



Protocolos y Anexos

del

curso con demostraciones
sobre

los aspectos más concretos
y aplicados de métodos de
fitopatología

que

apoyan el mejoramiento
genético de cultivos

Ejemplos: piriculariosis
del arroz y del trigo

Dr. M. Vales, Ing. J. Milazzo

UMR - BGPI

Biologie et Génétique

des Interactions Plante-Parasite



cirad



INRA

Montpellier
SupAgro

ANNEXES

Anexo 1 - Resistencia completa y resistencia parcial

1. Introducción

La noción de resistencia completa o parcial depende de la escala de observación: célula, tejido, órgano (hoja, espiga, etc.), planta, campo (epidemia) y economía (ingreso perdido). Aquí no se trata de las dos primeras.

2. Resistencia completa (RC)

Hay RC cuando “no hay” síntomas, por ejemplos, piriculariosis (piri.) foliar de tipo 1 de la escala 1 (Cf. anexo 7) y notación 1 de la escala 5 para la piri. de la espiga de trigo (Cf. anexo 10). A la fecha (17-03-12) no se conoce RC para la piri. del trigo.

Aunque, se puede considerar que hay RC, escala 3 (Cf. anexo 7), cuando “no se desarrolla” la epidemia, por ejemplo, cuando se observa lesiones de tipo 2 de la escala 1 (Cf. anexo 7) que no producen esporas (órgano de diseminación) por no tener centro diferenciado.

“Hay o no hay”, “se desarrolla o no”, por lo tanto, la RC tiene un efecto en “todo o nada”, por esto, se dice que es cualitativa.

En el caso de la piri. del arroz hay formas de RC que no funcionan contra algunas cepas (Cf. anexo 1) y que funcionan contra otras cepas; se dice que la RC es específica (de estas últimas cepas por controlarlas).

Para la piri. del arroz, no hay (a la fecha) formas de RC que funcionan contra todas las cepas. Por lo tanto, pocos años después de su liberación comercial, la RC de una variedad de arroz es (a la fecha) siempre superada por la piri., por esto, se dice que la RC a la piri. del arroz no es durable.

Cuando la RC de una variedad (que no tiene también una resistencia parcial suficiente) es superada, la pérdida de producción puede ser muy grave. Por lo tanto, el uso exclusivo de la RC a la piri. del arroz es una estrategia económicamente riesgosa.

3. Resistencia parcial (RP)

Hay RP cuando hay síntomas, pero que se nota una defensa de la planta, por ejemplo, con la lesiones de piri. foliar de tipos 3, 4 y 5 de la escala 1 (Cf. anexo 7) (se ve que hay “grados” del daño). No de tipos 1 y 2, porque se consideran como RC, y ni tampoco de tipo 6, porque las lesiones no tienen la bordura marrón que impide su extensión. Sin embargo, se puede admitir que siempre hay una RP, porque el hongo no crece en una hoja tan fácilmente que en caja de Petri.

La RP disminuye “más o menos” el tamaño de las lesiones y/o su número, por lo tanto, el porcentaje de la superficie foliar infectada (Cf. escala 4 del anexo 9). Para los tipos de lesión 3 a 6 (Cf. escala 1 del anexo 7), cuando aumenta este porcentaje, aumenta la superficie de la hoja que produce esporas y su posibilidad de contaminar otras plantas. Es por esto que, también, se considera que hay RP cuando la extensión de la enfermedad, la epidemia, es “más o menos” frenada.

Hay “grados”, disminuye “más o menos”, “más o menos” frenada, por lo tanto la RP tiene, según las variedades un efecto variable, por esto se dice que es cuantitativa.

La expresión de la RP depende también de las condiciones agroecológicas, por esto se debe realizar toda la selección en condiciones de producción, por ejemplo de forma participativa (Cf. protocolo D).

La RP disminuye el tamaño de las lesiones y/o su número, ¡pero la RC también! Si la planta no tiene RC todas las esporas de la población del hongo parasito que caen sobre sus hojas pueden producir lesiones, por lo tanto muchas; si la planta tiene RC todas la esporas no pueden producir lesiones (porque la RC es específica), por lo tanto hay menos lesiones. ¡Ojo! por lo tanto, un factor que produce un efecto cualitativo (en ocurrencia la RC) puede producir un efecto cuantitativo (en ocurrencia parecido a la RP) cuando se cambia de escala de observación!

Por lo tanto, para evaluar la RP en campo, se debe inocular el ensayo con una cepa por la cual no hay plantas (de población recurrente, de línea o de variedad) con RC eficaz (Cf. protocolos E, D y G).

Se busca variedades con un nivel de RP suficiente para que la menuda pérdida de producción sea económicamente aceptable.

Hay pocas variedades de arroz (IRAT 13, CIRAD 403, O. LLANOS 5, ACD 25-28, etc.) con alto nivel de RP no superada, a la fecha, por la piri. tras años (> 6) de producción; RP entonces durable.

Anexo 2 - Postulados de Koch

1. Objetivo

Los postulados de Koch fueron formulados en 1881 por Robert Koch, a partir de sus experimentos con el *Mycobacterium tuberculosis*, pero han sido generalizados para el resto de las enfermedades infecciosas, con objeto de saber cuál es el agente participante.

2. Postulados

Para asegurarse que un agente patógeno es el responsable de una enfermedad se debe cumplir con todos los postulados siguientes:

- 1) El agente patógeno debe estar presente en todas las plantas que tienen los síntomas de la enfermedad y ausente en las plantas sanas.
- 2) El agente debe ser aislado, a partir de las lesiones de la enfermedad, y cultivado de forma pura.
- 3) El agente debe provocar los mismos síntomas de la enfermedad, al ser inoculado en una planta susceptible
- 4) El agente debe ser aislado de nuevo de las lesiones producidas en dicha planta susceptible.

3. Referencia

Ruy Pérez Tamayo. 1997. De la magia primitiva a la medicina moderna. Capítulo VII La Medicina moderna (siglos XIX) y XX). Primera edición, 1997 Fondo de Cultura Económica, carretera Picacho-Ajusco 227, 14200 México, D.F. ISBN 968-16-5415-3. Impreso en México
http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/154/html/sec_16.html

Anexo 3 - Medios para cajas de Petri

1. Medio de cultivo harina de arroz

1.1. Introducción

El medio harina de arroz permite el cultivo de *Magnaporthe* del arroz y del trigo.

Ver los trucos económicos del protocolo 16.

1.2. Preparación del medio

En condiciones no estériles, en un Erlenmeyer  o un balón a fondo plano  de vidrio de 2 litros se pone 1 litro de agua destilada, 15 g de agar, 20 g de harina de arroz (grano como sale del campo, con sus glumelas) y 2 g de extracto de levadura. Se tapa el Erlenmeyer o el balón con algodón cardado (hidrófobo), que se pone en el cuello, y con un papel tipo kraft (que no se moja mucho) mantenido con un elástico. Se pone, por ejemplo, 1 l de medio en un Erlenmeyer o un balón de 2 l para evitar que al hervir (autoclave) este medio destapa dicho Erlenmeyer o balón.

Después se pone el Erlenmeyer o en balón al autoclave para 20 minutos a 120 °C.

En mismo tiempo se ponen 40 cajas de Petri a esterilizar en una estufa 15 minutos a 200 °C. Por ejemplo se pueden poner estas cajas de Petri 20 por 20 en cajas metálicas.

1.3. Conservación del medio

Según el plan de trabajo, se puede desear almacenar medio preparado con anticipación. En este caso, una vez que el medio está frío se puede guardar al refrigerador (≈ 5 °C).

Se puede utilizar este medio de cultivo después de volverlo líquido calentándolo en un horno microonda. ¡Ojo! un Erlenmeyer o un balón de 2 l no entra en un horno microonda común, por lo tanto se debe repartir el medio de cultivo en envases más pequeños antes de esterilizarlo en el autoclave.

1.4. Distribución del medio en cajas de Petri

En condiciones estériles, en una cámara de flujo laminar, se ponen las cajas de Petri estériles y el Erlenmeyer o el balón con el medio de cultivo. Se espera que baje la temperatura del medio de cultivo para que sea posible añadir un antibiótico, sin destruirlo, y distribuir el medio en las cajas de Petri sin quemarse las manos. Por lo tanto, la temperatura es correcta cuando se puede poner la mano sobre el Erlenmeyer o el balón, al nivel de medio de cultivo, si quemársela.

Se destapa el Erlenmeyer o el balón y se quema la entrada del cuello con un mechero. Se destapa con un abrebotellas un frasco de 500.000 U.I. (Unidades Intencionales) de penicilina G, se quema la entrada del cuello del frasco con un mechero y se añade la penicilina G al medio de cultivo.

Se mueve periódicamente el medio de cultivo para homogeneizarlo y se llenan las cajas de Petri, más o menos a mitad, cerca del mechero. Al inicio, cuando hay todo un litro de medio de cultivo en el Erlenmeyer o en el balón, es más cómodo, poner la caja de Petri a llenar sobre 2 otras.

Con un litro de medio de cultivo se pueden llenar 40 cajas de Petri. Una vez el medio de cultivo frío se puede utilizar estas cajas de Petri.

2. Medio bacto-agar

2.1. Introducción

El medio bacto-agar permite obtener cepas monoesporicas con control visual (Cf. protocolo 4). El bacto-agar es más transparente que el agar común, sin embargo, si no se tiene bacto-agar, se puede utilizar dicho agar común.

2.2. Protocolo

Es como para el medio harina de arroz sino que se pone 45 g de bacto-agar por litro (en general se necesita menos volumen) y se llenan las cajas de Petri, más o menos al cuarto mitad (para más transparencia).

Anexo 4 - Aislamiento multiesporico, cepa monoesporica y raza

1. Aislamiento multiesporico

Un aislamiento se obtiene a partir de una lesión (mancha debido a la enfermedad) (Cf. Protocolo 2). Como dicha lesión puede resultar de la infección por varias esporas (forma de dispersión) de un hongo parasito que provoca la enfermedad, un aislamiento es supuestamente multiesporico, por lo tanto considerado como genéticamente heterogéneo.

2. Cepa monoesporica

A partir directamente de una lesión o a partir de un aislamiento se puede individualizar esporas para obtener el mismo numero de cepas entonces monoesporicas (Cf. Protocolos 4 y 5). Una cepa es, en microbiología, un conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

3. Raza

Una raza es una cepa o un conjunto de cepas de misma(s) característica(s). Por lo tanto las razas son el resultado la(s) caracterización(es) que sea(n) patológica, fisiológica, genética, etc.

Por lo tanto, en resumen, los casos siguientes son posibles:



Anexo 5 -Caja de guantes-23 03 12

Caja de guantes o caja seca

1. Tipos

De la más sofisticada (①) a la más sencilla (②). La más sencilla puede ser suficiente para un trabajo que no sea rutinario.

2. Construcción casera

Se puede construir una caja seca básica (③) (Cf. 3.).

3. Referencia

Para más detalles del ③

http://chmgk.associationspore.com/modules/newbb/viewtopic.php?topic_id=210&forum=18

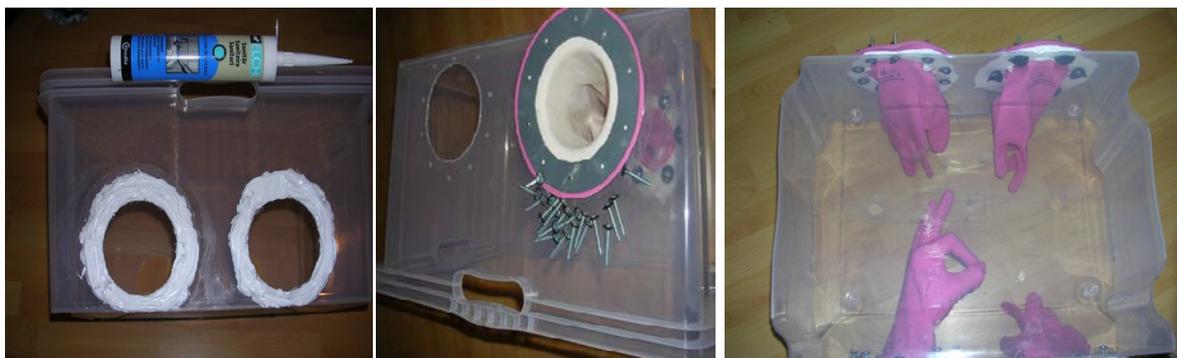
1-



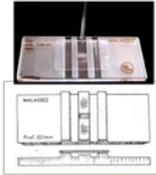
2-



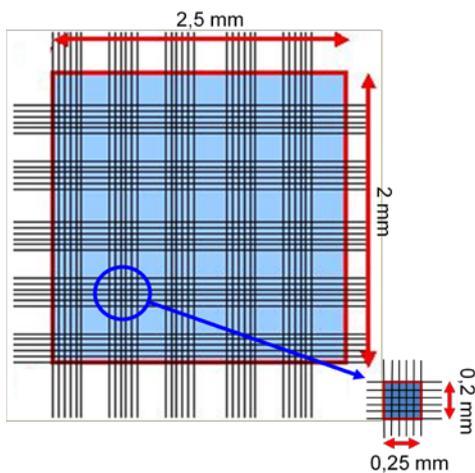
3-



Anexo 6 -Conteo esporas-23 03 12



Profundidad 0,2 mm



Conteo de esporas

1. Conteo

Con una pipeta se toman una gota de inóculo filtrado bien agitados (las esporas pegan a cualquiera superficie hidrofoba) que se coloca entre la lámina (especialmente plana) y la lama de lacélula. Se espera 1 minuto para que las esporas caigan sobre la lamina.

Después de localización de los límites de la célula al microscopio (ocular x objetivo \approx ampliación 100), las esporas son contadas (ocular x objetivo \approx ampliación 400). Según las células utilizadas (Malassez, Thoma, Nageotte, Fluchs-Rosenthal, etc.) y según la concentración deseada, se puede contar un cuadrado, una banda, incluso la célula entera. Para las esporas situadas entre dos cuadrados o bandas, contamos sólo a las que son a caballo sobre dos orillos, en general lo de arriba y lo de la derecha.

2. Calculo con una célula de Malassez

Con la especificación de cada tipo de célula se conoce el volumen donde se hizo el conteo para calcular la concentración de esporas. Para facilitar el cálculo con una célula de Malassez, siguen varios casos rutinarios.

□ Primer caso

Contar las esporas en toda la célula, por lo tanto en el gran cuadro de 2,0 mm x 2,5 mm (x 0,2 mm de profundidad = $10^{-3} \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{l}$) y multiplicar el número obtenido por 1.000, para obtener la cantidad de esporas por ml de inóculo preparado. Por ejemplo: $47 \times 1000 = 47.000$ esporas / ml.

□ Segundo caso

Contar las esporas al interior de los 25 cuadrillos de 0,20 mm x 0,25 mm (x 0,2 mm de profundidad) y multiplicar el número obtenido por 4.000, para obtener la cantidad de esporas por ml de inóculo preparado. Por ejemplo: $47 \times 4000 = 188.000$ esporas / ml.

□ Tercero caso

Contar las esporas al interior de 5 cuadrillos (una diagonal) y multiplicar el número por 20.000, para obtener la cantidad de esporas por ml de inóculo preparado. Por ejemplo: $47 \times 20.000 = 940.000$ esporas / ml.

3. Ajuste de la concentración

Después se debe realizar la dilución adecuada para obtener la concentración deseada.

Anexo 7 -Escalas 1-2-3 piri foliar-23 03 12

Tipos de lesión foliar de piriculariosis (*Magnaporthe grisea*) del arroz (1) e interpretaciones (2 y 3)



Anexo 7

Escala						
1	Tipo 1 Sin síntomas	Tipo 2 Puntos o lesiones marrones de 1 a 2 mm sin** centro diferenciado	Tipo 3 Lesiones de 2 a 3 mm con bordura marrón con centro diferenciado	Tipo 4 Lesiones de 4 a 5 mm con bordura marrón con centro diferenciado	Tipo 5 Lesiones de más de 6 mm con bordura marrón claro o purpúrea con centro diferenciado	Tipo 6 Lesiones de más de 6 mm sin bordura diferenciada
2	R esistente	R esistente	M ediana-mente S usceptible	S usceptible	S usceptible	A ltamente S usceptible
3	R esistencia C ompleta		R esistencia P arcial			N o hay R P*

**Sin centro diferenciado, que produce esporas, no se propaga epidemia a partir de estas lesiones (RC) *Casi no hay resistencia parcial

Anexo 8 - Selección recurrente

1. Población recurrente

La selección recurrente consiste primero en reemplazar la población F2 (resultado del cruzamiento de dos padres y de la autofecundación de la F1, caso de una especie autógama) o S1 (resultado del cruzamiento de dos padres y de una fecundación cruzada de la S0, caso de una especie alogama) por una población recurrente.

Esta población recurrente se deriva del cruzamiento de más de dos padres (desde 4, para una población recurrente de base genética estrecha (Vales *et al.*, 2000), hasta varias decenas para una población recurrente de base genética amplia). Un gen de macho-esterilidad (Fig. 1) es utilizado en general para que las fecundaciones cruzadas que se hagan espontáneamente al campo (no controladas) y no manualmente.

2. Mejoramiento poblacional recurrente

Una selección masal o genealógica (a menudo sobre descendencias de medio-hermanos (que descienden de la cosecha de plantas macho-estériles) es efectuada en esta población. Las descendencias de las plantas o las descendencias seleccionadas son sembradas y recombinadas (por cosecha de las plantas macho-estériles), esto para el mejoramiento recurrente de la población (ciclos sucesivos de selección y de recombinación).

3. Creación de variedades

Por otro lado, algunas descendencias entran en el proceso de selección-fijación para la obtención, al final, de variedades. Esta selección-fijación se puede hacer por la utilización inicial de la selección masal, o la fijación por haplo-diploidización (por cultivo de anteras) o por descendencias de semilla única, luego, o directamente, por selección genealógica.

Los términos de "selección recurrente" pues no se oponen a los de "selección masal" o "genealógica", ya que la selección recurrente puede ser, o genealógica, o masal.

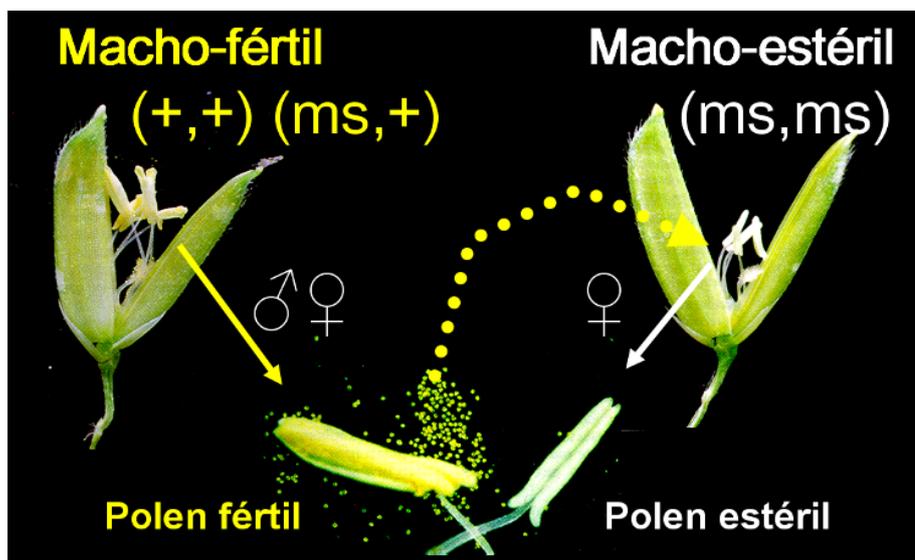


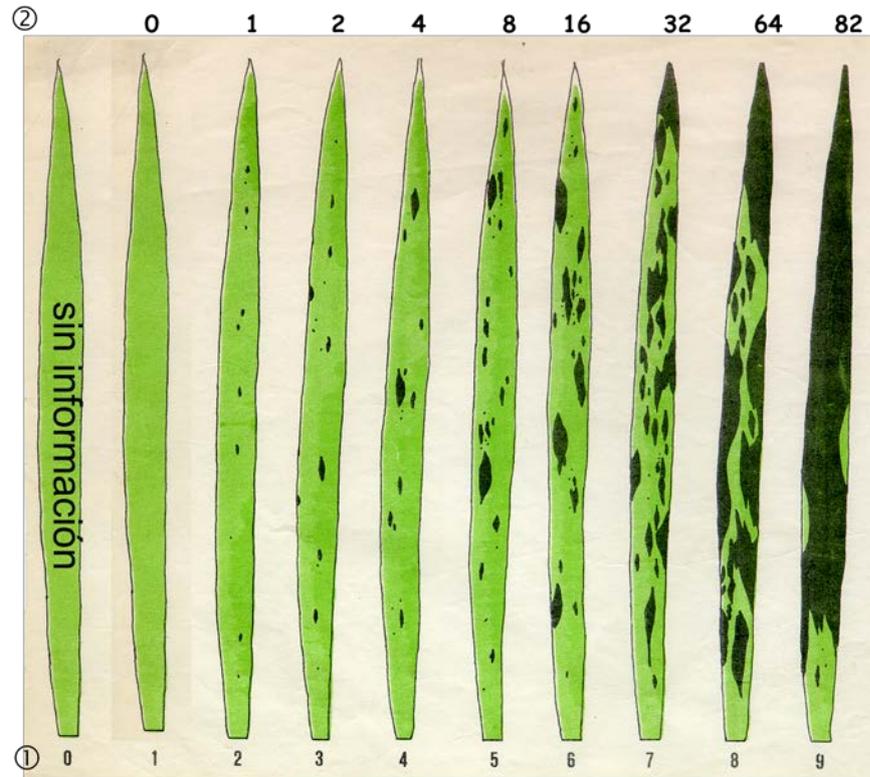
Figura 1: Uso de un gen de macho-esterilidad recesivo en arroz (hay el mismo sistema para el trigo)

4. Referencias

Vales M, Dossmann J, and Borrero J, 2000. Delivery of the first recurrent population with narrow genetic base. Collaborative CIAT-CIRAD sub-project. Enhancement of the genetic resources for the Latin America and the Caribbean. In Annual Report of the IP-4 Rice Project of CIAT. 2000. CIAT, Palmira. http://www.ciat.cgiar.org/riceweb/pdfs/report_2000/output_1.pdf

Anexo 9 -Escala 4 piri foliar-23 03 12

% Área Foliar Infectada



Escala para piriculariosis de la hoja (1 - 9 / 1)

(Por ejemplo, la nota 3 significa entre [3 y]4)

Escales para el área foliar afectada por la piriculariosis

1. Introducción

Las escalas visuales facilitan las calificaciones en el campo. Las escalas exponenciales, como la presentada, facilitan aun más.

2. Uso

En el campo, por facilidad, se califican únicamente las hojas fácilmente observables, por lo tanto, las ultimas (de arriba) completamente desarrolladas.

Se utilizan la notaciones (1) en el campo, pero se debe regresar a los porcentajes del área foliar infectado (%AFI) (2) para los análisis. Porque, por ejemplo, el promedio de las notas 5 y 7 seria la nota 6 que corresponde a un 16 %AFI, pero en realidad, los %AFI correspondientes a las notas 5 y 7 son 8 y 32, por lo tanto, de promedio 20 %AFI).

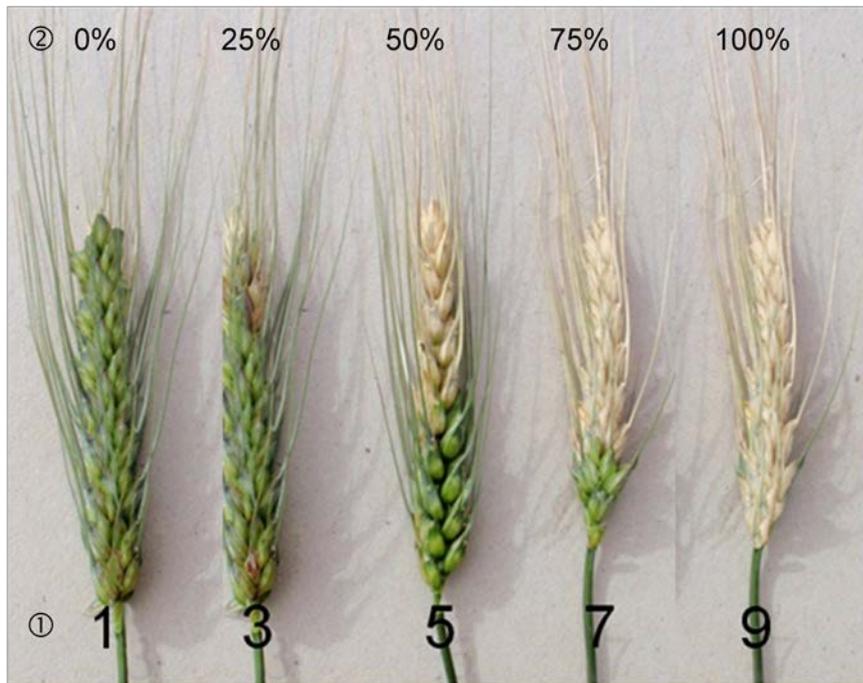
3. Referencia

Notteghem, J.-L., 1977. Field evaluation of horizontal resistance to rice blast disease (en francés). Agron. Trop. 34 (2), 180-192.

Anexo 9

Anexo 10 -Escala 5 piri espiga-24 03 12

Porcentaje de espiga afectada por la pirculariosis



Escala para la pirculariosis de la espiga de trigo

1. Introducción

Las escalas visuales facilitan las calificaciones en el campo.

2. Uso

Se utilizan la notaciones (①) en el campo y, como es una escala lineal, se puede hacer el análisis estadístico directamente sobre dichas notas. Sin embargo habla mas si los resultados son expresados en % de espiga atacada.

Por más precisión en la calificación se puede generar las notas intermedias (2, 4, 6 y 8) que corresponden a los % intermedios (12,5%, 37,5%, 62,5% y 87,5%, respectivamente).

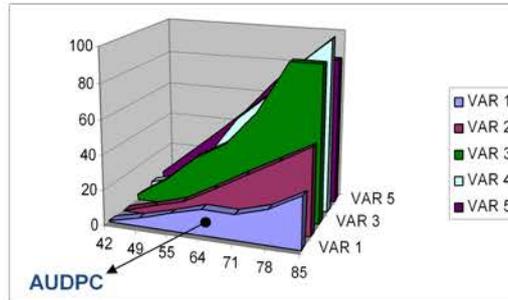
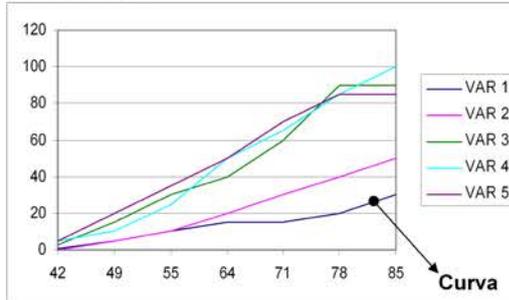
3. Referencia

Vales M., E. Guzmán. 2011. Escala de notación de la pirculariosis de la espiga.

Escala 5: Pirculariosis de la espiga (1 - 9 / 2)

Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (acrónimo inglés AUDPC)

1. Definición



2. Calculo con Excel

	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	Porcentaje de aera foliar infectada								
5	Variedades	Dias							AUDPC
6		42	49	55	64	71	78	85	
7	VAR 1	1	5	10	15	15	20	30	581,00
8	VAR 2	0	5	10	20	30	40	50	932,50
9	VAR 3	3	15	30	40	60	90	90	2018,00
10	VAR 4	5	10	25	50	65	85	100	2070,00
11	VAR 5	5	20	35	50	70	85	85	2192,50
12									
13	Copiar esta formula en la celda J7			=+ ((D7+C7)/2)*(\$D\$6-\$C\$6)+((E7+D7)/2)*(\$E\$6-\$D\$6)+((F7+E7)/2)*					
14	Copiar la celda J7 en las otras			(\$F\$6-\$E\$6)+((G7+F7)/2)*(\$G\$6-\$F\$6)+((H7+G7)/2)*(\$H\$6-\$G\$6)+					
15	(J8 =>J11)			((I7+H7)/2)*(\$I\$6-\$H\$6)					

3. Referencia

CIP's protocol for standard evaluation of potato clones for resistance to Late Blight (LB) in the field: experimental design, evaluation, data analysis and interpretation

