, D, E).

Ejemplo:

Cuadros de conteo

No. conteo	A	B	C	D	E	SUMA
1	10*	15	12	13	11	61
2	18	15	10	20	13	76
3	25	15	18	16	14	88
4	12	14	15	18	13	72
5	15	13	17	14	11	70
6	15	13	12	18	20	78

* No. de conidios o propágulos

445
Media=74

El campo de conteo que se debe utilizar depende del tamaño de los conidios del hongo con el que se esté trabajando. Si éstos son grandes, lo más conveniente es contar en los cuatro cuadros de las esquinas (A, B, C, D) más el cuadro del centro (E) (Figura 10). El conteo se repite por lo menos seis veces y se saca un promedio.

Con los datos obtenidos, se calcula un valor de la media; éste se multiplica por una constante que depende del hemacitómetro que se utilice. De ese producto se obtendrá la concentración en conidios/ml.

Entonces:

$$74 \times \text{constante} = \text{concentración en conidios/ml}$$

Esta concentración corresponde a la de la suspensión inicial. Cuando se desea calcular una dilución determinada, se aplica la fórmula siguiente:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Donde:

C_1 = Concentración inicial (conocida en el conteo)

V_1 = Volumen inicial (establecido arbitrariamente al preparar el inóculo)

C_2 = Concentración final deseada (según el estudio a realizar)

V_2 = Volumen final (desconocido)

Despejando:

$$V_2 = \frac{C_1 \times V_1}{C_2}$$

Si el volumen inicial era de 100 ml y se desea una concentración de 30,000 conidios/ml, entonces

$$V_2 = \frac{\text{concentración calculada} \times 100 \text{ ml}}{30,000} = \text{volumen final (ml)}$$

Con los datos que se obtengan:

- a) Calcular la concentración del inóculo inicial.
- b) Calcular la cantidad de líquido que se debe agregar a la suspensión de esporas preparada, para obtener una concentración de 30,000 esporas por ml.

Procedimiento de conteo con la cámara Fuchs-Rosenthal: Agregar 10 ml de agua a cada caja de Petri con cultivo y raspar suavemente con una espátula; vaciar lo raspado a través de una gasa en un vaso de precipitado con 70 ml de agua para obtener el inóculo original (80 ml).

Los conteos de conidios de la solución original se realizan con la cámara de conteo o hemacitómetro. Si es necesario se pueden hacer diluciones de la suspensión para facilitar el conteo. Hacer cuatro conteos como mínimo. Cada conteo es el resultado de la suma total de conidios.

El presente ejemplo se hará con una suspensión de conidios de *Bipolaris sorokiniana*; se recomienda usar una concentración de 7,500 a 30,000 conidios/ml para pruebas de inoculación en invernadero.

			X
		X	
	X		
X			

+

= Un conteo

X			
	X		
		X	
			X

◆ 98

1 mm

0.25 mm

Para obtener una concentración deseada de conidios de *B. sorokiniana* con la cámara para conteo de esporas Fuchs-Rosenthal, se requieren las siguientes fórmulas:

$$(S) \cdot (1,000) = C_o$$

$$C_o = \frac{FD}{CF}$$

$$VF = \frac{V_1}{FD}$$

En donde:

- S = Promedio de los 4 conteos de esporas (conidios)
- 1,000 = Constante de volumen
- 1.6 = Constante de la profundidad de la cámara de conteos
- C_o = Concentración de esporas (conidios) de la solución original concentrada (número de conidios/ml)
- CF = Concentración de esporas (conidios) deseada
- FD = Factor de dilución
- VF = Cantidad de inóculo deseado
- V₁ = Cantidad de la suspensión original concentrada para producir la cantidad de inóculo que se desea

Inoculación en invernadero

La inoculación en invernadero se lleva a cabo con diferentes propósitos, como son: demostración de los postulados de Koch, incrementos de inóculo, caracterización de sintomatología, pruebas de selección para resistencia genética y estudios de epidemiología. Inocular bajo estas condiciones tiene muchas ventajas, entre ellas: mejor control en el manejo del organismo, seguridad en la evaluación de los síntomas, certeza de que no hay interferencia de otros organismos (como sucede en el campo) y rapidez en evaluar el material. Generalmente la inoculación en invernadero se realiza en plántulas, pero también puede llevarse a cabo en otros estados fenológicos (dependiendo del patógeno y del hospedero de que se trate).

El siguiente ejercicio de inoculación es muy útil para seleccionar material genético bajo condiciones de invernadero y, en un programa de mejoramiento, puede ayudar a acelerar el proceso de selección. En el ejercicio se utilizan plantas susceptibles y resistentes, y se inoculan varias especies patógenas. En el caso de *Cochliobolus sativus* (anamorfo: *Bipolaris sorokiniana*), *Pyrenophora teres* f. sp. *teres*, *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* y *Pyrenophora tritici-repentis*, las plántulas al ser inoculadas deben de tener un crecimiento de 10 a 12 días. Se podrán determinar las diferencias y respuestas de resistencia en el germoplasma evaluado de 5 a 7 días después de la inoculación en el caso de *C. sativus* y 10 días en el caso de *P. teres* y *P. tritici-repentis*.

Los materiales que se inocularán se pueden preparar de diferentes formas. Los dos métodos que se describen en este ejercicio son iguales, salvo que comienzan de distintas maneras y que en el primer caso hay un ahorro significativo de espacio en el invernadero.

En el primer método se utilizan sobres de glase con toalla de papel absorbente en su interior (Figura 11 a); engrapar juntos en la parte superior y dejar espacio suficiente para poner las semillas que se desee germinar. Los sobres con las semillas se colocan en charolas (bandejas), acomodándolos entre soportes de hilaza para sostenerlos (Figura 11 b). El agua que se agregue a las charolas será absorbida por el papel en el interior de los sobres de glase y llegará a las semillas. Esto permite la germinación de las semillas y su abastecimiento posterior. Siempre se debe incluir un testigo resistente y uno susceptible.

En el segundo método se siembran juegos similares de semillas en vasos de cartón con tierra. Al igual que en el primer método, se debe incluir un testigo resistente y uno susceptible.

A partir de este punto, los dos métodos continúan como sigue. Cuando las plántulas tengan un crecimiento de 10 a 12 días, raspar el organismo cultivado en las cajas Petri. Disolver el raspado en agua destilada (si se tiene cultivo en grano se pone a agitar con agua); filtrar a través de una gasa para eliminar los pedazos de agar y obtener una suspensión de conidios lo más pura posible. Con la ayuda del hemacitómetro se hacen los conteos correspondientes y se obtiene una suspensión con una concentración de 30,000 conidios por ml; si se dispone de Tween 20, se agrega una gotita a la suspensión para evitar conglomerados de conidios y obtener una concentración más homogénea. Las plántulas se inoculan con un atomizador que permita un rociado uniforme (Figura 11 c). Separar las plántulas inoculadas con *C. sativus*, *P. teres* y *P. tritici-repentis*. Identificar los testigos sin inocular, los susceptibles y los resistentes.

Después de inoculadas, las plántulas se incuban en una cámara húmeda durante dos horas; a continuación, alternar 15 min de humedad por 45 min de luz durante 48 horas en el caso de *P. teres* y *P. tritici-repentis*, y entre 18 y 24 horas para *C. sativus*. Si no se cuenta con una cámara húmeda, se

pueden obtener resultados similares cubriendo las plántulas con bolsas de plástico y vigilando que siempre tengan humedad. Se riegan las plantas, las bolsas se asperjan por dentro y se sellan. El tiempo que las plantas deben mantenerse en las cámaras de humedad se estudia previamente para ajustarlo a las condiciones específicas. Un humidificador accionado por electricidad es de gran utilidad, sobre todo si se puede conectar a un reloj control para dar humedad en tiempos intermitentes prefijados de acuerdo con el patógeno.

A las 48 horas (o 24 horas, según el patógeno inoculado), sacar las plántulas y colocarlas en el invernadero durante 8 a 10 días. Observar los síntomas y tratar de diferenciar el tipo de lesión causada por *B. sorokiniana*, *P. teres* f. sp. *maculata* y *P. teres* f. sp. *teres* del causado por *P. tritici-repentis*. Evaluar la diferencia en susceptibilidad de las variedades utilizando las escalas que le serán proporcionadas, tomando como base los testigos susceptible y resistente (Figura 11 d).

Se sugiere realizar el siguiente proyecto como práctica. Indique cómo llevar a cabo, con los medios existentes en el país donde usted trabaja, la selección de germoplasma en un invernadero o una estructura similar. Para desarrollar este proyecto se debe escoger una enfermedad fungosa de importancia económica en la región donde se trabaja; el proceso se ajusta a las condiciones que ese patógeno requiere.

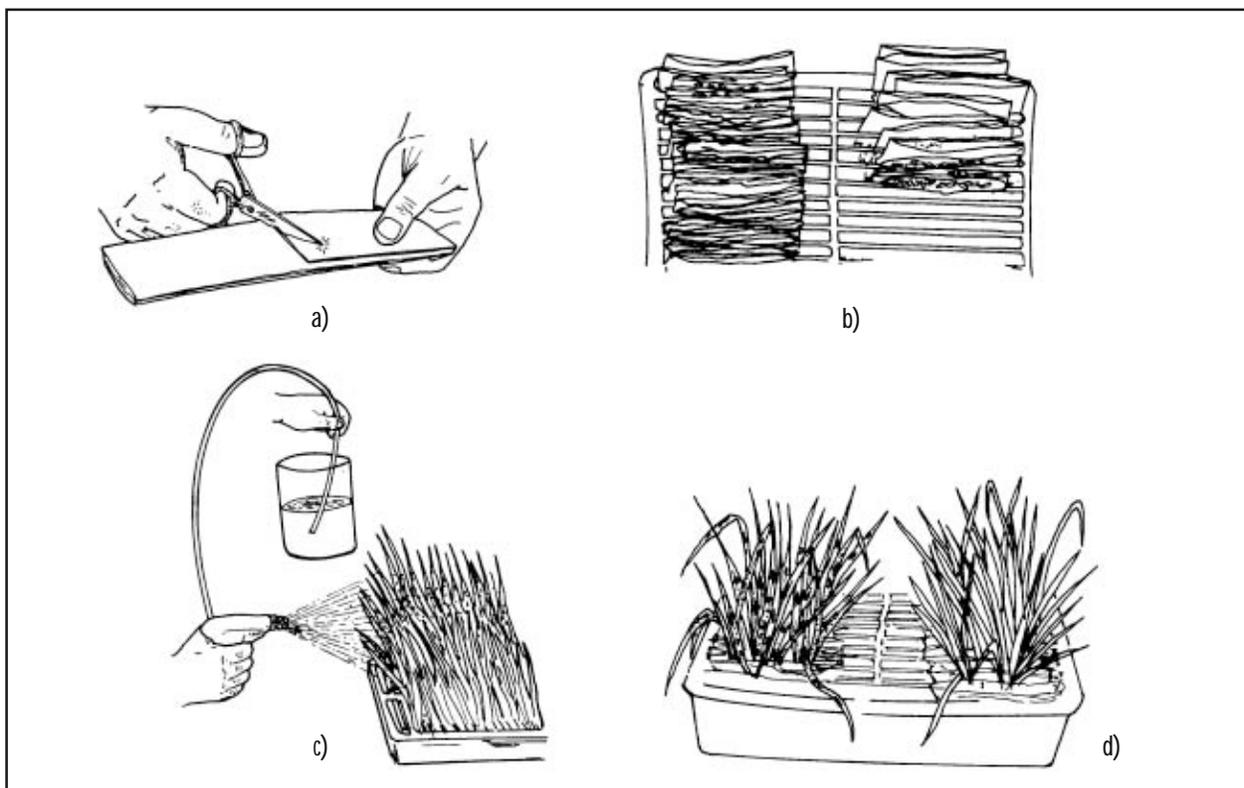


Figura 11 a, b, c, d. Bandejas adaptadas para el crecimiento, inoculación y selección rápida de plántulas con resistencia a algunos patógenos causantes de manchas foliares.

Capítulo 2 Basidiomycetes

Introducción

Muchas especies pertenecientes a la clase Basidiomycetes son patógenos importantes de plantas cultivadas, especies forestales y especies ornamentales. Algunas especies de Basidiomycetes (por ejemplo, los champiñones) se cultivan como alimento humano; otras son fuente importante de nutrientes para las plantas (micorrizas) y muchas son saprófitas.

Las esporas (basidiosporas) de estos hongos son producidas en la parte externa de una estructura especializada denominada basidio, que puede ser septado (heterobasidio) o sin septas (holobasidio). Las basidiosporas son producto de la plasmogamia (fusión de dos protoplastos), la cariogamia (fusión de dos núcleos) y la meiosis.

Las royas

Las royas constituyen un grupo extenso de fitopatógenos económicamente importantes. La mayoría de las especies vegetales son afectadas por las royas; sin embargo, en los cereales han causado mayor interés a través de la historia del hombre debido a la gran frecuencia con que se presentan y los daños que provocan. Las royas de los cereales típicamente tienen un ciclo de vida con fases sexuales y asexuales, y hasta cinco estadios diferentes de esporas.

El trigo es atacado por roya del tallo causada por *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, roya lineal (amarilla o estriada) causada por *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* y roya de la hoja causada por *Puccinia triticina* (antes *P. recondita* f. sp. *tritici*). La roya del tallo es más frecuente en climas cálidos y la roya lineal lo es en áreas más frías. Un clima intermedio favorece la roya de la hoja, y ésta es la más difundida y destructiva de las tres enfermedades hoy en día.

La roya del tallo produce pústulas alargadas de color café rojizo en tallos, vainas y pedúnculos. Las lesiones de roya de la hoja son más pequeñas y ovaladas, de color un poco más claro (anaranjado-café) y más evidentes en el haz de las hojas. La roya lineal es aún más clara (entre amarillo y anaranjado-amarillo) y se presenta en forma linear en el follaje y las glumas.

El desarrollo de métodos eficientes de control de las royas comenzó a principios del siglo, cuando se descubrió que existía una resistencia a ellas que con frecuencia se hereda mediante un solo gene. La capacidad de un biotipo del patógeno para vencer un gene específico de resistencia en el hospedero suele estar condicionado por un solo gene también, y esta relación hospedero-parásito se denomina concepto de "gene-por-gene".

Como consecuencia inmediata del cultivo, año tras año, de variedades resistentes en áreas extensas durante largos períodos, aparecieron biotipos del patógeno contra los que esta resistencia no fue eficaz. Los biotipos, que difieren en su habilidad (virulencia) para atacar una variedad o grupo de variedades, se denominan razas (fisiológicas). Una raza se define como un patrón de avirulencia diferente en un grupo de cultivos o aislamientos del patógeno, que se observa cuando se prueba en un grupo de variedades o líneas seleccionadas.

Por ejemplo, en el trigo se han encontrado cerca de 40 genes mayores de resistencia a roya de la hoja; sin embargo, también se han encontrado aislamientos del hongo que poseen virulencia para muchos de esos genes. Dado que existen dos clases descriptivas del patógeno (avirulencia y virulencia) para cada uno de los 40 genes de resistencia conocidos, el número posible de razas (ej. combinaciones diferentes de genes de virulencia/avirulencia) es de 240, o sea, más de 34 mil millones. Esto da una idea de la enorme variabilidad que poseen estos patógenos. También se han encontrado genes únicos de resistencia y de razas en otros grupos de hongos (por ejemplo, mildiús y tizón tardío de la papa).

Monitoreo de una población de roya de la hoja

Por las razones antes mencionadas, cuando se está mejorando para obtener resistencia a las royas, es importante monitorear las razas del patógeno, conocer su composición y probar las nuevas variedades con esas razas. De esta manera se obtendrá información acerca del posible incremento de una raza o combinación de virulencias, que se podrá utilizar para desarrollar estrategias en el uso de la resistencia (por ejemplo, la liberación de variedades).

A continuación se indica la forma de realizar el monitoreo de una población de roya de la hoja y establecer la composición de sus razas. Los objetivos de esta actividad son: 1) familiarizarse con roya de la hoja del trigo, y evaluar reacciones de susceptibilidad y resistencia; 2) ilustrar la interacción de los aislamientos del hongo con diferentes líneas de trigo y demostrar la presencia de distintas razas; y 3) mostrar técnicas para realizar un monitoreo práctico de las virulencias en una población de roya de la hoja.

En esta práctica, lo ideal es utilizar líneas isogénicas (o diferenciales) de trigo de primavera Thatcher. Cada una posee un gene de resistencia diferente que le ha sido transferido mediante un proceso de mejoramiento conocido como retrocruza. Hasta donde se sabe, las "isolíneas" son similares en toda su constitución genética, salvo en su gene específico de resistencia. El investigador puede trabajar con semilla de isolíneas para todos los genes conocidos o solamente para los que seleccione. A fin de demostrar una respuesta diferencial, se necesitan esporas de por lo menos dos aislamientos o cultivos del hongo de roya de la hoja. Cada cultivo es la progenie de una sola pústula.

1. Sembrar las isolíneas en golpes (6-8 semillas en cada uno) en una bandeja, empezando por la esquina frontal izquierda (poner una marca), y proseguir hacia la derecha. Las bandejas se colocan en un invernadero a 18-24 °C, hasta que las primeras hojas de las plántulas estén completamente extendidas (más o menos una semana). Las plantas se deben mantener separadas y aisladas de cualquier planta que esté infectada con roya. Regar y fertilizar cuando sea necesario.
2. Inocular cada grupo de isolíneas con los diferentes cultivos del hongo como sigue: suspender las esporas en aceite mineral o agua, y asperjarlas o frotarlas sobre la superficie de las hojas. Tener cuidado de no mezclar esporas de diferentes cultivos; lavar las manos, y si se utiliza un aspersor, lavarlo con etanol al 70% antes de inocular el segundo grupo de isolíneas con otro cultivo del hongo. Después de la inoculación, las plántulas se dejan secar durante unos 30 minutos.
3. Las esporas requieren de agua libre en la superficie de la hoja para poder germinar y penetrarla. En la naturaleza, esto lo proporciona el rocío de la noche. Para dar humedad a las hojas, asperjar las plantas con partículas finas de agua e incubarlas toda la noche en una cámara húmeda cerrada. Al siguiente día, la cámara se abre parcialmente para permitir que las plantas se sequen lentamente. Después de una hora, éstas se trasladan a una mesa en el invernadero y se mantienen a 16-24 °C. El período de colonización del tejido del hospedero, comprendido entre la penetración y la esporulación, se denomina período latente. Es posible calcular la duración de este período anotando el momento en que la primera pústula rompe la epidermis y libera las uredosporas. El desarrollo de las pústulas requiere de 10 a 14 días.

4. Dos semanas después, los uredios se observan con un microscopio de disección. Las royas son biótrofos, ya que son parásitos obligados (necesitan un hospedero vivo). La infección conduce a una asociación física en la que los haustorios (estructuras que permiten al hongo captar alimento) invaden células vivas para obtener nutrientes, pero sin destruirlas inmediatamente. Las infecciones generalmente son locales y el daño al hospedero se refleja en la presencia de muchas infecciones. Las plantas se debilitan debido a que los nutrientes y el agua se desvían hacia el crecimiento y reproducción del hongo. Las células invadidas permanecen vivas y activas hasta que el parásito se reproduce desarrollando esporas.
5. Anotar la reacción producida por cada combinación de aislínica/patógeno. Las reacciones pueden variar desde altamente susceptible (pústulas grandes con esporulación) hasta altamente resistente (pequeñas manchas cloróticas), con niveles intermedios (Figura 12 a, b, c). Se pueden realizar evaluaciones más precisas utilizando una escala visual de 0 a 4 o de 0 a 9, en la que 0 es la reacción más resistente. Para la identificación de razas, las reacciones se dividen en dos clases: alta (hospedero susceptible/patógeno virulento) y baja (hospedero resistente/patógeno avirulento). Las reacciones intermedias pueden ser difíciles de clasificar, pero se consideran resistentes (bajas), ya que cualquier disminución en la producción de esporas, o clorosis o necrosis representa un menor desarrollo de la enfermedad, lo cual reduce la velocidad de incremento de ésta.

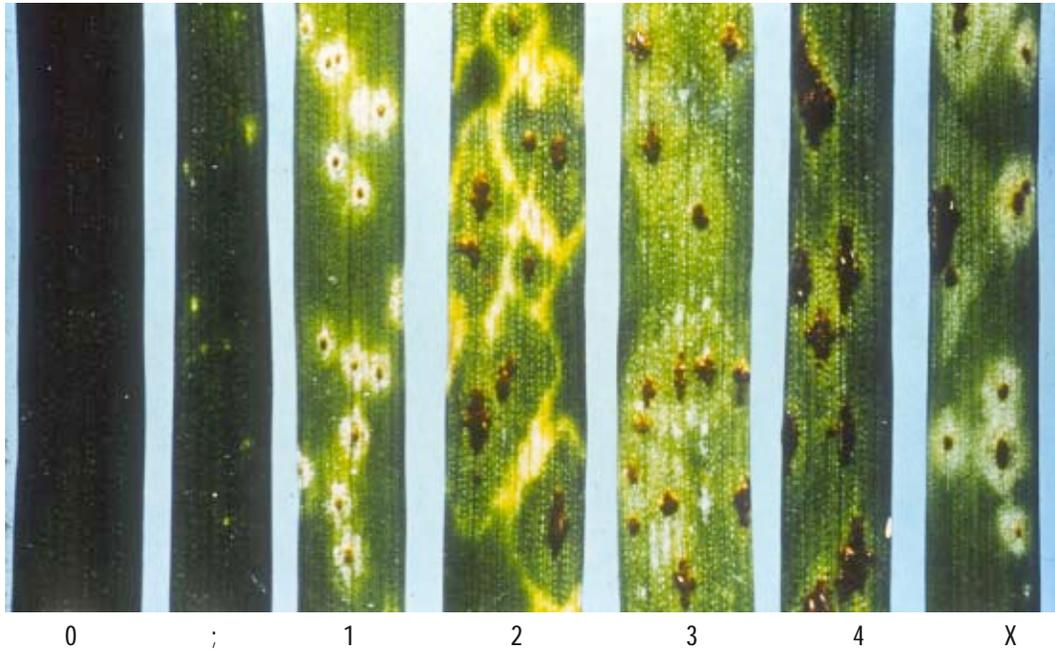
Las razas de roya se designan en secuencia por medio de códigos numéricos utilizando una clave dicótoma, o mediante una fórmula de avirulencia/virulencia. El número de raza o código se relaciona únicamente con el juego o grupo del hospedero utilizado. Anteriormente, se utilizaba un grupo de líneas de trigo para la identificación de razas; sin embargo, esto ya ha sido descartado debido al desarrollo de aislínicas. Hasta ahora, no se ha desarrollado un estándar que sea ampliamente utilizado, más bien se están usando fórmulas de avirulencia/virulencia para caracterizar cada aislamiento del hongo. Un ejemplo podría ser Lr 1, 9, 16, 24, 26 /2a, 2c y 3, el cual indica que las aislínicas Lr 1, 9, 16, 24 y 26 son resistentes, mientras que Lr 2a, 2c y 3 son susceptibles a ese cultivo de la roya. Inversamente, el cultivo es avirulento para las aislínicas Lr 1, 9, 16, 24 y 26 y virulento para Lr 2a, 2c y 3. Esto nos permite representar una raza diferente del cultivo que corresponde a Lr 2a, 2c, 9, 24, 26/1, 3, 16.

Como un ejercicio para comprender mejor la nomenclatura de razas y su interacción con el hospedante, se recomienda inocular las ocho aislínicas (Lr1, Lr2a, Lr2c, Lr3, Lr9, Lr16, Lr24 y Lr26) con los dos aislamientos (A y B) y señalar las reacciones que se producen en cada caso. Si se desea desarrollar un programa orientado a generar variedades con resistencia a royas, se recomienda utilizar las siguientes preguntas derivadas de este ejercicio de inoculación.

Preguntas

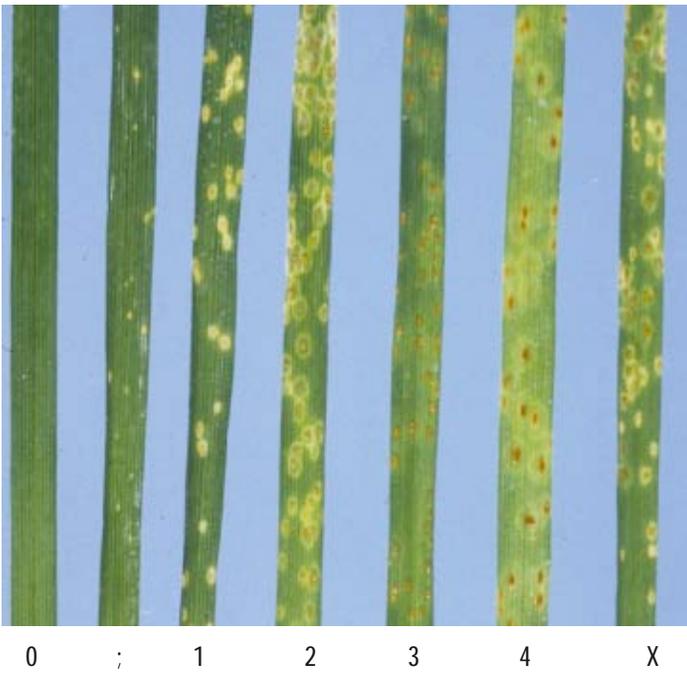
1. ¿Cómo se diferenciaron los dos cultivos del hongo en cada una de las líneas isogénicas de trigo?
2. ¿Cómo se diferenciaron las líneas isogénicas en esta prueba?
3. Si usted tuviera que recomendar fuentes de resistencia a un mejorador, ¿cuál de estos genes recomendaría? ¿Necesitaría mayor información para poder hacer una recomendación útil? Explique.
4. ¿Sería cualquiera de estos genes, por sí solo, útil para un mejorador?
5. ¿Podría ser útil la recombinación genética de estas resistencias?
6. ¿Por qué es útil para un mejorador un monitoreo regional o nacional de razas cuando se trata de desarrollar variedades con resistencia?
7. Además de ser útil para los mejoradores, ¿qué otros usos se podría dar a la información recolectada, después de llevar a cabo un muestreo extenso de las razas de la roya?

R.A. McIntosh



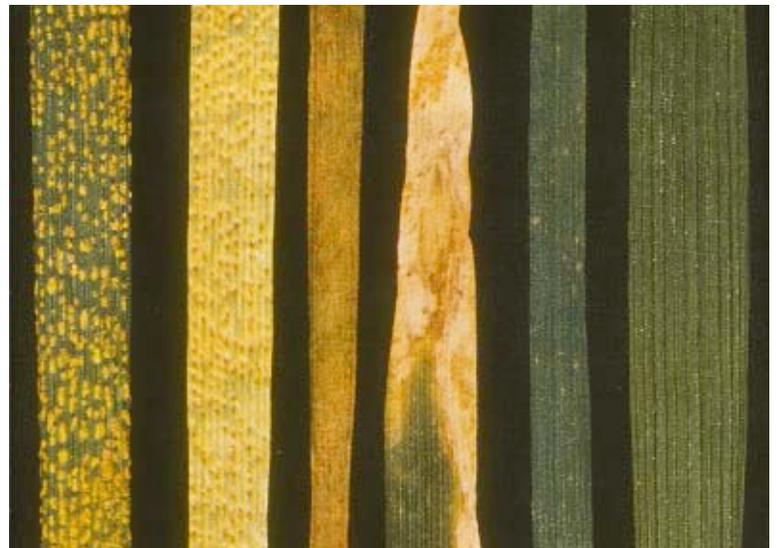
a. Roya del tallo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*)

R.P. Singh



b. Roya de la hoja (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*)

R.W. Stubbs



c. Roya lineal o estriada (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)

Figura 12. Escalas de evaluación de royas en plántulas bajo condiciones de invernadero.

Bibliografía

- Agrios, G.N. 1978. Genetics and plant disease. Capítulo 6 de *Plant Pathology*. Segunda edición. Academic Press, Orlando, FL. 703 pp.
- Hanson, C.H., Schafer, J.F. y Turnipseed, S.G. 1979. Genetic resistance for crop protection. Capítulo 3.2 de *Introduction to Crop Protection*. W.B. Ennis, Jr., ed. American Society of Agronomy. Madison, WI. 524 pp.
- Kenaga, C.B. 1974. Disease control-breeding for resistance. Capítulo 18 de *Principles of Phytopathology*. Segunda edición. Waveland Press, Prospect Heights, IL. 402 pp.
- Wiese, M.V. 1987. *Compendium of Wheat Diseases*. Segunda edición. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. pp. 37-42 sobre las royas.

Carbones

Bajo el título general de carbones se incluyen varios géneros de la clase Basidiomycetes. Los carbones son hongos patógenos obligados que pueden mantenerse latentes en el suelo durante períodos prolongados. Este grupo de hongos es conocido ampliamente por los síntomas que produce, pues son fáciles de reconocer; esporulan (producen esporas de color café o negro) principalmente en el grano, inflorescencia, hojas y tallos. Atacan a los cereales (trigo, cebada, avena, maíz, arroz, etc.) y otros cultivos de importancia económica para el hombre (papa, caña de azúcar, cebolla, etc.).

Entre sus características taxonómicas importantes se incluye que las teliosporas son producidas en forma individual, en pares o en agregados (bolas). También son importantes el tamaño, el color, la ornamentación y la morfología; la presencia de células estériles y su localización; el sitio de esporulación y el hospedero.

A diferencia de lo que ocurre en los uredinales (royas), la fertilización se lleva a cabo por medio de la unión (plasmogamia) de propágulos compatibles del hongo. Los carbones que afectan el trigo son: *Tilletia tritici* (sin. *T. caries*) y *T. laevis* (sin. *T. foetida*), causantes del carbón común; *Tilletia controversa*, causante de carbón del enanismo; *Tilletia indica*, causante del carbón parcial; *Ustilago tritici*, causante del carbón volador, y *Urocystis agropyri*, causante del carbón de bandera.

Identificación de carbón volador (*Ustilago tritici*) y carbón parcial (*Tilletia indica*)

A continuación se describe cómo realizar la prueba de germinación de teliosporas (esporas) que permite identificar estos carbones.

Carbón volador. Tomar muestras de espigas infectadas y agitarlas dentro de un recipiente que contenga una solución de agua con Tween 20 o algún otro surfactante. Agregar una gota de Tween 20 por litro de agua y agitar suavemente hasta disolver. Pasar la suspensión de esporas por una malla de 60 μm o menor para retener las partículas o basuras de mayor tamaño (las teliosporas miden 5 a 9 μm de diámetro). Centrifugar a 3000 rpm para que las teliosporas se concentren en la base del tubo; desechar el sobrenadante.

Preparar una solución de hipoclorito de sodio y agua (1:9, v:v). Agregar esta solución al tubo con teliosporas para esterilizar la superficie, agitar un poco, centrifugar y desechar el sobrenadante. Agregar al tubo con teliosporas agua esterilizada para remover el hipoclorito, agitar y centrifugar; desechar el sobrenadante y repetir la operación con agua esterilizada.

Las teliosporas se transfieren con pipeta o jeringa esterilizada a cajas de Petri con agar al 1.5-2.0% (15 ó 20 g de agar por litro de agua). Incubar las cajas con teliosporas a temperatura de laboratorio (18-22 °C). Siete días después, comenzar a observar y tomar notas de la forma en que germinan.

Carbón parcial. En el caso de *Tilletia indica* se toman granos infectados y se sigue el método descrito para *Ustilago tritici*. Para obtener una mejor germinación, las teliosporas se pueden dejar en la solución de agua y Tween 20 durante 24 horas antes de iniciar el tratamiento con hipoclorito de sodio. Es necesario utilizar una malla de 60 µm porque las teliosporas miden de 22 a 49 µm.

Aislamiento

Coloque el grano infectado con carbón parcial en un tubo de centrifuga esterilizado, que contenga 8 ml de agua con Tween 20 previamente esterilizado (1 gota de Tween 20 por 1,000 ml de agua se esteriliza en autoclave por 20 minutos a 121 °C). Agite hasta que las teliosporas presentes en el grano se desprendan. Filtre la suspensión de agua con teliosporas a través de una malla de 60 µm a un vaso de precipitado estéril. Con una pipeta igualmente estéril transfiera 2 ml de la suspensión a tubos de centrifuga.

Agregue a la suspensión con teliosporas 8 ml de una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% (prepare esta solución mezclando Cloralex comercial al 6% con agua destilada estéril con Tween 20) y agite ligeramente. Coloque los tubos en la centrifuga, uno frente al otro, para mantener el equilibrio; encienda la centrifuga y, al llegar a las 2,500 rpm, apáguela y espere a que termine el ciclo de centrifugado.

Deseche el sobrenadante y agregue nuevamente 8 ml de la solución de hipoclorito con Tween 20 y vuelva a repetir el ciclo de centrifugado anteriormente descrito. Vuelva a repetir este último paso. La última suspensión contendrá las teliosporas que luego se siembran en cajas Petri con medio agar-agua.

Si durante este proceso se usan materiales de plástico que no toleran la esterilización en autoclave, esterilícelos sometiéndolos a luz ultravioleta (UV) durante 24 horas; proceda de igual forma con las mallas de 60 µm.

Incremento del inóculo

Con una jeringa o micropipeta estéril tome alícuotas de 0.5 ml de la suspensión de teliosporas, transfíralas bajo condiciones asépticas a cajas Petri con medio agar-agua.

Bajo la cámara de aislamiento o flujo laminar, coloque cada caja Petri sobre una plataforma giratoria y con una varilla de vidrio estéril extienda la suspensión depositada en cada una de ellas. Bajo las condiciones de la cámara deje secar el contenido 24 horas y séllelas con parafilm.

Incuba las cajas a 18-24 °C y, después de cinco días, verifique la germinación.

Métodos de inoculación

Existen varios métodos de inoculación; sin embargo, aquí sólo se describe uno para el carbón volador y uno para el carbón parcial.

Carbón volador: espolvoreo de espigas (método go-go). Se escogen espigas en estado de floración-antes y se preparan como para emascular (cortando las aristas o barbas con parte de las glumas, lemas y paleas). Se cubren con bolsas de glasine que se abren con tijeras por la parte superior para poder espolvorear las espigas con teliosporas.

Carbón parcial: inoculación por inyección. Las colonias derivadas de teliosporas que germinaron, se transfieren a un medio rico en nutrientes (como papa-dextrosa-agar) para su multiplicación. El proceso es el siguiente: revisar que no exista contaminación en las cajas de agar donde las teliosporas se encuentran germinando. Con una espátula esterilizada (mediante el flameado), cortar pequeños pedazos de agar que contengan teliosporas en germinación, transferirlos a cajas de Petri con PDA invirtiéndolos en la tapa (de manera que el hongo esporule hacia abajo) y esperar 4 a 6 días hasta que las colonias empiecen a desarrollarse (Figura 13 a, b, c). Agregar agua esterilizada y raspar las colonias con una espátula flameada; después, inocular cajas con PDA por medio de una jeringa o pipeta esterilizada y esperar de 5 a 9 días para que las cajas se cubran con las colonias del hongo.

Pasado ese tiempo, se vuelve a agregar agua, se raspa la superficie y se criba utilizando una gasa (para eliminar los pedazos de agar o agregados de hifas del hongo que podrían tapar las jeringas). Cuando se hayan raspado unas 15 cajas, se calcula la concentración inicial de propágulos por mililitro con un hemacitómetro Neubauer y se agrega el agua necesaria para obtener la concentración deseada (10,000/ml). Con una jeringa hipodérmica, se deposita 1 ml de inóculo en cada espiga de plantas que se encuentren en estado de embuche (cuando se empiezan a ver las aristas), lo que corresponde al estadio 45 de la escala de Zadoks.

Las cepas de carbón parcial se conservan en tubos o en cajas Petri con medio PDA, a una temperatura de 4-5 °C. Es necesario renovarlas cada año.

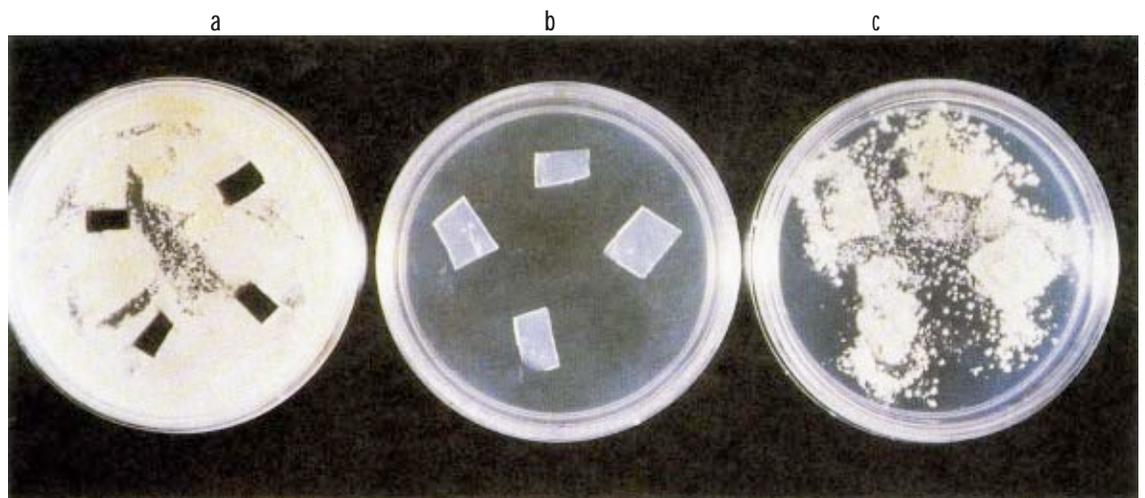


Figura 13 a. Cultivo del hongo y cortes en PDA. b. Cortes invertidos iniciando el crecimiento. c. Desarrollo y multiplicación del inóculo.

Bibliografía

- Fuentes-Dávila, G., Goates, B.J., Thomas, P., Nielsen, J. y Ballantyne, B. 2002. Smut diseases. En: *Bread Wheat: Improvement and Production*. B.C. Curtis, S. Rajaram y H. Gómez Macpherson (eds.). FAO, Roma.
- Wilcoxson, R. y Saari, E.E. (eds.). 1996. *Bunt and Smut Diseases of Wheat: Concept and Methods of Disease Management*. Mexico, D.F.: CIMMYT. 66 p.

Capítulo 3 Ascomycetes

Introducción

Los Ascomycetes comprenden varios miles de especies que pueden ser desde estrictamente saprofitas, hasta parásitos obligados de las plantas superiores. Entre estos últimos, existen algunos que pueden atacar y dañar severamente a los cereales de grano pequeño.

El ciclo de los Ascomycetes comprende dos fases: la asexual y la sexual. Durante la primera, el hongo produce conidióforos, es decir, las estructuras generadoras de esporas asexuales o conidios. Los conidióforos pueden nacer individualmente o en grupos, y libres, o en cuerpos fructíferos denominados picnidios o acérvulos. Desde el punto de vista fitopatológico, esta fase es muy importante porque se repite durante todo el ciclo del cultivo, y los conidios pueden infectar hojas, tallos, espigas e, incluso, granos.

La fusión de dos núcleos compatibles se produce en la segunda fase y, como consecuencia, la formación de cuerpos fructíferos (peritecios, cleistotecios o apotecios) capaces de resistir condiciones desfavorables de humedad y temperatura durante la ausencia del cultivo. En estos cuerpos fructíferos se producen las ascas que se activan al inicio de un nuevo ciclo del cultivo. Esta es la etapa invernante, aunque en la mayoría de los casos, las ascas y ascosporas no se forman ni maduran sino hasta el final del invierno o comienzo de la primavera. Por lo tanto, el hongo puede invernar también en forma de micelio y, en ocasiones, de conidio.

El micelio de los Ascomycetes está compuesto de hifas bien desarrolladas, delgadas o gruesas, profusamente ramificadas e interrumpidas por septas simples. En este grupo de hongos existen patógenos que provocan en los cereales enfermedades importantes, como los tizones foliares causados por especies comúnmente conocidas como "*Helminthosporium*" y *Septoria*.

Identificación del tizón o mancha foliar causada por *Cochliobolus sativus* (anam. *Bipolaris sorokiniana*) [sin. *Helminthosporium sativum*]

Entre los tizones foliares o manchas de la hoja, el causado por *C. sativus* se presenta a partir del comienzo del desarrollo foliar y se incrementa principalmente en las hojas después del espigamiento. Este hongo también puede presentarse en corona, raíces, nudos, vainas, espigas y granos, por lo que se le considera una enfermedad importante, sobre todo en lugares subtropicales, donde se encuentran las condiciones óptimas para su desarrollo: altas temperaturas acompañadas de alta humedad.

Al desarrollarse, *B. sorokiniana* forma, en el tejido foliar y otras partes de la planta, estructuras asexuales llamadas conidióforos a partir de los cuales se producen los conidios. El aislamiento de *C. sativus*, la fase sexual o teleomorfo, no presenta complicaciones, pues generalmente crece con facilidad en PDA o, incluso, en una cámara húmeda. *Cochliobolus sativus* no se encuentra con frecuencia en la naturaleza y sólo ha sido descrita bajo las condiciones agroecológicas de Zambia.

Sintomatología y aislamiento del patógeno

Pegar la muestra en la hoja de diagnóstico y describir los síntomas observados. Preparar hipoclorito de sodio al 1% (1 ml de hipoclorito de sodio en 99 ml de agua destilada estéril o, si se cuenta con Tween 20, agregar una gotita para eliminar la tensión superficial). Colocar en cajas de Petri, por separado, el hipoclorito y el agua destilada estéril. Hacer pequeños cortes en las hojas en áreas donde la lesión esté iniciándose y colocarlas en el hipoclorito durante 1 minuto. Sumergir la punta de las pinzas en alcohol y flamear. Tomar los pedacitos y enjuagar eliminando el exceso de hipoclorito. Enseguida, secarlos en toalla o papel filtro estéril. Bajo condiciones lo más estériles posible (microvoid y/o área limpia con alcohol o hipoclorito), sembrarlos en forma ordenada en cajas con PDA, colocando de 5 a 7 pedazos por caja.

En forma simultánea, preparar una cámara húmeda de la muestra. Incubar las cajas durante 3 a 7 días. Pasado este período, debe haber suficiente crecimiento del hongo. Para la cámara húmeda, asegurarse que el papel filtro siempre esté húmedo y agregar agua si fuera necesario. Describir las características de la colonia. Hacer una preparación temporal, tomando una muestra directamente del cultivo del hongo; observar al microscopio primero con el objetivo de menor aumento y, si fuera necesario, con el mayor para ver detalles. Dibujar y describir las estructuras visualizadas en el ocular: micelio, conidióforos, conidios, etc. Investigar bajo qué condiciones ambientales puede presentarse el ataque del hongo en raíces y bajo qué condiciones en las partes aéreas.

Este patógeno se puede aislar con facilidad de granos que presentan punta negra, de nudos con necrosis, o de la corona, raíz primaria y raíces secundarias de las plantas de cereales menores. Ataca también a una gran cantidad de especies de gramíneas (pastos).

Incremento de inóculo

Los medios de cultivo V8 al 30% y grano de trigo estéril (para su preparación ver el apéndice 1, p. 63) favorecen la esporulación de *B. sorokiniana*.

Para incrementar el inóculo, basta transferir pedazos pequeños del cultivo en medio PDA o V8 al 30% y mantener las cajas Petri a temperaturas de 22 a 25 °C durante 5 a 7 días. Después de ese tiempo, inundar las cajas Petri con agua estéril y raspar la superficie para obtener una suspensión de conidios que puede ajustarse a la concentración deseada usando un hemacitómetro Fuchs-Rosenthal o Neubauer.

Si se desean grandes cantidades de inóculo, se puede usar grano de trigo estéril en frascos, cuidando de mover el contenido de los frascos cada semana; es necesario mantenerlos en crecimiento durante tres a cuatro semanas en un cuarto con luz blanca. Para su uso final se puede lavar el grano y obtener una suspensión de esporas (aplicación foliar) o bien moler el grano (aplicación a raíces).

Conservación de las cepas

Las cepas purificadas de *B. sorokiniana* se conservan en tubos de ensayo en medio V8 al 30%. El crecimiento se cubre con aceite mineral esterilizado tres veces en autoclave (121 °C). Se recomienda regenerar las cepas cada año.

Las cepas se pueden conservar también en tejido vegetal, siguiendo el procedimiento que se describe enseguida. Se obtiene material enfermo en condiciones controladas de invernadero; una vez que genera síntomas, el material se corta, se seca en condiciones de ambiente durante 48 horas y se identifica correctamente. A continuación se envasa el material en bolsas de papel que se mantienen dentro de envases herméticos en refrigeración (4 °C). De esta forma, el material se conserva estable por más de 12 meses.

Identificación del tizón foliar, mancha amarilla o mancha bronceada causada por *Pyrenophora tritici-repentis* (anam. *Drechslera tritici-repentis*)

El tizón foliar (también conocido como mancha amarilla, mancha bronceada, atizonamiento de la hoja del trigo o mancha ocular) causado por *P. tritici-repentis* es una enfermedad que ataca al trigo, triticale y algunos pastos. Los síntomas aparecen como manchas necróticas, generalmente rodeadas por un halo clorótico, que varían en tamaño según la severidad del daño, llegando a coalescer hasta secar toda la hoja. Una característica importante es que la lesión presenta un punto más oscuro en el centro. Sin embargo, esta característica no es exclusiva de este hongo, ya que las manchas causadas por *B. sorokiniana* y *Stagonospora nodorum* también la presentan. Por esta razón, un diagnóstico final sólo se logra observando las estructuras al microscopio.

Resulta difícil aislar y hacer esporular este hongo en medio de cultivo, pues en la mayoría de los casos tiende a formar rápidamente la fase sexual (pseudotecios) (*Pyrenophora tritici-repentis*), aunque no logra madurar. Sin embargo, se ha observado que si las colonias con 5 a 7 días de crecimiento en medio de cultivo V8 al 30% se cubren con una película de agua estéril y se raspan, esto estimula la esporulación asexual dentro de las 48 horas siguientes.

La fase sexual ha sido reportada en muchos lugares del mundo y su formación parece depender, en particular, de las condiciones ambientales durante el invierno y comienzos de primavera. Se le encuentra normalmente en el rastrojo que permanece después de la cosecha.

Sintomatología y aislamiento del patógeno

Seleccionar hojas con lesiones típicas para la hoja de diagnóstico; pegar la muestra y describir los síntomas. Cortar pequeños pedazos de hojas con lesiones incipientes; desinfectarlas durante 1 ó 2 minutos en hipoclorito al 1%. Enjuagarlos en agua estéril y ponerlos a secar en papel filtro. Sembrar cinco pedacitos en una caja de Petri con medio V-8 al 30% (este medio es muy eficaz para el aislamiento y producción de esporas de este hongo) (ver el apéndice 1 para su elaboración).

Poner a incubar las cajas a una temperatura de 20-22 °C con luz fluorescente con longitud de onda cercana a la luz ultravioleta durante 5 a 7 días, alternando 10 horas de luz con 14 de oscuridad (condiciones indispensables para su esporulación). Para estimular la producción de conidios, cuando el cultivo tenga 5 a 6 días, agregar una capa de agua estéril y raspar con una espátula esterilizada. Remover el inóculo; volver a incubar la caja durante 48 horas más. Al término de este tiempo, volver a hacer preparaciones y observar al microscopio. Describir las características de la colonia. Describir y dibujar las estructuras que se observen.

Incremento del inóculo e inoculación

Para la producción de conidios. Si se quiere incrementar conidios, el medio de cultivo más eficaz es V8 agar al 30 % bajo luz cercana al ultravioleta con alternancia de luz-oscuridad. Se transfieren pedacitos de cultivos puros a cajas Petri con medio V8 al 30%. Entre el quinto y el séptimo día de crecimiento, se obtiene una suspensión de esporas después de raspar con una espátula el medio en las cajas Petri previamente cubierto con agua estéril. Se puede obtener una segunda cosecha de conidios, reincubando el medio durante 48 horas y repitiendo el proceso de raspado.

Este método tiene varias desventajas: es caro y los conidios deben aplicarse de inmediato al material a seleccionar, cuando hay humedad suficiente. Por tanto, es altamente dependiente del medio ambiente. No obstante, es recomendable para trabajos de selección en estado de plántula en el invernadero, donde hay buen control de las condiciones ambientales. Se recomienda utilizar un aspersor manual para aplicar la suspensión de conidios (30,000 esporas/ml) a la que se ha agregado unas gotas de Tween 20. Después de la inoculación, se colocan las plantas en una cámara húmeda durante 48 horas. Si el inóculo se aplica en campo, debe hacerse al atardecer, después de una lluvia, con un aspersor de volumen ultra bajo. Este método, desarrollado en los laboratorios y campos experimentales del CIMMYT, ha sido utilizado con éxito desde 1983 a la fecha en el mejoramiento genético de la resistencia a enfermedades del trigo de primavera.

Para la producción de propágulos formados por micelio. En este caso debemos contar con cultivos puros obtenidos en forma previa. Con un sacabocados esterilizado a la llama se obtienen círculos de cultivo con los que se inoculan matraces de 500 ml que contienen medio de cultivo líquido de sacarosa levadura (ver el apéndice 1 para su elaboración). Colocar los matraces en un agitador a 200 rpm. Después de siete días, el micelio habrá crecido lo suficiente para utilizarlo. Éste se licua varias veces hasta obtener una suspensión fina que se diluye a razón de 4 L de inóculo en 80 L de agua; agregar unas gotas de Tween 20.

Este tipo de inóculo es apropiado para inocular grandes extensiones de material genético bajo presión para obtener resistencia en campo. Puede aplicarse con un aspersor normal, pero debe repetirse varias veces durante el ciclo del cultivo. Este método, desarrollado y adaptado en los laboratorios y campos experimentales del CIMMYT, se ha utilizado a partir de 1993 para mejorar la resistencia a *P. tritici-repentis* en trigos de primavera. Es ideal para obtener una buena infección en grandes extensiones de tierra; sin embargo, tiene el inconveniente de que debe repetirse de 4 a 6 veces para asegurar la infección.

Para la producción de la fase sexual. La fase sexual (teleomorfo) se puede obtener en forma eficiente usando las estructuras de la panoja de plantas de avena. Cosechar las panojas cuando los granos estén en estado lechoso pastoso y las estructuras que los cubren, todavía verdes. Secar y guardar. Cuando se desee producir inóculo, el grano y sus estructuras se remojan en agua destilada durante 24 horas, al término de las cuales se elimina el exceso de agua. Llenar los frascos hasta tres cuartas partes con el material humedecido en agua; cerrar bien las tapas y luego regresarlas una media vuelta para permitir el intercambio de oxígeno. Esterilizar los frascos dos veces, dos horas cada vez, con un intervalo de dos días entre cada esterilización. Inocular los frascos con una suspensión de conidios obtenidos siguiendo las instrucciones incluidas en la sección "Para la producción de conidios" (p. 28), y cuidando de hacerlo en forma homogénea. Poner los frascos en un lugar con luz blanca cercana al ultravioleta, alternando ciclos de luz y oscuridad (12 y 12 horas), a una temperatura de entre 20 y 24 °C. Mover y agitar los frascos cada semana y observar el crecimiento de los pseudotecios. A partir de la tercera semana, sacar muestras para detectar, en observaciones al microscopio, su maduración, que es evidente por la formación de ascos y ascosporas en su interior. Una vez maduros los pseudotecios, lo cual normalmente ocurre cuatro a cinco semanas después de su inoculación con la suspensión de conidios, el material de avena está listo para ser aplicado en el centro de plantas en estado de amacollamiento.

Este método, desarrollado en el CIMMYT y usado con éxito durante los ciclos 2000 y 2001, tiene varias ventajas: 1) el inóculo puede ser aplicado en forma independiente del clima, ya que el hongo se mantiene en el sustrato aportado por el grano y la paja; 2) su costo es muy bajo, y 3) es ideal para inocular áreas extensas de material segregante.

Para la conservación de las cepas. Este patógeno se puede conservar a 4 °C, colocando el cultivo en tubos de ensayo con medio V8 agar al 30% y cubriéndolo con aceite mineral. Otra forma de conservarlo es en hojas inoculadas en condiciones controladas, siguiendo el mismo procedimiento que fue descrito para *B. sorokiniana*. Las cepas deben regenerarse cada año.

Identificación de las manchas causadas por *Pyrenophora* en cebada

La mancha reticulada de la cebada causada por *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* es muy común en las regiones frías y húmedas donde se produce este cultivo; es una mancha oscura que al desarrollarse forma un patrón en forma de red, con bandas transversales y longitudinales. Comúnmente se presenta en la hoja, aunque en las variedades muy susceptibles puede atacar a la espiga e infectar el grano.

Existe además otro tipo de mancha foliar, causada por *P. teres* f. sp. *maculata*, que provoca síntomas muy similares a la causada por *B. sorokiniana*, y sólo pueden diferenciarse mediante la observación de los conidios al microscopio.

Las especies *P. teres* f. sp. *teres* y *P. teres* f. sp. *maculata* presentan el mismo desarrollo morfológico en cultivo artificial; sin embargo, son capaces de inducir síntomas totalmente diferentes. La fase sexual se encuentra con bastante frecuencia en el rastrojo durante el ciclo invernante.

Sintomatología y aislamiento del patógeno

Pegar una muestra de cada una de las enfermedades en hojas de diagnóstico y describir los diferentes síntomas. Cortar pedacitos de tejido enfermo de cada muestra. Esterilizarlos en hipoclorito al 1% durante un minuto y enjuagarlos en agua estéril. Poner a secar en papel filtro y sembrar cinco pedacitos de cada muestra por caja con medio V-8 al 15%. Incubar las cajas a 20-22 °C durante 5 a 7 días alternando períodos de luz-obscuridad; *P. teres* no esporula si no existen estas condiciones. Hacer preparaciones y observar al microscopio. Describir la forma de crecimiento y color de las colonias en el medio. Dibujar las diferentes estructuras que se observen, diferenciando el tamaño y la forma de los conidios de cada especie aislada.

Incremento, preparación de inóculo e inoculación

Se desarrollan con antelación cultivos monospóricos del patógeno. Para incrementar el inóculo, transferir pedazos del cultivo a cajas Petri con medio V8 agar al 15%. Poner a incubar con alternancia de luz-obscuridad (12-12 horas), a una temperatura entre 20 y 22 °C. Cuando el micelio haya desarrollado conidióforos y conidios, cubrir el cultivo en las cajas con agua destilada estéril y rasparlos suavemente. Licuar el raspado durante un minuto y pasar a través de una gasa para eliminar cualquier pedazo de agar que pudo haber quedado. Ajustar el inóculo a la concentración deseada mediante la cámara de conteo Neubauer (ver procedimiento en la p. 14). Generalmente se utiliza una concentración de 30,000 esporas/ml para inocular tanto en campo como en invernadero.

Para lograr establecer la infección en condiciones de invernadero, aplique humedad continua durante dos horas y, enseguida, durante 15 minutos, cada dos horas, hasta completar 48 horas. Mantener las plantas durante una semana a una temperatura de 22 °C y una humedad superior al 75% en condiciones de invernadero para obtener una infección y desarrollo de síntomas que permitan discriminar entre las reacciones de resistencia y de susceptibilidad.

En condiciones de campo, aplique el inóculo con un aspersor de ultra bajo volumen sobre las plantas húmedas al atardecer. Las plantas deben estar, de preferencia, en estado de amacollamiento.

Para mantener las cepas, siga las mismas recomendaciones que para *P. tritici repentis* y *B. sorokiniana*; solamente cambie el medio de cultivo a medio V8 agar al 15%.

Identificación del tizón foliar causado por *Mycosphaerella graminicola* (anam. *Septoria tritici*) y tizón de las glumas causado por *Phaeosphaeria nodorum* (anam. *Stagonospora nodorum*) [ex. *Septoria nodorum*]

El trigo es atacado por varias especies comúnmente conocidas como septorias. Entre las más importantes están *Mycosphaerella graminicola* y *Phaeosphaeria nodorum*. La primera, el agente causal del tizón foliar, se presenta en regiones con pluviometría y humedad relativa altas, y temperaturas óptimas entre 18 y 22 °C. Esta mancha se identifica por la presencia de cuerpos asexuales (picnidios) de color negro formados por el hongo, que pueden sobresalir de la epidermis en ambos lados de la hoja, distribuidos en líneas paralelas siguiendo el patrón de los estomas, ya que se forman en la cavidad subestomática. Dentro de los picnidios se encuentran las picnidiosporas, delgadas, de forma alargada, que, ya maduras, salen del picnidio a través del ostiolo (abertura del picnidio) cuando existen condiciones de humedad favorables.

Stagonospora nodorum requiere de condiciones de humedad y temperatura similares a las requeridas por *S. tritici*, aunque un poco más templadas. Puede atacar todas las partes aéreas de la planta de trigo y, en particular, las glumas, nudos, entrenudos y hojas. A diferencia de *S. tritici*, los picnidios de *S. nodorum* son de color negro a rosado, producidos inmersos en la epidermis del tejido y distribuidos al azar. Las picnidiosporas son más pequeñas, cilíndricas, transparentes, con 0 a 3 septas.

En ambos casos, es frecuente encontrar la fase sexual al final del ciclo vegetativo del cultivo, pero su identificación es difícil, ya que la apariencia de los picnidios es muy similar a la de los peritecios. Solamente usando técnicas especiales en el laboratorio se logra su confirmación. Ambas especies se pueden aislar y cultivar en medios de cultivo específicos.

Sintomatología y aislamiento del patógeno

Recolectar muestras con síntomas de cada una de las dos enfermedades para la hoja de diagnóstico y describir los síntomas. En un portaobjetos, pegar un pedazo de hoja con síntomas, con el lado donde se observan los picnidios hacia arriba. Colocar en una caja de Petri con papel filtro que se satura con agua estéril para formar una cámara húmeda; sellar y poner bajo la luz a unos 15 ó 20 cm de distancia. Una o dos horas después, observar la caja (tapada) al estereoscopio; debe de haber exudados saliendo de los ostiolos de los picnidios. El exudado de *S. tritici* es blanco grisáceo, a diferencia del de *S. nodorum*, que es de color rosado. Con una aguja estéril y un mechero cerca, tomar el exudado y sembrarlo en una caja que contenga el medio de cultivo específico 444 agar malta levadura. Incubar la caja durante 6 a 8 días. Describir las características de las colonias.

Realizar cortes finos de los picnidios y hacer preparaciones en portaobjetos; observar al microscopio, describir y dibujar el tipo de picnidiosporas producido por cada especie.

Incremento de inóculo e inoculación

A partir de las colonias obtenidas, incrementar el inóculo siguiendo el procedimiento que a continuación se describe.

Bajo condiciones asépticas, raspe con una espátula la superficie del cultivo y transfiera lo raspado a un matraz Erlenmeyer con agua destilada y esterilizada (raspar de 1 a 2 cajas por 75 ml de agua). Agite para homogeneizar la suspensión. Con una micropipeta o jeringa estéril, transfiera entre 0.5 y 1 ml de la suspensión al medio de cultivo específico para cada especie.

Para *S. tritici* se puede utilizar medio sólido 444 agar malta levadura o medio líquido sacarosa levadura (ver su elaboración en el apéndice 1). Si usa medio sólido, distribuya el inóculo en forma homogénea sobre el medio con una varilla de vidrio en forma de L, antes esterilizada en alcohol y flameada. Si en su laboratorio cuenta con un plato giratorio, úselo para hacer más rápido y eficiente el trabajo, aunque no es indispensable. Selle las cajas con parafilm e incúbelas a una temperatura de 18 a 22 °C, con luz natural, o bien, en la obscuridad, durante cinco días. Las cajas Petri se cubrirán con un crecimiento levaduroide de color rosado. El inóculo puede usarse de inmediato, o bien, guardarse unos dos o tres días sin que pierda su viabilidad.

Si se usó medio líquido para incrementar el inóculo, tape los matraces con algodón y agítelos en forma constante durante 5 a 6 días a una temperatura de 18 a 22 °C, en un agitador mecánico. Si el inóculo se guarda más tiempo, pierde viabilidad; por tanto, debe usarse de inmediato.

Para *S. nodorum* se recomienda el uso de una gran variedad de medio sólidos, entre ellos agar V8 al 30%, agar extracto levadura, agar papa dextrosa y 444 malta levadura. Sin embargo, nuestra experiencia indica que debe evaluarse la eficacia de los medios en cada lugar, ya que los que funcionan en una localidad no necesariamente funcionan en otras. En el caso de México, se encontró que solo funcionan en forma efectiva V8 al 30%, agar extracto de levadura y agar frijol lima (no se había reportado que este último fuera apto para este propósito en otros lugares). Las cajas Petri con el hongo se incuban a 22 °C con luz cercana al ultravioleta, hasta que desarrollen picnidios.

Para llevar a cabo las inoculaciones de *S. tritici*, el crecimiento del hongo en las cajas Petri se cubre con agua destilada estéril y se raspa con una espátula. La suspensión se pasa a través de una gasa para eliminar los restos de agar. La concentración se ajusta a 50,000 a 70,000 esporas/ml con el hemacitómetro (ver instrucciones en la p. 14). Agregue 2 ó 3 gotas de Tween 20 como adherente.

Para realizar inoculaciones en el campo, se asperja el inóculo con un aplicador de ultra bajo volumen al atardecer, cuando haya mucha humedad libre sobre las hojas y una alta probabilidad de que estas condiciones se prolonguen durante 48 horas continuas. El estado de desarrollo de las plantas debe ser de amacollamiento a encañado.

Cuando el inóculo se ha preparado en medio líquido a partir del crecimiento en los matraces, es indispensable verificar que cada matraz tenga el crecimiento correcto, ya que es frecuente la contaminación por bacterias. Los matraces contaminados deben descartarse antes de hacer la suspensión final. Se pasa la suspensión de los matraces a través de gasa para eliminar el exceso de micelio, se ajusta la concentración y se aplica como en el caso anterior.

En el caso de *S. nodorum*, la caja con el cultivo está lista para usarse cuando los picnidios comienzan a producir cirrus y se observa claramente el exudado sobre los ostiolos. Se obtiene una suspensión de las picnidiosporas haciendo un lavado con agua destilada estéril. Para mantener cepas de cada especie, use el medio específico que se recomienda para cada una de ellas y hágalos crecer en tubos de ensayo con el medio inclinado, o bien incremente las cepas en el invernadero y consérvelas en hojas en refrigeración a 4 °C.

Identificación de fusariosis o roña de la espiga causada por *Fusarium* spp.

La fusariosis o roña de la espiga de trigo ataca la planta a partir de la emisión de la espiga, aunque la floración es el estado más susceptible. En México, la especie causal que predomina es *Fusarium graminearum* (teleom. *Gibberella zeae*), pero también están presentes *F. culmorum*, *Microdochium nivale* (antes *F. nivale*), *F. equiseti* y *F. avenaceum* (teleom. *Gibberella atenacea*).

La identificación de las especies de *Fusarium* no es fácil, dado que las diferencias entre ellas son poco evidentes. El medio de cultivo PDA se utiliza con buenos resultados en el aislamiento de estos hongos. Existen otros medios específicos para aislar este género, como agar harina de maíz, que se encuentra en el mercado ya preparado y listo para hidratarse, y el PCNB. Estos medios ayudan en la esporulación y aislamiento, y evitan problemas con saprófitos. Los criterios básicos para la identificación de las especies de *Fusarium* son la presencia y la forma de los microconidios, macroconidios y clamidosporas (consultar la sección “Aislamiento e identificación de *Fusarium*” en la p. 39). Las claves más utilizadas son las de Booth y de Toussoun y Nelson (citas en la sección mencionada).

Cuando el patógeno ataca las espigas, éstas muestran diferentes coloraciones que van desde el blanco-rosado hasta el naranja. En algunas localidades, la fase sexual se desarrolla en las glumas al final de ciclo vegetativo y permanece en el rastrojo durante el invierno.

Sintomatología y aislamiento del patógeno

Pegar una espiga en la hoja de diagnóstico; observar y describir los síntomas de la enfermedad. Desinfectar las pinzas. Separar cuidadosamente las estructuras florales y tomar con las pinzas granos de espiguillas infectadas, preferentemente de donde se observe micelio. Depositar en forma directa en cajas de Petri con medio papa dextrosa agar. Incubar las cajas durante 5 a 7 días bajo luz cercana al ultravioleta, que estimula el desarrollo de la fase asexual. Al término de este período, observar al microscopio y tratar de identificar la especie o especies presentes. Si existen contaminantes, es necesario purificar el cultivo transplantando una pequeña parte de las orillas de la colonia del hongo deseado a otra caja con PDA. Incubar durante 5 a 7 días.

Si se desea obtener cultivos 100% puros, sembrar diluciones de una suspensión de conidios en agar-agua y sacar con una aguja de disección conidios individuales que estén germinando, dentro de un plazo no mayor de 12 horas. Describir las características de la colonia. Dibujar y describir las estructuras vistas al microscopio.

Preparación del inóculo e inoculación en campo

Para evaluar material genético con resistencia a fusariosis, generalmente se utilizan dos métodos: inoculación de espiga individual e inoculación en masa.

Preparar el inóculo a partir del raspado de varias cajas de cultivo del hongo puro, como sigue: agregar agua destilada y raspar con una espátula o bisturí; filtrar la suspensión a través de una malla o gasa y, con el hematócimetro, calcular una suspensión de 50,000 esporas por ml. De ser posible, preparar el inóculo inmediatamente antes de la inoculación; no obstante, el inóculo permanece infectivo hasta 36 horas si se le mantiene en refrigeración a 4-5 °C.

Existe un medio de cultivo líquido natural, excelente para el incremento de inóculo, que se elabora a base de una especie de frijol conocida como frijol chino (*Vigna radiata*) (ver su preparación en el apéndice 1). Entre sus ventajas figuran que 1) al crecer en el frijol chino, el hongo produce únicamente conidios en gran cantidad, y 2) la virulencia de los aislamientos no se ve alterada durante su multiplicación, fenómeno negativo para los propósitos de la investigación, que es muy común en las especies del género *Fusarium* cuando crece en medios de cultivo sintéticos.

Inoculación de espiga individual (método del algodón). Este método es aconsejable cuando se selecciona para mejorar la resistencia tipo II. Seleccionar 10 espigas por línea e identificarlas con etiquetas. Las anteras deben estar comenzando a emerger de las florecillas. Cortar las barbas para facilitar el embolsado. Saturar un pedacito de algodón con la suspensión de esporas; abrir las glumas e inocular en el punto medio de la espiga, colocando una mota del algodón saturado en cada lado. Cubrir la espiga con una bolsa de papel glassine, anotando en ella la fecha de inoculación.

Inoculación en masa. Se aconseja este método cuando se evalúa un gran número de líneas avanzadas o poblaciones segregantes, o bien cuando se busca seleccionar para mejorar la resistencia tipo I. Se aplica el inóculo con un aspersor a una distancia de 10 a 15 cm, hasta que se observe un empapado uniforme de las espigas. Deben realizarse inoculaciones semanales por lo menos tres veces consecutivas si las condiciones ambientales no son óptimas. La inoculación debe hacerse cuando un 5-10% de las anteras en la parcela hayan emergido.

La evaluación se realiza 30 a 40 días después de haber inoculado, al final de la formación del grano, cuando las espigas están todavía verdes y hay un contraste fuerte entre el color de las espiguillas sanas (verdes) y las enfermas (amarillas). La inclusión de testigos susceptibles y resistentes es fundamental para determinar el día en que debe comenzar la evaluación, ya que esto variará de un ciclo a otro, dependiendo de las condiciones ambientales. La evaluación se puede realizar calculando porcentajes con base en el número de espiguillas enfermas respecto al número total de espiguillas.

Conservación de las cepas

Las cepas se pueden conservar en medio natural de grano de trigo estéril (ver el apéndice para su preparación) en tubos de ensayo. Cada aislamiento se deja crecer en forma individual durante 10 días, a una temperatura de 20 a 22 °C, para luego mantenerlos a 4 °C.

Otra forma de conservar las cepas es en papel filtro esterilizado en autoclave. Para este propósito se hace crecer el aislamiento en PDA o CMA; cuando se encuentra bien desarrollado se depositan sobre él, en forma aséptica, pedacitos de papel filtro estéril que se incuban hasta que el cultivo cubra los pedacitos de papel. Entonces se sacan cuidadosamente y se guardan a 4 °C en sobres de papel aluminio claramente identificados.

Bibliografía

- Duveiller, E., Dubin, H.J., Reeves, J. y McNab, A. (eds.). 1998. *Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot. Proc. of an Internacional Workshop*. Mexico, D.F.: CIMMYT. 376 p.
- Evans, C.K., Hunger, R.M. y Siegerist, W.C. 1993. Enhanced production of *Pyrenophora tritici-repentis* conidial suspensions. *Plant Disease* 77:981-984.
- Eyal, Z., Scharen, A.L., Prescott, J.M. y van Ginkel, M. 1987. *Enfermedades del trigo causadas por Septoria: Conceptos y métodos relacionados con el manejo de estas enfermedades*. Mexico, D.F.: CIMMYT.
- Gilchrist-S., L., Fuentes, S. y M. de L. de la Isla de Bauer. 1984. Identificación de *Helminthosporium tritici-repentis* (= *Pyrenophora tritici-repentis*), agente causal de un tizón de la hoja de trigo en México. *Agrociencia* 56:156-162.

- Gilchrist, L. y Dubin, H.J. 2002. Septoria diseases of wheat. 273-278. In: *Bread Wheat Improvement and Production*. B.C. Curtis, S. Rajaram y H. Gómez Macpherson (eds.). FAO, Roma.
- Lopez-Atilano, R.M., Gilchrist-Saavedra, L. y Leyva-Mir, G. 2002. Evaluación de medios de cultivo para el incremento de inóculo de *Stagonospora nodorum*. Memorias del XXIX Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Monterrey, Nuevo León, México. Abstract F-94.
- Richards, G.S. 1951. Factors influencing sporulation by *Septoria nodorum*. *Phytopathology* 41:571-578.
- Schilder, A.M.C. y G.C. Bergstrom. 1990. Variation in virulence within the population of *Pyrenophora tritici-repentis* in New York. *Phytopathology* 80:84-90.
- Sivanesan, A. 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exerohilum* and their teleomorphs. CAB International, Wallingford, Reino Unido. 261 p.
- Wallwork, H. 2000. *Cereal Leaf and Stem Diseases*. Kondinin Group, Australia. 104 p.

Capítulo 4 Deuteromycetes

Introducción

Existe en la naturaleza un gran número de hongos que, pese a ser de micelio septado, raras veces o nunca se reproducen sexualmente; por esto se les ha denominado Hongos Imperfectos o Deuteromycetes. La mayoría son saprófitos o parásitos débiles de las plantas, los animales y el hombre. Algunos son patógenos de otros hongos y nematodos.

Los Deuteromycetes sobreviven perfectamente en la naturaleza sin necesidad de reproducirse sexualmente. Llevan a cabo la reproducción asexual a partir de un estroma que genera conidios, o conidios que se desarrollan sin hifas especiales (conidióforos), o cuerpos fructíferos como picnidios, acérvulos, esporodoquios y sinemas.

Identificación de punta negra causada por *Alternaria alternata*, *A. triticina* y/o *Bipolaris sorokiniana*

La punta negra es causada principalmente por tres especies diferentes, *Alternaria alternata*, *A. triticina* y/o *Bipolaris sorokiniana* (*Cochliobolus sativus*) que ennegrecen uno de los extremos del grano. Para saber cuál o cuáles de las tres especies está causando el daño, es necesario aislar una muestra en medio de cultivo y realizar la identificación al microscopio.

Sintomatología y aislamiento del patógeno

Recolectar una muestra para la hoja de diagnóstico y describir los síntomas. Colocar en cajas de Petri, por separado, hipoclorito de sodio al 3% y agua estéril; esterilizar los granos en el hipoclorito durante 1 min y con pinzas esterilizadas transferirlos al agua estéril para eliminar el exceso de hipoclorito. Secar el exceso de agua sobre papel toalla para reducir el crecimiento de bacterias contaminantes. Enseguida se siembran cinco granos procedentes de cada localidad en estudio en sendas cajas de Petri con PDA.

Incubar las cajas durante 5 a 7 días; realizar preparaciones y observar al microscopio. Describir el color y la forma de la colonia en cada caso. Dibujar las estructuras que observe de cada aislamiento. Describir la forma, el número de septas y otras características que se observen en los conidios de cada aislamiento. Investigar bajo qué condiciones ambientales podrían ocurrir los daños provocados por cada patógeno.

Identificación de escaldadura de la cebada causada por *Rhynchosporium secalis*

La escaldadura (agente causal, *Rhynchosporium secalis*) es una de las enfermedades más importantes de la cebada en áreas frías y húmedas, y en tierras altas del trópico donde hay mucha precipitación y las temperaturas se mantienen bajas por la altura. Afecta principalmente las hojas, aunque puede dañar

también las glumas, aristas y granos. Los síntomas en campo son fácilmente reconocibles, pues se presentan al principio como lesiones ovaladas, alargadas o elípticas, con bordes café oscuro o rojizo y centros de color gris o café paja.

El aislamiento y cultivo de este hongo presenta algunas dificultades. Dado que su desarrollo es muy lento, los primeros indicios de crecimiento aparecen sólo después de 14 días de incubación. Por tanto, se recomienda eliminar todo crecimiento que aparezca antes de ese plazo porque probablemente sea contaminación. Para una identificación rápida, basta hacer preparaciones directas para el microscopio de tejido enfermo donde se observaron conidios. Sin embargo, si se desea aislar para hacer colección de virulencias y, posteriormente, incremento de inóculo para pruebas de resistencia, se recomienda el método descrito a continuación.

Sintomatología y aislamiento del patógeno

Recolectar muestras de hojas de cebada con síntomas de escaldadura para la hoja de diagnóstico y describir los síntomas observados.

Identificación directa de tejido enfermo. Con una navaja de rasurar (una "Gillette") o un bisturí, raspar la superficie de una hoja con lesiones claras y hacer la preparación. Observar al microscopio, dibujar y describir las estructuras del hongo.

Aislamiento en medio agar frijol lima (lima bean agar o LBA) e incremento posterior. Cortar pedacitos de tejido con lesiones jóvenes, de preferencia de color verde grisáceo sin bordes necróticos marcados. Remojar los pedacitos de tejido en alcohol etílico al 70% durante 15 a 20 segundos. Transferir los pedacitos a hipoclorito de sodio (grado comercial, 5.25% en peso) diluido en agua a 1:9. Remojar el tejido en el hipoclorito durante 90 segundos (asegurarse que los pedacitos estén bien sumergidos en el hipoclorito). El tiempo de remojo es importante; por ejemplo, si las muestras se dejan sólo 60 segundos, presentan mucha contaminación en los cultivos, pero si se remojan 2 minutos o más, se elimina el hongo. Después del remojo, transferir los trocitos de tejido a cajas con medio de cultivo.

Incubar las cajas a 18-20 °C. Schein y Kerelo (1956) indican que se requieren de 5 a 7 días para observar crecimiento, pero, en nuestra experiencia, este plazo se prolonga de 10 a 14 días. El crecimiento del hongo en este medio no es muy rápido, pero las pequeñas colonias que resultan son totalmente puras.

Incremento de inóculo e inoculación

Para obtener un gran número de esporas por cultivo, se recomienda sembrar en zigzag en tubo o caja de Petri, como se indica a continuación.

Tomar con una aguja estéril el crecimiento incipiente y diluirlo en 1 ml de agua estéril; agitarlo con fuerza para que la suspensión se homogenice. Con una pipeta Pasteur previamente flameada y enfriada, tomar una pequeña cantidad y depositarla sobre el medio de cultivo. Con la flama se dobla la punta de la pipeta Pasteur, que luego se enfría y se desliza suavemente sobre la superficie del medio de cultivo a fin de distribuir el inóculo en la forma más homogénea posible. El cultivo que se obtiene después de 8 días tiene la apariencia de levadura y una concentración de 30 millones de esporas, o más. Todos los aislamientos que crecen en este medio tienen un tono rosado que contrasta con el color negro o café que adquieren en otros medios de cultivo.

No es posible conservar las cepas en medios de cultivo de un ciclo a otro, pues *Rhynchosporium secalis* no es capaz de sobrevivir en un medio. Por eso se recomienda mantener las cepas en hojas infectadas con lesiones incipientes que se secan y luego son guardadas en bolsas de papel dentro de un recipiente hermético a 4 °C.

Si se quiere seleccionar germoplasma, el inóculo se prepara raspando el crecimiento con una espátula estéril y obteniendo una suspensión que se aplica en un ambiente muy húmedo con agua libre sobre las hojas. Para inocular áreas extensas y disminuir los costos, se recomienda incrementar la infección sobre un área o bordos compuestos de variedades susceptibles. Cuando la infección se haya desarrollado, cortar las plantas y distribuir los tallos dentro de las hileras a seleccionar. La infección pasará fácilmente al nuevo material y éste podrá ser seleccionado eficientemente.

Bibliografía

Schein, R.D. y J.W. Kerelo. 1956. Culturing *Rhynchosporium secalis*. *Plant Disease Reporter* 4(9):814-815.

Capítulo 5 Hongos del suelo, la corona y las raíces

Introducción

Los patógenos del suelo producen enfermedades asociadas con la inhibición o la destrucción, o ambas, del sistema radical de las plantas. Resulta difícil identificar todos los problemas que los fitopatógenos del suelo pueden provocar; sin embargo, es factible agrupar estos hongos en forma general, según las zonas climáticas donde predominan. Por ejemplo, *Bipolaris*, *Fusarium* y *Pythium* son importantes en climas templados, *Sclerotium rolfii* lo es en el subtropical y *Gaeumannomyces graminis* prevalece en zonas frías y lluviosas.

En general, los efectos de estos patógenos en la planta son un desarrollo menor, menor número de macollos y madurez prematura (espigas blancas). Asimismo, se observa una distribución irregular de grupos de plantas enfermas en el campo.

Sintomatología de *Fusarium* y *Bipolaris sorokiniana* (sin. *Helminthosporium sativum*)

Fusarium y *Bipolaris sorokiniana* se presentan en muchas regiones debido a su variada gama de hospederos y amplia adaptación a temperaturas. Ambos patógenos interfieren con la etapa de establecimiento, así como la pre y post-emergencia de la raíz, especialmente si se presentan cuando la temperatura del suelo es alta (25-30 °C) en el momento de la siembra. Los suelos húmedos tienden a favorecer los daños causados por *B. sorokiniana*, mientras que los secos tienden a favorecer el desarrollo de *Fusarium*, especialmente cuando las plantas se acercan a la madurez y ésta coincide con períodos de sequía.

Cuando el trigo se acerca a la madurez, se pueden observar espigas blancas esparcidas por el cultivo, ya sea en uno o muchos tallos o en grandes grupos irregulares. Si la infección es provocada por *Fusarium*, los entrenudos de la base de las plantas que presentan espigas blancas son de color oscuro a café claro. En climas templados, el desarrollo de espigas blancas está estrechamente relacionado con la sequía, pues cuanto más intensa sea ésta cerca de la madurez, mayor es la probabilidad de que se observe el síntoma de espigas blancas.

En cuanto a *B. sorokiniana*, la sintomatología característica son lesiones de color café a negro en el entrenudo debajo de la corona, que tienden a intensificarse a medida que crece la planta. Durante la época de crecimiento, los cambios en la severidad de las lesiones pueden ser observados mientras las subcoronas mantengan su integridad. *Bipolaris sorokiniana*, al igual que *Fusarium* y *Gaeumannomyces graminis* (mal del pie), puede causar el síntoma de espigas blancas cuando las plantas se acercan a la madurez.

Aislamiento e identificación de *Fusarium*

Generalmente se usa PDA para aislar e identificar *Fusarium*, pero algunos estudios especiales requieren de medios selectivos. A continuación se señalan los componentes y el modo de preparar medio selectivo PCNB para *Fusarium*, en cantidad suficiente para 40 ó 50 cajas de Petri (15 x 100 mm).

Componentes:

Agua desionizada	1000 ml
Agar	20 g
Peptona	15 g
Fosfato de potasio (monobásico KH_2PO_4)	1 g
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 g

Mezclar, disolver y esterilizar. El medio se enfría a 45-50 °C y se agregan los siguientes ingredientes:

PCNB (pentacloronitrobenceno; Terraclor)	0.5 g
Bacto-oxgall	1 g
Sulfato de estreptomicina	0.1 g
Clorotetraciclina-HCL	0.05 g

El sulfato de estreptomicina se suspende en 3 a 5 ml de alcohol al 95%; los demás ingredientes se agregan secos. El medio se agita suavemente durante 2 ó 3 minutos, teniendo cuidado de no formar burbujas.

Procedimiento: De las plantas recolectadas en el campo, escoger el material del cual se hará el aislamiento. Observar el tejido descolorido al estereoscopio. Algunas veces se observa en el primer entrenudo que el micelio de *Fusarium* crece tanto en el exterior como el interior del tejido; en ese caso, la superficie del tejido no se esteriliza.

Utilizar pinzas para remover las vainas de las hojas tan asépticamente como sea posible (no tocar el tejido con los dedos). Con tijeras previamente flameadas, cortar el tejido del entrenudo en segmentos pequeños (0.5 cm o menos) y colocarlos en una caja de Petri. Se requieren 5 a 10 pedacitos de cada entrenudo para sembrarlos en una caja con medio selectivo o con PDA. Incubar las cajas y, 3 a 5 días después, observar el desarrollo de *Fusarium*. Este debe presentar un crecimiento micelial aéreo veloso que varía de blanco puro a rojizo con una ligera sombra amarilla. Los subcultivos se deben purificar en este momento y colocarse en el mismo medio. Examinar los subcultivos al microscopio y determinar si están puros, para identificarlos y, posteriormente, almacenarlos.

Para identificar las especies de este género, es preciso trabajar con cultivos producidos por un solo conidio; sin embargo, los trabajos de resistencia deben hacerse con una mezcla de aislamientos con el fin de mantener una diversidad genética tan grande como sea posible. El trabajo de identificación se hace principalmente en laboratorio usando aislamientos purificados que provienen de una sola espora. **No debe hacerse ningún tipo de evaluación de resistencia del hospedero usando sólo aislamientos procedentes de conidios individuales. Éstos deben multiplicarse individualmente y mezclarse al momento de preparar el inóculo.**

La mayor parte del trabajo de crecimiento y purificación de *Fusarium* se hace en CMA o PDA, medios apropiados para iniciar cultivos que han estado almacenados. También se pueden usar porciones de estos cultivos para infectar medio de semilla de trigo utilizado en ensayos de patogenicidad e incrementar inóculo para pruebas de campo.

Para identificar las especies de *Fusarium*, se recomienda hacer esporular los aislamientos bajo condiciones estandarizadas y usar un solo medio de cultivo. Tousson y Nelson recomiendan usar pedazos de hoja de clavel inmersos en agar agua. Se ponen de 4 a 5 pedazos de hoja en la superficie de

agar-agua al 2%, equidistantes del centro, donde se coloca una porción del aislamiento en crecimiento activo. Se repite el procedimiento en varias cajas que luego se sellan y se incuban a temperatura ambiente (25 °C) bajo luz fluorescente (con ciclo alternado de 12 h luz-12 h oscuridad).

Después de 6 a 7 días, se examinan las cajas. Cuando un aislamiento ha comenzado a esporular, se toma un caja para hacer observaciones y tomar notas de la presencia de microconidios, macroconidios, clamidosporas, etc. Con base en la morfología de las estructuras observadas y utilizando las claves que se indican en las referencias, se empieza a reducir el número de especies que podrían estar presentes. Las siguientes son características importantes para utilizar correctamente cualquiera de esas claves:

- a) Micelio septado.
- b) Macroconidios: Son grandes, con más de 2 septas. Se debe observar la célula apical, célula basal (célula con pie) y el número de septas. Es muy importante la forma que tienen las células apicales y basales. La fijación del esporóforo o conidióforo puede ser una característica importante a considerar.
- c) Microconidios: Son pequeños, con 1 a 2 células; no todas las especies los producen. Es importante determinar si se producen o no.
- d) Clamidosporas: Esporas latentes, de paredes gruesas, producidas por hifas y conidios. Su presencia o ausencia es un factor importante. Generalmente se forman en cultivos de más de una semana de edad.

Durante este proceso se debe tener paciencia. Seleccionar de 1 a 4 aislamientos que representen tipos diferentes (por ejemplo, colonias blancas o colonias de muchos colores). Estos se trabajan en detalle, observando los macroconidios, presencia o ausencia de microconidios, etc., de preferencia a lo largo de varios días, empleando un par de aislamientos. Una vez que se esté familiarizado con la variación y las especies con las que se trabaja, será mucho más fácil categorizar la mayoría de los aislamientos que se tengan.

Preparación de inóculo e inoculación en raíces

Cuando se desea producir inóculo e inocular el suelo para infectar las raíces, se recomienda usar grano de trigo estéril en frascos (para su preparación, ver el apéndice 1). Los frascos se inoculan con los aislamientos deseados y se mantienen en una pieza con luz blanca.

Cuando el grano ha sido invadido por el hongo y éste ha esporulado en forma abundante (alrededor de un mes), el inóculo se extiende en condiciones de medio ambiente para que seque (2 días). Después se muele en un molino de café o un aparato similar. Se pesan cantidades iguales de inóculo, que se aplicarán a cada línea genética a evaluar. Se recomienda calibrar la cantidad de inóculo según el lugar donde se vaya a hacer la evaluación. Se comparan las reacciones producidas en germoplasma susceptible y en resistente antes de aplicar el inóculo a un gran número de líneas.

Durante el proceso de establecimiento del germoplasma, se recomienda incluir los testigos y repetirlos cada cierto número de líneas para poder observar la variación de la infección en el material genético. Esta variación es normal cuando se trabaja con organismos que viven en el suelo y atacan las raíces. El inóculo se puede mezclar con la semilla dos días antes de la siembra, o bien, se aplica al suelo en el mismo surco donde se pondrá la semilla.

Aislamiento e identificación de *Bipolaris sorokiniana* (*Cochliobolus sativus*)

El aislamiento e identificación de *B. sorokiniana* suele ser menos problemático que las especies del género *Fusarium*; en general se usa el medio PDA, aunque para trabajos específicos se pueden usar medios selectivos como el agar modificado de Czapek que a continuación se describe.

Componentes:

Agua desionizada	1000 ml
Caldo Dox de Czapek	35 g
Agar	15 g

Mezclar y esterilizar el medio y dejar enfriar a 46-50 °C; después agregar:

Estreptomicina	0.1 g
Benomyl (Benlate 50 WP)	0.004 a 0.008 g

Fórmula del caldo de Czapek:

Sacarosa	30 g
Nitrato de sodio (NaNO ₃)	3 g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄ -3H ₂ O)	1 g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ -7H ₂ O)	0.5 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.5 g
Sulfato ferroso (FeSO ₄ -7-H ₂ O)	0.01 g
Agua destilada	1000 ml

El crecimiento de *B. sorokiniana* es usualmente visible como un frente de micelio blanco que avanza y que se torna oscuro detrás de ésta área. Los cultivos tienen que ser examinados microscópicamente para verificarlos porque en el medio, las especies de *Alternaria* muestran características de crecimiento similares, aunque los conidios son diferentes y se producen en cadena.

Helminthosporium spiciferum también se puede aislar usando este método, aunque su crecimiento es muy diferente, pues es de tipo veloso y color oscuro descolorido. Esta especie produce sus conidios en verticilos en la punta de los conidióforos. Los conidios son también mucho más pequeños que los de *B. sorokiniana*, producidos individualmente o en pares sobre la base del conidióforo. Con algo de experiencia, estas diferencias son fáciles de distinguir al estereoscopio.

Procedimiento: Para hacer un aislamiento a partir de tejido vegetal o de los entrenudos abajo de la corona, se recomienda seguir la siguiente metodología:

Traer al laboratorio el material vegetal ya lavado. Cortar los entrenudos abajo de la corona, al igual que el sistema radical seminal. Desinfectar superficialmente la muestra 1 minuto y colocarla en una solución 1:1 (alcohol-hipoclorito de sodio al 5%). Lavar dos veces con agua estéril y poner a secar en papel absorbente. Los pedacitos desinfectados se siembran acomodando cinco por caja de medio y se ponen a incubar a 22 °C durante cinco días.

Sintomatología de *Pythium*, *Gaeumannomyces* y *Rhizoctonia*

Pythium

Pueden presentarse muchas especies del género *Pythium* que dañan a los cereales. El daño que causa en el campo es un achaparramiento y amarillamiento de las plantas que puede ser muy obvio, aunque casi indistinguible de los síntomas causados por deficiencia de nitrógeno. Al realizar un examen directo de las raíces, éstas se observan atrofiadas y acuosas, con lesiones de color café rojizo. Se pueden buscar directamente las oosporas en el tejido radical coloreando el tejido con lacto fuscina (0.1 g ácido fuscínico/100 ml de ácido láctico).

Gaeumannomyces graminis var. *tritici* (sin. *Ophiobolus graminis*), mal del pie

Los síntomas de mal del pie se inhiben cuando la temperatura del suelo sobrepasa los 27 °C. Por eso, este patógeno puede no ser importante en zonas tropicales donde las temperaturas son altas, pero predomina en áreas donde la temperatura del suelo es relativamente baja (10-15 °C) y éste está sobresaturado por exceso de lluvia.

El daño en las regiones templadas se manifiesta primordialmente en la aparición en el campo de pequeñas áreas irregulares de plantas muertas prematuramente (espigas blancas), similares a las causadas por *Fusarium*. Sin embargo, muy distinto a los síntomas de ese mal es el color negro brillante que se observa al examinar las raíces y entrenudos más bajos de la planta. Se forma además una red de micelio en la superficie de las raíces, que presenta una apariencia oscura al observarse al microscopio. Es común observar en las vainas del tallo los peritecios correspondientes a la fase sexual del patógeno.

Rhizoctonia

Rhizoctonia puede causar marchitez o amarillamiento de las plántulas y/o daños a las plantas adultas similares a los provocados por *B. sorokiniana* y *Fusarium*. En planta adulta, ocasiona una lesión llamada mancha ocular (quiebra-paja) en la base de los tallos, que puede debilitarlos y llevar subsecuentemente al acame.

Aislamiento de *Pythium*, *Gaeumannomyces* y *Rhizoctonia*

La técnica que se describe a continuación da buenos resultados en el aislamiento de *Pythium* y *Gaeumannomyces* del sistema radical de trigo. También ha probado ser útil para aislar *Rhizoctonia* de tejido de trigo.

La técnica básica consiste en usar como trampa tejido de las raíces u otras partes de la planta infectada. Cuando se intenta aislar *Pythium*, se usan raíces de trigo recolectadas en el campo en las que se sospecha un problema relacionado con *Pythium*, aunque quizá no haya síntomas bien definidos. Una de las razones por las que no se definen es que otros organismos patógenos y saprófitos pueden estar presentes en la misma lesión, especialmente conforme las plantas se aproximan a la madurez. Por eso se tiene poco éxito cuando se intenta aislar *Pythium* y *Gaeumannomyces* directamente del tejido radical infectado.

Para aislamientos de *Pythium* y *Gaeumannomyces* se usa agar harina de maíz. Este medio se puede preparar con 40 g de harina de maíz en un litro de agua, mantenida a 50 °C por una hora, filtrar, agregar 15 g de agar y esterilizarlo. *Rhizoctonia* crece fácilmente en PDA.

Trampas. Recolectar en el campo sistemas radicales con síntomas, llevarlos al laboratorio y lavarlos cuidadosamente sobre tamices con agua corriente para remover, hasta donde sea posible, la tierra y otros desechos. Colocar este material en macetas parcialmente llenas con arena estéril; sembrar de 4 a 6 semillas de trigo sobre el material radical (Figura 14 a). Cubrir las raíces y las semillas con 2 cm de arena estéril. Regar las macetas y ponerlas a incubar en una mesa de laboratorio con iluminación complementaria (12 horas de luz). En el caso de *Rhizoctonia*, la temperatura debe ser de 20 a 25 °C, para *Gaeumannomyces* de 14 a 16 °C y para *Pythium* de 18 a 20 °C. Las macetas deben tener un drenaje adecuado; durante el desarrollo de la prueba se agrega agua según sea necesario.

Las plántulas se extraen cuando tienen 5 a 6 días de emergidas, como sigue (Figura 14 b). Las raíces se sacan cuidadosamente del suelo y se lavan sumergiéndolas con cuidado en agua, de tal manera de recuperarlas intactas. Si *Pythium* está presente, las raíces infectadas están poco desarrolladas y usualmente tienen una coloración café claro. En el caso de *Rhizoctonia*, se observan lesiones de color café y en el de *Gaeumannomyces*, de color negro (Figura 14 c).

Para los aislamientos pueden seguirse dos métodos:

1. Todo el sistema radical puede ser suavemente extendido sobre la superficie de una caja con medio de cultivo. Este método generalmente se usa cuando hay pocos síntomas visibles, o ninguno.
2. Cuando se observan síntomas severos, se cortan segmentos individuales de tejido radical infectado y se siembran en cajas con un medio indicado para las especies que se sospecha están presentes. Con este método normalmente no se esteriliza el material vegetal. Secar bien las raíces antes de pasarlas al medio de cultivo; así se evitará el exceso de contaminación por bacterias.

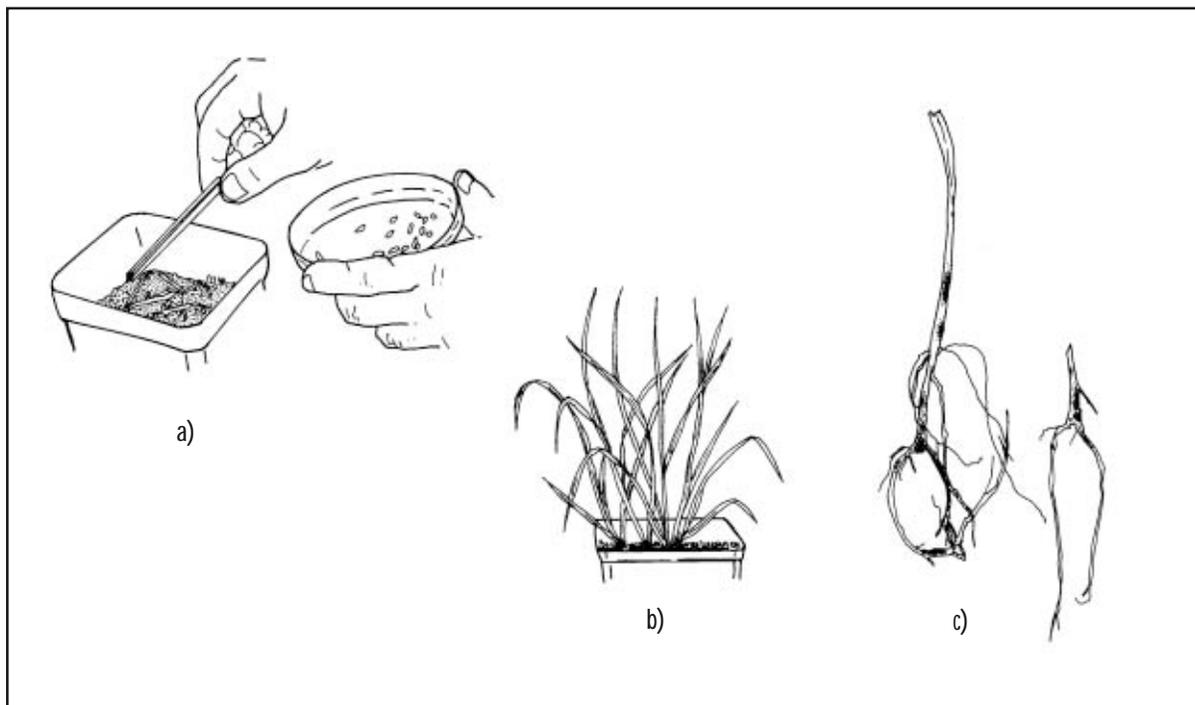


Figura 14 a, b, c. Secuencia para construir una trampa para aislar hongos causantes de pudriciones de raíces.

El usar plántulas de trigo o trampas como medio selectivo para el organismo patogénico más agresivo que pudiera estar presente en el tejido vegetal enfermo permite evitar la interferencia de otros saprófitos y patógenos débiles. En ambos casos, las cajas sembradas se incuban en posición invertida (la tapa hacia abajo). En el caso de *Pythium*, la revisión debe comenzar a partir de las 24 horas para no tener interferencia por contaminación. Normalmente los aislamientos de *Pythium* producirán una colonia de unos 50 a 60 μm de diámetro en las primeras 24 ó 48 horas. Nótese que el crecimiento de *Pythium* en este medio es mucho menos obvio que el de *Fusarium*. El crecimiento de *Pythium* será usualmente bastante comprimido, con poco desarrollo aéreo. El crecimiento es más evidente cuando se observa por el fondo de la caja Petri con luz refractada. Si el crecimiento de la colonia es como se describió anteriormente (24 a 48 horas posteriores a la siembra), casi invariablemente será *Pythium*. En este momento deben hacerse reaislamientos tomando micelio de los bordes de las colonias en desarrollo para obtener aislamientos puros; los aislamientos que aparecen después de tres días o más, usualmente corresponden a *Fusarium*, *Gaeumannomyces*, *Bipolaris sorokiniana* y / o *Rhizoctonia*.

El crecimiento inicial de *Gaeumannomyces*, en comparación con *Pythium*, será mucho más lento, pues a esta temperatura su desarrollo tomará varios días. Deberán hacerse cultivos y examinarlos para eliminar contaminantes.

Identificación de *Pythium*

La taxonomía de las especies del género *Pythium* en general se basa en unas cuantas estructuras morfológicas distintivas, relacionadas con la formación de esporangios y oosporas o conidios. La presencia o ausencia, tamaño, forma o número de estas estructuras depende grandemente del medio que se use, los regímenes de temperatura, la edad del cultivo y otras condiciones ambientales usadas para inducir su formación. Enseguida se definen y describen las estructuras en que se basa la identificación de este género.

Esporangio. Estructura en forma de saco cuyo contenido protoplásmico total se convierte en un número indefinido de esporas asexuales móviles denominadas zoosporas. El tiempo requerido para la formación de esporangios en cultivo, así como la morfología y abundancia de éstos, varía ampliamente según la especie. Algunos se forman rápidamente después de pocos días en medio de agar, mientras que otros sólo se forman cuando el micelio es sumergido en agua. Hay básicamente tres tipos de esporangios producidos por *Pythium*: globosos, lobulados y filamentosos. Aquellas especies que generan esporangios filamentosos generalmente producen zoosporas solamente cuando se les sumerge en agua. Las zoosporas varían en tamaño, forma y la posición de los flagelos; sin embargo, debido a su tamaño tan pequeño, solamente la variación extrema de estas características se considera útil en la taxonomía.

Conidios. Estas estructuras son desde esféricas o globosas hasta elipsoidales, y asemejan esporangios en la mayoría de los casos. La única diferencia es que los conidios no producen zoosporas.

Oogonio. Corresponde al gametangio femenino y contiene uno o más gametos. Los oogonios son esféricos, subsféricos o elipsoidales y pueden tener espinas u otras protuberancias. Pueden ser terminales o intercalares, y la gran mayoría de las especies producen ambos tipos. La temperatura, el medio y el tiempo que los aislamientos hayan permanecido en cultivo, son factores que afectan el tamaño y la forma, así como el número de oogonios producidos.

Anteridio. Es el gametangio masculino. Los anteridios son probablemente el carácter taxonómico más difícil de observar. Su número puede variar desde uno hasta más de 25 por oogonio. Según su posición, pueden ser hipóginos (abajo del oogonio) o paráginos (al lado del oogonio) y en origen pueden ser monoclinos (los anteridios brotan de cualquier hifa que no sea el tallo oogónico).

Oospora. Es una espora sexual producida por la unión de dos gametangios morfológicamente diferentes (oogonio y anteridio). Bajo condiciones normales, las oosporas suelen presentarse en forma individual. La oospora puede llenar por completo la cavidad oogónica o la oosfera dentro de la cual se forma, en cuyo caso se dice que es plerótica. Si casi llena la cavidad o está libre dentro de la cavidad oogónica, se dice que es aplerótica. Desafortunadamente, existen pocas especies en las cuales se da uno de estos casos con exclusión del otro. Algunas veces las dos condiciones pueden ser observadas en la misma caja de Petri.

Método para inducir la producción de zoosporas

El hongo se cultiva en agar harina de maíz durante 5 días a 15 °C. Porciones pequeñas de cultivo (3 a 5 mm) se transfieren a tubos de ensayo que contienen agua estéril y láminas foliares frescas (2 cm) que han sido hervidas 10 minutos en agua esterilizada y destilada. Después de la infección de las hojas (24 h), éstas son transferidas a cajas de Petri frescas e incubadas a 18 ó 20 °C. Los esporangios se producen generalmente después de 24 a 36 horas. En algunos casos, los cambios periódicos de agua estimulan la producción de zoosporas.

Identificación de *Gaeumannomyces*

Esta especie forma micelio grueso de color negro; al comienzo, las raicillas toman una coloración café pero, después de 10 días, se vuelven de color negro. Al mismo tiempo que el hongo invade la planta, se inicia la formación de peritecios en las raíces, corona y hojas envainantes inferiores.

Identificación de *Rhizoctonia*

El micelio producido por esta especie forma ángulos rectos, muy cerca de los cuales se generan septas. Después de una semana, el medio de cultivo se cubre de esclerocios irregulares.

Identificación de *Sclerotium rolfsii*

Este organismo tiene un amplio rango de hospederos y se ha encontrado que afecta gravemente la producción de algunos cultivos, en especial en zonas tropicales. Típicamente produce un crecimiento micelial blanco sobre la superficie de las plantas y del suelo. A partir del micelio se producen esclerocios inicialmente de color blanco, que se vuelven color café oscuro, similares a semillas de mostaza, que son fácilmente visibles en las plantas que están muriendo. Para aislar este organismo, basta tomar micelio o esclerocios con una aguja estéril y transferirlos a papa dextrosa agar.

Bibliografía

- Booth, C. 1977. *Fusarium. Laboratory Guide to the Identification of the Major Species*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, Inglaterra. 58 pp.
- Booth, C. 1977. *The Genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, Inglaterra. 237 pp.
- Burgess, L.W., C.M. Liddell y B.A. Summerell. 1988. *Laboratory Manual for Fusarium Research*. Segunda edición. Fusarium Research Laboratory, Department of Plant Pathology and Australia Entomology. The University of Sydney.
- Francis, R.G. y L.W. Burgess. 1977. Characteristics of two populations of *Fusarium roseum* 'graminearum' in Eastern Australia. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 68:421-427.
- Frezzi, M.J. 1956. Especies de *Pythium* fitopatógenas identificadas en la República Argentina. *Revista de Investigaciones Agrícolas*. T.X., No. 2, pp. 197-241. Buenos Aires, Argentina.
- Nelson, P.E., T.A. Tousson y W.F.O. Marasas. 1983. *Fusarium Species*. University Park y Londres: The Pennsylvania State University Press. 193 pp.
- Tousson, T.A. y P.E. Nelson. 1976. *Fusarium*. A pictorial guide to the identification of *Fusarium* species according to the taxonomic system of Snyder and Hansen. Segunda edición. University Park y Londres: The Pennsylvania State University Press. 43 pp.
- Wallwork, H. 1996. *Cereal Root and Crown Diseases*. Kondinin Group, Australia. 62 p.
- Zillinsky, F.J. 1984. *Guía para la identificación de enfermedades en cereales de grano pequeño*. México, D.F.: CIMMYT. 141 pp.
- Luttrell, E.S. 1964. Systematics of *Helminthosporium* and related genera. *Mycologia* 56:119-132.
- Shoemaker, R.A. 1959. Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated for '*Helminthosporium*'. *Can. J. Bot.* 37:879-887.
- Stack, R.W. 1977. A simple selective medium for isolation of *Cochliobolus sativus* from diseased cereal crowns and roots. *Pl. Dis. Rep.* 61:119-522.
- Sivanesan, A. 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exerohilum* and their teleomorphs. CAB International, Wallingford, Reino Unido. 261 p.

Capítulo 6 Nematodos

Introducción

Los nematodos, conocidos también como anguñulas, tienen forma alargada y son demasiado pequeños (suelen medir de 0.3 a 5 μm) para observarlos a simple vista. En el pasado, los daños que éstos provocaban a los cultivos a menudo se ignoraban o se atribuían a otras causas, como la infertilidad del suelo o deficiencia de agua. Además, no se disponía de información clara sobre su patogenia.

Los nematodos fitoparásitos están ampliamente distribuidos, y casi todas las plantas son infestadas por una o más especies. Más de 5,000 especies pertenecientes a 200 géneros son reconocidas como parásitos de plantas capaces de causar daño económico a los cultivos.

Nematodos fitopatógenos del suelo: Identificación de especies parásitas y saprófitas

Aunque los géneros tienen características morfológicas que los distinguen, todas las especies patógenas poseen una estructura del aparato bucal, conocida como estilete, que permite al nematodo penetrar las plantas para obtener los nutrientes que requiere. El estilete está ausente en los nematodos saprófitos.

Los nematodos ectoparásitos como *Tylenchorhynchus*, *Helicotylenchus* y *Xiphinema* permanecen fuera del hospedero mientras se alimentan de sus células internas. Con el estilete penetran las células de las plantas; después de un período de alimentación breve, retraen el estilete y repiten el proceso. En contraste, los nematodos endoparásitos —incluyendo *Meloidogyne* y *Pratylenchus*— penetran la planta y migran hacia el tejido de la raíz donde se alimentan y completan su ciclo de vida. Los nematodos endoparásitos son considerados más insidiosos porque destruyen el tejido interno durante su migración y durante su alimentación están en contacto con el sistema vascular. Otra consecuencia importante del ataque de nematodos es que provocan heridas que permiten la entrada de bacterias y hongos patógenos del suelo, lo cual crea infecciones secundarias.

Una característica importante que distingue a los nematodos fitoparásitos, es la presencia del estilete. Estas y otras características se observan en la Figura 15.

Esquemas de muestreo

El diagnóstico de un problema de nematodos requiere la identificación de la plaga en asociación con la planta enferma. En los esquemas que se señalan en la Figura 16, se presentan diferentes formas de muestrear suelo y tejido de plantas en áreas que padecen estos problemas.

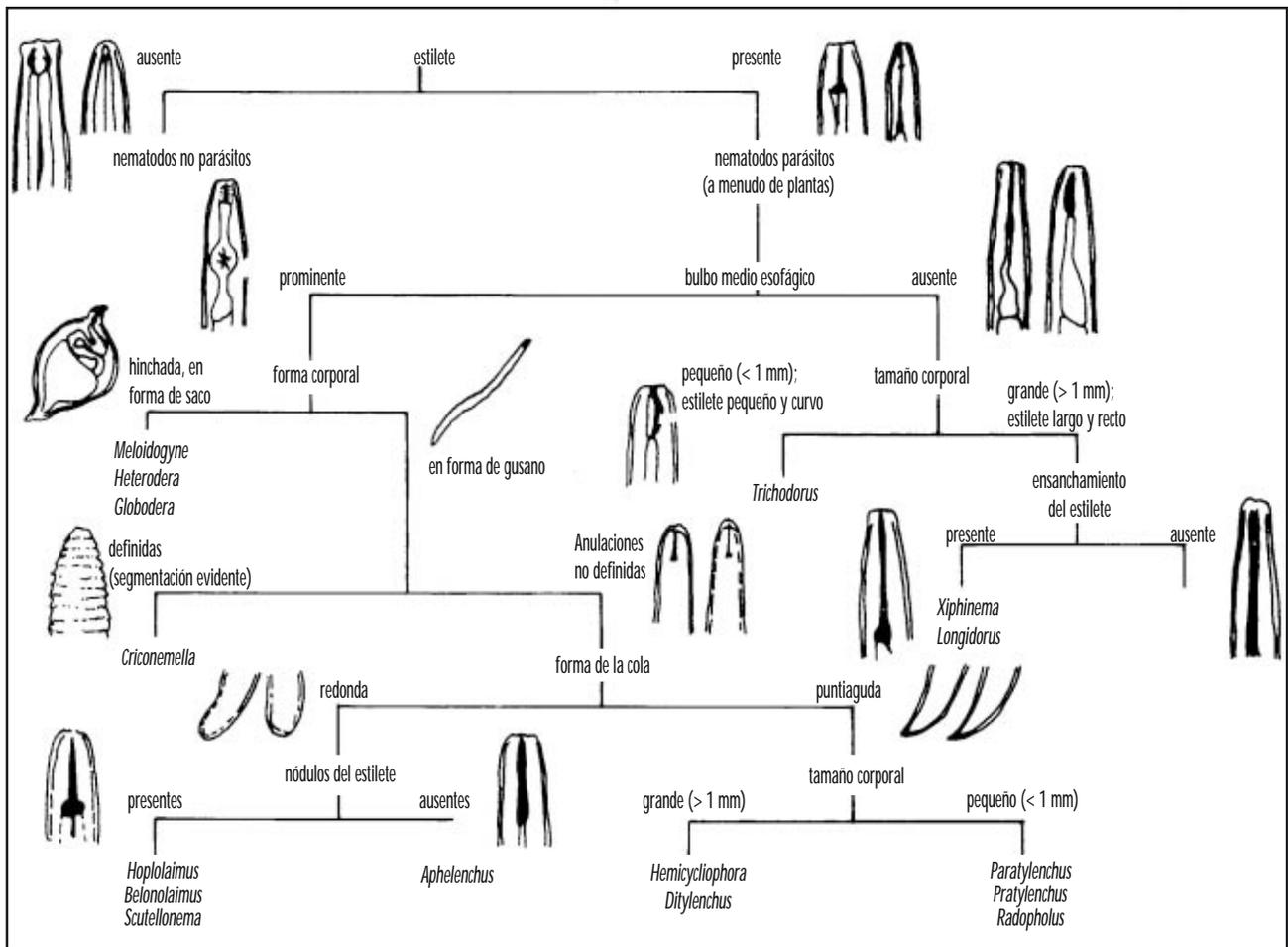


Figura 15. Clave para la identificación de algunos grupos de nematodos fitoparásitos.

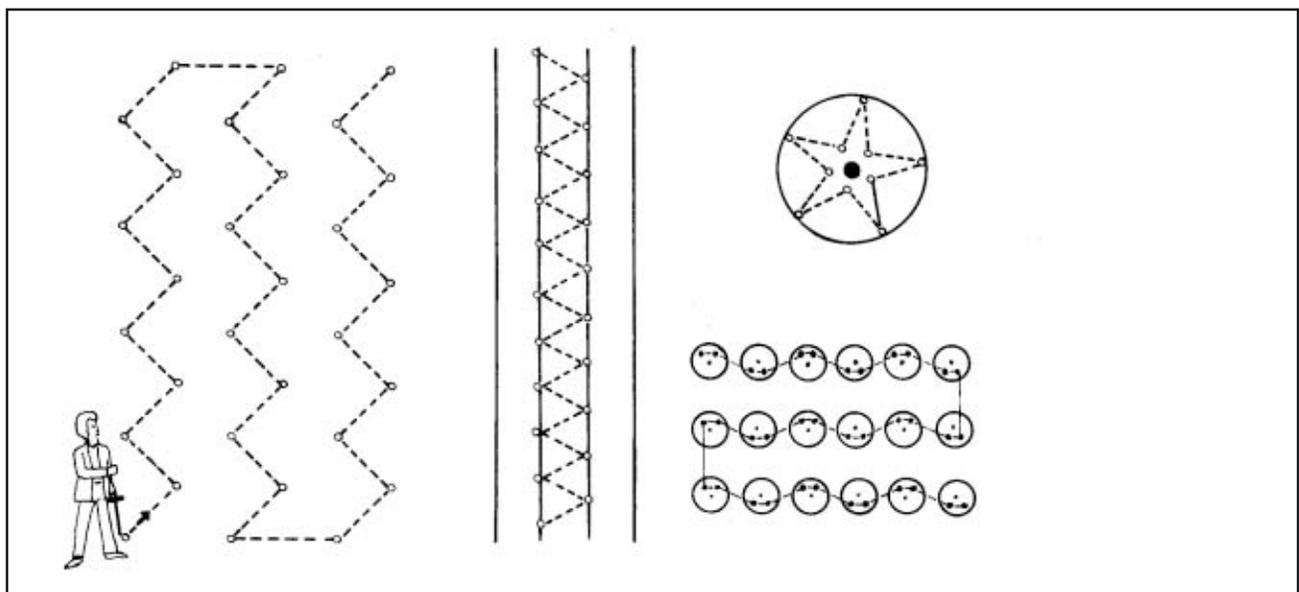
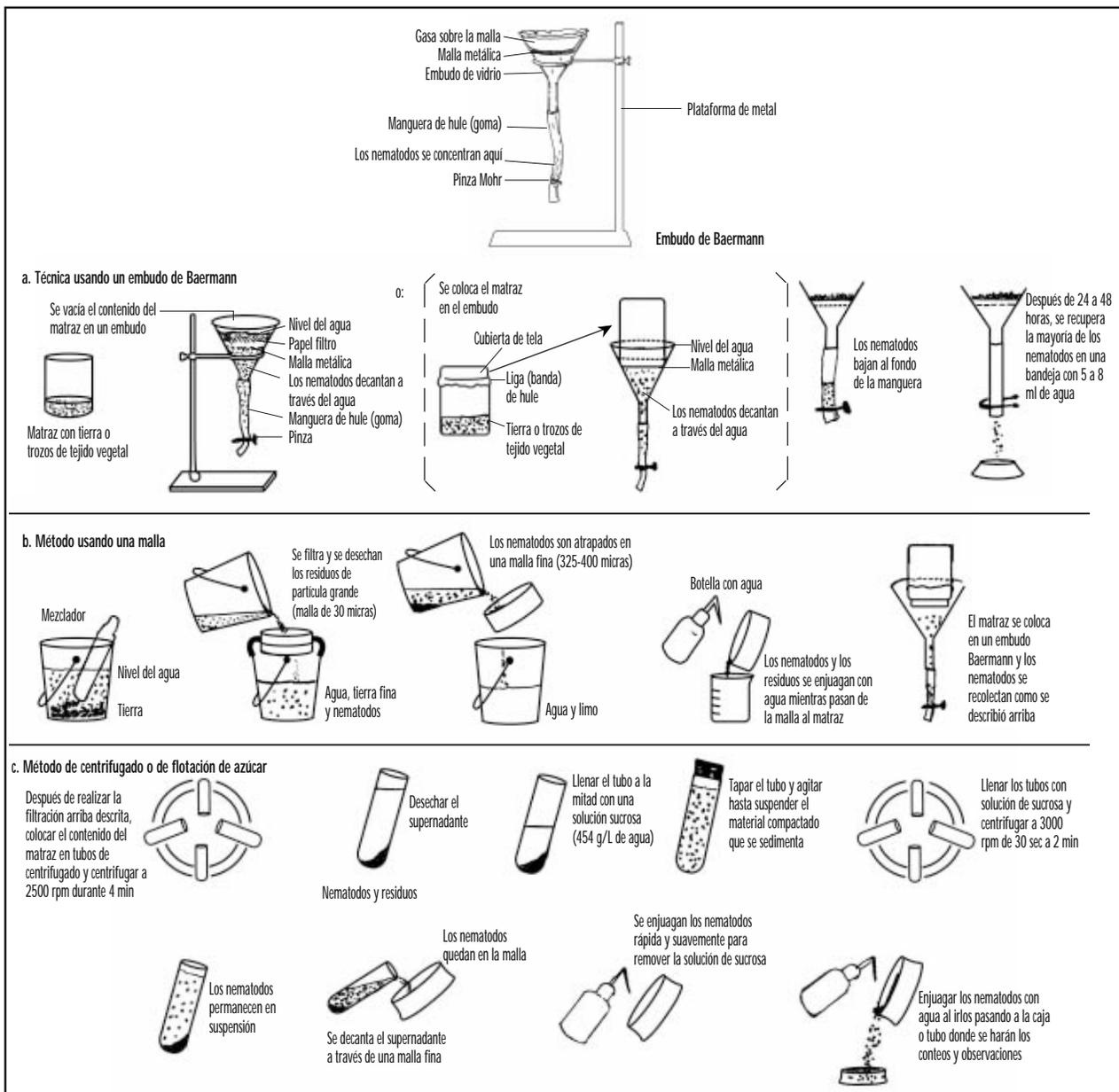


Figura 16. Esquemas de muestreo del suelo que permiten diagnosticar la presencia de nematodos.

Métodos para extraer nematodos de muestras de suelo o de tejido vegetal

En el caso de *Heterodera* o *Meloidogyne*, pueden observarse directamente hembras enquistadas en las raíces o en agallas; en los géneros restantes, los nematodos deben ser extraídos del suelo o de las raíces. La técnica más conocida y sencilla para extraer nematodos del suelo es con un embudo de Baermann (Figura 17 a). Lo ideal es suspender la muestra de suelo en agua y pasarla a través de mallas; entonces los nematodos, junto con los residuos, pueden colocarse en un embudo de Baermann (Figura 17 b) o extraerse utilizando la técnica de flotación de azúcar (Figura 17 c).



Figuras 17 a, b y c. Métodos para extraer nematodos de tierra o tejido vegetal: embudo de Baermann y flotación de azúcar.

Fuente: Tomados, con permiso, de G.N. Agrios (1978), *Plant Pathology*, Academic Press, Inc.

Comparación de dos métodos para extraer nematodos de muestras de suelo o de tejido vegetal

Instalar dos embudos Baermann y comparar la eficiencia de extracción utilizando una muestra que se pasó a través de malla de alambre y otra en la que no se usó esta técnica. Cuando se detecta un problema de nematodos en un área determinada y se desea muestrear una superficie, se pueden usar los esquemas señalados en la Figura 17.

Identificación de especies del género *Meloidogyne*

La identificación de especies dentro del género *Meloidogyne* requiere de la ayuda de cortes perineales. En la Figura 18 a, b, c y d, se pueden observar los pasos más importantes de esta técnica.

Metodología para obtener cortes perineales en hembras del género *Meloidogyne*

Los cortes perineales son necesarios en la identificación de especies de algunos géneros como *Meloidogyne*. Enseguida se describe el procedimiento para realizar esos cortes.

Se seleccionan nódulos con hembras maduras y se colocan en una caja de Petri con un poco de agua. De preferencia, se escogen nódulos simples. Con la ayuda de pinzas y una navaja de media hoja, desprender el tejido de la raíz para sacar las hembras adultas (Figura 18 a). Romper la cutícula de la hembra cerca del cuello, apretar ligeramente y sacar los tejidos del cuerpo (Figura 18 b).

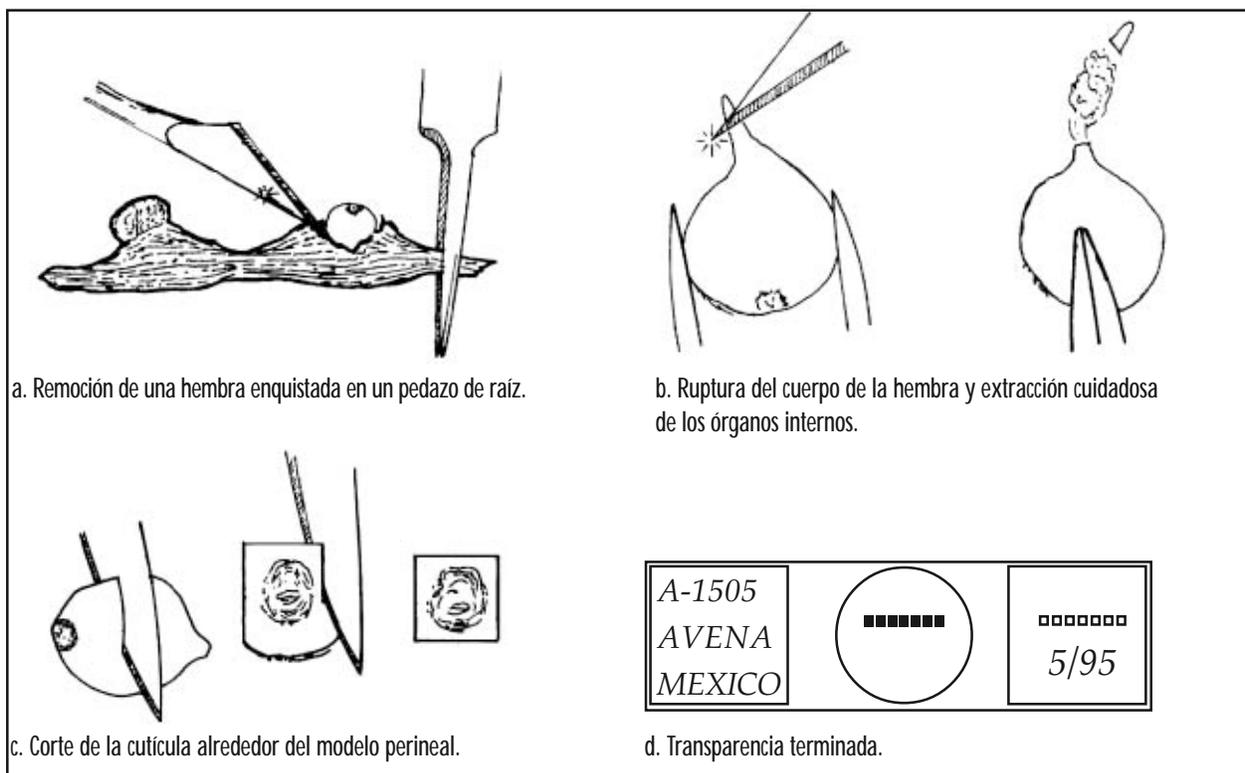


Figura 18. Cortes perineales en el género *Meloidogyne*.

En una caja de Petri de plástico, poner la cutícula en una gota de ácido láctico al 45%. El ácido láctico facilita la remoción de los tejidos del cuerpo que hayan quedado adheridos a la cutícula después de haberla apretado. Reunir 10 ó 20 cutículas en una gota y dejarlas remojando en el ácido desde 30 minutos hasta varias horas. Todos los cortes se realizan en cajas de Petri de plástico para minimizar el gasto del filo de la navaja (es recomendable siempre trabajar con una navaja bien afilada).

Cortar la cutícula por la mitad (ecuatorialmente), sacarla del ácido con el corte perineal y colocarla junto a la gota recortando el modelo perineal en forma de cuadro (Figura 18 c). Volver a colocar el corte perineal en el ácido. Cortar de 5 a 10 modelos por muestra. Con una aguja limpiar los modelos perineales, tratando de remover los restos.

Transferir los modelos perineales a una gota de glicerina en un portaobjetos, alineados de manera que todos queden con el ano orientado hacia abajo. La superficie inferior de la cutícula debe colocarse contra la superficie del portaobjetos. Con la ayuda de una aguja de disección, presionar ligeramente el modelo perineal contra el portaobjetos. Colocar cuidadosamente el cubreobjetos sobre la gota de glicerina. El exceso de glicerina puede absorberse con papel filtro. Si la glicerina no es suficiente, poner una pequeña gota en la orilla del cubreobjetos. Sellar la muestra y etiquetarla (Figura 18 d).

Metodología para obtener cultivos puros, y mantener e incrementar nematodos

Se recolectan nematodos de plantas enfermas y se identifican correctamente. Se lavan con agua estéril y estreptomycinina al 0.3% durante una hora y después se transfieren a cortes horizontales de zanahoria de aproximadamente 0.5 cm de grosor. Éstos se acomodan en cajas Petri estériles, de tal forma que permitan un buen cerrado de la caja.

Preparación de la zanahoria: Se escogen zanahorias en muy buen estado sanitario, sin lesiones ni raspaduras visibles; se lavan bien y se pelan con utensilios correctamente esterilizados con alcohol y flameados. Una vez peladas se sumergen en alcohol durante cinco minutos, se vuelven a pelar y se cortan en rodajas.

Una vez acomodadas en las cajas Petri, las rodajas de zanahoria se inoculan con los nematodos limpios. Las cajas se sellan y se mantienen en una incubadora a 25 °C. Las cajas deben revisarse continuamente, ya que existe la posibilidad de contaminación con bacterias. Las cajas que se contaminen deben descartarse.

Si se desea inocular plantas, se licua la zanahoria en forma muy ligera, se pasa por un tamiz y el sobrenadante se aplica a las plantas que se van a inocular. La concentración que se use dependerá de la especie a inocular, del hospedero y de las condiciones ambientales del experimento.

Bibliografía

- Nicol, J. 2002. Important nematode pests. 317-330. In: *Bread Wheat: Improvement and Production*. B.C. Curtis, S. Rajaram y H. Gómez Macpherson (eds.). FAO, Roma.
- Wallwork, H. 1996. *Cereal Root and Crown Diseases*. Kondinin Group, Australia. 62 p.

Capítulo 7 Bacterias

Introducción

Las especies bacterianas patógenas del trigo pueden agruparse en cuatro géneros: *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Clavibacter* y *Erwinia*. Los dos primeros incluyen especies de importancia que ocasionan enfermedades de consecuencias económicas considerables. Ambos géneros corresponden a bacilos aeróbicos gram negativos. Las especies de *Xanthomonas* no reducen el nitrato a nitrito y la mayoría de ellas producen una sustancia mucosa, polisacárida, extracelular, amarilla en medios que contienen glucosa o sucrosa. Las *Pseudomonas* son fluorescentes (producen fluorescín, pigmento verde amarilloso) en medio B de King. El género *Clavibacter* es el único que se caracteriza por bacilos gram positivos; el género *Erwinia* se caracteriza por bacilos gram negativos y facultativamente anaeróbicos.

Casi todas las bacterias fitopatógenas son baciliformes y miden entre 0.6 y 3.5 μm de largo, y 0.5 ó 1.0 μm de diámetro. Las paredes celulares de la mayoría de estas bacterias están rodeadas por un material viscoso y pegajoso. Casi todas las especies poseen flagelos delicados; algunas tienen un solo flagelo, otras tienen un flagelo en forma de mechón en un extremo de la célula, y otras más tienen flagelos distribuidos en toda la superficie celular.

Cuando una bacteria se multiplica en la superficie de un medio con agar sólido, su progenie pronto produce una masa visible denominada colonia. Las bacterias se reproducen a una velocidad sorprendente; en condiciones favorables se dividen cada 20 minutos. A esa velocidad se puede generar un millón de bacterias en 10 horas.

Identificación de una enfermedad bacteriana

Las enfermedades bacterianas a menudo se consideran difíciles de manejar. En algunos casos, no son fáciles de identificar, pues a simple vista pueden ser confundidas con daños fisiológicos o daños provocados por condiciones ambientales adversas. La metodología para aislar e identificar las enfermedades bacterianas es muy distinta de la utilizada para los hongos, ya que por su tamaño, las bacterias no pueden ser identificadas por medio de observaciones al microscopio.

A continuación se describe el procedimiento para la identificación de una enfermedad bacteriana, tomando como ejemplos especies de los géneros *Xanthomonas* y *Pseudomonas*. En el primer ejemplo, se utiliza *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* (sin. *X. translucens*).

Pegar la muestra en la hoja de diagnóstico y describir los síntomas observados. Para confirmar que la muestra ha sido infectada por una bacteria, proceder de la siguiente manera:

Observación al microscopio con fondo oscuro. Cortar un pedazo de hoja (de aproximadamente 3 x 3 mm) de la zona entre tejido sano y tejido necrótico. Preparar un portaobjetos con una gota de agua estéril, colocar en él el trozo de hoja y cubrir con un cubreobjetos. Usar un campo oscuro en el microscopio; con el objetivo de baja magnificación, observar el exudado bacteriano proveniente del tejido enfermo (el exudado se observa como un flujo continuo de puntitos blancos, sobre el fondo oscuro, que sale del tejido afectado) (Figura 19).

Aislamiento. Para el aislamiento de *Xanthomonas* y *Pseudomonas*, los dos géneros más importantes, se usan el medio de Wilbrink y el medio B de King, cuyos componentes y forma de preparación se señalan a continuación:

Medio de Wilbrink (medio semi-selectivo para *Xanthomonas*)

Componentes:	
Bactopeptona	5 g
Sucrosa	10 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25 g
Na ₂ SO ₃ (anhídrico)	0.05 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Se esteriliza todo el medio; se deja enfriar a 45-46 °C y se agregan 75 mg de cicloheximida disuelto en 2 ml de etanol al 75%.

Medio B de King (para *Pseudomonas fluorescense*)

Componentes:	
Agar	15 g
Peptona proteosa No. 3 (DIFCO) o polipeptona	20 g
Glicerol	10 g o 15 ml
K ₂ HPO ₄ (anhídrico)	1.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.5 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7.2

Usar una caja de Petri con medio de cultivo de Wilbrink. Tomar del borde de la lesión un pedazo de tejido foliar enfermo, similar en tamaño al que se utiliza para observación bajo el microscopio. Desgarrar el tejido en agua estéril usando una navaja y pinzas estériles. Macerar y dejar reposar 10 minutos. Esterilizar un asa de níquel o cromo (si no cuenta con un asa, ver cómo elaborarla en la Figura 20 a); tomar con ella un poco del líquido y sembrar sobre el agar en cuatro campos de dilución. Quemar y enfriar el asa después de cada campo, como se indica en la Figura 20 b y c.

Incubar a 27-30 °C durante tres días. Después, observar la colonia (amarilla y mucoide), que debe corresponder a *X. campestris* pv. *undulosa*. Hacer subcultivos para obtener un cultivo puro por medio de estriados de dilución (Figura 20 b). Una colonia pura se obtiene multiplicando una célula que fue separada de las otras por medio del estriado de dilución.

Prueba de patogenicidad

Esta es la prueba más importante para definir si el cultivo puro obtenido corresponde a una especie de bacteria patogénica. Usar plantas jóvenes de la variedad del cultivo en el que se haya observado la lesión, en este caso, trigo. Inyectar una suspensión concentrada de bacterias, derivada de un cultivo puro, en el tallo de la planta. Observar en la Figura 21 a y b cómo colocar la aguja. Se trata de infiltrar la suspensión bacteriana en la hoja.

Incubar las plantas una semana en cámara húmeda (Figura 22). Si se reproducen lesiones extendidas, similares a los síntomas observados en el campo, es casi seguro que el aislamiento sea patogénico. Sin embargo, es necesario volver a aislar la bacteria que se inoculó para verificar los postulados de Koch. Usar el mismo medio de cultivo; el aspecto de la colonia re-aislada debe ser el mismo que el de la colonia inicialmente aislada y de la obtenida en cultivo puro de la muestra del campo.

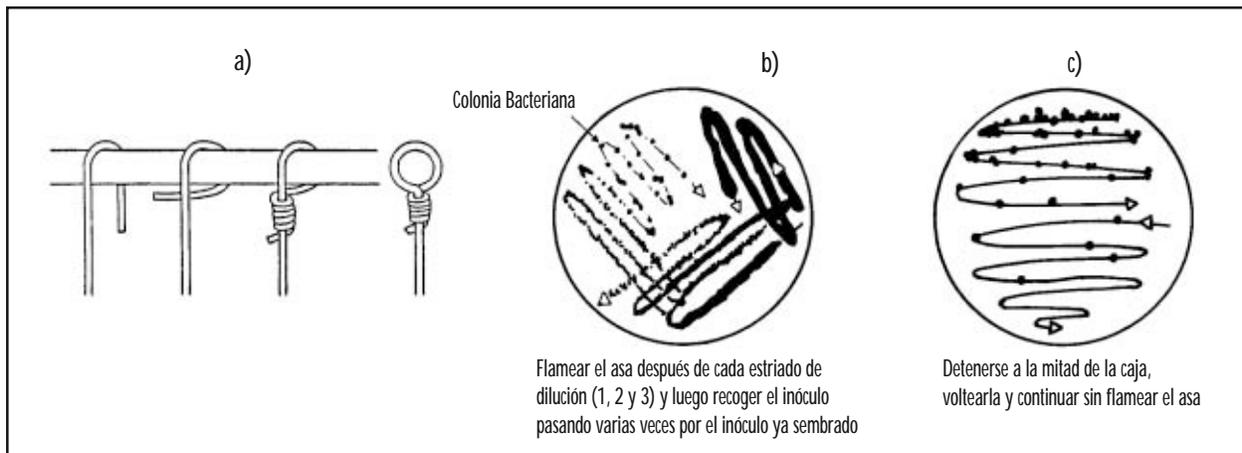


Figura 20. Indicaciones para hacer un cultivo bacteriano. a. Preparación de un asa para inocular utilizando alambre de platino o nicromio de 24 swg y una varilla de vidrio de 4 mm de diámetro. b. Preparación de inóculo concentrado. c. Preparación de suspensiones en dilución.

Fuente: Lelliot, R.A. y Stead, D.E. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*.

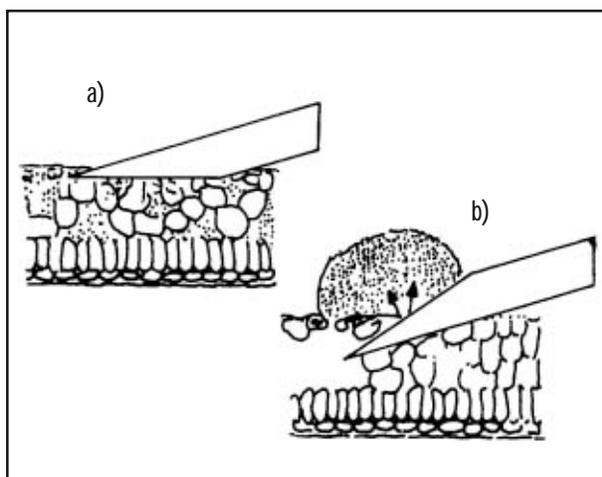


Figura 21. Posición correcta (a) e incorrecta (b) de colocar la aguja al infiltrar la suspensión en la hoja.

Fuente: Kiraly et al. 1970. *Methods in plant pathology*, Budapest. p. 161.

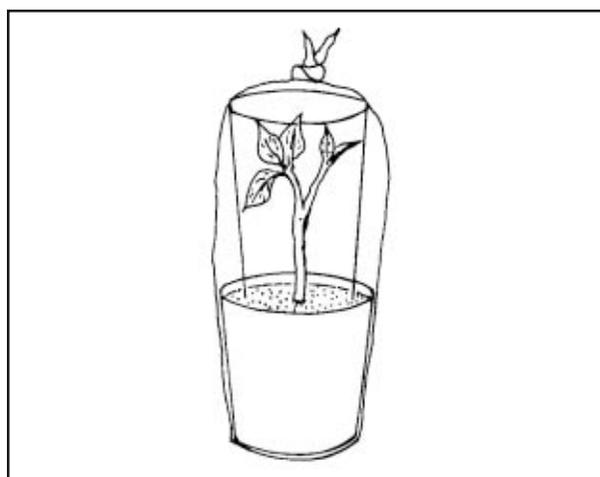


Figura 22. Plántula hospedera incubada cubierta con una bolsa de polietileno sostenida con un marco de alambre para evitar que la planta toque el polietileno.

Fuente: Kiraly et al. 1970. *Methods in plant pathology*, Budapest. p. 158.

Pruebas bioquímicas y fisiológicas

Después de la prueba de patogenicidad, se deben realizar diferentes pruebas bioquímicas y fisiológicas que permiten definir el género y la especie a la que pertenece el patógeno aislado. En cereales hay dos géneros que son de importancia económica (*Xanthomonas* y *Pseudomonas*) por lo que, con fines de enseñanza, sólo se presentarán tres pruebas básicas que ayudarán a su identificación.

Fluorescencia en medio B de King. Tomar una colonia individual de los dos tipos de bacteria que se le proporcionó durante la práctica y sembrarlas, en la forma ya descrita, en dos platos diferentes con medio B de King. Después de cuatro días de incubación a 27 °C, observar la fluorescencia presente en uno de ellos; esto permite identificar bacterias del género *Pseudomonas* (Figura 23).

Prueba de reducción de nitratos. Esta prueba permite distinguir grupos importantes de bacterias, por ejemplo, *Xanthomonas*, que no son capaces de reducir nitratos. Se utiliza el medio que se señala a continuación:

Medio para la prueba de reducción de nitratos

Componentes:	
Peptona	10 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Extracto de levadura	1 g
KNO ₃	1 g
Agar	2 g
Agua destilada	1000 ml

Para esta prueba se requieren tubos de ensayo con 5 ml de medio que hayan sido esterilizados. Con un asa, inocular el medio con un cultivo puro y fresco, colocándolo hasta el fondo del tubo. Incubar los tubos durante dos días o más, hasta obtener un desarrollo adecuado. Después, agregar lo siguiente:

Lugol	Una gota
Reactivo I (Greiss I)	0.5 ml
Reactivo II (Greiss II)	0.5 ml

Reactivo I (Greiss I): Solución de ácido sulfanílico al 0.8% en ácido acético 5N (este último se prepara mezclando 57 ml de ácido acético glacial y 143 ml de agua destilada).

Reactivo II (Greiss II): N-(1-naftil) bclorhidrato de etilendiamina acuoso al 0.1%.

Si hay nitrito, una mancha roja aparecerá en la superficie en unos momentos, y la prueba es positiva. Si no se detecta nitrito, se agrega una pequeña cantidad de polvo de zinc con la punta de una espátula. Si después de unos minutos aparece una mancha roja, esto indica la presencia de nitrato en el medio y confirma que la prueba de reducción de nitrato a nitrito es negativa (Figura 24).

Prueba de KOH. Utilizar las mismas cajas que para la primera prueba. Poner unas gotas de la solución de KOH al 3% sobre un portaobjetos. Con una aguja, tomar un poco del cultivo y revolver rápidamente en forma circular. Si las cepas son Gram negativas, la suspensión se vuelve viscosa y se forma un hilillo mucoso al levantar la aguja. Las bacterias Gram positivo se dispersan en la gota y no presentan esta reacción (Figura 25).

Indicar si la bacteria es Gram positiva o negativa. Con la excepción del género *Corynebacterium*, la mayoría de las bacterias fitopatógenas muestran una reacción negativa.

E. Duveiller



Figura 19. Procedimiento para el diagnóstico preliminar de una enfermedad causada por bacterias.

E. Duveiller



Figura 23. Fluorescencia en medio B de King para el género *Pseudomonas*.

E. Duveiller

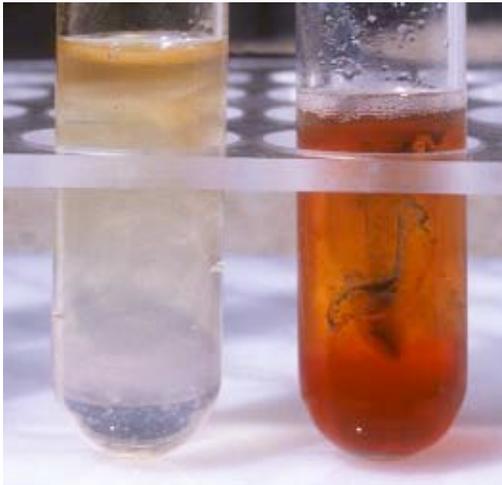


Figura 24. Prueba de reducción de nitrato a nitrito.

E. Duveiller



Figura 25. Detección de bacterias Gram negativas mediante la prueba de KOH.

Bibliografía

- Duveiller, E., L. Fucikovsky y K. Rudolph (eds.). 1997. *The Bacterial Diseases of Wheat : Concepts and Methods of Disease Management*. Mexico, D.F.: CIMMYT.
- Duveiller, E. Bragard y H. Maraite. 2002. Bacterial leaf streak and black chaff. 317-330. In: *Bread Wheat: Improvement and Production*. B.C. Curtis, S. Rajaram y H. Gómez Macpherson (eds). FAO, Roma.

Introducción

Los virus que infectan a las plantas tienen la característica de que nunca abandonan al hospedero porque son incapaces de sobrevivir fuera de éste. Por esta razón, no son diseminados por el viento o el agua, como es el caso de la mayoría de hongos y bacterias, sino que son transmitidos de planta a planta mediante la propagación vegetativa, semillas, polen, insectos, ácaros, nematodos, cúscura y hongos, o mecánicamente por medio de la savia. Los virus que atacan las plantas se diferencian de los demás fitopatógenos por su tamaño y forma, la sencillez de su constitución química (ácido nucleico y proteína) y estructura física, método de infección, propagación, translocación dentro del hospedero, diseminación y sintomatología.

Por su tamaño tan pequeño (medido en nanómetros), los virus no siempre pueden observarse, ni detectarse mediante los métodos utilizados con otros patógenos. Los métodos para la detección de virus en plantas se basan principalmente en la transmisión del virus de una planta enferma a una sana por medio de la savia, injertos, plantas parásitas o insectos, hongos y ácaros. Sin embargo, la prueba definitiva de la presencia de un virus sólo se logra después de su purificación, la visualización de su imagen en un microscopio electrónico y/o pruebas de serología y ácido nucleico.

Entre las enfermedades virosas más importantes de los cereales figuran el virus del enanismo amarillo de la cebada y el virus del enanismo amarillo de los cereales (*Barley yellow dwarf virus*, o BYDV, y *Cereal yellow dwarf virus*, o CYDV), el virus del mosaico del trigo transmitido por el suelo (*Soil-borne wheat mosaic virus*, o SbWMV) y el virus del mosaico estriado de la cebada (*Barley stripe mosaic virus*, o BSMV), el virus del mosaico estriado del trigo (*Wheat streak mosaic virus*, o WSMV) y el virus del mosaico estriado ahusado del trigo (*Wheat spindle streak mosaic virus*, o WSSMV).

Virus del enanismo amarillo de la cebada (BYDV)

Esta enfermedad es causada por un complejo de virus antiguamente llamado barley yellow dwarf virus, o BYDV, y que ahora se clasifica en dos géneros: los luteovirus, BYDV-PAV y BYDV-MAV, y los polerovirus, CYDV-RPV. Existen otras variantes, BYDV-SGV y BYDV-RMV, que aún no han sido asignadas a un grupo. Para facilitar la lectura de este manual, el complejo que causa el virus del enanismo amarillo de la cebada se denominará BYDV-CYDV.

Estos virus son transmitidos por áfidos que actúan como vectores. Se han reportado hasta 25 especies de vectores en diferentes partes del mundo; las cinco más importantes son *Rhopalosiphum padi*, *R. maidis*, *Sitobion avenae*, *Schizaphis graminum* y *Metopolophium dirhodum*. Estos vectores, comúnmente llamados áfidos de los cereales, transmiten diferentes variantes del virus. La especificidad de la transmisión ha ido cambiando con el tiempo y con el descubrimiento de nuevos aislamientos de virus y áfidos. El cuadro más representativo de este fenómeno es el que se señala a continuación:

Variantes específicas de BYDV y CYDV transmitidas por las especies más importantes de los áfidos de cereales.

Especies de áfidos	BYDV-MAV	BYDV-PAV	CYDV-RMV	RMV	SGV
<i>Metopolophium dirhodum</i>	+	+	-	-	-
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	-	-	-	+	-
<i>R. padi</i>	-	+	+	-	-
<i>R. rufiabdominalis</i>	-	+	+	+	-
<i>Schizaphis graminum</i>	-	+	+	-	+
<i>Sitobion avenae</i>	+	+	-	-	-

(+) Indica las especies de áfidos que han sido reportadas como transmisoras consistentes de variantes de BYDV-CYDV en pruebas con un solo áfido. La eficiencia de transmisión varía de acuerdo con la combinación virus-vector.

Fuente: Gildow, F.E. 1987. Barley yellow dwarf virus: Aphid vector interactions associated with virus transmission and vector specificity. En: P.A. Burnett (ed.). World Perspectives on Barley Yellow Dwarf. Proceedings of the International Workshop. Udine, Italy. pp. 111-122.

Identificación de los áfidos vectores del BYDV-CYDV

Observar bajo el estereoscopio las especies de áfidos, distinguiéndolas por sus características particulares, como por ejemplo: forma y dimensión de los sifúnculos, longitud de las antenas, localización de las venas de las alas y coloración.

Transmisión del BYDV-CYDV

La transmisión por medio de los áfidos vectores puede realizarse siguiendo dos métodos, uno en el campo y otro en invernadero:

1. En el campo, recolectar áfidos de plantas que presenten síntomas de BYDV-CYDV y colocarlos en cajas de Petri (sellar las cajas para evitar que escapen). En el laboratorio, identificar la especie o especies que se obtuvieron; si pertenecen a los áfidos de los cereales, ponerlos en plantas sanas que hayan estado cubiertas o protegidas desde su germinación (con botes, cilindros, cajas, etc.) para tener la seguridad de que no han sido infestadas por ningún otro insecto. Procurar que el áfido quede sostenido en las hojas o tallo de la planta, y volver a cubrirla (Figura 26 a, b, c). Se recomienda inocular en variedades susceptibles de cebada, como Atlas 57, o de avena Black Hull-less. Los síntomas se examinan al mes de haber realizado la inoculación.

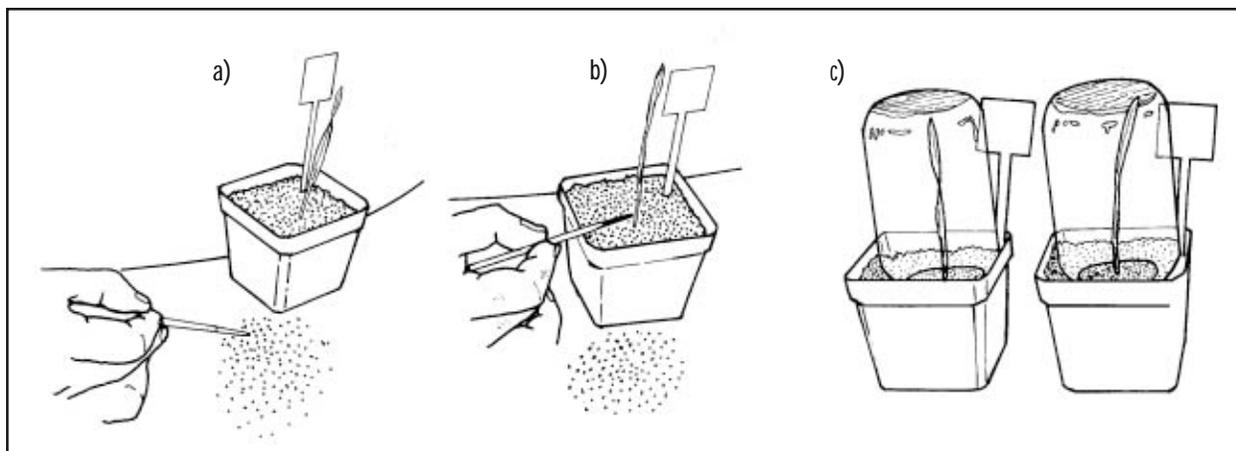


Figura 26 a, b y c. Secuencia de la inoculación de plantas utilizando áfidos vectores.

Mantener las plantas en condiciones de invernadero (20-25 °C). A las 72 horas, sacar el áfido y fumigar la planta para asegurar que no llegue otro insecto. Si se dispone de la técnica de ELISA, a los ocho días de la inoculación se analizan las hojas para determinar si el virus ha sido transmitido y de qué variante se trata. Si no se dispone de esta técnica, en un período de 10 a 12 días, las plantas mostrarán síntomas de la enfermedad (la claridad de los síntomas depende mucho de las condiciones ambientales del invernadero). En este último caso, sólo se podrá tener una idea aproximada de la variante que está presente, con base en la especificidad de la transmisión especie del áfido-vector-variante del virus.

2. El segundo método se utiliza cuando se dispone de invernaderos donde se pueden mantener colonias de áfidos sanos, libres de virus. Los áfidos se ponen en una caja de Petri con pedazos de hojas infectadas con el virus, sobre un papel filtro húmedo, o los pedazos de hojas se entierran en arena húmeda para mantener un ambiente favorable. Se sella la caja con parafilm y se deja a la temperatura ambiente durante 36 a 48 horas. Se supone que durante ese período los áfidos se han alimentado de las hojas y adquirido el virus. A continuación se saca cada áfido y se le pone en una planta sana para que le transmita el virus. En ambos casos se recomienda usar plantas provenientes de variedades muy susceptibles, como la variedad de avena Black Hull-less o la cebada Atlas 57. Las plantas deben estar a una temperatura de 20 °C con mucha luminosidad; de lo contrario, los síntomas no se expresan como es debido.

Detección mediante la técnica ELISA

La técnica ELISA (enzyme-immunosorbent assay) es un método muy confiable y poco costoso para detectar los virus y, en particular, el complejo BYDV-CYDV. Los anticuerpos específicos de las diferentes variantes del complejo se pueden comprar y son de fácil utilización. Aunque es ideal tener un espectrofotómetro para la lectura de la densidad óptica del producto de ELISA, la diferenciación de muestras negativas y positivas se puede hacer sin ese aparato. La técnica ELISA es rápida y tiene la ventaja de diferenciar entre las variantes del virus sin depender de que haya una buena expresión de los síntomas.

Virus del mosaico estriado de la cebada (BSMV)

Este virus es uno de los pocos que son transmitidos por semilla del grupo de las gramíneas. Cuando ataca la cebada, puede ser confundido con la enfermedad causada por *Pyrenophora graminea*, dado que los síntomas en los primeros estados de desarrollo son muy similares.

El virus del BSMV ha sido observado en la cebada en la mayoría de los países del mundo; su distribución tan amplia quizás se deba al movimiento internacional de semilla. También se le ha encontrado en trigo y avena.

Transmisión del BSMV

Esta enfermedad es transmitida mediante la semilla y, mecánicamente, por medio de la savia. La transmisión mecánica es una de las pruebas de diagnóstico más usadas por eficiente, sensible y económica, y porque provee información esencial para la caracterización del virus.

Los virus pueden ser transmitidos entre plantas que pertenecen a la misma especie o género, e incluso a distintos géneros. Las plantas de otras especies, denominadas "indicadoras", manifiestan los síntomas característicos de cada virus y son muy útiles en el diagnóstico de las enfermedades virales. Entre las

dicotiledóneas que han sido infectadas artificialmente para usarse como plantas indicadoras se cuentan *Chenopodium amaranticolor*, *Ch. album*, *Ch. quinoa*, *Beta vulgaris*, *Spinacea oleracea* y *Nicotiana tabacum* var. *Samsun*.

Este tipo de transmisión tiene la desventaja de que se requieren varias semanas para que la reacción se manifieste y esto no se logra a menos que se realice una exitosa extracción del virus. Además, al inocular hay que estar seguro de hacer las heridas necesarias para que el virus penetre.

Procedimiento: Lavar las manos con agua y jabón. Seleccionar las plantas indicadoras y las hojas que se van a inocular. Colocar el material infectado en un mortero estéril; agregar 0.5-1 ml de agua destilada y macerarlo. Agregar carborundum (cantidad: la mitad del volumen de una semilla de chícharo o arveja), un abrasivo que se utiliza para provocar las heridas.

Sostener la hoja en una mano y, con un dedo humedecido de la otra mano o con un aplicador de algodón, frotar la suspensión de la savia desde el pecíolo hasta la punta de la hoja. No pasar dos veces por la misma área. Repetir con cada hoja marcada. Inmediatamente después de inocular, lavar el inóculo de la planta en prueba usando agua destilada y un pulverizador. La infección es instantánea; las hojas se lavan para eliminar los compuestos que la planta genera para inhibir la infección. Poner las plantas en el invernadero y revisarlas cada día, ya que es importante saber cuando aparecen los síntomas.

Detección de la transmisión del virus por semilla

Para detectar el virus en semillas, éstas se siembran y se colocan en el invernadero. Deben mantenerse bajo buenas condiciones de luminosidad y temperatura (alrededor de 25 °C), de tal forma que los síntomas puedan expresarse sin ninguna restricción ambiental. Los síntomas comienzan a manifestarse cuando las plantas han desarrollado 2-3 hojas o más, dependiendo de la concentración original del virus en la semilla. Si la concentración era baja, tomará más tiempo para que las plantas expresen los síntomas.

Virus del mosaico estriado del trigo (WSMV)

En los últimos años se ha reportado la presencia del virus del mosaico estriado del trigo (WSMV) en México y en otros países de América Latina. El virus causa daños importantes en algunas zonas productoras de cereales de Estados Unidos. Este virus es transmitido por el ácaro *Aceria tosichela*, de la familia Eriophyidae.

Transmisión mecánica: Se puede detectar este virus en forma mecánica, por medio de la savia (ver la sección sobre BSMV en este capítulo) obtenida por maceración con un amortiguador de fosfatos, a una dilución de 1 mg/ml. Los síntomas ocasionados por este virus consisten en estrías cloróticas que al progresar se convierten en un mosaico severo. En las especies *Triticum aestivum* y *T. durum* aparecen estrías cloróticas que posteriormente se unen hasta provocar un mosaico amarillo. En la avena, se presentan estrías más anchas y más difusas que, al progresar la infección, se tornan necróticas. En la cebada, los síntomas se manifiestan como estrías cloróticas bien marcadas que posteriormente se necrosan.

Detección mediante la técnica ELISA

Al igual que lo es para BYDV-CYDV, la técnica ELISA es eficiente y rápida para detectar la presencia del virus del WSMV.

Mosaico estriado del trigo transmitido por el suelo (SbWMV) y mosaico estriado ahusado del trigo (WSSMV)

Estas dos virosis son comunes en Norte América, y SbWMV se ha encontrado también en Argentina. Estos virus son transmitidos por un hongo del suelo, *Polymyxa graminis*, a través de la raíz. Es posible, aunque difícil, utilizar la transmisión mecánica para diagnosticar estos virus, dado que la expresión de los síntomas no es siempre clara. El método más eficaz y seguro de diagnóstico para estos dos virus es la técnica ELISA, por medio de antisueros específicos.

Bibliografía

- D'Arcy, C.J., L.L. Domier y M.A. Mayo. 1999. Luteoviridae. En: *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle y R.B. Wickner (eds.). Academic Press. pp. 775-784.
- Henry, M. y A. McNab (eds.). 2002. *Barley Yellow Dwarf Disease: Recent Advances and Future Strategies*. Mexico, D.F.: CIMMYT.
- Henry, M. y R.T. Plumb. 2002. Bacterial leaf streak and black chaff. 331-344. En: *Bread Wheat: Improvement and Production*. B.C. Curtis, S. Rajaram, y H. Gómez Macpherson (eds.). FAO, Roma.
- Mayo, M.A. y D'Arcy, C.J. 1999. Family Luteoviridae: a reclassification of luteoviruses. En: *The Luteoviridae*. H.G. Smith y H. Barker (eds.). CABI Publishing, Oxon, Reino Unido. pp. 15-22.
- Mayo, M.A. 2002. Virology Division News: Virus Taxonomy-Houston. *Arch. Virol.* 147:1072-1076.

Apéndice 1

Medios sintéticos y naturales

Caldo papa-dextrosa. Este medio líquido se usa para incrementar propágulos de micelio de *Pyrenophora tritici-repentis*.

Componentes:	
Dextrosa	20 g
Papas sin cáscara	200 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: Se cortan las papas en cuadritos y se ponen a hervir durante 15 minutos en un matraz de 1000 ml con 500 ml de agua destilada. Se filtra el caldo y se agrega la dextrosa aforando con agua destilada hasta obtener un volumen de 500 ml. La mezcla se transfiere a matraces de 250 ml en alícuotas de 100 ml.

Esterilizar en autoclave durante 20 min a 121 °C. Poner en baño maría a 50 °C y agregar un antibiótico como sulfato de estreptomicina (0.1 g por 1000 ml) para evitar la contaminación por bacterias; mezclar bien.

Agar V-8. Este medio es muy útil para estimular la esporulación de muchos hongos. El jugo V-8, que contiene extractos de tomate, apio, betabel (betarraga o remolacha), perejil, lechuga, espinaca y berro, es elaborado por la Campbell Soup Co. y la empresa Hérdez (en México), entre otras. Existen diferencias entre las distintas marcas y, por tanto, conviene hacer pruebas comparativas para cada especie con que se vaya a usar. En aquellos lugares donde no se consigue jugo V-8 enlatado, es posible reemplazar este medio con uno que contenga extracto de hojas (ver el que sigue), especialmente si se trata de especies como *P. tritici-repentis* y *P. teres*.

Componentes:	
Jugo V-8	200 ml
Carbonato de calcio	3 g
Agar	15-20 g
Agua destilada	800 ml

Preparación: Se pesan el agar y el carbonato de calcio. Se colocan en un matraz, se agrega el jugo y se afora con el agua hasta obtener un volumen de 1000 ml. Sellar y esterilizar el matraz. Se recomienda agitarlo un poco al momento de vaciarlo para que el jugo no se precipite. Este medio puede hacerse en diferentes concentraciones variando únicamente la cantidad de jugo. Por ejemplo, para obtener una concentración del 30%, se usan 300 ml de jugo V8 y 700 ml de agua destilada; para obtener una del 15% se usan 150 ml de jugo y 850 ml de agua destilada.

Medio con extracto de hojas. Este medio se utiliza principalmente para estimular el crecimiento y la formación de las estructuras asexuales de ciertos hongos. Se usan hojas de distintas especies, según sea el caso.

Componentes:	
Agar	15-20 g
Agua destilada	1000 ml
Hojas frescas (trigo, avena, cebada, etc.)	100 g
Sucrosa	10 g

Preparación: Las hojas se ponen a hervir en el agua durante 20 a 30 minutos y enseguida se filtran. Se agrega el filtrado al agar y la mezcla se afora hasta obtener 1000 ml. Luego se esteriliza y se vacía en cajas de Petri o tubos de cultivo.

Medio 4-4-4 agar malta levadura. Este medio a menudo se utiliza para aislar e incrementar *Septoria tritici* y *Stagonospora nodorum*.

Componentes:

Extracto de malta	4 g
Extracto de levadura	4 g
Sucrosa	4 g
Agar	18 g
Estreptomicina	0.1 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: Se mezclan con agua destilada todos los ingredientes, salvo el antibiótico (estreptomicina). La mezcla se agita bien y se esteriliza durante 20 minutos; cuando está tibia, se agrega el antibiótico y se vacía en cajas de Petri o tubos de cultivo.

Agar extracto-levadura. Este medio es recomendable para el crecimiento y desarrollo de picnidios de *Stagonospora nodorum*.

Componentes:

Extracto de malta	3 g
Extracto de levadura	2 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.5 g
Agar	20 g
Estreptomicina	0.1 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: Se mezclan bien todos los ingredientes y se esterilizan durante 20 minutos. Cuando la mezcla esté tibia, se le agrega el antibiótico y se vacía en cajas de Petri o tubos de cultivo.

Caldo de frijol chino (*Vigna radiata*). Este medio se usa para el incremento de *Fusarium graminearum*. Es muy barato y eficiente para producir inóculo en grandes cantidades.

Componentes:

Frijoles chinos	20 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: Se hierven los frijoles en agua durante 20 minutos y se filtran; el filtrado se esteriliza por 20 minutos en matraces de 500 ml (llenar sólo a la mitad).

Incremento: Inocular el líquido y poner en un agitador durante cinco días. No es recomendable usar el inóculo después de un crecimiento de ocho días porque el hongo comienza a producir toxinas.

Agar frijol lima (lima bean agar, o LBA). Este medio se utiliza para aislar e incrementar *Stagonospora nodorum*, *Rynchosporium secalis* y hongos que atacan raíces y corona. Puede prepararse con frijol lima o bien comprarse ya preparado.

Componentes	
Frijol lima	8 g
Agar	15-18 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: Se hierve el frijol lima en el agua durante 20 a 30 minutos; se filtra la infusión, se agrega el agar y se esteriliza durante 20 minutos.

Existen otras fórmulas para elaborar este medio, como por ejemplo:

Componentes:	
Lima bean agar (Difco)	12 g
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar durante 20 minutos a 120 lb de presión. También se usa la siguiente fórmula:

Componentes:	
Preparación comercial LBA	23 g
Agar puro	5 g
Agua destilada	1000 ml

Al preparado comercial LBA, se añaden 5 g de agar puro (si no se tiene este preparado se puede usar 8 g de infusión de frijol lima y 15 g de agar); esto se mezcla con el agua destilada. Esterilizar 20 minutos.

Medio líquido de sacarosa-levadura. Utilizar para incrementar *Septoria tritici* y *P. tritici-repentis* sólo si se dispone de agitador y existen condiciones que favorezcan la aplicación del inóculo en forma diaria, dado que, después del quinto día, comienza a perder viabilidad.

Componentes:	
Sacarosa	10 g
Extracto de levadura	10 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: Se mezclan los componentes y se esterilizan durante 20 minutos en matraces de 250 ml. El medio se inocula una vez que se ha enfriado, y se agita en forma constante durante el período de incubación. Usar el inóculo al quinto día.

Medio con trozos de hojas. Este medio es propicio para estimular la formación de la fase sexual de algunos hongos, como los del género *Pyrenophora*.

Componentes:	
Agar	15-20 g
Agua destilada	1000 ml
Trocitos de hojas de plántulas	

Preparación: Se disuelve el agar en el agua. Se colocan bien distribuidos los trocitos de hojas de plántulas (probar diferentes especies) en una caja Petri y se esterilizan. Una vez esterilizados el medio y las hojas, se procede a vaciar el agar; cuando el agar está cerca del punto de solidificación, se colocan de 5 a 10 trocitos de hoja en cada caja, de tal forma que queden en la parte superior del agar. El hongo en estudio se inocula sobre los trocitos de tejido vegetal y se observa periódicamente.

Medios que se utilizan para la conservación o multiplicación de hongos

En la preservación y manejo de cultivos de hongos, conviene reducir la cantidad y frecuencia de las transferencias de aislamientos a una vez cada seis meses. Los aislamientos deben ser mantenidos en un substrato tan natural como sea posible (por ejemplo, hojas de trigo para *Pythium* y semilla de trigo para *Fusarium* y otros) para evitar cambios en la patogenicidad. Los procedimientos de preservación varían según el organismo.

Grano estéril. Se utiliza una gran variedad de granos para la conservación de algunos hongos que de esta forma se mantienen estables y no pierden virulencia ni la capacidad de esporulación, como ocurre en algunos medios sintéticos. El tipo de grano que se usa depende del microorganismo con el que se esté trabajando.

Preparación: El grano se pone a remojar en agua destilada durante 24 horas; después se escurre el exceso de agua y se llenan con el grano tubos de ensayo, matraces o frascos. Estos se cierran sin apretar completamente y se esterilizan en autoclave durante dos horas. Enseguida se incuban de 48 a 72 horas a temperatura ambiente (22 °C) para asegurar que no crezca ningún hongo o bacteria contaminante. Al término de este período, los matraces y tubos se inoculan con el cultivo puro y se incuban durante 7 a 10 días, o los que sean necesarios para obtener una buena esporulación. Durante este período, se recomienda moverlos cada dos días, golpeándolos fuertemente contra la palma de la mano para que no se forme una masa compacta y se facilite el crecimiento del hongo.

Cuando se trata de mantener aislamientos, los tubos y matraces se almacenan en bolsas de plástico y se refrigeran. Si el objetivo es multiplicar el inóculo, éste se extrae en forma de una suspensión en agua destilada estéril. Una vez que han alcanzado el desarrollo deseado, los cultivos se almacenan en el refrigerador a 4-5 °C.

Entre los granos que se pueden utilizar están el trigo, la cebada, la avena, el triticale y el sorgo, según la afinidad del grano como sustrato del hongo en estudio. Los medios a base de grano se usan comúnmente en especies del género *Fusarium* y algunas de *Pyrenophora*. *Gaeumannomyces graminis* se conserva y se multiplica bien en semillas de avena esterilizadas de la misma forma señalada anteriormente.

Tierra estéril. Se esteriliza tierra cernida y húmeda durante dos horas en tubos o matraces, y se repite el proceso con un intervalo de 24 horas como mínimo. Esto permite la germinación subsecuente de estructuras de resistencia que no se afectaron en la primera fase de esterilización. Una vez finalizada la esterilización, los tubos o matraces están listos para ser inoculados con las cepas puras.

Agua estéril con trozos de hojas. La preservación de cultivos en agua estéril es particularmente útil en el caso de *Pythium* spp. Este patógeno es almacenado en un medio de hojas de trigo y agua. Las hojas de plántulas de trigo (5 ó 6 hojas de 2 cm de largo) se secan al aire y se suspenden en 9 ml de agua destilada en tubos de ensayo. Los tubos se tapan con algodón y se esterilizan en el autoclave. Los aislamientos se transfieren asépticamente en un trocito de agar y se les deja crecer varios días a temperatura ambiente. Los tubos se sellan entonces con parafina y se almacenan a 4 ó 5 °C. Los aislamientos se pueden mantener un año o más sin necesidad de ser transferidos.

Un segmento pequeño de hoja de estos cultivos colocado en medio de harina de maíz (corn meal agar, CMA) es suficiente para reiniciar el crecimiento. Se ha encontrado que no todas las especies sobreviven a períodos largos de almacenamiento de esta manera; por lo tanto, si se está trabajando con *Pythium*, los aislamientos deberán transferirse cada seis meses hasta que se determine la capacidad de viabilidad de las especies que estén en estudio.

Medio con extracto de hojas. Este medio es específico para mantener aislamientos de *Septoria tritici* durante períodos largos, sin que se modifique su virulencia.

Componentes:

Hoja de trigo	30 g
Bactoagar	20 g
Estreptomina	0.1 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: Las hojas se maceran con el agua en una licuadora o mortero y se filtran a través de una gasa para separar el material grueso; se agrega el agar y se esteriliza la mezcla durante 20 minutos. Cuando esté tibia, se agrega la estreptomina, agitando suavemente con movimientos rotatorios para homogeneizar, cuidando de no ensuciar las paredes ni los tapones. Se vacía en cajas Petri, poniendo una cantidad mínima, justo lo necesario para cubrir la base de la caja. Para conservar el patógeno a largo plazo, se inocula el medio con conidios de *Septoria* en el centro de la caja. Se aconseja hacer paquetes con varias cajas cubriéndolas con papel aluminio; éstos se mantienen a una temperatura de entre 20 y 25 °C, hasta que el agua del medio se haya evaporado (aproximadamente tres meses). Al cabo de ese tiempo se deben haber formado picnidios maduros.

De esta forma se pueden conservar aislamientos durante períodos largos (hasta tres años) a una temperatura de 4 a 6 °C. Si se desea obtener nuevamente un cultivo activo, los picnidios disecados se sacan y se colocan en un medio de cultivo apto para el incremento de *Septoria*. Se debe considerar que no todos los aislamientos tienen la capacidad de formar picnidios en este medio.

Conservación en hojas infectadas y disecadas. *Pyrenophora tritici-repentis*, *P. teres*, *Septoria tritici*, *Stagonospora nodorum* y *Rynchosporium secalis* son difíciles de conservar en medios de cultivo, ya que su capacidad de esporulación y su patogenicidad disminuyen drásticamente y desaparecen sin posibilidad de recuperación. Para evitar este problema, se recomienda inocular los aislamientos en variedades susceptibles bajo condiciones controladas. Las hojas que presentan la infección se cortan cuando las lesiones muestran un desarrollo medio, se secan 48 horas al medio ambiente y se conservan a 4 °C. *Pyrenophora tritici-repentis* puede permanecer viable durante seis meses en estas condiciones, en tanto que *S. tritici* y *S. nodorum* permanecen viables por más de 12 meses. En el caso de *R. secalis*, los aislamientos se guardan en un recipiente hermético de plástico en el congelador a -15 °C. Se recomienda probar estas condiciones con otras especies que provocan manchas foliares.

Bibliografía

- Barnes, E.H. 1968. *Atlas and Manual of Plant Pathology*. New York: Plenum Press.
- Eyal, Z., A.L. Scharen, J.M. Prescott, y M. van Ginkel. 1987. *Enfermedades del trigo causadas por Septoria: Conceptos y métodos relacionados con el manejo de estas enfermedades*. México, D.F.: CIMMYT.
- French, E.R. y T.H. Teddy. 1982. *Métodos de investigación fitopatológica*. Primera edición. Primera reimpresión. San José: IICA.
- Murray, T.D., D. Parry, y N.D. Cattlin. 1998. *A Color Handbook of Diseases of Small Grain Cereal Crops*. Iowa State University Press, Ames, IA, EUA. 142 p.
- López-Atilano, R.M., L. Gilchrist-Saavedra y G. Leyva-Mir. 2002. Evaluación de medios de cultivo para el incremento de inóculo de *Stagonospora nodorum*. *Memorias del XXIX Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.* Monterrey, Nuevo León, México. Abstract F-94.
- Tuite, J. 1969. *Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria*. Department of Botany and Plant Pathology, Purdue University. Lafayette, Indiana.
- Waller, J.M., J.M. Lenne, y S.J. Waller. 2001. *Plant Pathologist's Pocketbook*. Tercera edición. CABI Publishing, Wallingford, Reino Unido. 516 p.
- Zelibovitch, N. y Z. Eyal. 1989. Maintenance of virulence of *Septoria tritici*.
- Zillinsky, F.J. 1984. *Guía para la identificación de enfermedades en cereales de grano pequeño*. México, D.F.: CIMMYT. 141 pp.

Apéndice 2

Medios de cultivo para el aislamiento, incremento y conservación de varios patógenos de cereales

Patógeno	Aislamiento	Incremento	Conservación
<i>Fusarium</i> spp.	PCNB (suelo) Agar harina maíz PDA	Medio frijol chino PDA Trozos de tallos de maíz estéril	Granos de trigo estériles Suelo estéril
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	PDA Agar modificado CZAPEK (especifico)	PDA Agar modificado CZAPEK (especifico) Caldo CZAPEK	Granos de trigo estériles Hojas infectadas
<i>Helminthosporium spiciferum</i>	PDA	PDA	Granos de trigo estériles
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	V-8 (30%)	V-8 (30%)	Hojas infectadas
<i>P. teres</i> f. <i>teres</i> <i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	V-8 (15%)	V-8 (15%)	Hojas infectadas
<i>Pythium</i> spp.	Usar trampas (plántulas de trigo) sembradas en arena estéril con tejido	Agar harina de maíz	Hojas de trigo en agua estéril
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	Usar trampas (plántulas de trigo) sembradas en arena estéril con tejido infectado	Agar harina de maíz	Granos de avena estériles
<i>Rhizoctonia</i> spp.	Usar trampas (plántulas de trigo) sembradas en arena estéril con tejido infectado	PDA	PDA
<i>Sclerotium rolfsii</i>	PDA	PDA	PDA
<i>Septoria tritici</i>	PDA 444 levadura-peptona	Medio líquido levadura-peptona Medio 444 levadura-peptona	Medio 4-44 Medio de hojas
<i>Stagonospora nodorum</i>	PDA	Medio específico para <i>S. nodorum</i>	Medio específico para <i>S. nodorum</i>
<i>Rhynchosporium secalis</i>	Frijol lima	Frijol lima	Hojas de cebada
<i>Alternaria</i> spp.	PDA	PDA	PDA