

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS:

**Identificación del agente causal del mildiú de la quinua
(*Chenopodium quinoa* Willd.) y evaluación endógena en
las semillas, Ayacucho, 2761 msnm, 2022**

Para optar el título profesional de:
INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR:

Bach. Roberto Carlos MORALES GAMBOA

ASESOR:

Ph.D. Germán Fernando DE LA CRUZ LAPA

COASESORAS:

M.Sc. Ángela Juana REQUIS QUINTANILLA

M.Sc. Eugenia Rocío QUISPE MEDINA

AYACUCHO - PERÚ

2026

DEDICATORIA

*A Dios, que me ha concedido salud, vida y la
fortaleza para culminar mis estudios.*

*A mi familia, que ha sido un pilar fundamental en
mi desarrollo profesional y me ha enseñado a
superar los obstáculos en cada etapa de mi vida.*

*A mis docentes, quienes me ayudaron a crecer
profesionalmente al compartir una gran
variedad de experiencias.*

AGRADECIMIENTO

A mi alma máter, la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, donde recibí mi formación profesional. A los profesores de la Facultad de Ciencias Agrarias, que me transmitieron sus conocimientos y su visión a lo largo de mi trayectoria profesional.

Al Ph.D. Germán Fernando De La Cruz Lapa gestor y asesor, a la M.Sc. Ángela Juana Requis Quintanilla y a la M.Sc. Eugenia Rocío Quispe Medina coasesoras de este proyecto de investigación, por su ayuda, por sus valiosos consejos y por ayudarme a terminar este trabajo.

Los evaluadores de esta investigación, Dra. Nery Luz Santillana Villanueva, Dr. José Antonio Quispe Tenorio y al M.Sc. Guillermo Carrasco Aquino, por todas las aportaciones realizadas para garantizar el nivel de calidad exigido en la presentación de esta investigación.

A mis compañeros de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, y a mis colegas en el ámbito laboral, por su respaldo incondicional y colaboración estrecha que fueron fundamentales para hacer realidad esta investigación.

A esa persona tan especial que me ha ayudado y aconsejado a lo largo de este camino. Te agradezco tu apoyo incondicional y tu presencia en los momentos difíciles.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
MARCO TEÓRICO	3
1.1 Antecedentes	3
1.2 Bases teóricas	5
1.2.1 Descripción botánica de la quinua.....	5
1.2.2 Ecotipos y variedades	5
1.2.3 Mildiú de la quinua	6
1.2.4 Sistemática.....	6
1.2.5 Morfología del mildiú veloso.....	7
1.2.6 Ciclo de vida	7
1.2.7 Epidemiología.....	9
1.2.8 Sintomatología.....	10
1.2.9 Diversidad genética de <i>Peronospora</i>	10
1.2.10 Identificación del mildiú de la quinua	11
CAPÍTULO II.....	15
METODOLOGÍA.....	15
2.1 Localización	15
2.2 Material biológico	16
2.3 Metodología para la identificación morfológica del agente causal del mildiú veloso	16
2.3.1 Recolección de muestras	16
2.3.2 Aislamiento de <i>Peronospora</i> spp.	17
2.3.3 Microscopía de estructuras de <i>Peronospora</i> spp.	17

2.4	Metodología para la identificación molecular del agente causal del mildiú veloso	18
2.4.1	<i>Protocolo Möller</i>	18
2.4.2	<i>Protocolo Lee y Taylor</i>	19
2.4.3	<i>Protocolo Ristaino</i>	20
2.4.4	<i>Protocolo Huanca-Mamani</i>	21
2.4.5	<i>Evaluación de la calidad de ADN</i>	22
2.4.6	<i>Pre PCR</i>	23
2.4.7	<i>PCR (Reacción en cadena de polimerasa)</i>	23
2.4.8	<i>Post PCR</i>	25
2.5	Metodología para comprobar la presencia o ausencia endógena de <i>Peronospora sp.</i> dentro de las semillas de quinua	25
2.5.1	<i>Recolección de muestras</i>	25
2.5.2	<i>Prueba de germinación</i>	26
2.5.3	<i>Manejo de plantas de quinua en invernadero</i>	26
2.5.4	<i>Aislamiento y observación microscópica de Peronospora spp.</i>	28
2.5.5	<i>Detección molecular de oosporas en semillas de quinua</i>	28
	CAPÍTULO III	30
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1	Identificación morfológica del agente causal de mildiú veloso	30
3.1.1	<i>Esporangióforos</i>	30
3.1.2	<i>Esporangios</i>	32
3.1.3	<i>Oosporas</i>	35
3.1.4	<i>Descripción morfológica de mildiú veloso en el cultivo de quinua</i>	37
3.2	Resultados de la caracterización molecular del agente causal de mildiú veloso .	38
3.2.1	<i>Protocolo Moller-Bahnweg et al. (1992)</i>	38
3.2.2	<i>Protocolo Ristaino et al. (1998)</i>	39
3.2.3	<i>Protocolo Lee y Taylor (2024)</i>	40
3.2.4	<i>Protocolo Huanca-Mamani et al. (2024)</i>	41
3.2.5	<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	42
3.3	Comprobación de la presencia o ausencia endógena de <i>Peronospora</i> en las semillas de quinua del germoplasma de Ayacucho	44
3.3.1	<i>Prueba de germinación</i>	44

3.3.2	<i>Resultados de comprobación endógena del agente causal de mildiú vellosa</i>	45
3.3.3	<i>Observación microscópica</i>	47
3.3.4	<i>Electroforesis</i>	49
3.3.5	<i>Resultados de la cuantificación de ADN de semillas de quinua mediante Espectrofotometría</i>	49
3.3.6	<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	50
CONCLUSIONES		52
RECOMENDACIONES		53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		54

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 2.1 Mezcla maestra para amplificación en PCR, para 13 reacciones.	23
Tabla 2.2 Cebadores utilizados en el estudio (Testen et al., 2014)	24
Tabla 2.3 Accesiones de semillas de quinua utilizadas del banco de germoplasma del Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal	26
Tabla 3.1 Micrometría de esporangióforo de <i>Peronospora</i> sp. en <i>Chenopodium</i> <i>quinoa</i> Willd.	30
Tabla 3.2 Micrometría de esporangios de <i>Peronospora</i> sp. en <i>Chenopodium</i> <i>quinoa</i> Willd.	33
Tabla 3.3 Micrometría de oosporas de <i>Peronospora</i> sp. en <i>Chenopodium</i> <i>quinoa</i> Willd.	35
Tabla 3.4 Descripción morfológica de <i>Peronospora variabilis</i> en <i>Chenopodium</i> <i>quinoa</i> Willd.	37
Tabla 3.5 ADN extraído (diluido 10 μ l ADN/10 μ l NFW)	39
Tabla 3.6 ADN extraído (diluido 10 μ l ADN/10 μ l NFW)	40
Tabla 3.7 ADN extraído (diluido 10 μ l ADN/10 μ l NFW)	41
Tabla 3.8 ADN extraído (diluido 10 μ l ADN/10 μ l NFW)	42
Tabla 3.9 Homogenización de la concentración de ADN.....	42
Tabla 3.10 Prueba de germinación de 20 accesiones de quinua	44
Tabla 3.11 Presencia de oosporas en quinua sembradas en condiciones de invernadero.....	45
Tabla 3.12 ADN extraído (diluido 10 μ l ADN/10 μ l NFW)	49

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1 <i>Ciclo de vida de Peronospora variabilis en la zona andina. Cf, esporangióforo; C, esporangio; a, anteridio; Og, oogonio y Os, Oospora (Tapia et al., 1979)</i>	9
Figura 2.1 <i>Mapa de ubicación del experimento.....</i>	15
Figura 2.2 <i>Recolección de muestras</i>	17
Figura 2.3 <i>Perfil térmico para la Reacción en Cadena de Polimerasa.....</i>	24
Figura 2.4 <i>Prueba de germinación en condiciones de laboratorio</i>	26
Figura 2.5 <i>Pasteurización del sustrato en autoclave</i>	27
Figura 2.6 <i>Siembra de semillas y crecimiento de quinua en bandejas.</i>	27
Figura 3.1 <i>Esporangióforo del Peronospora sp. en Chenopodium quinoa Willd.....</i>	31
Figura 3.2 <i>Esporangios del Peronospora sp. en Chenopodium quinoa Willd.....</i>	33
Figura 3.3 <i>Oosporas del Peronospora sp. en Chenopodium quinoa Willd.</i>	36
Figura 3.4 <i>Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Möller al 1% de agarosa</i>	38
Figura 3.5 <i>Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Möller al 1.8% de agarosas.....</i>	38
Figura 3.6 <i>Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Ristaino.....</i>	39
Figura 3.7 <i>Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Lee y Taylor.....</i>	k
Figura 3.8 <i>Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Huanca Mamani.....</i>	41
Figura 3.9 <i>PCR de las muestras obtenidas en el protocolo Lee & Taylor, Huanca Mamani y Moller</i>	43
Figura 3.10 <i>Síntomas observados en las accesiones de quinua.....</i>	46
Figura 3.11 <i>Observación microscópica de las estructuras de Peronospora variabilis Gaum.....</i>	47
Figura 3.12 <i>Bandas de ADN de semillas de quinua obtenidas mediante el protocolo de Moller.</i>	49
Figura 3.13 <i>PCR de las muestras de ADN de semillas de quinua obtenidas en el protocolo Moller.....</i>	50

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. <i>Prueba de germinación de accesiones del banco de germoplasma del Laboratorio de Genética y Biotecnología vegetal.</i>	59
Anexo 2. <i>Esterilización del sustrato.</i>	59
Anexo 3. <i>Colección de muestras con síntomas característicos en campo y selección de muestras aptas en el laboratorio.</i>	60
Anexo 4. <i>Protocolo de Risco (2014) para la observación microscópica de oosporas.</i>	60
Anexo 5. <i>Procedimiento para realizar extracción de ADN.</i>	61
Anexo 6. <i>Procedimiento para realizar PCR.</i>	62
Anexo 7. <i>Porcentaje de germinación de accesiones de semillas de quinua del banco de germoplasma del Laboratorio de Genética y Biotecnología vegetal.</i>	63
Anexo 8. <i>Mediciones del esporangióforo del agente causal de mildiú veloso.</i>	66
Anexo 9. <i>Mediciones del esporangio del agente causal de mildiú veloso.</i>	68
Anexo 10. <i>Mediciones de las oosporas del agente causal de mildiú veloso.</i>	70

RESUMEN

La quinua tiene un enorme potencial tanto en el mercado nacional como en el extranjero debido a que sus granos son una fuente de alta calidad de proteína. Es susceptible a enfermedades, entre las que destaca el mildiú veloso, que puede reducir significativamente la producción, a pesar de que es muy tolerante a condiciones desfavorables como la sequía, las heladas y los suelos salinos. El objetivo del presente trabajo de investigación fue: identificar la especie del agente causal del mildiú de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y evaluar su presencia endógena en las semillas de quinua, Ayacucho, 2761 msnm, 2022. La identificación morfológica se realizó mediante la descripción y medición de esporangióforos, esporangios y oosporas observados (n=60) a partir de los signos mostrados en campo. La identificación molecular se realizó mediante la extracción de ADN y prueba de PCR (primer PV6). Así mismo, la detección de oosporas se realizó mediante el método desarrollado por Risco (2014) y la siembra en bandeja de 20 accesiones de quinua. El tamaño obtenido de los esporangióforos fue entre 237.8 y 659.01 μm de longitud y 11.9 y 7.22 μm de diámetro, los esporangios midieron entre 25.02 a 34.2 μm de largo y 18.46 y 26.93 de diámetro, así mismo, el diámetro de las oosporas osciló entre 22.05 y 31.25 μm . La prueba de PCR muestra que el ADN extraído pertenece a la especie de *Peronospora variabilis* Gaum. Así mismo, el análisis de semilla en 18 de 20 accesiones de semillas de quinua, presentaron síntomas y signos de la enfermedad, confirma que las semillas de quinua son portadoras en forma superficial del inóculo de la enfermedad de mildiú veloso de quinua, en forma endógena molecularmente no se logró identificar.

Palabra clave: *Chenopodium quinoa*, *Peronospora variabilis*., marcadores moleculares, accesiones.

INTRODUCCIÓN

En la región de Ayacucho, la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) es un cultivo importante con un valor comercial significativo. Se cultiva principalmente en diferentes partes de Perú, a través de la agricultura familiar (Mujica & Jacobsen, 2006).

La mayor limitación en la producción de quinua a nivel mundial es causada principalmente por el mildiú vellosa causado por *Peronospora variabilis* Gäum (EI-Assiuty et al., 2019). Los daños más severos ocasionados por el patógeno se presentan bajo condiciones óptimas de temperatura y humedad relativa alta o saturada. Danielsen et al. (2004) señalan que la humedad influye significativamente en la aparición de la esporulación asexual en el mildiú vellosa.

Se ha demostrado que las semillas, que son la principal fuente de infección, pueden propagar las oosporas de *P. variabilis* (Danielsen et al., 2004). De manera que, es necesario realizar una detección temprana y rápida de *P. variabilis*, lo que permitirá garantizar la sanidad de las semillas y una buena producción del cultivo de quinua (Testen et al., 2014).

Testen et al. (2014) llevaron a cabo un estudio con el fin de establecer un método de detección basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *P. variabilis* presente en las semillas. El método basado en la PCR se validó utilizando un método basado en la secuenciación. Se detectó *P. variabilis* en 32 de 33 lotes de semillas de quinua mediante el método basado en la secuenciación y en 31 de 33 lotes de semillas de quinua mediante el método basado en la PCR. Esto permitió confirmar la presencia de oosporas incrustadas en distintas estructuras de las semillas a través de PCR.

Corroborado por EI-Assiuty et al. (2019), quienes investigaron las oosporas de *Peronospora variabilis* Gäum, causante del mildiú vellosa en la quinua (*Chenopodium*

quinoa L.), con el fin de identificarlas histológicamente. Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para corroborar los hallazgos histológicos de las oosporas. Las comparaciones entre el perianto y los distintos tejidos de la semilla en cuanto a la presencia de oosporas revelaron que el perianto presenta un alto porcentaje de oosporas (90 %), seguido del pericarpio (87 %), mientras que los porcentajes más bajos se observaron en el embrión (3 %) y el perispermo (2 %).

En la región de Ayacucho y su entorno, se carece de estudios que permitan confirmar el agente causal del mildiú veloso a nivel de especie. De tal manera que, se requieren trabajos científicos que ayuden en la identificación de este patógeno mediante técnicas actuales y modernas, como son los métodos moleculares haciendo uso de cebadores específicos.

La importancia de la aplicación de los métodos morfológicos y moleculares en la región de Ayacucho para la identificación a nivel de especie del agente causal del mildiú veloso de la quinua, permitirá obtener información científica que será la base conceptual para posteriores estudios. Además, es posible establecer métodos de detección temprana del agente causal del mildiú veloso en semillas.

Objetivo general

Identificar la especie del agente causal del mildiú de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y evaluar su presencia endógena en las semillas de quinua, Ayacucho, 2761 msnm, 2022.

Objetivos específicos

- 1 Identificar morfológicamente el agente causal del mildiú de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en la región de Ayacucho.
- 2 Identificar molecularmente a nivel de especie el agente causal del mildiú de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en la región de Ayacucho.
- 3 Comprobar la presencia o ausencia endógena de *Peronospora* sp. dentro de las semillas de quinua, mediante PCR.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

Testen et al. (2014), realizaron un trabajo de investigación con el fin de establecer un método de detección basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *P. variabilis* transmitido por semillas. El método basado en la PCR se validó mediante un método basado en la secuenciación. Así mismo, para determinar si las poblaciones de *P. variabilis* de Ecuador, Bolivia y Estados Unidos presentaban diferencias geográficas, se analizaron las filogenias del espaciador transcrito interno (ITS) y de la subunidad 2 del citocromo C oxidasa (COX2). Se detectó *P. variabilis* en 32 de los 33 lotes de semillas de quinua mediante el método basado en secuenciación y en 31 de los 33 lotes de semillas de quinua mediante el método basado en PCR. La filogenia basada en COX2 sugirió que existían diferencias geográficas entre las muestras sudamericanas y las estadounidenses, mientras que la filogenia basada en ITS no mostró diferencias regionales. La presencia de una especie de *Peronospora*, distinta de *P. variabilis* y que provoca síntomas sistémicos de mildiú veloso en la quinua en Ecuador, fue confirmada mediante los análisis filogenéticos de ITS y COX2.

Choi et al. (2010) desarrollaron una investigación que tuvo por objetivo comparar morfológicamente y molecularmente treinta y seis aislamientos de *Peronospora* de la quinua con diferentes orígenes geográficos, incluidos Argentina, Bolivia, Dinamarca, Ecuador y Perú, con especies de *Peronospora* de otras especies de *Chenopodium*. La morfología de tres especímenes de herbario fue similar a la de *P. variabilis*, que se originó a partir de *C. album*, caracterizada por ramillas finales flexuas a curvas y esporangios pedicelados. El análisis filogenético basado en secuencias de ADNr de ITS también colocó al patógeno de la quinua dentro del mismo clado que *P. variabilis*. Dentro de las secuencias de ADNr de ITS de los patógenos de la quinua, se encontraron dos sustituciones de bases, que separaron la mayoría de los aislados daneses de los aislados

de América del Sur, pero no se encontraron diferencias de secuencia entre los aislados de diferentes cultivares de quinua. Los presentes resultados indican que el patógeno responsable del mildiú vellosa de la quinua es idéntico a *Peronospora variabilis* y que no debe agruparse con *P. farinosa* como se afirma anteriormente en la mayoría de los estudios.

Choi et al. (2008) realizaron un estudio que tuvo como propósito analizar los caracteres morfológicos y las relaciones filogenéticas de las especies de *Peronospora* parasitarias en cinco especies de *Chenopodium*. Por lo cual, realizaron un análisis de secuencia del ADN de ITS para revelar las relaciones filogenéticas de especímenes de *Peronospora* de cinco especies de *Chenopodium*, a saber. *C. album*, *C. ambrosioides*, *C. bonus-henricus*, *C. hybridum* y *C. polyspermum*. Los cinco clados correspondieron a especies particulares de *Chenopodium* y mostraron un alto nivel de divergencia de secuencia. Las diferencias en la morfología de los esporangios y las ramillas finales también apoyaron la separación de los cinco grupos a nivel de especie hospedante. Estos resultados sugieren que los nombres *P. variabilis*, *P. boni-henrici*, *P. chenopodii* y *P. chenopodii-polyspermi* debe usarse para los cuatro patógenos de mildiú vellosa específicos de *C. album*, *C. bonus-henricus*, *C. hybridum* y *C. polyspermum*, respectivamente. Se encontró que la *Peronospora* de *C. ambrosioides* es una especie independiente.

Assiuty et al. (2019) realizaron un estudio de las oosporas de *Peronospora variabilis* Gäm., el agente causal del mildiú vellosa de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.), que tuvo por objetivo detectar histológicamente en el perianto, pericarpio, testa, perispermo y los cotiledones del embrión de la semilla de quinua. Las detecciones histológicas de oosporas fueron confirmadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el ADN extraído del perianto y todas las partes de la semilla. El porcentaje de ocurrencia de oosporas en las muestras de semillas examinadas fue alto en el perianto (90%) seguido por la cubierta de la semilla (87%) mientras que los porcentajes más bajos se encontraron en el embrión (3%) y el perispermo (2%).

1.2 Bases teóricas

1.2.1 Descripción botánica de la quinua

La región andina es el lugar de origen de la quinua, una planta herbácea anual. Es increíblemente versátil y capaz de adaptarse a numerosas condiciones ambientales. Por lo tanto, puede cultivarse en cualquier lugar, desde el nivel del mar hasta los 4,000 metros sobre el nivel del mar, en regiones húmedas o áridas, en climas templados o cálidos, y en condiciones de frío, sequía y suelos altamente salinizados (Mujica et al., 2001, citado por Ramírez, 2020).

El nombre científico de la quinua es *Chenopodium quinoa* Willd. y su posición taxonómica, según Integrated Taxonomic Information System (2011) es la siguiente:

División	: Tracheophyta
Subdivisión	: Spermatophyta
Clase	: Magnoliopsida
Superorden	: Caryophyllanae
Orden	: Caryophyllales
Familia	: Amaranthaceae
Género	: <i>Chenopodium</i> L.
Especie	: <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.

1.2.2 Ecotipos y variedades

A lo largo de miles de años, la quinua se domesticó y se cultivó en diversos entornos naturales, desde el nivel del mar o la costa (la Yunga); pasando por la región de media montaña (la zona quechua o los valles interandinos); hasta el altiplano, el Suni o el Altiplano; esto juega un papel importante en la aparición de diferentes variedades de quinua, conocidas como ecotipos; por lo tanto, elegir variedades específicas para la siembra es esencial para lograr una alta calidad del grano y un buen rendimiento (Gómez & Aguilar, 2016).

Los ecotipos de mayor importancia en el Perú, son los de Altiplano y Valles interandinos, los cuales se describirán a continuación:

Las quinoas del Altiplano son originarias de las llanuras peruvianas y bolivianas que rodean el lago Titicaca, a una altitud de entre 3.600 y 4.000 m.s.n.m. Estas plantas

presentan rasgos morfológicos únicos, como una sola panícula principal, una altura que oscila entre 0,5 y 1,5 m, y una susceptibilidad al mildiú vellosa. Por el contrario, las quinuas de valle son aquellas que se originaron en los valles de la región andina, a altitudes comprendidas entre los 2,500 y los 3,000 metros sobre el nivel del mar. También presentan características que las distinguen de las quinuas del Altiplano; Las quinoas de Valle, por el contrario, tienen ramas y alcanzan una altura de casi 2,4 metros. Algunas variedades son resistentes al mildiú vellosa, principalmente en términos cuantitativos (Gómez-Pando & Aguilar, 2016, citado por Ramírez, 2020).

1.2.3 Mildiú de la quinua

Choi et al. (2010) indican que, a pesar de la importancia y la amplia distribución de esta enfermedad, la identificación y clasificación del agente causal aún son inciertas debido a la confusión taxonómica del patógeno. De manera que, a través de estudios de pruebas moleculares, demostraron que el patógeno de *Chenopodium quinoa* Willd. fue identificado como *Peronospora variabilis* y no como *P. farinosa*, como se le consideraba más comúnmente.

Por otro lado, Rollano-Perñaloza et al. (2019) señalan que la gran amenaza ambiental en el altiplano andino sobre el cultivo (*Chenopodium quinoa* Willd.) de quinua se debe al oomiceto biotrófico de *Peronospora variabilis*.

El mildiú vellosa de la quinua se ha encontrado e informado en países fuera de la región andina, que es área de distribución de este cultivo, incluidos Canadá, Dinamarca, India y, recientemente, los Estados Unidos. Se desconoce exactamente la fuente original de inóculo para cada introducción de *P. variabilis*, pero estudios señalan que el patógeno se haya introducido en la semilla infectada, ya que las oosporas de *P. variabilis* pueden ser transmitidas por semillas y permanecer viables (Testen et al., 2014).

1.2.4 Sistemática

El organismo causal del mildiú vellosa está ubicado dentro de la familia Peronosporaceae, que pertenece al reino Chromista. Se diferencian de otras enfermedades vegetales, como las causadas por los géneros *Pythium* y *Phytophthora*, pertenecientes a la misma familia, por su naturaleza biotrófica y su gama de huéspedes muy especializada (Thines & Choi, 2016).

Choi et al. (2010), señalan que el agente causal del mildiú de la quinua está identificado como *Peronospora variabilis* Gäum. Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino	: Chromista
Clase	: Oomycete
Orden	: Peronosporales
Familia	: Peronosporaceae
Especie	: <i>Peronospora variabilis</i> Gäum. (Choi et al., 2010)

1.2.5 Morfología del mildiú vellosa

Hifa de haustorio: Frecuentemente ramificado, sin vainas (Choi et al., 2010).

Esporangio: De color pálido a oliváceo, ampliamente elipsoidales, a veces aparecen como ovoides o napiformes debido al pedicelo, subglobosa en los jóvenes, mediana o submediana de mayor ancho, 24.5-35 μm de largo, 20.5-27.3 μm de ancho, con una relación largo/ancho de 1.18-1.56 (Choi et al., 2010).

Esporangióforo: Emergiendo a través de estomas, son hasta 10 en un fascículo, incoloros, rectos a ligeramente curvados de 230-550 μm de largo; tronco de sustrato recto a ligeramente curvado, 110.370 μm de largo, extremo basal no diferenciado, raramente bulboso, hasta 15 μm de ancho, 11-15 μm de ancho en la base, 7.5-10 μm de ancho debajo de la primera rama, y ramillas finales en pares simples (Kara et al., 2020).

Órganos de reposo: Suelen estar presentes y claramente visibles como puntos de color marrón oscuro a amarillentos en la superficie inferior de la hoja; ovogonias subglobosas a irregulares, de 32 a 55 μm de diámetro, pared suave, de 1 a 3 μm de espesor; oosporas globosas, 22.5-32.5 μm de diámetro, marrón dorado a marrón, pared de 1.5-3.5 μm de espesor (Choi et al., 2008).

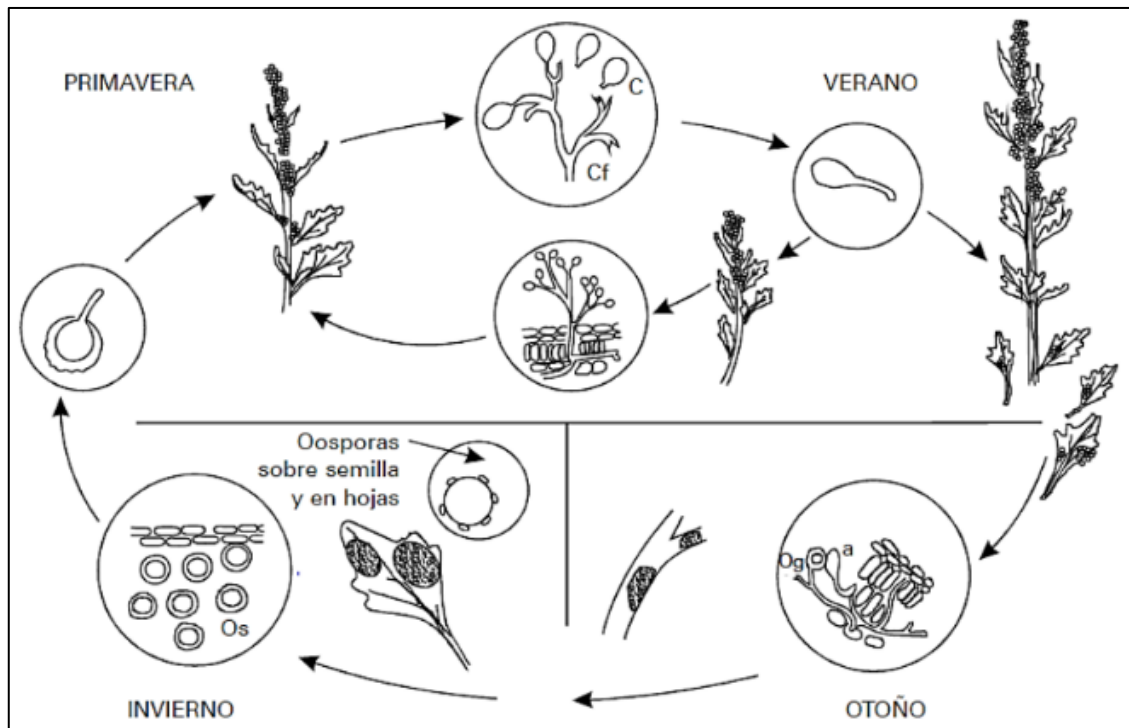
1.2.6 Ciclo de vida

Risco (2014) describió de manera resumida el ciclo de vida de *Peronospora variabilis* de la siguiente manera:

Un esporangio aterriza en una hoja de quinoa para iniciar el ciclo vital y, en condiciones ideales, germina de inmediato (humedad > 80 %) para formar el apresorio provisto de una hifa infectiva que infectará las células adyacentes llegando perforarlas y luego de un periodo de latencia empieza a crecer a través de los espacios intercelulares formando el micelio. El desarrollo de los esporangióforos, que sobresalen hacia el envés de la hoja a través de los estomas, comienza entre cinco y seis días después de la penetración, tiempo durante el cual el patógeno se ha desarrollado vegetativamente en el interior del huésped. Las estructuras reproductoras del patógeno, conocidas como esporangios, se forman una vez que los esporangióforos alcanzan la madurez completa y pueden prolongar el brote mientras la planta huésped siga presente en el campo. En este punto, la zona afectada presenta los primeros síntomas de la enfermedad, entre los que se incluye una clorosis leve, lo que indica que las células afectadas se están deteriorando y perdiendo su capacidad de síntesis. En esta fase se produce la esporulación máxima del patógeno. La parte vegetativa del patógeno acaba desapareciendo y la zona afectada se vuelve necrótica. El patógeno puede multiplicarse de forma asexual (esporangios) y provocar numerosas infecciones (policíclicas) durante la temporada de crecimiento. Cuando el tejido foliar parasitado comienza a degenerarse y ya no puede proporcionar al patógeno los nutrientes que necesita para mantener su crecimiento vegetativo, se rompe una especie de equilibrio entre el huésped y la infección. Para garantizar su supervivencia, el parásito desarrolla estructuras sexuales. Las oosporas se forman cuando se produce la fecundación entre los anteridios y los oogonios, que pueden sobrevivir durante mucho tiempo en la cáscara de la semilla, en la hojarasca que queda tras la cosecha o simplemente esparcidas por el suelo una vez que el tejido foliar se ha descompuesto. La principal fuente de inóculo para la próxima temporada de crecimiento son las oosporas. Las oosporas en estado de latencia germinan e inician un nuevo ciclo de vida cuando entran en contacto con un huésped susceptible y con la humedad suficiente. Es fundamental recordar que el patógeno puede pasar por varios ciclos asexuales, pero solo por un ciclo sexual durante una temporada de crecimiento.

Figura 1.1

Ciclo de vida de Peronospora variabilis en la zona andina. Cf, esporangióforo; C, esporangio; a, anteridio; Og, oogonio y Os, Oospora (Tapia et al., 1979)



EI-Assiuty et al. (2019) observaron que las oosporas podrían germinar en las plántulas de quinua después de 15 días de la siembra; de manera que, plantearon la hipótesis de que las oosporas fúngicas en los tejidos de la médula de la semilla germinada pueden actuar como fuente inicial del micelio diseminado en los tejidos de las raíces, así como en el hipocótilo y el tallo. Este hallazgo permite la búsqueda de un método crítico de aplicación temprano en la temporada para prevenir la germinación de las oosporas de hongos en las plántulas.

1.2.7 Epidemiología

Hay tres factores que interactúan para provocar la enfermedad: un patógeno virulento, un huésped vulnerable y unas condiciones ambientales favorables para la infección (Agrios, 2004, citado por León Ttacca, 2016, pág. 12).

Las temperaturas entre 15 y 20 °C y una humedad relativa superior al 80 por ciento son ideales para el crecimiento del mildiú vellosa de la quinua y la transmisión de la enfermedad en el campo (Danielsen et al., 2004).

“Las partes desprendidas durante el ciclo de vida de las plantas de quinua, desempeñan un papel en la persistencia de las ooporas en el suelo e infectan las radículas de las plántulas de quinua la próxima temporada” (EI-Assiuty et al., 2019).

1.2.8 Sintomatología

Aguilar et al. (2020) en un estudio realizado, descubrieron que los primeros signos del mildiú vellosa aparecieron 34 días después de la siembra, comenzando con pequeñas manchas amarillentas. Las venas principales y laterales de la hoja fueron rodeadas por manchas cloróticas irregulares que se formaron entre tres y cuatro días después. A continuación, la planta presentó defoliación y rizado de las hojas. En el envés de las hojas y en el interior de las manchas cloróticas se observó un moho grisáceo de aspecto algodonoso, formado por esporangios y esporangióforos.

1.2.9 Diversidad genética de *Peronospora*

“Se ha informado alrededor de 20 especies de *Peronospora* causan mildiú vellosa en *Chenopodium*” (Choi et al., 2008). Además, Testen et al. (2014), identificaron una especie de *Peronospora* que produce síntomas sistémicos de mildiú vellosa en la quinua en Ecuador, diferente de *Peronospora variabilis*, mediante análisis filogenéticos de los genes ITS y COX2.

Choi et al. (2010), realizaron las secuencias de ADN_r de ITS, que permitieron la separación de mildiú vellosa de quinua en dos grandes grupos correspondientes a sus orígenes geográficos. Los aislamientos que se originaron en América del Sur (Argentina, Bolivia, Ecuador y Perú) fueron uniformes en las secuencias de ITS, pero exhibieron dos nucleótidos diferentes de la mayoría de los aislamientos daneses. La presencia de dos grupos geográficamente distintos entre los aislamientos de mildiú vellosa de quinua también se encontró utilizando una técnica de PCR de huellas dactilares, UP-PCR.

Choi et al. (2008), utilizó DC6 e ITS4 para la amplificación selectiva de la región ITS completa de ARN_r, cuyo fin fue revelar las relaciones filogenéticas de especímenes de *Peronospora* de cinco especies de *Chenopodium* (*C. album*, *C. bonus-henricus*, *C. hybridum* y *C. polyspermum*). En conclusión, los especímenes de *Peronospora* de las cinco especies de *Chenopodium* se dividieron en cinco grupos diferentes mediante análisis morfológicos y moleculares, por lo cual sugirieron que los nombres de estas

especies son: *P. variabilis*, *P. boni-henricus*, *C. hybridum* y *C. chenopodii.polyspermi*, respectivamente.

1.2.10 Identificación del mildiú de la quinua

2.2.10.1 Técnicas morfológicas para la identificación

a. Identificación del agente causal en función de las características morfológicas

Rollano-Perñaloza et al. (2019), realizaron una investigación, donde aislaron *P. variabilis*, utilizaron un microscopio para estudiar sus estructuras. Para ello, se tiñeron las hifas y las esporangiosporas, según lo descrito por Koroch et al. (2013) con algunas modificaciones. Después, de cortar las hojas de quinua infectadas con *P. variabilis* en trozos de 1 cm², se aplicaron dos gotas de la solución de I₂/KI (0,5 g de I₂, 1,5 g de KI en 25 ml de H₂O) en la cara abaxial de la hoja contaminada. A continuación, se dejó reposar a temperatura ambiente durante cinco minutos antes de cubrirla con un cubreobjetos.

Aguilar et al. (2020), mediante una técnica más sencilla, seleccionaron hojas que evidenciaban la sintomatología de mildiú veloso y dispusieron en portaobjetos las estructuras reproductivas utilizando una aguja desinfectada, con el fin de realizar la caracterización morfométrica de *P. variabilis*, los esporangióforos, los esporangios y las oosporas se midieron y se observaron bajo un microscopio compuesto después de colocarlos en portaobjetos con una gota de agua destilada y cubrirlos con un cubreobjetos.

Para la identificación morfológica de las estructuras del mildiú veloso en quinua, Choi et al. (2010) y Choi et al. (2008) usaron especímenes de herbarios, los cuales se humedecieron con alcohol al 70 % y se transfirieron a ácido láctico al 60 % en un portaobjetos. Las preparaciones del microscopio se calentaron, se cubrieron con cubreobjetos y se examinaron en microscopía de luz de campo claro y DIC.

Así mismo, El-Assiuty et al. (2019), para la detección morfológica, tomaron muestras de plántulas de hasta 15 días, en el que se separaron radículas, hipocotilos y cotiledones, y de plantas mayores, en el cual se tomaron segmentos (1-2 cm de largo) de distintos órganos. Para el aclarado, se sumergió las muestras de investigación en 25 ml de KOH 1 M durante 30 min a 90 °C para hidrolizar el contenido protoplasmático cuyo propósito es opacar los tejidos necesarios para el examen microscópico. Seguidamente,

las muestras se enjuagaron en agua, acidificaron con HCl diluido y se tiñeron con lactofenol-azul de tripán (10 ml de ácido láctico, 10 ml de glicerol, 10 g de fenol, 10 mg de azul de tripán disueltos en 10 ml de agua).

b. Detección de oosporas en semillas

Khalifa & Thabet (2018), recolectaron entre 200 a 300 g de semillas de cada cultivo de quinua evaluado. Remojaron las muestras de semillas (tres réplicas por cada cultivar) de aproximadamente 1,5 ml de volumen (alrededor de 500 - 1000 semillas, dependiendo del cultivar) en 50 ml de agua destilada y se agitó durante 5 min con un agitador de mesa (300 rpm). Posteriormente, apartaron las semillas vertiendo la solución a través de una capa de estopilla. La suspensión se centrifugó luego a 3000 rpm durante 5 min y el sedimento se volvió a suspender en 5 ml de agua destilada. Se utilizó un microscopio óptico con cámara digital para detectar oosporas en diez gotas (de 10 µl cada una) de la suspensión.

Testen et al. (2014) detectaron *P. variabilis* en las semillas, desarrollando una técnica de detección basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, crearon los cebadores específicos PV4 y PV6, que se aplicaron a las oosporas extraídas durante el lavado de las semillas.

Aguilar et al. (2020), utilizaron 100 granos de quinua en tubos de ensayo con 1 mililitro de agua destilada estéril para detectar oosporas. La solución se agitó durante cinco minutos con un agitador magnético. A continuación, agregaron una gota de safranina, utilizaron una pipeta para dispensar una alícuota de 0,25 ml en portaobjetos de microscopio marcados con una cuadrícula de 3 x 3 mm y examinaron la muestra bajo un microscopio compuesto para contar las oosporas.

Danielsen et al. (2004), para hidrolizar el endospermo y ablandar y desprender la cubierta de la semilla, sumergieron 100 semillas de cada muestra en 20 mililitros de KOH 1 N durante 16 horas. Para determinar si había oosporas de *P. variabilis*, utilizaron un microscopio óptico para realizar análisis detallados de las diferentes secciones de la semilla, lo que permite a los investigadores calcular la cantidad promedio de oosporas por semilla infectada, contar el número de oosporas en cada semilla afectada y anotar el porcentaje de semillas afectadas en cada muestra.

2.2.10.2 Técnica molecular para la identificación

a. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Desarrollado por Kary Mullis en 1985. Con esta técnica se puede amplificar una molécula de ADN para producir millones de copias de un fragmento conocido como amplicones. Para ello se utilizan cebadores u oligonucleótidos que son complementarios a la cadena molde de ADN y que tienen un extremo 3' libre. Estos «oligos» son el punto de partida para añadir nucleótidos y amplificar la cadena molde en la PCR. La ADN polimerasa sigue extendiendo la cadena complementaria una vez que el oligonucleótido se une al objetivo. En una reacción normal, por lo general se utilizan dos cebadores, ubicados en los extremos del segmento de ADN que se va a amplificar. A lo largo de un número predeterminado de ciclos de reacción, se amplifica el número de copias del fragmento de ADN delimitado por los oligonucleótidos. Cada ciclo de una reacción de PCR consta de tres pasos (De Necochea Campion & Canul Tec, 2004):

1. Desnaturalización de las hebras de ADN.
2. Temperatura de alineamiento.
3. Extensión de la cadena de ADN.

Mediante este método desarrollado por Testen et al. (2014), se permite un cribado rápido de las semillas de quinua para detectar (*P. variabilis*), lo cual garantiza el desarrollo de estrategias sostenibles de manejo de esta enfermedad logrando asegurar la producción continua de quinua en los países andinos. Así mismo, desarrollaron el conjunto de cebadores PV6 (*P. variabilis*) a partir de las secuencias de consenso ITS utilizando el Primer Blast del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Las condiciones óptimas de PCR para el conjunto de cebadores PV6 consistieron en lo siguiente: La primera etapa fue la desnaturalización inicial a una temperatura de 94°C durante 2 min; seguido de 32 ciclos de una PCR de contacto con desnaturalización a 95 ° C durante 30 s; la segunda etapa fue la hibridación a una temperatura entre 66 a 56 ° C durante 45 s; y la tercera etapa fue la extensión a 72 ° C durante 90 s; con un paso de alargamiento final de 72 ° C durante 5 min. se permite un cribado rápido de las semillas de quinua para detectar (*P. variabilis*), lo cual garantiza el desarrollo de estrategias sostenibles de manejo de esta enfermedad logrando asegurar la producción continua de quinua en los países andinos.

b. Primers específicos utilizados en la identificación del agente causal del mildiú vellosa en el cultivo de la quinua

Testen et al. (2014) diseñaron cebadores específicos para *P. variabilis* con el fin de desarrollar un método de detección rápida en semillas de quinua. De manera que diseñaron los pares de cebadores PV6F (GTTGCTGGTTGTGAAGGCTG) y el PV6R (ATGCTACGCAACCGAAGTCA). Siendo este utilizado en estudios realizados por El-Assiuty et al. (2019), que consistió en un ensayo de PCR con cebadores de PV6 con el objetivo de confirmar la presencia de oosporas en semillas de quinua.

Por otro lado, Choi et al. (2008); Choi et al. (2010) y Rollano Perñaloza et al. (2019) utilizaron los pares de cebadores DC6 e ITS4 para la amplificación selectiva de la región ITS completa del ADNr. Para lo cual, los 2 primeros extrajeron el ADN genómico utilizando esporangióforos y esporangios formados en la superficie inferior o superior de las hojas infectadas utilizando el tejido huésped infectado de las muestras; mientras que el último, extrajo de las suspensiones de esporangiosporas de Kari aislado de *P. variabilis* utilizando el kit de ADN genómico Pureink.

Khalifa & Thabet (2018) utilizaron un termociclador T100TM para la PCR convencional con el fin de detectar el ADN de *P. variabilis*, utilizando un conjunto de cebadores de espaciador transcrito interno (ITS) ribosómico específico ES P1: 5' GAACCTGCGGAAGGATCA-3' y ES P2: 5'-AGTTCAGCGGGTAATCTTGC-3'. Para lo cual, el ADN total de la hifa fúngica se aisló de los tejidos de las hojas de cada cultivo utilizando el kit MiniPrep TM (ZYMO Research).

De acuerdo a Kara et al. (2020), para amplificar el ADNr del espaciador transcrito interno (ITS) utilizaron los cebadores ITS1-O y LR-0 y el ADNmt del citocromo oxidasa II (cox2) con los cebadores cox2-F y cox2-RC4. Se extrajo ADN genómico de esporangióforos y esporangios formados en hojas de plantas hospedantes infectadas.

CAPÍTULO II

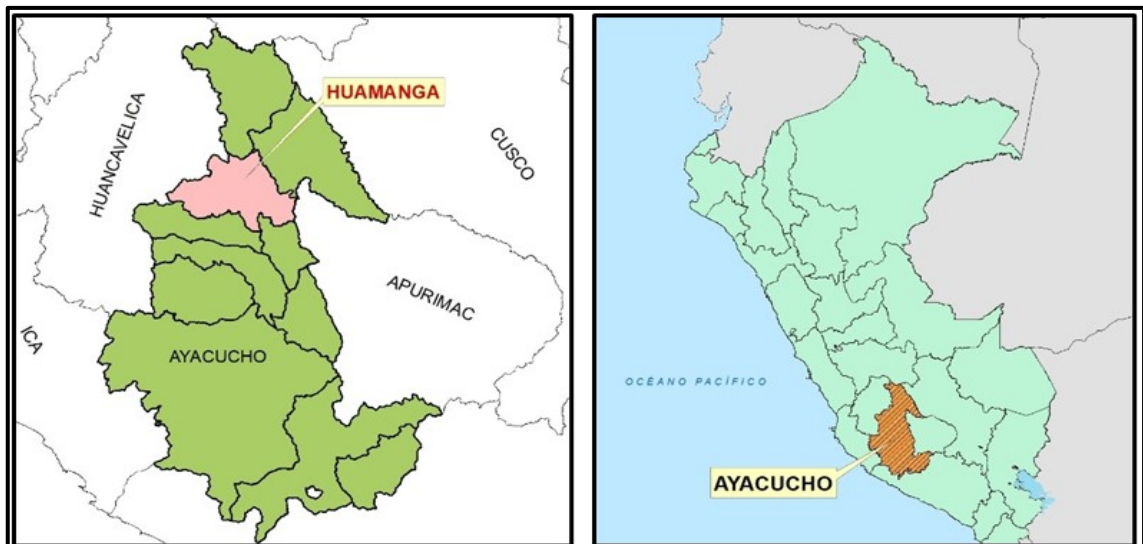
METODOLOGÍA

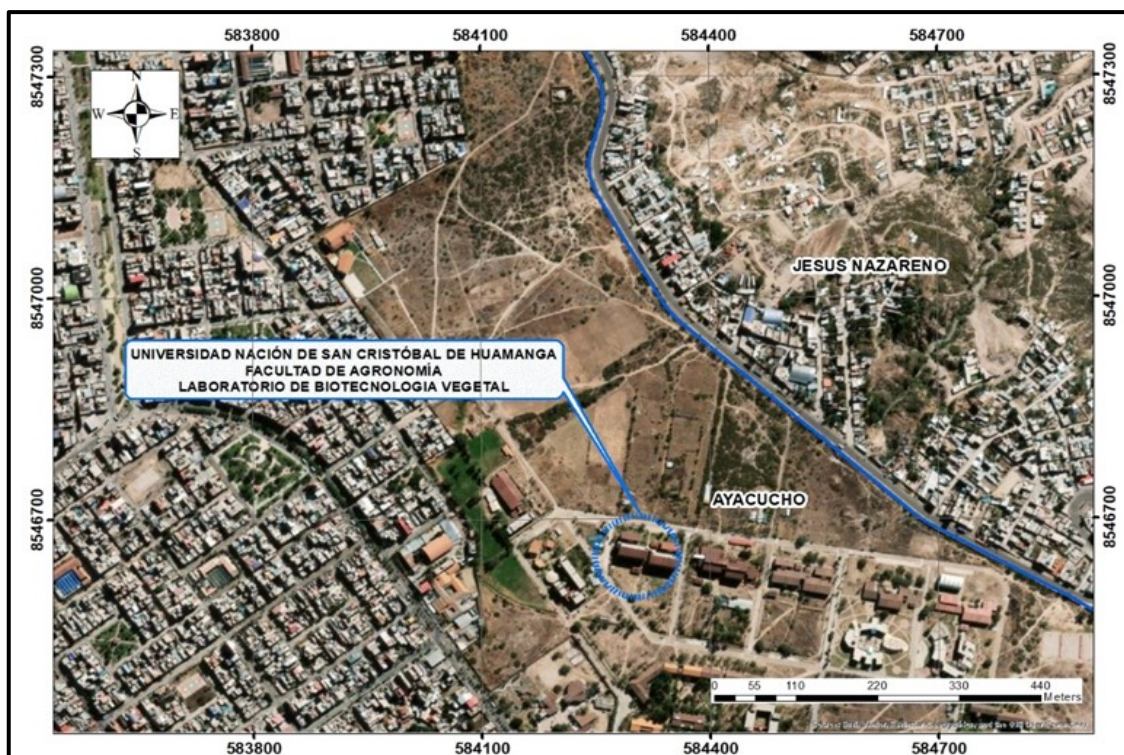
2.1 Localización

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología (Identificación morfológica del agente causal de mildiú vellosa) y en el laboratorio de Biotecnología Vegetal (identificación molecular del agente causal de mildiú vellosa), Se encuentra situado a $13^{\circ}08'53''$ de latitud sur y $74^{\circ}13'12''$ de longitud oeste, a una altitud de 2.792 metros sobre el nivel del mar, en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga y región de Ayacucho, en la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Figura 2.1

Mapa de ubicación del experimento





Nota. (*) Elaborado en ArcGIS 10.8.

2.2 Material biológico

Las muestras de hojas con signos de mildiú veloso de quinua procedieron de campos de quinua situados en el Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA. Por otro lado, las accesiones de semillas de quinua se obtuvieron del banco de germoplasma de quinua en la región de Ayacucho en el Laboratorio de Genética y Biotecnología vegetal, de la Escuela de Formación Profesional de Agronomía (EPA), FCA – UNSCH.

2.3 Metodología para la identificación morfológica del agente causal del mildiú veloso

2.3.1 Recolección de muestras

1. Se hizo uso de accesiones conservadas en el banco de germoplasma de quinua en la región de Ayacucho en el Laboratorio de Genética y Biotecnología vegetal, de la Escuela Profesional de Agronomía (EPA), FCA – UNSCH.
2. Se colectó muestras foliares de quinua de campo, con signo y síntoma de la enfermedad de la Estación Experimental Agraria Canaán - INIA, Ayacucho.
3. Las muestras procedieron de las estructuras fúngicas (hifas y esporangióforos) que crecieron en las plantas cultivadas e inoculadas en el invernadero de la Facultad de Agronomía.

Figura 2.2

Recolección de muestras



2.3.2 Aislamiento de *Peronospora* spp.

Se procedió de acuerdo al protocolo de Danielsen & Ames (2014) para la colección de aislamientos in vitro:

- ✓ Se colectó hojas con signo y síntoma de las plantas crecidas en las bandejas y en campo. Estas muestras se colocaron en placas de Petri forradas con papel de filtro húmedo y presentaban una única lesión con esporulación reciente.
- ✓ Se cortó la parte de la hoja con una lesión.
- ✓ Se inició la propagación inmediatamente con las muestras que presentaron lesión con esporulación abundante.
- ✓ Por otro lado, en muestras con poca esporulación se realizó la incubación en cámara húmeda por un día o por el tiempo que fue necesario, hasta 7 días.

2.3.3 Microscopía de estructuras de *Peronospora* spp.

- **Esporangióforos y esporangios:** Se realizaron montajes de las estructuras encontradas en el envés de las hojas que presentaban síntomas y signos de la enfermedad. Para lo cual con un estilete se tomaron dichas estructuras, fueron depositadas en un porta objeto que contenía una gota de lactofenol, luego se cubrió con un porta objeto y se observaron en los diferentes aumentos, para luego usar los montajes para realizar las mediciones.

- **Oosporas:** Se pesó un gramo de quinoa y se dejó remojar en agua destilada durante sesenta minutos, agitando la mezcla cada diez minutos durante tres minutos cada vez. Se utilizó una centrífuga, colocando cinco mililitros de la suspensión por un tiempo de seis minutos a una velocidad de 2.500 rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en seis gotas de agua destilada. Por último, se utilizó un microscopio con un aumento de 100X para analizar dos gotitas de la suspensión. Así mismo, se obtuvo muestras de hojas que presentaron síntomas en estado avanzado.

2.4 Metodología para la identificación molecular del agente causal del mildiú veloso

Las muestras se obtuvieron a partir de las hojas frescas de quinua con signos de mildiú veloso procedentes de campos de cultivo de la Estación Experimental Agraria Canaán (EEA CANAÁN) - INIA, Ayacucho., de donde se extrajo las estructuras fúngicas mediante raspado.

El ADN total se extrajo de las estructuras del patógeno aisladas de los tejidos de las hojas inoculadas en las plantas crecidas en el invernadero de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

2.4.1 Protocolo Möller

Möller et al. (1992), modificado en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal, E.P. Agronomía de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

1. Con un bisturí se raspó el micelio y se colocaron pequeños trocitos de este en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, además se utilizó muestras con semillas de quinua; a continuación, se trituró la mezcla con la ayuda de las perlitas.
2. Se añadió 500 µl de TES (100 mM de Tris, pH 8,0, 10 mM de EDTA, 2 % de SDS); se añadió 5 µl de proteinasa K procedente de una solución madre adecuada; se incubó a una temperatura de entre 55 y 60 °C durante al menos 30 minutos a una hora, removiendo de vez en cuando.
3. Se añadió 140 µl de NaCl 5 M, 65 µl de CTAB al 10 % (1/10 del volumen) y se incubó a 65 °C durante 10 minutos para modificar la concentración de sal de 1,4 M.

4. Se agregó un volumen de SEVAG (aproximadamente 700 μ l), se mezcló cuidadosamente y se incubó durante 30 minutos a 0 °C antes de centrifugar durante 10 minutos a 40 °C a una velocidad máxima, rpm_{máx}.
5. El sobrenadante se colocó en un tubo de 1.5 ml y se le agregaron 225 μ l de NH₄Ac 5 M; se mezcló cuidadosamente; luego, la mezcla se dejó en hielo durante unos 30 minutos (cuanto más tiempo, mejor); posteriormente, se centrifugó a 4 °C durante 20 minutos a máxima velocidad, rpm_{máx}.
6. El sobrenadante se colocó en un recipiente limpio y se agregaron 0,55 vol. de isopropanol (aproximadamente 510 μ l) para lograr que el ADN precipita. El tubo se centrifugó durante cinco minutos a máxima fuerza. Si no se forman el pellet de ADN, las muestras deben colocarse en hielo durante 15 a 30 minutos antes de la centrifugación.
7. Después de retirar el sobrenadante y lavar el pellet dos veces con etanol al 70 por ciento, se centrifugó el sedimento durante cinco minutos a 4 grados Celsius (12 600 rpm) y se dejó reposar en aproximadamente 50 μ l de TE.

2.4.2 Protocolo Lee y Taylor

Lee & Taylor (1990) modificado en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal, E.P. Agronomía, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

1. Se añadió una porción de micelio (20–60 mg) o micelio fresco (0,1–0,3 g de peso húmedo) y semillas de quinua a un tubo Eppendorf de 1.5 ml con fondo cónico, y se trituró con nitrógeno líquido.
2. Para obtener una mezcla homogénea, agregamos 400 μ l de tampón de lisis y se mezcló con el mezclador Vortex. Si la mezcla queda demasiado espesa, agrega más tampón de lisis (hasta 700 μ l).
3. Se incubó a 65 °C por una hora.
4. Después de agregar 400 μ L de cloroformo: fenol, agitamos con vórtex de manera cuidadosa y rápida (agrega un volumen equivalente de cloroformo: Fenol si se utilizaron más de 400 μ L del tampón de lisis del paso 2.).
5. La fase acuosa (parte superior) debe quedar transparente después de 15 minutos de centrifugación a temperatura ambiente a 10 000 rpm en una microcentrífuga.
6. Vierte entre 300 y 350 μ L de la fase acuosa que contiene el ADN en un tubo nuevo. Ten cuidado de no incluir ningún residuo celular de la interfaz.

7. Se añadió 10 μL de NaOAc 3 M a la fase acuosa, posteriormente se agregaron 0.54 volúmenes de isopropanol. Para mezclar, agita suavemente. Dependiendo de la cantidad de material de partida, los coágulos de ADN precipitados pueden ser visibles o no.
8. Se microcentrifugó a temperatura ambiente durante dos minutos, tal como se indica en el paso 5. Deseche el sobrenadante. Se lavó el pellet una vez con etanol al 70 %. Después de un minuto de agitación, seca los tubos con toallas de papel.
9. Durante quince minutos, o hasta que se secaron, los tubos se mantuvieron en una cámara de vacío a 50 °C.
10. Se resuspendió el sedimento en agua destilada o en 100–500 μL de TE (10 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA). La cantidad de ADN en el sedimento determina la cantidad de TE que se necesita. La concentración final de ADN debe estar entre 0,1 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

2.4.3 Protocolo Ristaino

Ristaino et al. (1998), modificado por Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal, E.P. Agronomía, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

El ADN se extrajo del micelio congelado y semillas trituradas de quinua mediante un procedimiento CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio).

1. Se colocó micelio congelado a tubos de 1,5 μL , luego se agregó 150 μL de tampón de extracción (0,35 M de sorbitol, 0,1 M de Tris, 0,005 M de EDTA [pH 7,5] y 0,02 M de bisulfito de sodio), posteriormente se agitaron los tubos.
2. Se agregó buffer de lisis nuclear (150 μL) compuesto por Tris 0,2 M, EDTA 0,05 M (pH 7,5), NaCl 2,0 M y CTAB al 2 % (pH 7,5), seguidamente se agregó 60 μL de Sarkosyl al 5 % (5 g de N-Lauroylsarcosine por 100 ml de H_2O). Después de agitar los tubos, se incubaron durante 15 a 30 minutos a 65 °C.
3. En cada tubo se añadió un volumen de cloroformo y alcohol isoamílico (mezclados en una proporción de 24:1), que luego se combinaron y se centrifugaron a 13 000 rpm durante quince minutos.
4. Se transfirió fase acuosa a un tubo nuevo, luego se repitió el proceso de la extracción con cloroformo.

5. Tras agregar 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 8,0) y 2 volúmenes de etanol al 100 % frío, el ADN se precipitó durante la noche a -20 °C.
6. Después de desechar el sobrenadante, los sedimentos se limpiaron con etanol al 70 % y se centrifugaron al vacío para secarlos.
7. Se resuspendió el ADN en 100 µl de TE (10 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA [pH 8,0]) y posteriormente se realizó la dilución a 1:100 para la PCR en TE.

2.4.4 Protocolo Huanca-Mamani

Huanca-Mamani et al. (2014) modificado por Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal, E.P. Agronomía, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

1. Con un cuchillo se retiró el micelio, y se colocaron pequeños trozos de micelio y semillas de quinua en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Luego la mezcla se trituró con nitrógeno líquido y se le añadió perlita para desmenuzar el micelio.
2. A continuación, se agregaron 500 µL de buffer de lisis con CTAB al 2 % (100 mM de Tris-HCl, 1,4 M de NaCl, 1 % de PVP, 20 mM de Na₂EDTA + LiCl, 0,2 % de CTAB). Tras ajustar el pH a aproximadamente 8, la mezcla se agitó una vez más y se incubó durante al menos media hora a 65 °C.
3. La mezcla se centrifugó durante cinco minutos a 4 °C a 10 000 rpm. Después de transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, se agregaron 500 µL de una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1 v/v).
4. Después de eso, se invirtió suavemente varias veces y se centrifugó durante diez minutos a temperatura ambiente a 12 000 rpm.
5. Se utilizó un nuevo tubo para verter la fase superior. Para precipitar el ADN, agrega 10 gotas (aproximadamente 200 µL) de isopropanol frío (-20 °C) (opcional: mantén la mezcla a -20 °C durante 30 minutos).
6. La muestra se centrifugó durante diez minutos a temperatura ambiente a 12 073,6 g (12 000 rpm). Después de retirar el sobrenadante y agregar 500 µL de etanol al 70 % a 4 °C, la muestra se centrifugó durante cinco minutos a 12 000 rpm.
7. El sedimento se seca a temperatura ambiente (TA) después de desechar el sobrenadante. Posteriormente, se disolvió el sedimento en 50 µL de TE. La solución de ADN se mantuvo a -20 °C.

2.4.5 Evaluación de la calidad de ADN

a. Espectofotometría

Se utilizó el valor de absorbancia a 260 nm para medir la concentración de ADN, mientras que la relación ADN/proteína a 280 nm se utilizó para medir la pureza. El ADN de alta calidad se define como aquel que tiene una relación A260/A280 entre 1,8 y 2,0.

Se presenta el procedimiento estandarizado desarrollado en el Laboratorio de Genética Vegetal y Biotecnología de la Facultad de Agronomía.

1. Para garantizar una disolución completa, el sedimento de ADN aislado se disolvió primero en 50 μ L de T10E1.
2. Se utilizó 1.5 μ L de T10E1 como blanco. Para la lectura en el espectofotómetro, se utilizó 1,5 μ L de ADN disuelto. Antes de cada lectura las muestras se homogeneizaron mediante un suave movimiento. Es importante destacar que el blanco se preparó con la misma solución utilizada para disolver el pellet de ADN.
3. Por último, la concentración de ADN se expresó en ng/ μ L. En el caso del ADN molde que se utilizará en la amplificación por PCR, esta concentración se ajustará.

b. Por densitometría (electroforesis)

La integridad y la calidad del ADN se evaluaron siguiendo este protocolo:

1. Se preparó un gel de agarosa al 2,0 % añadiendo 2 μ L de bromuro de etidio a 90 mL de solución TBE 1X.
2. El gel preparado se incorporó en la bandeja con peine, se dejó que se solidificara.
3. Una vez que el gel solidificado se colocó en la cámara de electroforesis, se llenó con tampón de electroforesis TBE 1X hasta cubrirlo por completo. A continuación, se retiró el peine para permitir el acceso a los pocillos.
4. Se preparó un volumen final de 6 μ L mezclando 2 μ L de agua libre de nucleasas (NFW), 1 μ L de tampón de carga 6X y 3 μ L de ADN de muestra para obtener la mezcla de correr en gel.
5. La mezcla se sometió a electroforesis en un gel a 90 voltios durante una hora y cuarenta y cinco minutos, después de haberla vertido en los pocillos del gel en el orden correcto. A continuación, se observó la integridad del ADN mediante

un transiluminador UV y, por último, se tomó una imagen del gel para su verificación.

2.4.6 Pre PCR

a. Homogenización de la concentración de ADN

Utilizando agua libre de nucleasas (NFW), las concentraciones de ADN extraído se homogeneizaron primero hasta alcanzar una concentración de trabajo (ADN molde) de 15 ng/μL. Se utilizó la espectrofotometría para determinar los valores de concentración iniciales, los cuales se expresaron en nanogramos por microlitro (ng/μL).

b. Preparación de la mezcla Master Mix

Para el marcador molecular PV6, se preparó la mezcla maestra. La composición de esta mezcla para cuatro reacciones se presenta en la Tabla 2.1. Primero, se calcularon las cantidades para una sola reacción (1Rxx). Luego, estas cifras se multiplicaron por el número total de reacciones necesarias. Para compensar las pérdidas derivadas del contacto con las puntas de las micropipetas, se añadió una reacción adicional a las muestras.

Tabla 2.1

Mezcla maestra para amplificación en PCR, para 13 reacciones.

Reactivos	[I] ^o	[I] ^f	Volumen 1Rx (μL)	Volumen 13 Rx(μL)
Agua libre de nucleasas (NFW)			11.8	141.6
Buffer 5X	5 X	1 X	5.00	60
MgCl ₂	25 mM	4 mM	3.00	36
DnTPs	10 mM	0.4 mM	1.00	12
Directo (PV6F)	10 μM	0.2 μM	0.50	6
Inverso (PV6R)	10 Um	0.2 μM	0.50	6
ADN Taq polimerasa	5 U/μl	0.04 U/μl	0.20	2.4
DNA			3.00	36
Vol. final			25	300

Nota. (*) Al realizar la amplificación por PCR. 1Rxx: 1 reacción, 13 Rxx: 13 reacciones, por El-Assiuti et al. (2019).

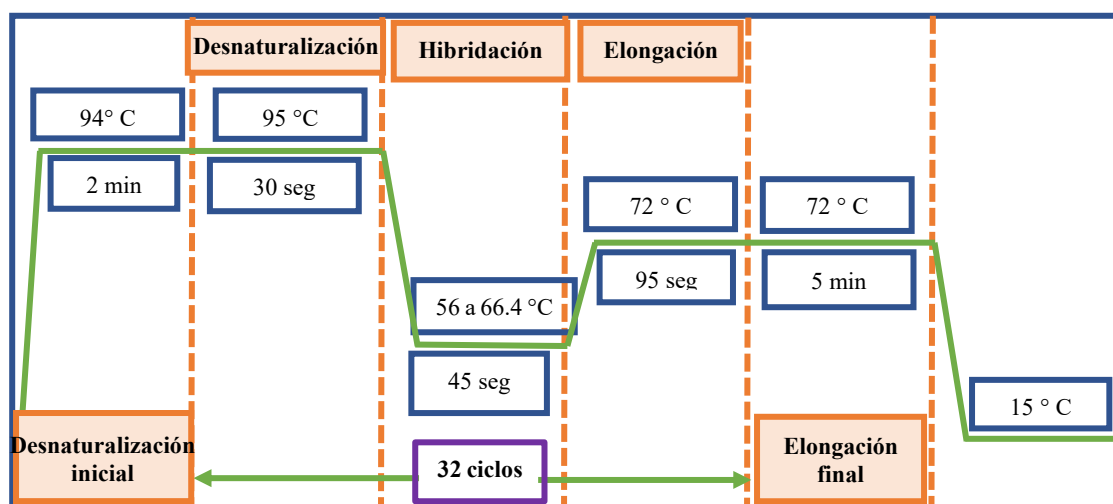
2.4.7 PCR (Reacción en cadena de polimerasa)

Se utilizó el método de PCR para el marcador molecular PV6, tomando en cuenta las longitudes de los cebadores expresadas en pares de bases (278 pb). A continuación,

se presenta la estructura del perfil térmico que se utilizó: desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos, continuando con 32 ciclos que incluían desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, se hibridación a 56 a 66.4 °C (gradiente de temperatura) por 45 segundos, y extensión a 72 °C por 95 segundos, culminando con una extensión a 72 °C durante 5 minutos. Se utilizó un termociclador Eppendorf pro S.

Figura 2.3

Perfil térmico para la Reacción en Cadena de Polimerasa



Nota (*) En el proceso de hibridación se realizó un gradiente de temperatura desde los 56 hasta 66.4 °C.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ejecutó con primers diseñados para amplificar la región PV6. Los cebadores utilizados en el estudio (Testen et al. 2014) son:

Tabla 2.2

Cebadores utilizados en el estudio (Testen et al., 2014)

Nombre de la cartilla	Secuencia (5' a 3')	Fuente
PV6F	GTTGCTGGTTGTGAAGGCTG	Testen, 2014
PV6R	ATGCTACGCAACCGAAGTCA	Testen, 2014
DC6	GAGGGACTTTTGGGTAATCA	Cooke, 2000
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White, 1990
ITS6	GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG	White, 1990
Peronosporomycete adelante	GGCAAATGGGTTTTCAAGATCC	Hudspeth, 2000
Peronosporomycete reverso	CCATGATTAATACCACAAATTTCACTAC	Hudspeth, 2000

2.4.8 Post PCR

a. Preparación del gel de agarosa

Los productos obtenidos luego de realizar PCR se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa horizontal al 1,8 %.

b. Preparación del mix de carga

Se combinaron tres microlitros de producto de PCR, un microlitro de tampón de carga 6X y dos microlitros de NFW para preparar la mezcla de electroforesis. Se siguieron las instrucciones del fabricante para preparar el marcador de peso molecular (Gen Ruler): 3 µL de NFW, 1 µL de DNA ladder y 2 µL de DNA loading 6X. Para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR, estos marcadores fragmentos de ADN de tamaño conocido se colocaron en el gel de agarosa junto con las muestras durante la electroforesis. Durante dos horas, el voltaje de funcionamiento fue de 100 V (4 V/cm), y se mantuvieron durante 30 minutos en 90 mililitros de TBE.

c. Visualización de las bandas

Se utilizó el transiluminador UV Star de 312 nm para visualizar la integridad del ADN y, a continuación, se tomó una fotografía del gel como confirmación.

d. Comparación con marcadores de peso molecular

El tamaño de las bandas se determinó comparándolas con el marcador de peso molecular; el tamaño aproximado de los fragmentos se determinó comparando la migración de las bandas de la muestra con la de los marcadores.

2.5 Metodología para comprobar la presencia o ausencia endógena de *Peronospora sp.* dentro de las semillas de quinua

2.5.1 Recolección de muestras

Se hizo uso de 20 accesiones conservadas en el banco de germoplasma de quinua en la región de Ayacucho en el Laboratorio de Genética y Biotecnología vegetal, de la Escuela de Formación Profesional de Agronomía (EPA), FCA – UNSCH.

Tabla 2.3

Accesiones de semillas de quinua utilizadas del banco de germoplasma del Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal

Accesiones	Accesiones	Accesiones
✓ BLANCA JUNIN 441	✓ SALXPAN 165 C4	✓ SALXCOL 46 - C6
✓ T201	✓ T144	✓ ALTIPLANO
✓ T139	✓ SALXPAN 171 C4	✓ SEÑOR DEL HUERTO
✓ T163	✓ AMARILLA MARANGANI	✓ PASANKALLA
✓ NARANJITA	✓ T141	✓ NEGRA QOITO - T33
✓ T170	✓ INIA SALCEDO	✓ HUAXKCA 53 - C1
✓ T143	✓ BOLIVIANO	

2.5.2 Prueba de germinación

Se realizó la prueba de germinación de 100 semillas por accesión durante 48 horas, en condiciones de laboratorio a 20 °C en una estufa automática, agregando 6 ml de agua por táper.

Figura 2.4

Prueba de germinación en condiciones de laboratorio



2.5.3 Manejo de plantas de quinua en invernadero

La siembra de las accesiones de quinua se realizó en el invernadero de Genética y Biotecnología vegetal, se utilizó bandejas con capacidad de 5 litros, en las cuales crecieron las plantas de quinua hasta mostrar crecimiento foliar adecuado y luego se efectuó la inoculación con el patógeno. La preparación del sustrato fue de 2:1:1/2 de tierra agrícola, tierra negra y arena. Fue sometido a la pasteurización (120 °C) en autoclave en costales con 20 kg de sustrato.

Figura 2.5

Pasteurización del sustrato en autoclave



Siembra en bandejas: Se utilizó bandejas con capacidad de 5 litros, cuyas medidas son: 35 cm de largo, 16 cm de ancho y 13 cm de alto. Se utilizó un total de 48 semillas por bandeja, las cuales fueron divididas en 3 partes. El riego fue constante; además, se utilizó un aspersor para dar las condiciones de alta humedad relativa en el ambiente donde crecieron las plantas de quinua y favorecer el desarrollo de la enfermedad. Las plantas de quinua se desarrollaron a 15-20 °C y 90-95 % de HR, siendo estas las condiciones óptimas para el desarrollo del agente causal del mildiú vellosa (Kara et al., 2020; Danielsen et al., 2004).

Figura 2.6

Siembra de semillas y crecimiento de quinua en bandejas.





2.5.4 Aislamiento y observación microscópica de *Peronospora* spp.

Se procedió de acuerdo a Danielsen & Ames (2014):

- ✓ Se recolectaron hojas que presentaban síntomas de las plantas cultivadas en las bandejas. Estas muestras se colocaron en platillas de Petri forradas con papel de filtro húmedo, se seleccionaron aquellas que presentara esporulación reciente y se llevó a la cámara húmeda.
- ✓ En el envés de las hojas de quinua infectadas se observó un moho grisáceo con esporangióforos y esporangios. Se realizaron observaciones bajo el microscopio y se prepararon muestras microscópicas.
- ✓ Se cortó la parte de la hoja y se observó directamente en el microscopio.

Para la observación microscópica de oosporas en semillas de quinua, se utilizó el método de Risco (2014):

El método consistió en pesar un gramo de quinua para remojarlos en agua destilada durante 60 minutos, cada 10 minutos se agitó por un periodo de tres minutos. Se tomó cinco mililitros de la suspensión y se centrifugó durante seis minutos a velocidad aprox. 2500 rpm en una centrifuga. El sobrenadante se eliminó y el sedimento fue resuspendido en seis gotas de agua destilada. Finalmente, dos gotas de la suspensión fueron examinadas con un microscopio a 100X de magnificación.

2.5.5 Detección molecular de oosporas en semillas de quinua

Para determinar la presencia o ausencia endógena mediante método molecular de oosporas en semillas de quinua se realizó la limpieza de las semillas con agua corriente, desinfección superficial con hipoclorito de sodio (0.1 %) y lavando con agua destilada y

se dejó remojar por 24 horas. Luego fueron machacadas las semillas de las accesiones Roja Pasankalla y Blanca Junín (procedentes de banco de germoplasma de quinua en el Laboratorio de Genética y Biotecnología vegetal) utilizando perlitas de acero. La extracción de ADN se realizó de acuerdo al protocolo de Moller, así mismo, se realizó PrePCR y PCR de acuerdo a la metodología mencionada en el ítem 2.3.

Danielsen y Ames (2014) indican que las semillas son la fuente de inóculo principal de oosporas. Así mismo, diversos autores señalan que las semillas, en su mayoría, están infectadas por este patógeno, lo que sugiere realizar investigación con el fin de detectar de manera temprana la presencia de oosporas dentro de las semillas.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Identificación morfológica del agente causal de mildiú veloso

3.1.1 Esporangióforos

Los esporangióforos (n=60) midieron entre 239.5 y 659.01 μm de longitud y 7.22 y 11.9 μm de diámetro, con forma arborescente, los esporangios se ramificaron dicotómicamente que terminan en 2 - 3 extremos flexuosos dispuestos en ángulo recto o agudo, en los que se insertan los esporangios. Las ramillas terminales se curvan y se estrechan en la punta.

Tabla 3.1

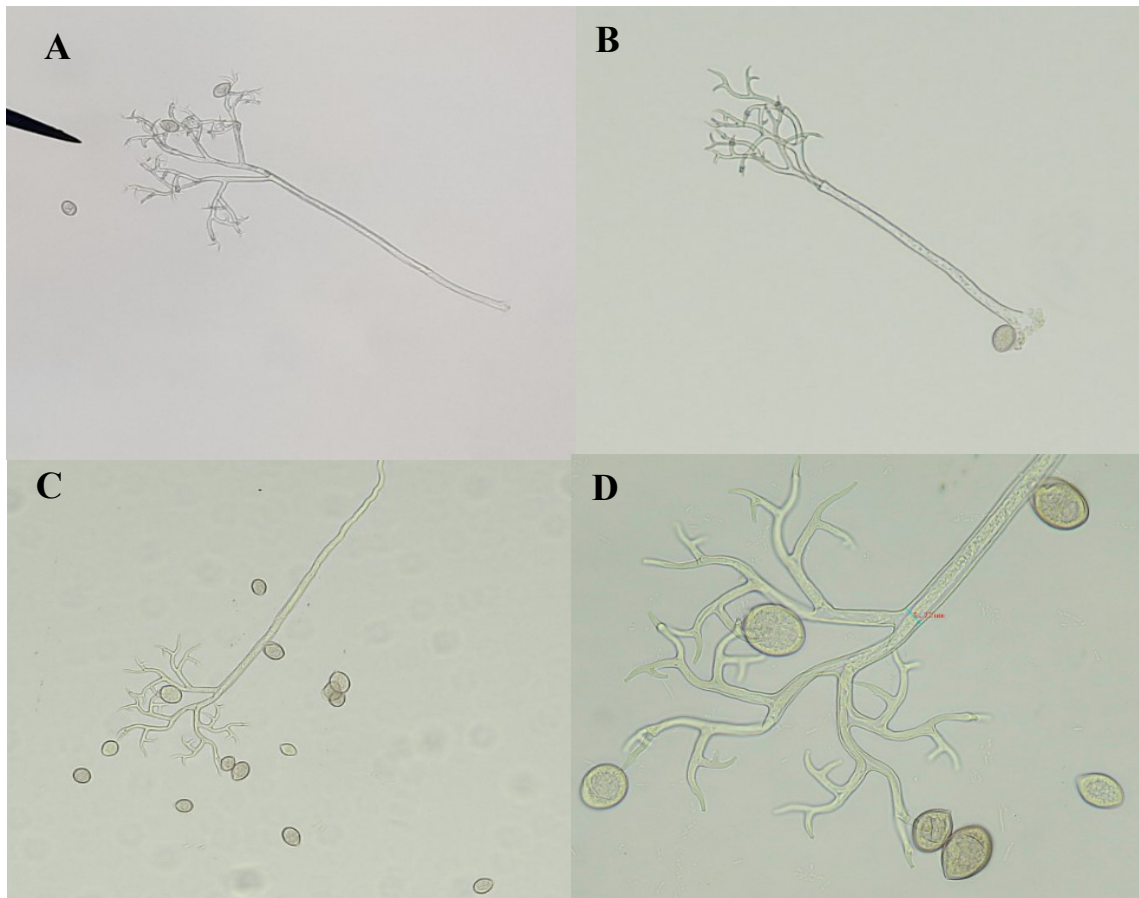
Micrometría de esporangióforo de Peronospora sp. en Chenopodium quinoa Willd.

Nº	Largo	Diámetro	Nº	Largo	Diámetro	Nº	Largo	Diámetro
	μm	μm		μm	μm		μm	μm
1	260.73	9.89	21	454.26	11.10	41	454.06	8.27
2	319.78	8.20	22	384.57	8.32	42	354.81	7.88
3	444.48	8.02	23	247.18	10.38	43	379.67	7.70
4	347.36	8.22	24	256.47	8.41	44	302.31	8.32
5	659.01	11.73	25	286.25	9.71	45	400.28	8.87
6	375.67	8.15	26	628.04	10.05	46	270	8.1
7	332.24	10.23	27	647.16	10.95	47	270	8.19
8	324.65	8.66	28	651.55	10.71	48	367.4	8.1
9	267.30	7.22	29	361.64	9.53	49	239.5	8.14
10	386.90	9.60	30	400.24	8.60	50	336.8	10.8
11	350.36	9.31	31	387.25	10.82	51	275.4	8.1
12	487.30	11.12	32	324.53	8.95	52	256.5	8.13
13	367.60	7.39	33	431.33	11.35	53	483.5	8.1
14	333.23	7.25	34	523.43	10.46	54	278.1	10.2
15	428.85	9.87	35	539.01	11.90	55	310.5	10.8
16	414.65	11.17	36	391.48	9.96	56	297	10.8
17	392.28	10.21	37	257.02	8.90	57	294.3	9.45
18	393.34	9.01	38	386.05	9.70	58	243	9.18
19	373.45	10.06	39	316.25	8.58	59	270	8.12
20	440.44	10.77	40	438.05	9.23	60	370.3	9.4

Nota (*). Datos de largo de esporangióforo: Promedio=374.4, máximo=659.01, mínimo=239.5, desviación estándar=+/-102.87; Datos de ancho de esporangióforo: Promedio=9.34, máximo=11.9, mínimo=7.22, desviación estándar=+/-1.23.

Figura 3.1

Esporangióforo del Peronospora sp. en Chenopodium quinoa Willd.



Notas. (*) En la figura A, B y C: se observan la forma arborescente de los esporangióforos a una escala de 7.278 μm , D: se observan las ramificaciones y extremos terminales del esporangióforo a un aumento de 10X.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se encuentran dentro del rango mencionado por Choi et al. (2010) que nos indican que los esporangióforos emergen de los estomas, son incoloros, rectos a levemente curvados, 320–630 μm de largo ($n = 89$); extremo recto a ligeramente curvado, extremo basal no diferenciado, raramente bulboso, 8–14 μm de ancho debajo la primera rama, a menudo ligeramente ahusada hacia arriba, raras veces presenta tapones callosos; ramas subdicotómica o monopodialmente ramificadas en 5–7 órdenes, ligeramente curvadas, elaboradas, pared a menudo engrosada; ramillas finales mayormente en pares, con diferentes longitudes. Por otro lado, Choi et al. (2008) señala que los esporangióforos tuvieron una medida de 240 a 580 μm de largo, delgados; tronco subrecto a ligeramente curvado, raramente bulboso, de hasta 15 μm de ancho, 8–10 μm de ancho debajo de la primera rama; ramas ramificadas subdicotómicamente en 5–6(–7) órdenes ligeramente curvadas a sigmoideas; ramitas últimas en pares o individuales, flexuosas a curvadas, ápice obtuso.

Kara et al. (2020) en su trabajo de investigación realizado en Turquía, menciona que los esporangióforos ($n = 50$) emergiendo a través de estomas, fueron incoloros, rectos a ligeramente curvados de 230.0 a 550.0 μm de largo; tronco sub-recto a ligeramente curvado, de 110.0 a 370.0 μm de largo, extremo basal no diferenciado, raramente bulboso, hasta 15.0 μm de ancho, de 11.0 a 15.0 μm de ancho en la base, de 7.5 a 10.0 μm de ancho debajo de la primera rama, ramillas finales en pares o individuales. Estos datos se asemejan a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, indicando que el agente causal de mildiú vellosa en quinua es *Peronospora variabilis* Gaum.

Así mismo, Baiswar et al. (2010), en su trabajo de investigación realizado en India, señala que los esporangióforos eran rectos o curvos y medían de 390 a 810 μm . La ramificación fue monopodial, las ramillas finales estaban en pares, curvadas, midiendo de 6.5 a 16 μm y anchos en la base de 2 a 4 mm.

Danielsen y Ames (2014) señalan que el patógeno ataca principalmente a la hoja, produciendo esporangióforos en el envés que miden entre 11,0 y 14,8 μm de diámetro y entre 167 y 227 μm de longitud. Los esporangióforos arborescentes terminan en 2 o 3 puntas sinuosas dispuestas en ángulos rectos o agudos, donde se fijan los esporangios. Se ramifican dicotómicamente de cuatro a cinco veces en ángulos agudos.

Aguilar et al. (2020) indica que los esporangióforos midieron entre 156 y 231 μm de longitud y 8,0 y 12,3 μm de diámetro, presenta una forma arborescente, ramificados dicotómicamente que terminan en 2 - 3 extremos flexuosos dispuestos en ángulo recto o agudo.

Danielsen y Ames (2014) y Aguilar et al. (2020) lograron resultados diferentes al trabajo de investigación, esto se debe a las distintas condiciones edafoclimáticas y genéticas.

3.1.2 Esporangios

Los esporangios ($n=60$) son deciduos (a la madurez se desprenden del esporangióforo), ovales, con una papila apical translúcida, son de color, miden entre 25.02 a 34.2 μm de largo y 18.72 y 26.89 de diámetro, los esporangios presentaron pedicelo.

Tabla 3.2

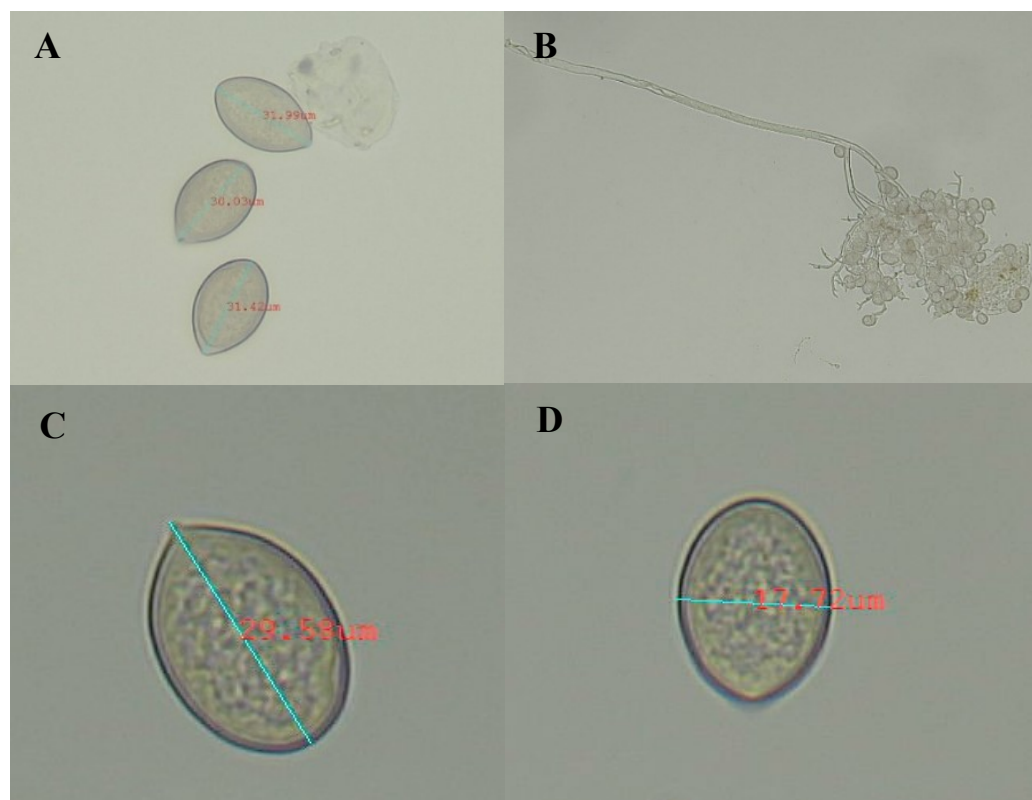
Micrometría de esporangios de Peronospora sp. en Chenopodium quinoa Willd.

Nº	Largo	Ancho	Nº	Largo	Ancho	Nº	Largo	Ancho
	µm	µm		µm	µm		µm	µm
1	33.33	23.54	21	27.01	19.89	41	31.60	23.36
2	28.42	20.11	22	31.67	21.86	42	29.56	22.71
3	29.68	20.26	23	31.79	22.63	43	31.40	20.87
4	29.52	23.13	24	29.65	22.10	44	30.07	21.01
5	32.42	22.07	25	27.09	21.28	45	25.95	18.97
6	28.29	22.13	26	33.35	22.25	46	27.01	19.54
7	30.08	25.82	27	29.21	20.81	47	32.67	21.23
8	32.49	24.34	28	32.29	22.97	48	30.66	23.41
9	32.73	20.68	29	31.39	21.94	49	28.87	19.98
10	30.19	19.10	30	26.71	19.75	50	28.76	18.81
11	30.68	20.44	31	30.44	21.67	51	29.09	18.77
12	27.74	19.78	32	29.71	21.75	52	28.14	22.86
13	33.21	20.01	33	28.08	21.87	53	28.05	21.79
14	25.02	18.72	34	30.66	21.82	54	27.92	20.62
15	29.58	19.86	35	29.26	24.54	55	32.72	20.91
16	30.91	19.10	36	32.09	26.89	56	27.87	21.06
17	27.37	18.99	37	29.02	24.47	57	29.80	20.16
18	27.89	20.65	38	30.42	26.87	58	28.48	20.81
19	28.77	20.66	39	25.71	23.70	59	29.65	19.25
20	33.01	21.60	40	34.20	24.15	60	28.36	19.53

Nota (*). Datos de largo de esporangio: Promedio=29.8, máximo=34.2, mínimo=25.02, desviación estándar=+/-2.13; Datos de ancho de esporangio: Promedio=21.5, máximo=26.89, mínimo=18.72, desviación estándar=+/-1.95.

Figura 3.2

Esporangios del Peronospora sp. en Chenopodium quinoa Willd.



Notas. (*) A, C y D: medición de los esporangios a una escala de 18.24 µm; B: esporangios insertados en el esporangióforo a un aumento de 40X.

Los resultados coinciden con varios estudios realizados por distintos autores que se mencionan a continuación:

Choi et al. (2010) describe a los esporangios de color marrón pálido a oliváceo, de forma variada, en su mayoría ampliamente elipsoidales a elipsoidales, señala que a veces aparecen en forma obovoide debido a un pedicelo distintivo, subglobosas en los jóvenes, mediana o submediana de mayor ancho, 24.5 a 35.0 μm de largo, 20.5 a 27.3 μm de ancho, relación largo/ancho de 1.18 a 1.56 ($n = 96$), punta redondeada, base redondeada o gradualmente estrecha; pedicelo mayormente presente, cónico corto o cilíndrico.

Choi et al. (2008) señala que los esporangios son oliváceos con un tinte grisáceo, ampliamente elipsoidales a elipsoidales, a veces aparecen como obovoides o napiformes debido al pedicelo, el ancho máximo es mediano en la mayoría de los esporangios, rara vez supra o submediano, 24-35 μm de largo, 22-26 μm de ancho, relación $l/w = 1.2-1.5$, pedicelo presente y luego cónico corto, ligeramente posicionado excéntricamente en la base de los esporangios.

Kara et al. (2020), en su trabajo de investigación realizado en Turquía indica que los esporangios ($n = 50$) eran oliváceos con un tinte grisáceo, ampliamente elipsoidales a elipsoidales, a veces aparecían como obovoides o napiformes debido al pedicelo, ancho máximo mediano, 25.0–35.0 μm de largo, 22.5–27.5 μm de ancho, con una relación largo/ancho de 1.2–1.4.

Baiswar et al. (2010), en su trabajo de investigación realizado en India, señala que los esporangios eran de color marrón pálido, ampliamente elipsoidales a elipsoidales y medían 25.5–32.5 x 18–21 μm (relación longitud: anchura, 1,2: 1,7). El pedicelo también estaba presente en los esporangios. Las observaciones de microscopía electrónica de barrido revelaron puntas cónicas truncadas de las ramillas finales y ensanchamiento de los esporangióforos hacia las ramificaciones.

Danielsen y Ames (2014) muestra que los esporangios son ovalados, tienen una papila apical translúcida, son caducos (se desprenden del esporangióforo al madurar) y miden entre 25.7 y 31.9 μm de largo y entre 19.3 y 24.3 μm de ancho. Su protoplasma es

granular y su pared es bastante rugosa. También mencionan que son translúcidos, de color marrón claro y que germinan directamente mediante la formación de un tubo germinativo; a diferencia de otros oomicetos, no producen zoosporas. Debido a esta característica, se les conoce como esporangios, esporas o conidios cuando germinan.

Aguilar et al. (2020) indica que los esporangios tuvieron forma ovoide con doble pared presentando un tamaño de 25.2 y 30.6 μm de largo y 18.6 y 23.6 μm de diámetro y con pedicelo.

3.1.3 Oosporas

Así mismo, se observó las oosporas (n=60) de forma esférica, con doble pared, oscuras, ligeramente rugosa y ondulada en la parte externa, protoplasma granulado. El diámetro de las oosporas osciló entre 22.09 y 32.3 μm .

Tabla 3.3

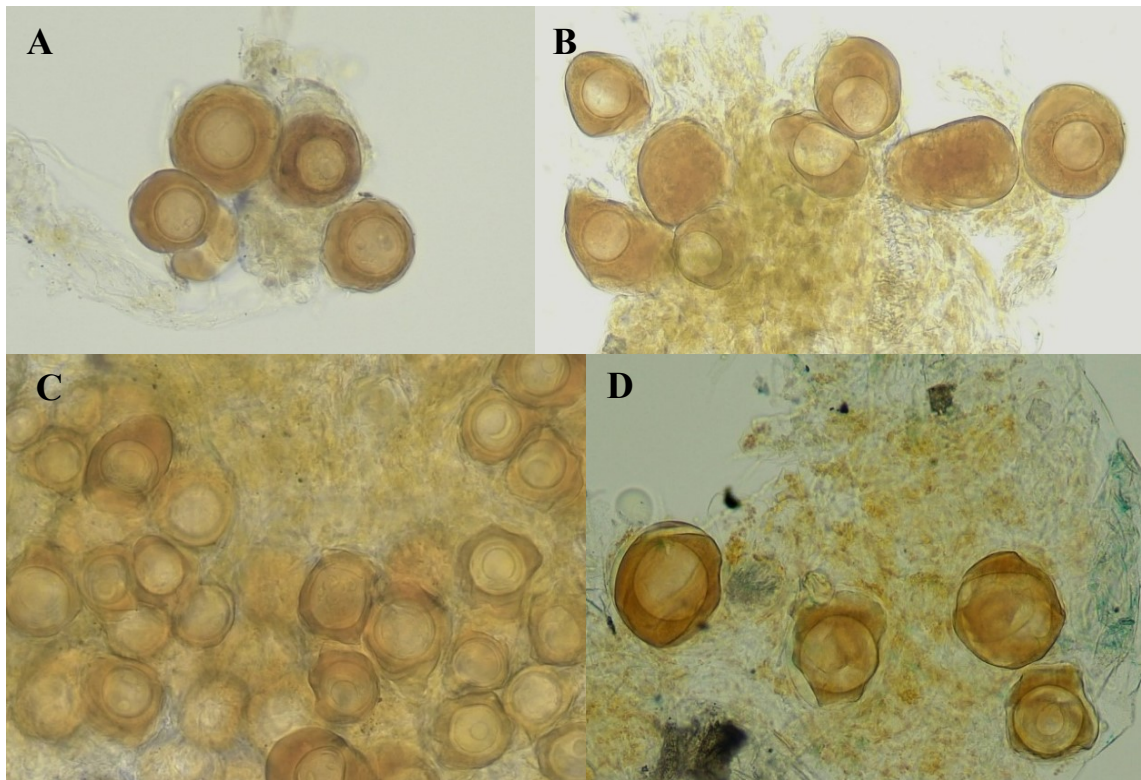
Micrometría de oosporas de Peronospora sp. en Chenopodium quinoa Willd.

Nº	Diámetro	Nº	Diámetro	Nº	Diámetro
	μm		μm		μm
1	24.49	21	23.63	41	25.36
2	23.91	22	24.84	42	28.52
3	24.49	23	32.30	43	28.73
4	22.66	24	23.03	44	26.22
5	24.02	25	22.39	45	27.25
6	24.22	26	22.15	46	25.98
7	23.21	27	23.72	47	23.74
8	23.64	28	22.94	48	25.51
9	23.74	29	23.74	49	29.85
10	23.26	30	23.16	50	26.26
11	25.02	31	22.71	51	23.87
12	23.11	32	22.55	52	23.36
13	22.43	33	24.24	53	31.25
14	23.15	34	27.74	54	24.77
15	22.09	35	24.86	55	25.02
16	22.45	36	28.23	56	26.11
17	23.25	37	25.83	57	25.37
18	22.50	38	27.02	58	28.29
19	22.66	39	26.47	59	23.94
20	22.72	40	25.76	60	25.47

Nota (*). Diámetro: Promedio=24.82, máximo=32.3 mínimo=22.09, desviación estándar=+/-2.27.

Figura 3.3

Oosporas del Peronospora sp. en Chenopodium quinoa Willd.



Notas. (*) En la figura se observan la morfología de oosporas a un aumento de 40X.

El presente estudio, se encuentra dentro del rango obtenido por Choi et al. (2008), quienes señalan que los órganos de reposo a menudo están presentes y son claramente visibles como puntos de color marrón oscuro a amarillentos en la superficie inferior de la hoja; oosporas globosas, 22,5–32,5 μm de diámetro, de color marrón dorado a marrón, pared de 1,5–3,5 μm de espesor. Así mismo, Kara et al. (2020) en su trabajo de investigación realizado en Turquía, señala que los órganos en reposo ($n = 50$) estaban frecuentemente presentes y eran claramente visibles como puntos de color marrón oscuro a amarillento en la superficie inferior de la hoja; oosporas globosas, de 20,0 a 30,0 μm de diámetro.

EI-Assiuty et al. (2019) indica que las oosporas tienen forma esférica, con doble pared, oscuras, ligeramente rugosa y ondulada en la parte externa, protoplasma granulado, cuyo tamaño fue de 35 a 50 μm de diámetro. El diámetro de las oosporas globosas osciló entre 14 y 22 μm , mientras que las ovoides tenían un tamaño de 14,2 a 19,2 μm de ancho y 16,6 a 22,2 μm de largo. Coincidiendo con Danielsen y Ames (2014), quienes señalan que La pared externa de la oospora, o episporio, es gruesa, ondulada e hialina cuando se

forma inicialmente, pero también se oscurece a medida que la oospora envejece y adquiere un color marrón dorado. El diámetro de la oospora varía entre 39 y 50 μm .

Khalifa y Thabet (2018), realizaron la evaluación de las variedades “CICA” y “Real”, y tuvieron como resultado que las oosporas presentan un color marrón oscuro con pared gruesa, midiendo entre 30 y 55 μm de diámetro. Así mismo, indican que mediante el método de lavado de semillas se logró observar oosporas relativamente transparentes en la variedad “Real”. Estos resultados coinciden con Baiswar et al. (2010), quienes señalan que las oosporas eran de color marrón oscuro con paredes gruesas, con un promedio de 30 a 55 μm de diámetro. Además, se encontraron algunas oosporas relativamente transparentes en el lavado de semillas.

3.1.4 Descripción morfológica de mildiú vellosa en el cultivo de quinua

Tabla 3.4

Descripción morfológica de Peronospora variabilis en Chenopodium quinoa Willd.

Morfología	<i>Peronospora variabilis</i>
Esporangióforos (n=60)	
Longitud	239.5 - 659.01 μm
Ancho del tronco (por debajo de la primera rama)	7.22 - 11.9 μm
Tipo de ramificación	Dicotómica
Forma	Arborescente, dicotómicamente ramificado
Número de ramificaciones	4 a 5 veces
Esporangios (n=60)	
Longitud	25.02 - 34.2 μm
Ancho	18.72 - 26.89 μm
Forma	Ovoide
Color	Color castaño claro translúcido
Pedicelo	Presente y de forma cónica
Oosporas (n=60)	
Diámetro	22.09 - 32.3 μm
Forma	Esférica, la pared externa o episporio es gruesa y ondulada.
Color	Recién formada: Pared externa hialina. Madura: Marrón dorado, la pared se oscurece.

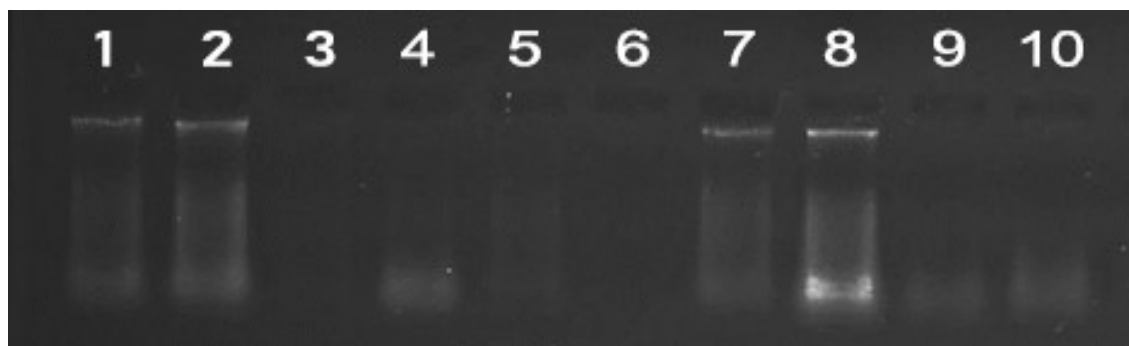
3.2 Resultados de la caracterización molecular del agente causal de mildiú veloso

En las figuras 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8 se muestran pruebas fotográficas del ADN extraído del mildiú veloso de la quinua utilizando los métodos de Moller, Taylor, Ristaino y Huanca-Mamani, respectivamente. La mayor calidad y la mayor cantidad de ADN obtenido hicieron que las técnicas de Moller y Huanca-Mamani tuvieran más éxito.

3.2.1 Protocolo Moller-Bahnweg et al. (1992)

Figura 3.4

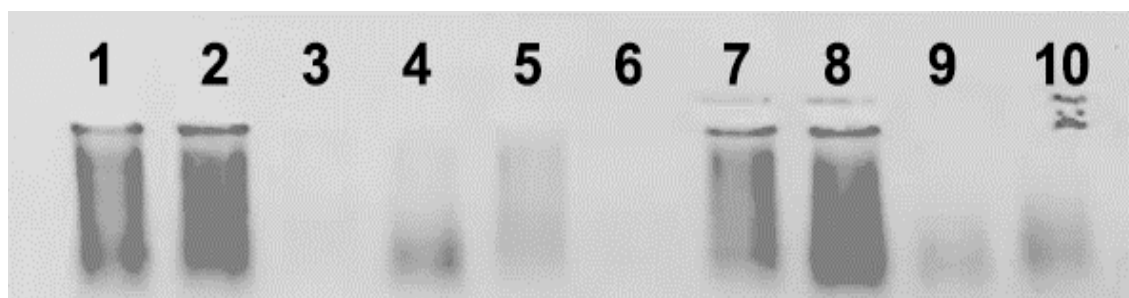
Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Möller al 1% de agarosa



Nota. (*) Muestras de ADN extraído de hongos que causan el mildiú veloso en quinua en gel de agarosa al 1%, corrida de gel 90 voltios durante 40 minutos. Se agregó 5 µl de proteinasa K a las muestras 1, 3, 5, 7 y 9. 1 y 2: muestras de semilla remojada por 4 días; 3, 4, 9 y 10: muestras de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Blanca Junín; 5 y 6: muestras de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Roja Pasankalla; 7 y 8: muestras de semillas remojadas por 24 horas. Se utilizó perlita en todas las muestras.

Figura 3.5

Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Möller al 1.8% de agarosas



Nota. (*) Muestras de ADN extraído de hongos que causan el mildiú veloso en quinua en gel de agarosa al 1.8%, corrida de gel 90 voltios durante 40 minutos. Se agregó 5 µl de proteinasa K a las muestras 1, 3, 5, 7 y 9; 1 y 2: muestras de semilla remojada por 4 días; 3, 4, 9 y 10: muestras de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Blanca Junín; 5 y 6: muestras de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Roja Pasankalla; 7 y 8: muestras de semillas remojadas por 24 horas.

Resultados de la cuantificación de ADN mediante Espectrofotometría

Tabla 3.5

ADN extraído (diluido 10 µl ADN/10 µl NFW)

Código de muestra	ng/µl	A260/280
1	452.7	1.97
2	509.1	202.2
3	28.6	1.02
4	184.5	1.93
5	257.4	1.68
6	3.3	1.52
7	182.9	2.04
8	299.3	2.06
9	150.3	1.83
10	127.3	2.06

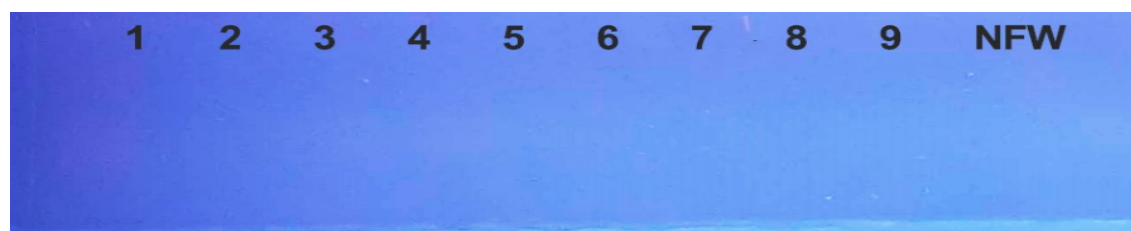
Datos. (*) Las muestras fueron diluidas en 200 ml de TE.

Möller et al. (1992) indica que este método es adecuado para el procesamiento simultáneo de numerosas muestras, ya que todos los pasos pueden realizarse en tubos Eppendorf. Realizó un tratamiento con metanol con 0,1 % de mercaptoetanol antes de la extracción de ADN cuando los basidiocarpos y los tejidos vegetales contenían grandes cantidades de compuestos reactivos (resinas, fenólicos) que interferían con la solubilización del ADN. Se observó que la extracción con metanol era superior. De esta manera, aislaron ADN de una amplia variedad de hongos, como *Fusarium*, *Pseudocercospora*, *Phytophthora*, *Setosphaeria*, *Armillaria*, *Heterobasidion*, *Boletus*, *Russula*, *Lactarius*, *Suillus*, *Cortinarius*, y de raíces y acículas de coníferas (*Picea abies*, *Pinus sylvestris*).

3.2.2 Protocolo Ristaino et al. (1998)

Figura 3.6

Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Ristaino



Nota. (*) Muestras de ADN extraído de hongos que causan el mildiú vellosa en quinua en gel de agarosa al 1.8% a 90 voltios por 50 minutos. 1 y 2: muestras de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Roja Pasankalla, 3 y 4: muestras de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Blanca Junín. 6, 7, 8 y 9: muestras de semillas Blanca Junín.

Resultados de la cuantificación de ADN mediante Espectrofotometría

Tabla 3.6

ADN extraído (diluido 10 ul ADN/10 ul NFW)

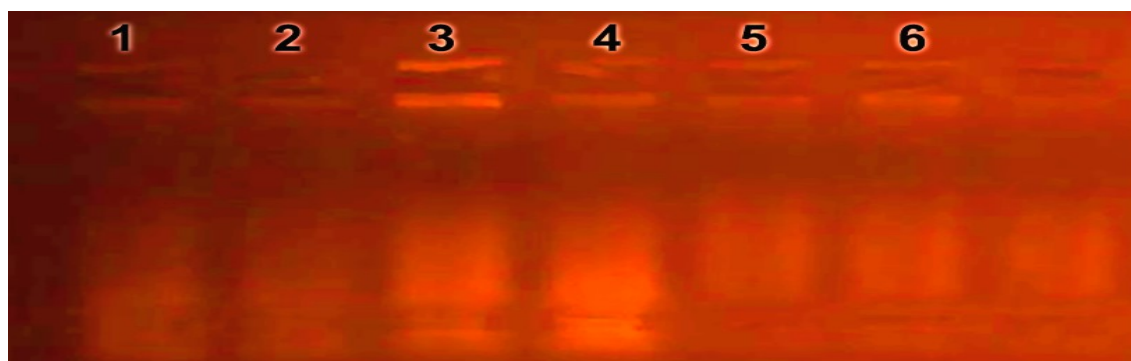
Código de muestra	ng/ul	A260/280
1	546.4	1.54
2	210.5	1.754
3	54.9	1.78
4	86	1.785
5	65.1	1.62
6	22.1	1.42
7	26	1.694
8	6.3	1.83
9	13.4	1.74
10	297.4	1.83

Ristaino et al. (1998) adoptaron un procedimiento rápido de extracción de ADN y una técnica de PCR fiable para la amplificación de ADN de especies de *Phytophthora*. Este método se basa en los procedimientos desarrollados por Lee y Taylor para especies de *Phytophthora* e implica la amplificación del gen ITS y del ADNr 5.8S. El ADN amplificado se cortó entonces con una serie de enzimas de restricción para desarrollar patrones de fragmentos de restricción específicos de cada especie para la rápida identificación de las importantes especies fitopatógenas de *Phytophthora* de todos los diferentes grupos taxonómicos del género que infectan a huéspedes de importancia económica.

3.2.3 Protocolo Lee y Taylor (2024)

Figura 3.7

Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Lee y Taylor.



Nota. (*) Muestras de ADN extraído de hongos que causan el mildiú vellosa en quinua en gel de agarosa al 1.8% a 90 voltios por 60 minutos. 1, 2, 3 y 4: muestras de semillas Blanca Junín; 5 y 6: muestra de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Blanca Junín.

Resultados de la cuantificación de ADN mediante Espectrofotometría

Tabla 3.7

ADN extraído (diluido 10 µl ADN/10 µl NFW)

Código de muestra	ng/µl	A260/280
1	324.5	2.37
2	337.3	2.18
3	799.1	2.09
4	748	2.36
5	214.1	2.27
6	269.6	2.27

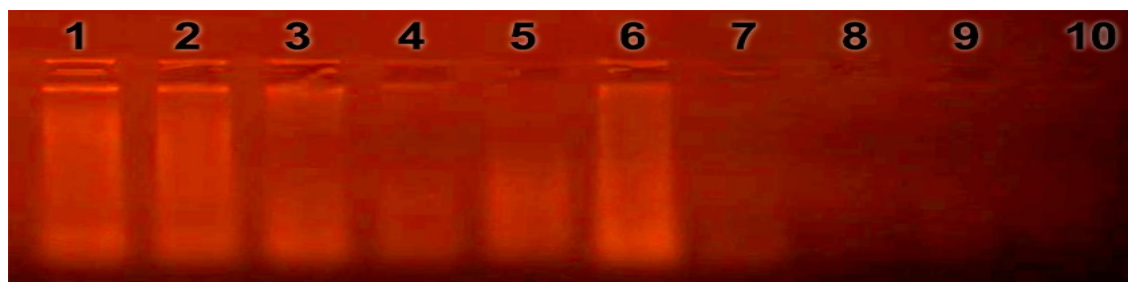
Lee & Taylor (1990) simplificaron el método de aislamiento de ADN total y lo utilizaron para amplificar genes multicopia a partir de pequeñas cantidades de micelio fresco y liofilizado. Se han utilizado con éxito diluciones de mil a diez mil veces de ADN total en minipreparaciones en reacciones de amplificación, obteniendo productos bicatenarios y monocatenarios. Este método ha funcionado con hongos de todos los grupos estudiados hasta la fecha, incluyendo los quidiomicetos, oomicetos, zigomicetos, deuteromicetos, ascomicetos y basidiomicetos.

3.2.4 Protocolo Huanca-Mamani et al. (2024)

Las muestras se sometieron a un procedimiento de extracción de ADN. Se utilizó electroforesis en gel de agarosa al 1,8 % para confirmar la eficacia del procedimiento. Esta técnica permitió extraer de manera eficaz ADN de alta calidad en cantidades adecuadas para cada aislado examinado, lo que demostró ser más útil y eficaz que otros métodos. Registro fotográfico del ADN aislado mediante el procedimiento de Huanca-Mamani (Figura 3.19).

Figura 3.8

Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Huanca Mamani.



Nota. (*) Muestras de ADN extraído de hongos que causan el mildiú veloso en quinua en gel de agarosa al 1.8% a 90 voltios por 60 minutos. 1 y 2: muestras de semillas Blanca Junín; 3 y 4: muestra de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Roja Pasankalla; 5 y 6: muestra de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Blanca Junín; 7, 8, 9 y 10: muestra de semilla Roja Pasankalla.

Resultados de la cuantificación de ADN mediante Espectrofotometría

Tabla 3.8

ADN extraído (diluido 10 µl ADN/10 µl NFW)

Código de muestra	ng/µl	A260/280
1	799.1	2.09
2	748	2.36
3	195.6	2.3
4	360	2.28
5	324.5	2.37
6	337.3	2.18
7	230.7	2.34
8	303.3	2.35
9	125.4	2.29
10	220.8	2.34

Huanca-Mamani et al. (2014), para aplicaciones como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), modificaron una técnica sencilla para extraer y purificar ADN de hongos filamentosos aislados del suelo. La metodología que se presenta es rápida y económica. Considerando, que la extracción de ADN de alta calidad de hongos puede ser afectada debido a la presencia de una pared celular compleja, alto contenido de polisacáridos o metabolitos secundarios.

3.2.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los resultados de la PCR obtenidos mediante la amplificación con los cebadores PV6 e ITS6/ITS4 se muestran en la Figura 3.9. Los resultados demuestran la amplificación de fragmentos de ADN de 278 pb procedentes del micelio fúngico presente en las muestras a una temperatura de hibridación de 63,3 °C.

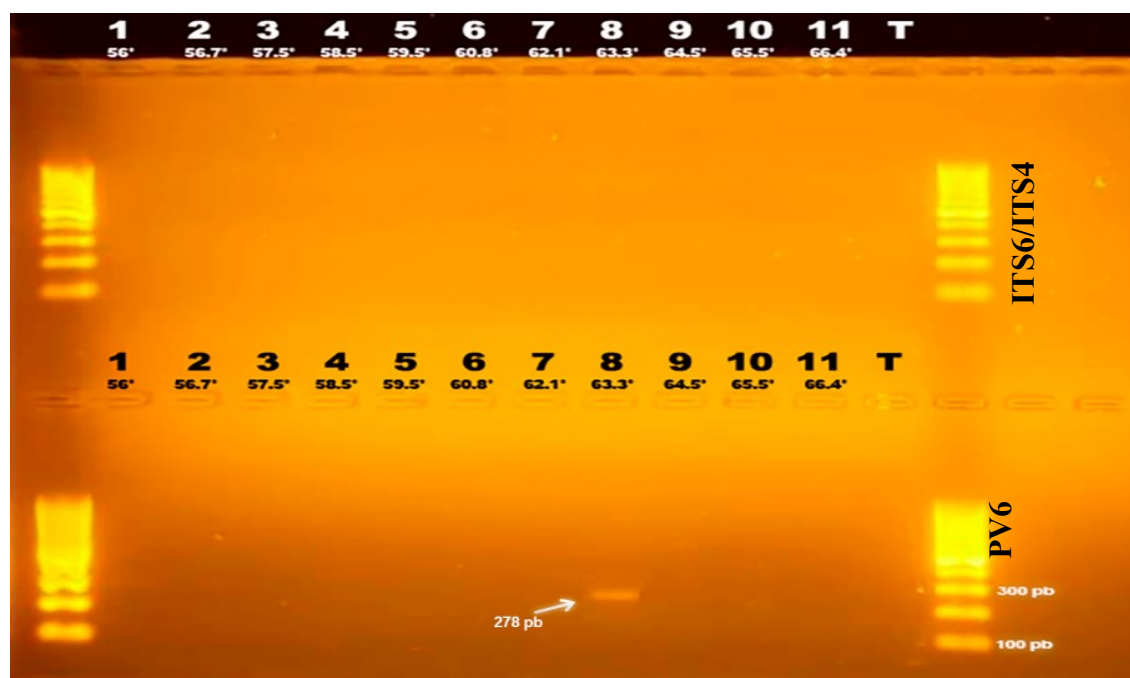
Tabla 3.9

Homogenización de la concentración de ADN

Nº	Concentración ADN inicial (ng/ul)	ADN muestra (ul)	NFW (ul)	VF (ul)	Concentración de trabajo para PCR (20 ng/ul)
1	214.1	46.7	453	500	
2	269.6	37.1	463		
3	195.6	51.1	449		
4	360.9	27.7	472		
5	799.1	12.5	487		
6	748	13.4	487		
7	324.5	30.8	469		
8	337.3	29.6	470		
9	940.4	10.6	489		
10	303.3	33.0	467		
11	220.8	45.3	455		

Figura 3.9

PCR de las muestras obtenidas en el protocolo Lee & Taylor, Huanca Mamani y Moller



Nota. (*) Muestras de ADN extraído de hongos que causan el mildiú vellosa en quinua en gel de agarosa al 1.8% a 100 voltios por 2 horas y 30 minutos. 1, 2, 8, 9 y 10: muestra de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Roja Pasankalla; 3 y 7: muestra de semillas de quinua Blanca Junín; 5 y 6: muestras de semilla Roja Pasankalla; 4, 8 y 11: muestra de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Blanca Junín.

La banda obtenida confirma la funcionalidad del protocolo de PCR y de extracción de ADN, confirmando que el agente causal de mildiú vellosa en quinua es *Peronospora variabilis* Gaum, ya que representa un amplicón generado con secuencias específicas para la especie.

Testen et al. (2014) diseñaron cebadores específicos para *P. variabilis* (PV6) con el fin de desarrollar un método rápido de detección de *P. variabilis* en semillas de quinua, incluyendo semillas importadas para consumo humano. Este método, basado en PCR, se centraron en la región ITS y complementaron con un método de secuenciación para la detección del patógeno del mildiú vellosa de la quinua en semillas. El conjunto de cebadores PV6 solo amplificó ADN de *P. variabilis* y produjo consistentemente un amplicón de 278 pb. La PCR de baja frecuencia (TPP) también permitió una alta sensibilidad del cebador, con un límite de detección para el ADN de *P. variabilis*. Esta sensibilidad del cebador se refiere al ADN puro de *P. variabilis* y puede verse reducida en presencia de otro ADN, como ADN vegetal o fúngico.

Por otro lado, EI-Assiuty et al. (2019) realizaron la PCR con PV6F y PV6R que dio productos de amplificación del tamaño esperado (278 pb) con ADN de todas las partes de la semilla (perianto, cubierta de la semilla y embrión).

Choi et al. (2008) extrajeron ADN genómico utilizando esporangióforos y esporangios formados en la superficie inferior o superior de las hojas infectadas o utilizando el tejido huésped infectado de especímenes de herbario. La extracción de ADN genómico se llevó a cabo según el método de Lee y Taylor. Se utilizaron cebadores DC6 y ITS4 para la amplificación selectiva de la región ITS completa del ADNr. Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% y se purificaron utilizando un kit de extracción en gel QIAquick.

3.3 Comprobación de la presencia o ausencia endógena de *Peronospora* en las semillas de quinua del germoplasma de Ayacucho

3.3.1 Prueba de germinación

Tabla 3.10

Prueba de germinación de 20 accesiones de quinua

Nº	Accesión	Prom	V	Nº	Accesión	Prom	V
1	BLANCA JUNIN 441	83.0	B	11	AMARILLA MARANGANI	93.0	B
2	T201	83.3	R+	12	T141	93.3	B
3	T139	84.7	B	13	INIA SALCEDO	93.7	R+
4	T163	85.0	B	14	BOLIVIANO	94.0	B
5	NARANJITA	88.0	B	15	SALXCOL 46 - C6	94.0	B
6	T170	88.3	R+	16	LTIPLANO	95.0	B
7	T143	88.5	B	17	SEÑOR DEL HUERTO	95.3	B
8	SALXPAN 165 C4	89.0	B	18	PASANKALLA	96.0	B
9	T144	92.0	B	19	NEGRA QOITO - T33	97.0	B
10	SALXPAN 171 C4	93.0	B	20	HUAXKCA 53 - C1	98.0	B

Nota. (*) Para fines del trabajo de investigación se utilizó accesiones con un porcentaje de germinación por encima del 80 % y de buen vigor. B: Buen Vigor, crecimiento y formación de primeras hojas, R+: De vigor regular con formación de las primeras hojas en la mayoría, R-: De vigor regular con formación de las primeras hojas en la minoría, M: vigor bajo con emisión solamente radicular.

3.3.2 Resultados de comprobación endógena del agente causal de mildiú vellosa

Tabla 3.11

Presencia de oosporas en quinua sembradas en condiciones de invernadero.

Nº	Accesión	Presencia de oosporas	Observación de la sintomatología
1	BLANCA JUNIN 441	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
2	T201	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
3	T139	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
4	T163	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
5	NARANJITA	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
6	T170	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
7	T143	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
8	SALXPAN 165 C4	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
9	T144	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
10	SALXPAN 171 C4	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
11	AMARILLA MARANGANI	No	No existe presencia de signos y síntomas de la enfermedad.
12	T141	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
13	INIA SALCEDO	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
14	BOLIVIANO	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
15	SALXCOL 46 - C6	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
16	ALTIPLANO	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
17	SEÑOR DEL HUERTO	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
18	PASANKALLA	No	No existe presencia de signos y síntomas de la enfermedad.
19	NEGRA QOITO - T33	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
20	HUAXKCA 53 - C1	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja

Treinta días después de la siembra, en condiciones de alta humedad, aparecieron pequeñas manchas amarillentas y esporas grisáceas en el envés de las hojas. Tres o cuatro días después, se formaron manchas cloróticas irregulares, rodeadas por las nervaduras principales y laterales de la hoja.

La tabla 3.9 muestra la infestación de oosporas en 18 de las 20 accesiones de quinua, fueron determinadas mediante observación microscópica. Así mismo, se observó presencia de plántulas con síntomas y signos causados por mildiú vellososo de quinua.

Danielsen y Ames (2014) señala que, cuando la humedad relativa era alta, se observó un moho de aspecto algodonoso y grisáceo, formado por esporangios y esporangióforos, en el envés de las hojas y dentro de las zonas cloróticas.

Saravia et al. (2014), Demuestran que la esporulación, que es abundante en las variedades susceptibles y escasa o inexistente en las resistentes, está relacionada con el grado de resistencia de las variedades. Además, demuestran que la variedad Salcedo del INIA se comportó como sensible en Piura y presentó una esporulación abundante.

Figura 3.10

Síntomas observados en las accesiones de quinua

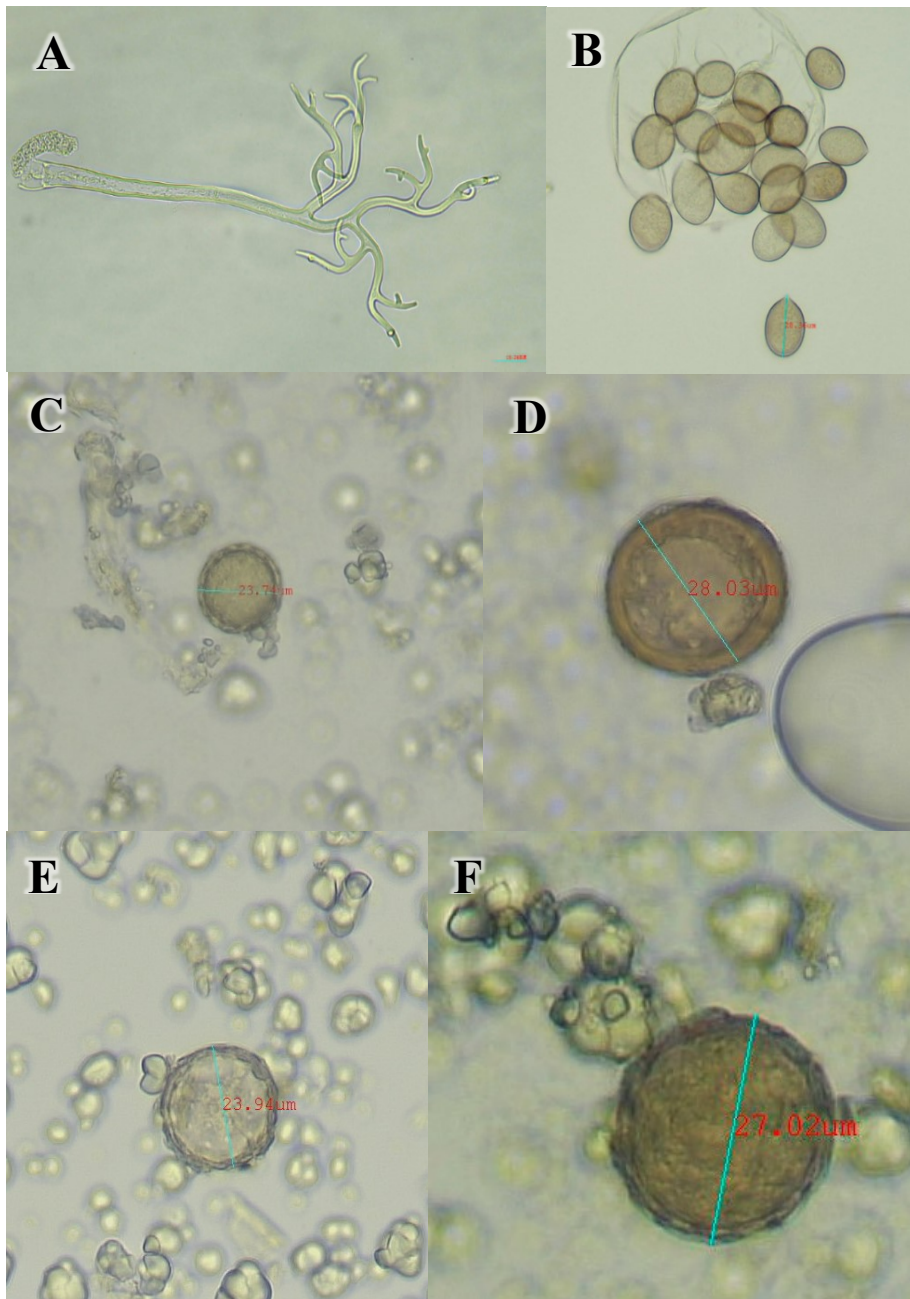


3.3.3 Observación microscópica

Además de los síntomas observados en el invernadero, las observaciones microscópicas mostradas en la figura 3.11 de las estructuras extraídas, indican que se trata del agente causal de mildiú vellos en quinua. Dando a entender que las semillas son portadoras de oosporas y fuente de inóculo.

Figura 3.11

Observación microscópica de las estructuras de Peronospora variabilis Gaum



Nota (*). A: esporangióforo (aumento 10X); B: esporangios; C, D, E Y F: Oosporas aisladas de acuerdo al protocolo Risco (2014) a un aumento de 40X.

Aguilar et al. (2020) Descubrieron que las oosporas de *P. variabilis* estaban presentes en el 100 % de las 15 muestras que examinaron. Salcedo INIA-ECOSAC y Pasankalla contenían la menor cantidad de oosporas (10 y 8 por cada 100 unidades de semilla), mientras que INIA-Altiplano, Salcedo INIA-Lambayeque y Kolicu tenían la mayor cantidad (96, 80 y 64, respectivamente).

Khalifa y Thabet (2018) observaron varias oosporas en los fragmentos de lavado de semillas en las variedades CICA y Real, lo que sugiere que las oosporas transmitidas por las semillas son probablemente la principal fuente de inóculo en Egipto.

El-Assiuty et al. (2019) En Egipto se ha informado que el 90 % de las oosporas se encuentran en el pericarpio, el 87 % en la cubierta de la semilla y el 3 % en el embrión. De manera similar, una investigación realizada por Testen et al. (2014) muestra que las semillas de quinua son una fuente de inóculo primario y una vía de propagación de las oosporas del mildiú vellosa.

Danielsen y Ames (2014) indican que las semillas de quinua actúan como la fuente inicial del patógeno que causa la enfermedad en una próxima temporada de cultivo, por lo que para garantizar que se comienza una investigación con material sin ningún tipo de infección, es fundamental examinar las semillas en busca de oosporas. Además, la identificación de oosporas en semillas es un componente clave en las investigaciones sobre el rol de estas estructuras en el comienzo y evolución de la enfermedad.

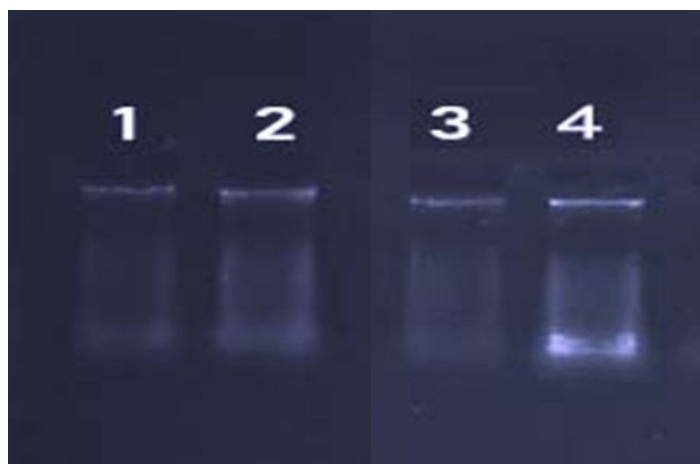
Chuchon (2023), realizaron un trabajo de investigación en la población del distrito de Los Morochucos, donde encontraron oosporas de *Peronospora variabilis* Gaum. directamente en las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd. (“quinua”). Esto indica que el 100 % de las muestras presentan oosporas en la superficie de la semilla (pericarpio), lo cual constituye una fuente de inóculo para la aparición del mildiú vellosa. De manera similar, al sembrar plántulas de quinua en suelo estéril, se detectaron indirectamente oosporas de *Peronospora variabilis* Gaum en la etapa de vivero. Se ha demostrado que las semillas de quinua contienen oosporas de *P. variabilis* Gaum, basándose en los síntomas y en la observación microscópica de los esporangióforos y los esporangios en el envés de las hojas.

Danielsen et al. (2004) analizaron ciento veintiocho muestras de semillas de quinua de diferentes provincias del Perú con el fin de detectar la presencia de oosporas. Se encontraron oosporas en 19 muestras de semillas y cortes ultramicrotómicos de semillas fijas mostraron que las oosporas se encuentran en el pericarpio. Las semillas de las muestras infectadas con oosporas se sembraron en el invernadero a dos niveles de humedad relativa. En la humedad más baja, se observó una fuerte esporulación en los cotiledones de 12 muestras. A mayor humedad, se encontró esporulación en cotiledones de 18 muestras. En Cajamarca, se encontró que el 50 % de las muestras eran infectadas por oosporas.

3.3.4 Electroforesis

Figura 3.12

Bandas de ADN de semillas de quinua obtenidas mediante el protocolo de Moller.



Nota. (*) Muestras de ADN extraído de hongos que causan el mildiú veloso en quinua en gel de agarosa al 1%, corrida de gel 90 voltios durante 40 minutos. Se agregó 5 µl de proteinasa K a las muestras 1 y 3; 1 y 2: muestras de semilla remojada por 4 días; 3 y 4: muestras de semillas remojadas por 24 horas. Se utilizó perlita en todas las muestras.

3.3.5 Resultados de la cuantificación de ADN de semillas de quinua mediante Espectrofotometría

Tabla 3.12

ADN extraído (diluido 10 µl ADN/10 µl NFW)

Código de muestra	ng/µl	A260/280
1	799.1	2.09
2	748	2.36
3	230.7	2.34
4	303.3	2.35

3.3.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En la figura 3.13 se muestra el resultado de PCR empleando los cebadores PV6 en la amplificación a partir de tejido (semilla con superficie desinfectada). No se observó bandas de ADN en ninguna de las 4 muestras de semillas de quinua.

Figura 3.13

PCR de las muestras de ADN de semillas de quinua obtenidas en el protocolo Moller



Nota. (*) Muestras de ADN extraídas de semillas desinfectadas (tejido endógeno) de quinua en gel de agarosa al 1.8% a 100 voltios por 2 horas y 30 minutos.

Testen et al. (2014) en su trabajo de investigación, desarrollaron un método de detección de oosporas transmitidas por semillas mediante el diseño de un cebador específico para detectar *P. variabilis* a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y para verificar el método basado en la PCR, utilizaron una técnica basada en la secuenciación. Se detectó *P. variabilis* en 32 de los 33 lotes de semillas de quinua mediante el método basado en la secuenciación y en 31 de los 33 lotes de semillas de quinua mediante el método basado en la PCR.

EI-Assiuty et al. (2019) realizaron detecciones histológicas de oosporas mediante PCR utilizando primers específicos PV6F y PV6R desarrollado por Testes et al. (2014), que dio productos de amplificación del tamaño esperado (278 pb) con ADN de todas las partes de la semilla (perianto, cubierta de la semilla y embrión).

Choi et al. (2010), evaluaron treinta y seis aislamientos de *Peronospora* de quinua con diferentes orígenes geográficos, incluidos Argentina, Bolivia, Dinamarca, Ecuador y

Perú, comparándolos molecularmente con especies de *Peronospora* de otras especies de *Chenopodium*. Sus estudios indican que el patógeno responsable del mildiú vellosa de la quinua es idéntico a *Peronospora variabilis* y que no debe agruparse con *P. farinosa* como se afirma anteriormente en la mayoría de los estudios.

CONCLUSIONES

- 1 Se identificó a través de las características morfológicas que el agente causal del mildiú veloso en quinua es *Peronospora variabilis* Gaum. en la región de Ayacucho, presentando esporangióforos entre 237.8 y 659.01 μm de longitud y 11.9 y 7.22 μm de diámetro. Los esporangios midieron entre 25.02 a 34.2 μm de largo y 18.46 y 26.93 de diámetro. Así mismo, el diámetro de las oosporas osciló entre 22.05 y 31.25 μm .
- 2 Se identificó y confirmó molecularmente que el agente causal de mildiú veloso en quinua es *Peronospora variabilis* Gaum., mediante PCR utilizando un cebador específico PV6, que mostró una banda de ADN de 278 pares de bases a una temperatura de 63.3 °C de Hibridación.
- 3 Se detectó de forma indirecta la presencia de oosporas de *Peronospora variabilis* Gaum. posiblemente en la superficie de la semilla de quinua, mediante el crecimiento de plántulas de *Chenopodium quinoa* Willd. en condiciones de invernadero.
- 4 Se comprobó la ausencia endógena de *Peronospora variabilis* dentro de las semillas de quinua, mediante procedimiento molecular de PCR.

RECOMENDACIONES

- 1 Ampliar el número de muestras incluyendo variedades nativas y mejoradas de quinua provenientes de diferentes zonas geográficas, con el fin de estudiar la diversidad genética de mildiú veloso en Quinoa.
- 2 Se sugiere realizar estudios de investigación que permita conocer el comportamiento de *Pernospora variabilis* Gaum y tomar medidas eficaces de prevención, manejo y control.
- 3 Implementar estudios sobre aislamiento in vitro de oosporas con el fin de manejar la enfermedad a través de un adecuado método de inoculación controlada y respuesta genética del hospedero mediante Transcriptómica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, R., More-Yarleque, M., Rafael-Rutte, R., & Maldonado, E. (2020). Inductores de defensa en el control del mildiu (*Peronospora variabilis* Gaum.) en el cultivo de quinua: Detección, epidemiología, síntomas, características y control. *Scientia Agropecuaria*, 11(4), 555–563. doi:10.17268/sci.agropecu.2020.04.11
- Aguín, O., Sabarís, M., Abelleira, A., Pintos, C., & Mansilla, J. (25-28 de Septiembre de 2001). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como técnica de diagnóstico en fitopatología foresta. <http://www.efadip.org/comun/publicaciones/posters/2001/2001%20Granada/Poster%20PCR%20HONGOS.pdf>
- Baiswar, P., Chandra, S., Kumar, R., & Ngachan, S. (2010). *Peronospora variabilis* on *Chenopodium murale* in India. India. <https://link.springer.com/article/10.1071/DN10017>
- Bazile, D., Bertero, D., Nieto, C., Salcedo, S., & Santivañez, T. (2014). *Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013*. Montpellier, Santiago de Chile, Chile.
- Bernardo Rojas, J. (2020). *Respuesta de una población M3 de quinua (Chenopodium quinoa Willd) var. Amarilla Marangani al mildiú (Peronospora variabilis) en la Molina* [Tesis de grado, Universidad Nacional Agraria La Molina]. Repositorio institucional, Lima, Perú.
- Calixtro Zárate, M. (2017). *Respuesta de 100 accesiones de quinua a la infección natural de mildiú (Peronospora variabilis Gäum) en el Valle del Mantaro*. Repositorio institucional, Lima, Perú.
- Centro Internacional de la Papa (CIP). (1998). Protocolos de Laboratorio de Biología. (M. Ghislain, Z. Dapeng, & M. Herrera, Edits.) *Departamento de Recursos Genéticos. Manual de Capacitación*.
- Choi, Y.-J., Danielsen, S., Lübeck, M., Hong, S.-B., Delhey, R., & Shin, H.-D. (2010). Morphological and molecular characterization of the causal agent of downy mildew on Quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Mycopathologia*, 169(5), 403–412. doi:<https://doi.org/10.1007/s11046-010-9272-y>
- Choi, Y.-J., Denchev, C., & Shin, H.-D. (2008). Morphological and Molecular Analyses Support the Existence of Host-specific *Peronospora* Species Infecting *Chenopodium*. *Mycopathologia*, 165(3), 155-164. doi:10.1007/s11046-007-9087-7

- Chuchon, S. (2023). *Oosporas de Peronospora variabilis Gaum. en semillas de Chenopodium quinoa Willd. "quinua", Ayacucho 2023* [Tesis de grado, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga]. Repositorio institucional, Ayacucho, Perú. <https://repositorio.unsch.edu.pe/items/cee9b3f4-b6a1-4fe6-80a1-1dd3aab0d94d>
- Danielsen, S., & Ames, T. (2014). El mildiú (*Peronospora farinosa*) de la quinua (*Chenopodium quinoa*) en la zona andina. Manual técnico para el estudio de la enfermedad y el patógeno. Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP) royal danish ministry of foreign affairs the royal veterinary and agricultural university.
- Danielsen, S., & Lübeck, M. (2010). Universally Primed-PCR indicates geographical variation of *Peronospora farinosa* ex. *Chenopodium quinoa*. *Journal of Basic Microbiology*, 50, 104–109. doi:<https://doi.org/10.1002/jobm.200900019>
- Danielsen, S., Jacobsen, S., Echegaray, J., & Ames, T. (1999). Impact of Downy Mildew on the Yield of Quinoa. *Scientist and farmer*, 397-401.
- Danielsen, S., Mercado, V., Ames, T., & Munk, L. (2004). Seed transmission of downy mildew (*Peronospora farinosa* f. sp. *Chenopodii*) in quinoa and effect of relative humidity on seedling infection. *Seed Science and Technology*, 32(1), 91-98. doi:10.15258/sst.2004.32.1.10
- De Necochea Campion, R., & Canul Tec, J. C. (2004). *Métodos fisicoquímicos en biotecnología: Secuenciación de ácidos nucleicos*. Instituto de biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11-15.
- EI-Assiuty, E., Fahmy, G., Taha, E., Fahmy, Z., Ismael, A., Abd-Elghany, W., & Kafsheer, D. (2019). Microscopic visualization of *Peronospora variabilis* Gäum., the cause of quinoa downy mildew in plant tissues at different stages of plant growth. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 10(9), 1022-1033.
- EI-Assiuty, E., Taha, E., Fahmy, Z., & Mohammad Fahmy, G. (2019). Histological and Molecular Detections of *Peronospora variabilis* Gäum Oospores in Seeds of Quinoa (*Chenopodium quinoa* L.). *The Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany)*, 15(2), 197-203. doi:10.5455/egyjeb.20190620115158
- Gómez Pando, L., & Aguilar Castellanos, E. (2016). *Guía de cultivo de la quinua*. Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina.

- Huanca-Mamani, W., Salvatierra, R., & Sepúlveda, G. (2014). A fast and efficient method for total DNA extraction from soil filamentous fungi. *IDESIA*, 32(2), 75-78. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292014000200010>
- Integrated Taxonomic Information System (ITIS)*. (2011). Amaranthaceae and Phytolaccaceae of North America: [//www.itis.gov/](http://www.itis.gov/)
- Kara, M., Soylu, E., Uysal, A., Kurt, Ş., Choi, Y.-J., & Soylu, S. (2020). Morphological and molecular characterization of downy mildew disease caused by *Peronospora variabilis* on *Chenopodium album* in Turkey. *Australasian Plant Disease Notes*, 15(10), 1-3. doi:<https://doi.org/10.1007/s13314-020-0381-2>
- Khalifa, W., & Thabet, M. (2018). Variation in downy mildew (*Peronospora variabilis* Gäm.) resistance of some quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) cultivars under Egyptian conditions. *Middle East Journal of Agriculture Research*, 7(2), 671-682.
- Kitz, L. (2008). Evaluation of Downy Mildew (*Peronospora farinosa* f.sp. *Chenopodii*) Resistance among Quinoa Genotypes and Investigation of *P. farinosa* Growth using Scanning Electron Microscopy. *Theses and Dissertations*. doi:<https://scholarsarchive.byu.edu/etd/1512>
- Koroch, A., Villani, T., Pyne, R., & Simon, J. (2013). Rapid staining method to detect and identify downy mildew (*Peronospora belbahrii*) in basil. *Applications in Plant Sciences*, 1(7). doi:<https://doi.org/10.3732/apps.1300032>
- Lee, S., & Taylor, J. (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia an single spores. *Academic Press*. doi:DOI: 10.1016/b978-0-12-372180-8.50038-x
- León Ttacca, B. (2016). *Biocontrol del mildiu (Peronospora variabilis Gäm.) de la quinua (Chenopodium quinoa Willd.) con cepas de Trichoderma sp. con capacidad endofítica [Tesis de doctorado, Universidad Nacional del Altiplano]*. Repositorio institucional, Puno, Perú.
- Möller, E., Bahnweg, G., Sanderman, H., & Geiger, H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res*, 20(22), 6115-6116. doi:10.1093/nar/20.22.6115
- Mujica, Á. (2015). *El origen de la quinua y la historia de su domesticación*. Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú.
- Mujica, Á., & Jacobsen, S. (2006). La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y sus parientes silvestres. 449-457.

- Ramírez Maguiña, H. (2020). *Severidad de Peronospora variabilis Gäum. en cinco variedades de Chenopodium quinoa Willd. en condiciones de la Molina* [Tesis de grado, Universidad Nacional Agraria La Molina]. Repositorio institucional, Lima, Perú.
- Risco Mendoza, A. (2014). *Severidad de Peronospora variabilis Gäum. en Chenopodium quinoa Willd. 'Pasankalla' como respuesta a aplicaciones de fungicidas sintéticos y bioestimulantes*. Repositorio institucional, Lima, Perú.
- Ristaino, J., Madritch, M., Trout, C., & Parra, G. (1998). PCR Amplification of Ribosomal DNA for Species Identification in the Plant Pathogen Genus Phytophthora. *Applied And Environmental Microbiology*, 64(3), 948–954. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/aem.64.3.948-954.1998>
- Rollano Perñaloza, O., Palma Encinas, V., Widell, S., Rasmusson, A., & Mollinedo, P. (3 de abril de 2019). The disease progression and molecular defense response in Chenopodium quinoa infected with *Peronospora variabilis*, the causal agent of quinoa downy mildew. *Biorxiv [the preprint server for biology]*, 1-28. doi:<https://doi.org/10.1101/607465>
- Saravia, R., Plata, G., & Gandarillas, A. (2014). Plagas y enfermedades del cultivo de quinua. https://www.proinpa.org/publico/libro_plagas_quinoa/files/res/downloads/download_0144.pdf
- Tamayo Contreras, H. (2010). *Caracterización molecular inter e intragenotípica de 16 accesiones de Chenopodium quinoa mediante la técnica de ISSR* [Tesis de grado, Universidad Nacional Agraria La Molina]. Repositorio institucional, Lima, Perú.
- Tapia, M., Gandarillas, H., Alandia, S., Cardozo, A., & Mujica, A. (1979). *Quinoa y la Kañiwa: cultivos andinos*. Bogotá, Colombia: IICA.
- Testen, A., Jiménez-Gasco, M., Ochoa, J., & Backman, P. (2014). Molecular Detection of *Peronospora variabilis* in Quinoa Seed and Phylogeny of the Quinoa Downy Mildew Pathogen in South America and the United States. *Phytopathology*, 104(4), 379-386.
- Thines, M., & Choi, Y.-J. (2016). Evolution, Diversity, and Taxonomy of the Peronosporaceae, with Focus on the Genus *Peronospora*. *Phytopathology*, 106, 6-18. doi:<https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-15-0127-RVW>

ANEXOS

Anexo 1. *Prueba de germinación de accesiones del banco de germoplasma del Laboratorio de Genética y Biotecnología vegetal.*



Nota (*). Para el presente trabajo de investigación se seleccionaron 20 accesiones con alto porcentaje de germinación.

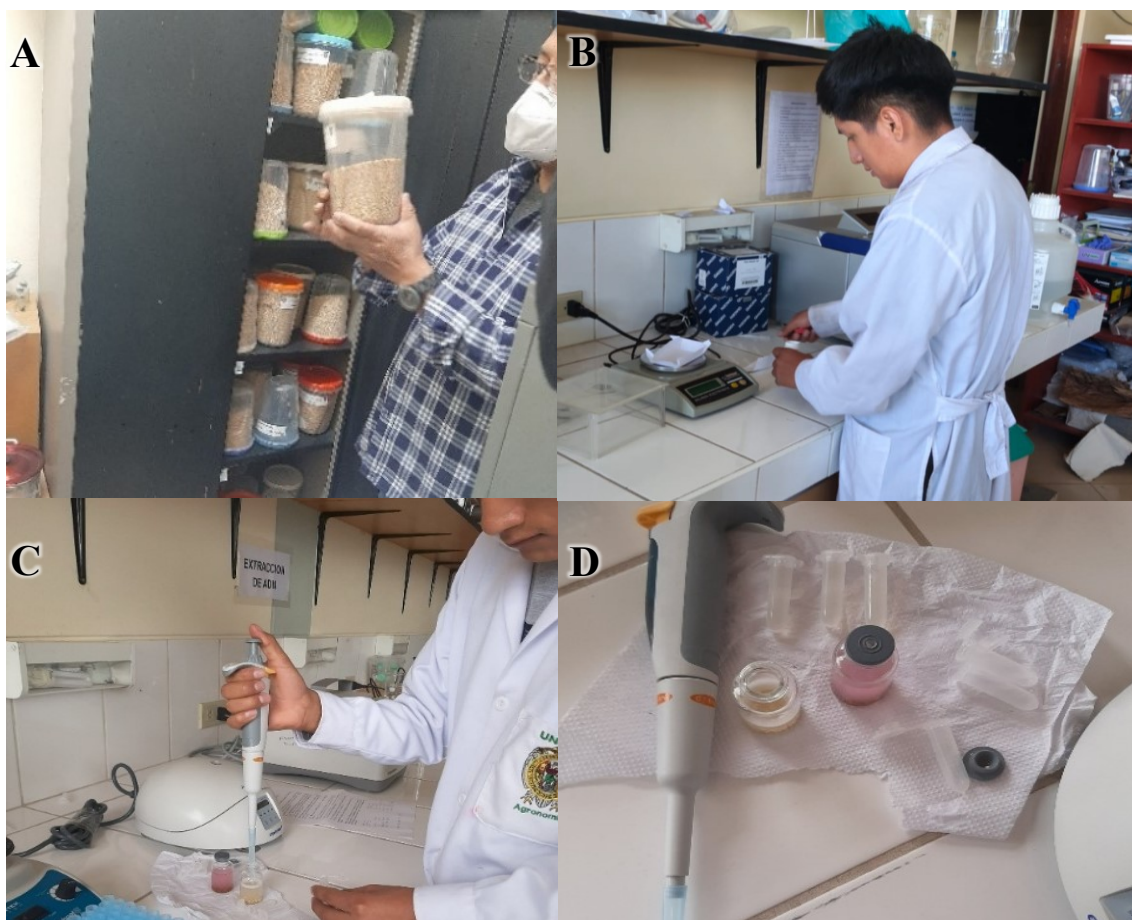
Anexo 2. *Esterilización del sustrato.*



Anexo 3. *Colección de muestras con síntomas característicos en campo y selección de muestras aptas en el laboratorio.*

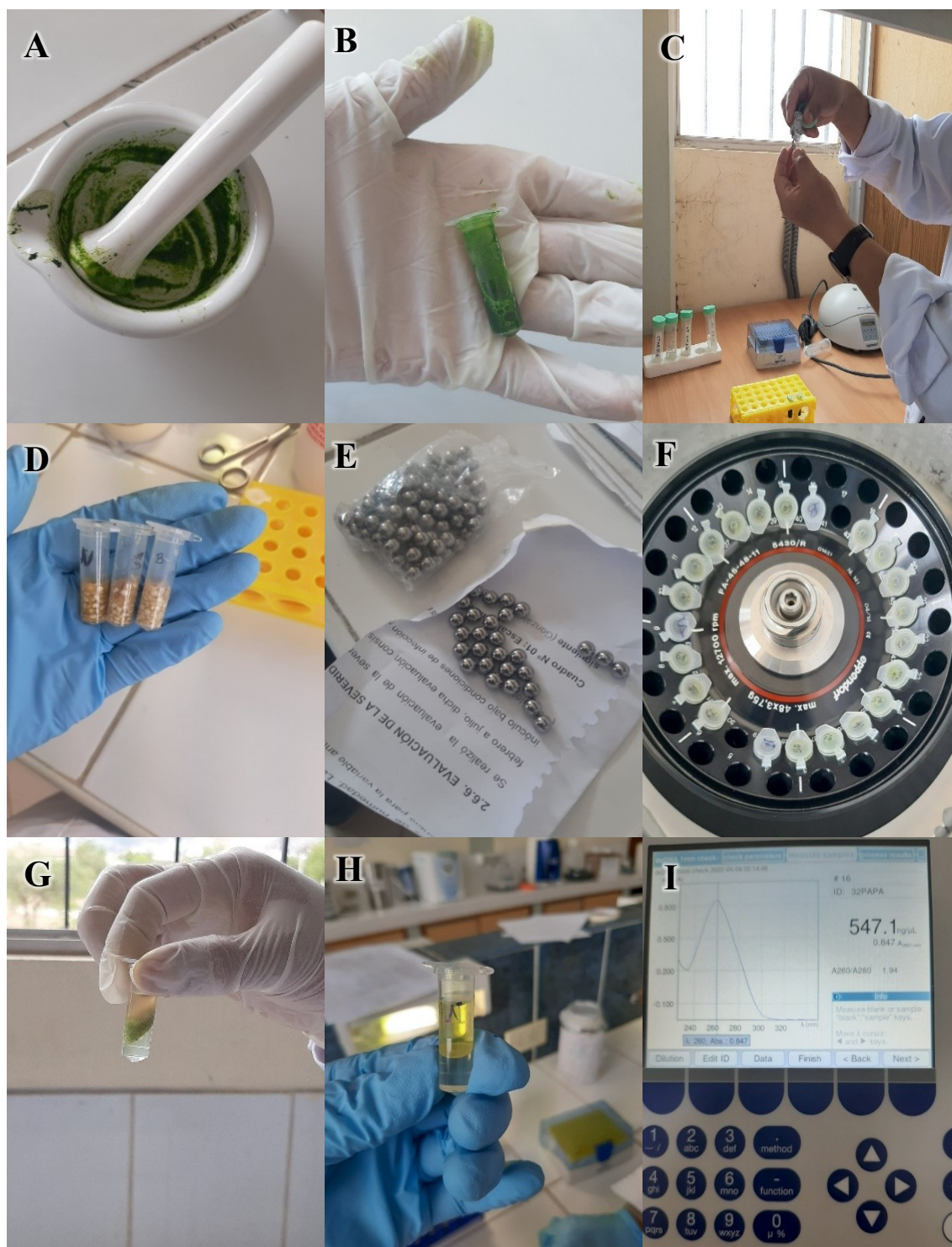


Anexo 4. *Protocolo de Risco (2014) para la observación microscópica de oosporas.*



Nota (*). A: Acciones de quinua en el banco de germoplasma del Laboratorio de Genética y Biotecnología vegetal. B-D: ejecución del protocolo de extracción de oosporas presentes en semillas de quinua.

Anexo 5. Procedimiento para realizar extracción de ADN.



Nota (*). A-D: Raspado de micelio y machacado de semillas de quinua. E: Perlitas utilizadas para machacar las semillas, F: Centrifuga del tejido machacado. G-H: Se extrajo el sobrenadante del ADN. I: Curva de cuantificación de ADN.

Anexo 6. Procedimiento para realizar PCR.



Nota (*). A: Colocación de muestras en el termociclador. B: Cuantificación de las muestras de ADN. C: Servido de mix de PCR. D: Observación de bandas de ADN con luz UV.

Anexo 7. *Porcentaje de germinación de accesiones de semillas de quinua del banco de germoplasma del Laboratorio de Genética y Biotecnología vegetal.*

N	Accesiones	R1	R2	R3	Promedio
1	T203	0	0	0	0.0
2	T196	0	0		0.0
3	T98	0	0	0	0.0
4	T200	2	0	0	0.7
5	T187	0	0	2	0.7
6	T172	2	0		1.0
7	T207	2	4	0	2.0
8	T194	3	3	6	4.0
9	T197	6	2	4	4.0
10	T177	5	0	11	5.3
11	T88	8			8.0
12	T173	32	0	0	10.7
13	T56	7	12	15	11.3
14	T127 -I	11	7	18	12.0
15	T08	21	9	10	13.3
16	T20	16	16	26	19.3
17	T118	17	19	33	23.0
18	T204	11	30	28	23.0
19	T198	8	25	38	23.7
20	T191	29	10	38	25.7
21	T178	30	36	31	32.3
22	T199	33	35	30	32.7
23	T202	3	6	89	32.7
24	T35	29	37	39	35.0
25	T83	27	44	34	35.0
26	T133	43	29	43	38.3
27	T61	27	50		38.5
28	T128	30	48	42	40.0
29	T130	37	37	47	40.3
30	T127	27	47	48	40.7
31	T158	50	57	17	41.3
32	T192	45	44	40	43.0
33	T60	50	37	45	44.0
34	T68	43	45	46	44.7
35	T117	41	55	44	46.7
36	T195	82	24	35	47.0
37	T190	43	48	51	47.3
38	T66	46	57		51.5
39	T205	71	45	43	53.0
40	T125	58	56	48	54.0
41	T137	54	58	50	54.0

42	T129	65	80	23	56.0
43	T13K	53	80	36	56.3
44	T122	57	56		56.5
45	T123	65	56	50	57.0
46	T127-III	67	55	49	57.0
47	T120	52	57	65	58.0
48	T158	50	58	66	58.0
49	T174	48	58	69	58.3
50	T159	54	61	61	58.7
51	T161	54	70	59	61.0
52	T138	67	63	53	61.0
53	T168	56	64	64	61.3
54	T126	59	64		61.5
55	T166	66	65	54	61.7
56	T189	57	60	69	62.0
57	T143	61	63		62.0
58	T160	66	57	69	64.0
59	T119	66	68	61	65.0
60	T87	60	72	64	65.3
61	T28	63	60	73	65.3
62	T149	63	68	68	66.3
63	T169	66	73	61	66.7
64	T155	53	75	74	67.3
65	NEGRA	54	68	82	68.0
66	T193	69	65	71	68.3
67	T152	65	72		68.5
68	T147	66	82	58	68.7
69	BLANCA ARETE	69	67	72	69.3
70	T67	63	77		70.0
71	T164	64	67	79	70.0
72	T151	66	68	79	71.0
73	T58	69	65	86	73.3
74	T167	65	82		73.5
75	T140	78	70	73	73.7
76	T145	80	61	85	75.3
77	T171	62	82	85	76.3
78	T96	70	79	80	76.3
79	T150	87	73	71	77.0
80	T165	60	92	80	77.3
81	T47	68	80	85	77.7
82	T157	77	83	75	78.3
83	T136	75	89	77	80.3
84	T162	69	93		81.0
85	T146	70	87	86	81.0
86	T153	86	86	72	81.3
87	T188	78	84	83	81.7

88	T154	72	89	86	82.3
89	BLANCA JUNIN 441	71	86	92	83.0
90	T201	84	83	83	83.3
91	T176	96	86	69	83.7
92	T148	82	87		84.5
93	T139	80	85	89	84.7
94	T163	93	90	72	85.0
95	NARANJITA	89	87		88.0
96	T170	93	89	83	88.3
97	T143	87	90		88.5
98	SALXPAN 165 C4	83	90	94	89.0
99	ROJA	85	87	97	89.7
100	T144	92			92.0
101	SALXPAN 171 C4	90	95	94	93.0
102	AMARILLA MARANGANI	95	94	90	93.0
103	T141	95	93	92	93.3
104	INIA SALCEDO	93	95	93	93.7
105	BOLIVIANO	93	95	94	94.0
106	SALXCOL 46 - C6	90	95	97	94.0
107	ALTIPLANO	91	97	97	95.0
108	T49 - Q	94	96		95.0
109	SEÑOR DEL HUERTO	94	95	97	95.3
110	PASANKALLA	95	98	95	96.0
111	NEGRA QOITO - T33	95	98	98	97.0
112	HUAXKCA 53 - C1	99	98	97	98.0

Nota (*). Se realizó 3 repeticiones para la prueba de germinación (R1, R2 y R3).

Anexo 8. *Mediciones del esporangióforo del agente causal de mildiú vellos.*

Nº	Largo	Diámetro	Color	Forma
	µm	µm		
1	260.73	9.89	Hialino	Arborescente
2	319.78	8.2	Hialino	Arborescente
3	444.48	8.02	Hialino	Arborescente
4	347.36	8.22	Hialino	Arborescente
5	659.01	11.73	Hialino	Arborescente
6	375.67	8.15	Hialino	Arborescente
7	332.24	10.23	Hialino	Arborescente
8	324.65	8.66	Hialino	Arborescente
9	267.3	7.22	Hialino	Arborescente
10	386.9	9.6	Hialino	Arborescente
11	350.36	9.31	Hialino	Arborescente
12	487.3	11.12	Hialino	Arborescente
13	367.6	7.39	Hialino	Arborescente
14	333.23	7.25	Hialino	Arborescente
15	428.85	9.87	Hialino	Arborescente
16	414.65	11.17	Hialino	Arborescente
17	392.28	10.21	Hialino	Arborescente
18	393.34	9.01	Hialino	Arborescente
19	373.45	10.06	Hialino	Arborescente
20	440.44	10.77	Hialino	Arborescente
21	454.26	11.1	Hialino	Arborescente
22	384.57	8.32	Hialino	Arborescente
23	247.18	10.38	Hialino	Arborescente
24	256.47	8.41	Hialino	Arborescente
25	286.25	9.71	Hialino	Arborescente
26	628.04	10.05	Hialino	Arborescente
27	647.16	10.95	Hialino	Arborescente
28	651.55	10.71	Hialino	Arborescente
29	361.64	9.53	Hialino	Arborescente
30	400.24	8.6	Hialino	Arborescente
31	387.25	10.82	Hialino	Arborescente
32	324.53	8.95	Hialino	Arborescente
33	431.33	11.35	Hialino	Arborescente
34	523.43	10.46	Hialino	Arborescente
35	539.01	11.9	Hialino	Arborescente
36	391.48	9.96	Hialino	Arborescente
37	257.02	8.9	Hialino	Arborescente
38	386.05	9.7	Hialino	Arborescente
39	316.25	8.58	Hialino	Arborescente
40	438.05	9.23	Hialino	Arborescente
41	454.06	8.27	Hialino	Arborescente

42	354.81	7.88	Hialino	Arborescente
43	379.67	7.7	Hialino	Arborescente
44	302.31	8.32	Hialino	Arborescente
45	400.28	8.87	Hialino	Arborescente
46	270	8.1	Hialino	Arborescente
47	270	8.19	Hialino	Arborescente
48	367.4	8.1	Hialino	Arborescente
49	239.5	8.14	Hialino	Arborescente
50	336.8	10.8	Hialino	Arborescente
51	275.4	8.1	Hialino	Arborescente
52	256.5	8.13	Hialino	Arborescente
53	483.5	8.1	Hialino	Arborescente
54	278.1	10.2	Hialino	Arborescente
55	310.5	10.8	Hialino	Arborescente
56	297	10.8	Hialino	Arborescente
57	294.3	9.45	Hialino	Arborescente
58	243	9.18	Hialino	Arborescente
59	270	8.12	Hialino	Arborescente
60	370.3	9.4	Hialino	Arborescente
PROMEDIO	374.4135	9.339		
MÁXIMO	659.01	11.9		
MÍNIMO	239.5	7.22		
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	102.86657	1.2314862		

Anexo 9. *Mediciones del esporangio del agente causal de mildiú vellos.*

Nº	Largo	Ancho	Color	Forma	Presencia de pedicelo
	µm	µm			
1	33.33	23.54	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
2	28.42	20.11	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
3	29.68	20.26	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
4	29.52	23.13	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
5	32.42	22.07	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
6	28.29	22.13	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
7	30.08	25.82	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
8	32.49	24.34	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
9	32.73	20.68	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
10	30.19	19.1	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
11	30.68	20.44	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
12	27.74	19.78	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
13	33.21	20.01	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
14	25.02	18.72	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
15	29.58	19.86	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
16	30.91	19.1	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
17	27.37	18.99	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
18	27.89	20.65	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
19	28.77	20.66	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
20	33.01	21.6	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
21	27.01	19.89	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
22	31.67	21.86	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
23	31.79	22.63	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
24	29.65	22.1	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
25	27.09	21.28	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
26	33.35	22.25	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
27	29.21	20.81	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
28	32.29	22.97	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
29	31.39	21.94	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
30	26.71	19.75	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
31	30.44	21.67	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
32	29.71	21.75	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
33	28.08	21.87	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
34	30.66	21.82	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
35	29.26	24.54	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
36	32.09	26.89	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
37	29.02	24.47	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
38	30.42	26.87	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
39	25.71	23.7	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
40	34.2	24.15	Castaño claro translúcido	Oval	Sí

41	31.6	23.36	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
42	29.56	22.71	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
43	31.4	20.87	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
44	30.07	21.01	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
45	25.95	18.97	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
46	27.01	19.54	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
47	32.67	21.23	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
48	30.66	23.41	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
49	28.87	19.98	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
50	28.76	18.81	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
51	29.09	18.77	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
52	28.14	22.86	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
53	28.05	21.79	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
54	27.92	20.62	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
55	32.72	20.91	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
56	27.87	21.06	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
57	29.8	20.16	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
58	28.48	20.81	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
59	29.65	19.25	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
60	28.36	19.53	Castaño claro translúcido	Oval	Sí
PROMEDIO	29.80	21.50			
MÁXIMO	34.2	26.89			
MÍNIMO	25.02	18.72			
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	2.13	1.95			

Anexo 10. *Mediciones de las oosporas del agente causal de mildiú vellosa.*

Nº	Largo	Ancho	Color	Forma
	µm	µm		
1	33.33	23.54	Marrón dorado	Esférica
2	28.42	20.11	Marrón dorado	Esférica
3	29.68	20.26	Marrón dorado	Esférica
4	29.52	23.13	Marrón dorado	Esférica
5	32.42	22.07	Marrón dorado	Esférica
6	28.29	22.13	Marrón dorado	Esférica
7	30.08	25.82	Marrón dorado	Esférica
8	32.49	24.34	Marrón dorado	Esférica
9	32.73	20.68	Marrón dorado	Esférica
10	30.19	19.1	Marrón dorado	Esférica
11	30.68	20.44	Marrón dorado	Esférica
12	27.74	19.78	Marrón dorado	Esférica
13	33.21	20.01	Marrón dorado	Esférica
14	25.02	18.72	Marrón dorado	Esférica
15	29.58	19.86	Marrón dorado	Esférica
16	30.91	19.1	Marrón dorado	Esférica
17	27.37	18.99	Marrón dorado	Esférica
18	27.89	20.65	Marrón dorado	Esférica
19	28.77	20.66	Marrón dorado	Esférica
20	33.01	21.6	Marrón dorado	Esférica
21	27.01	19.89	Marrón dorado	Esférica
22	31.67	21.86	Marrón dorado	Esférica
23	31.79	22.63	Marrón dorado	Esférica
24	29.65	22.1	Marrón dorado	Esférica
25	27.09	21.28	Marrón dorado	Esférica
26	33.35	22.25	Marrón dorado	Esférica
27	29.21	20.81	Marrón dorado	Esférica
28	32.29	22.97	Marrón dorado	Esférica
29	31.39	21.94	Marrón dorado	Esférica
30	26.71	19.75	Marrón dorado	Esférica
31	30.44	21.67	Marrón dorado	Esférica
32	29.71	21.75	Marrón dorado	Esférica
33	28.08	21.87	Marrón dorado	Esférica
34	30.66	21.82	Marrón dorado	Esférica
35	29.26	24.54	Marrón dorado	Esférica
36	32.09	26.89	Marrón dorado	Esférica
37	29.02	24.47	Marrón dorado	Esférica
38	30.42	26.87	Marrón dorado	Esférica
39	25.71	23.7	Marrón dorado	Esférica
40	34.2	24.15	Marrón dorado	Esférica
41	31.6	23.36	Marrón dorado	Esférica

42	29.56	22.71	Marrón dorado	Esférica
43	31.4	20.87	Marrón dorado	Esférica
44	30.07	21.01	Marrón dorado	Esférica
45	25.95	18.97	Marrón dorado	Esférica
46	27.01	19.54	Marrón dorado	Esférica
47	32.67	21.23	Marrón dorado	Esférica
48	30.66	23.41	Marrón dorado	Esférica
49	28.87	19.98	Marrón dorado	Esférica
50	28.76	18.81	Marrón dorado	Esférica
51	29.09	18.77	Marrón dorado	Esférica
52	28.14	22.86	Marrón dorado	Esférica
53	28.05	21.79	Marrón dorado	Esférica
54	27.92	20.62	Marrón dorado	Esférica
55	32.72	20.91	Marrón dorado	Esférica
56	27.87	21.06	Marrón dorado	Esférica
57	29.8	20.16	Marrón dorado	Esférica
58	28.48	20.81	Marrón dorado	Esférica
59	29.65	19.25	Marrón dorado	Esférica
60	28.36	19.53	Marrón dorado	Esférica
PROMEDIO	29.80	21.50		
MÁXIMO	34.2	26.89		
MÍNIMO	25.02	18.72		
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	2.13	1.95		

**UNSCH**FACULTAD DE CIENCIAS
AGRARIAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Bach. ROBERTO CARLOS MORALES GAMBOA
R.D. N° 298-2026-UNSCH-FCA-D

En la ciudad de Ayacucho, a los diez días del mes de agosto del año dos mil veintiséis, siendo las dieciséis horas, se reunieron en el auditorio de la Facultad de Ciencias Agrarias, bajo la presidencia del Dr. Felipe Escobar Ramírez Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias; los miembros del jurado conformado por el Ph.D. Nery Luz Santillana Villanueva, Ph.D. Germán Fernando De La Cruz Lapa como asesor, Dr. José Antonio Quispe Tenorio y el Ing. Guillermo Carrasco Aquino; actuando como secretario de actas el Mtro. Rodolfo Alca Mendoza, para recibir la sustentación de la Tesis titulado: **Identificación morfológica y molecular del agente causal del mildiú vellosa de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y comprobación de su presencia endógena dentro de las semillas de quinua, Ayacucho, 2761 msnm, 2022**, para obtener el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo, presentado por el Bachiller **ROBERTO CARLOS MORALES GAMBOA**.

El señor Decano previa verificación de los documentos exigidos solicitó se proceda con la sustentación y posterior defensa de la tesis en un periodo de cuarenta y cinco minutos de acuerdo al reglamento de grados y títulos vigente. Terminado la exposición, los miembros del Jurado, formularon sus preguntas, aclaraciones y/o observaciones correspondientes. Luego se invitó a los miembros del jurado pasar a otra aula para la deliberación y calificación del trabajo de tesis, teniendo el siguiente resultado:

Jurado evaluador	Exposición	Respuestas a las preguntas	Generación de conocimiento	Promedio
Ph.D. Nery Luz Santillana Villanueva	17	16	17	17
Ph.D. Germán Fernando De La Cruz Lapa	18	16	18	17
Dr. José Antonio Quispe Tenorio	16	16	16	16
Ing. Guillermo Carrasco Aquino	16	15	16	16
PROMEDIO GENERAL				17

OBSERVACIONES: Por acuerdo unánime de los miembros del jurado, el título del trabajo de investigación debe ser: **Identificación del agente causal del mildiú de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y evaluación endógena en las semillas, Ayacucho, 2761 msnm, 2022**

Acto seguido se invita a la sustentante y público en general para dar a conocer el resultado final. Firman el acta.


.....
Ph.D. Nery Luz Santillana Villanueva
Presidente


.....
Ph.D. Germán Fernando De La Cruz Lapa
Asesor


.....
Dr. José Antonio Quispe Tenorio
Jurado


.....
Ing. Guillermo Carrasco Aquino
Jurado


.....
Mtro. Rodolfo Alca Mendoza
Secretario Docente

CONSTANCIA DE CONTROL DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

El que suscribe, miembro de la comisión de docentes instructores responsables de operativizar, verificar, garantizar y controlar la originalidad de los trabajos de **TESIS** de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, autorizado por la R.D N° 213-2025-UNSCH-FCA-D; hace constar que el trabajo titulado:

Identificación del agente causal del mildiú de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y evaluación endógena en las semillas, Ayacucho, 2761 msnm, 2022

Autor : Roberto Carlos Morales Gamboa
Asesor : Germán Fernando De La Cruz Lapa

Ha sido sometido al control de originalidad mediante el software TURNITIN UNSCH, acorde al Reglamento de originalidad de trabajos de tesis, aprobando mediante de RCU 039-2021-UNSCH-CU, arrojando un resultado de diecisiete por ciento **(17%)** de índice de similitud, realizado con **depósito de trabajo estándar**.

En consecuencia, se otorga la presente Constancia de Originalidad para los fines pertinentes.

Nota: Se adjunta el resultado con identificador de la entrega: 3021518098

Ayacucho, 31 de agosto de 2026



.....
Angela J. Requis Quintanilla
M.Sc. en Fitopatología
E.P. Agronomía
Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga

Identificación del agente causal del mildiú de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y evaluación endógena en las semillas, Ayacucho, 2761 msnm, 2022

por Roberto Carlos Morales Gamboa

Fecha de entrega: 31-ago-2026 06:42p. m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 3021518098

Nombre del archivo: Borrador_de_tesis_-_Roberto_Carlos_Morales_Gamboa-2026.docx (21.27M)

Total de palabras: 19069

Total de caracteres: 96964

Identificación del agente causal del mildiú de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y evaluación endógena en las semillas, Ayacucho, 2761 msnm, 2022

INFORME DE ORIGINALIDAD

17%
INDICE DE SIMILITUD

17%
FUENTES DE INTERNET

3%
PUBLICACIONES

7%
TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	8%
2	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	3%
3	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	www.revistas.unitru.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	Submitted to Universidad Nacional de Tumbes Trabajo del estudiante	1%
6	enlinea2.unsch.edu.pe Fuente de Internet	<1%
7	repositorio.utc.edu.ec Fuente de Internet	<1%
8	doczz.es Fuente de Internet	<1%
9	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	<1%
10	repositorio.chapingo.edu.mx Fuente de Internet	<1%
11	www.repositorio.unadmexico.mx:8080 Fuente de Internet	<1%
12	repositorio.unp.edu.pe Fuente de Internet	<1%
13	www.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	<1%
14	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1%

15	patents.google.com	Fuente de Internet	<1 %
16	www.slideshare.net	Fuente de Internet	<1 %
17	faz.ujed.mx	Fuente de Internet	<1 %
18	repositorio.umsa.bo	Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas	Activo	Excluir coincidencias	< 30 words
Excluir bibliografía	Activo		

Identificación del agente causal del mildiú de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y evaluación endógena en las semillas, Ayacucho, 2761 msnm, 2022

Identification of the causal agent of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) mildew and assessment of seed-borne presence, Ayacucho, 2761 masl, 2022

Roberto Carlos Morales Gamboa¹
Germán Fernando De La Cruz Lapa¹

roberto.morales.01@unsch.edu.pe
german.delacruz@unsch.edu.pe

Área de investigación: Biotecnología
Línea de investigación: Mejoramiento genético agropecuario

RESUMEN

La quinua tiene un enorme potencial tanto en el mercado nacional como en el extranjero debido a que sus granos son una fuente de alta calidad de proteína. Es susceptible a enfermedades, entre las que destaca el mildiú velloso, que puede reducir significativamente la producción, a pesar de que es muy tolerante a condiciones desfavorables como la sequía, las heladas y los suelos salinos. El objetivo del presente trabajo de investigación fue: identificar la especie del agente causal del mildiú de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y evaluar su presencia endógena en las semillas de quinua, Ayacucho, 2761 msnm, 2022. La identificación morfológica se realizó mediante la descripción y medición de esporangióforos, esporangios y oosporas observados (n=60) a partir de los signos mostrados en campo. La identificación molecular se realizó mediante la extracción de ADN y prueba de PCR (primer PV6). Así mismo, la detección de oosporas se realizó mediante el método desarrollado por Risco (2014) y la siembra en bandeja de 20 accesiones de quinua. El tamaño obtenido de los esporangióforos fue entre 237.8 y 659.01 µm de longitud y 11.9 y 7.22 µm de diámetro, los esporangios midieron entre 25.02 a 34.2 µm de largo y 18.46 y 26.93 de diámetro, así mismo, el diámetro de las oosporas osciló entre 22.05 y 31.25 µm. La prueba de PCR muestra que el ADN extraído pertenece a la especie de *Peronospora variabilis* Gaum. Así mismo, el análisis de semilla en 18 de 20 accesiones de semillas de quinua, presentaron síntomas y signos de la enfermedad, confirma que las semillas de quinua son portadoras en forma superficial del inóculo de la enfermedad de mildiú velloso de quinua, en forma endógena molecularmente no se logró identificar.

Palabra clave: *Chenopodium quinoa*, *Peronospora variabilis*., marcadores moleculares y accesiones.

ABSTRACT

Quinoa holds enormous potential in both domestic and international markets, as its grains are a high-quality source of protein. Although the crop is highly tolerant of adverse conditions such as drought, frost, and saline soils, it is susceptible to diseases most notably downy mildew, which can significantly reduce yields. The objective of this research was to identify the causal agent of downy mildew in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and to evaluate its presence within the seeds, conducted in Ayacucho (2,761 meters above sea level) in 2022. Morphological identification was carried out by describing and measuring observed sporangiophores, sporangia, and oospores (n=60) based on signs observed in the field. Molecular identification was performed using DNA extraction and PCR analysis (primer PV6). Additionally, oospore detection was carried out using the method developed by Risco (2014) and by sowing 20 quinoa accessions in trays. The sporangiophores measured between 237.8 and 659.01 µm in length and 11.9 and 7.22 µm in diameter; sporangia measured between 25.02 and 34.2 µm in length and 18.46 and 26.93 µm in diameter; and oospore diameters ranged from 22.05 to 31.25 µm. PCR analysis showed that the extracted DNA belonged to the species *Peronospora variabilis* Gaum. Furthermore, seed analysis revealed symptoms and signs of the disease in 18 of the 20 quinoa accessions, confirming that quinoa seeds carry the downy mildew inoculum superficially; however, endogenous presence could not be identified at the molecular level.

Keywords: *Chenopodium quinoa*, *Peronospora variabilis*, molecular markers and accessions.

¹ Escuela Profesional de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga - Perú

I. INTRODUCCIÓN

En la región de Ayacucho, la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) es un cultivo importante con un valor comercial significativo. Se cultiva principalmente en diferentes partes de Perú, a través de la agricultura familiar (Mujica & Jacobsen, 2006).

La mayor limitación en la producción de quinua a nivel mundial es causada principalmente por el mildiú veloso causado por *Peronospora variabilis* Gäum (EI-Assiuty et al., 2019). Los daños más severos ocasionados por el patógeno se presentan bajo condiciones óptimas de temperatura y humedad relativa alta o saturada. Danielsen et al. (2004) señalan que la humedad influye significativamente en la aparición de la esporulación asexual en el mildiú veloso.

Se ha demostrado que las semillas, que son la principal fuente de infección, pueden propagar las oosporas de *P. variabilis* (Danielsen et al., 2004). De manera que, es necesario realizar una detección temprana y rápida de *P. variabilis*, lo que permitirá garantizar la sanidad de las semillas y una buena producción del cultivo de quinua (Testen et al., 2014).

Testen et al. (2014) llevaron a cabo un estudio con el fin de establecer un método de detección basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *P. variabilis* presente en las semillas. El método basado en la PCR se validó utilizando un método basado en la secuenciación. Se detectó *P. variabilis* en 32 de 33 lotes de semillas de quinua mediante el método basado en la secuenciación y en 31 de 33 lotes de semillas de quinua mediante el método basado en la PCR. Esto permitió confirmar la presencia de oosporas incrustadas en distintas estructuras de las semillas a través de PCR.

Corroborado por EI-Assiuty et al. (2019), quienes investigaron las oosporas de *Peronospora variabilis* Gäum, causante del mildiú veloso en la quinua (*Chenopodium quinoa* L.), con el fin de identificarlas histológicamente. Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para corroborar los hallazgos histológicos de las oosporas. Las comparaciones entre el perianto y los distintos

tejidos de la semilla en cuanto a la presencia de oosporas revelaron que el perianto presenta un alto porcentaje de oosporas (90 %), seguido del pericarpio (87 %), mientras que los porcentajes más bajos se observaron en el embrión (3 %) y el perispermo (2 %).

En la región de Ayacucho y su entorno, se carece de estudios que permitan confirmar el agente causal del mildiú veloso a nivel de especie. De tal manera que, se requieren trabajos científicos que ayuden en la identificación de este patógeno mediante técnicas actuales y modernas, como son los métodos moleculares haciendo uso de cebadores específicos.

La importancia de la aplicación de los métodos morfológicos y moleculares en la región de Ayacucho para la identificación a nivel de especie del agente causal del mildiú veloso de la quinua, permitirá obtener información científica que será la base conceptual para posteriores estudios. Además, es posible establecer métodos de detección temprana del agente causal del mildiú veloso en semillas.

Objetivo general

Identificar la especie del agente causal del mildiú de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y evaluar su presencia endógena en las semillas de quinua, Ayacucho, 2761 msnm, 2022.

Objetivos específicos

1. Identificar morfológicamente el agente causal del mildiú de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en la región de Ayacucho.
2. Identificar molecularmente a nivel de especie el agente causal del mildiú de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en la región de Ayacucho.
3. Comprobar la presencia o ausencia endógena de *Peronospora sp.* dentro de las semillas de quinua, mediante PCR.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal y procedencia de las muestras

La investigación se desarrolló con material vegetal de quinua procedente del banco de germoplasma del Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal de la Escuela Profesional

¹ Escuela Profesional de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga - Perú

de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH), y de campos de cultivo de la Estación Experimental Agraria Canaán del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Ayacucho. Se recolectaron hojas con signos y síntomas de mildiú veloso, así como estructuras del patógeno obtenidas de plantas cultivadas e inoculadas en condiciones de invernadero.

El estudio comprendió tres procedimientos principales: identificación morfológica del agente causal, caracterización molecular mediante extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y evaluación de la presencia de *Peronospora* spp. en semillas de quinua.

2.2. Identificación morfológica del agente causal

El aislamiento de *Peronospora* spp. se realizó siguiendo el procedimiento de Danielsen y Ames (2014). Las hojas con lesiones y esporulación reciente se colocaron en placas de Petri con papel de filtro húmedo. Las muestras con abundante esporulación se procesaron inmediatamente, mientras que aquellas con menor cantidad se mantuvieron en cámara húmeda durante un periodo de uno a siete días, según la respuesta observada.

Para la caracterización microscópica, se recolectaron esporangióforos y esporangios del envés de las hojas afectadas y se montaron en portaobjetos con lactofenol. Las estructuras se observaron con microscopio óptico para efectuar su descripción y medición.

La búsqueda de oosporas se realizó mediante el método de Risco (2014). Se pesó un gramo de semillas de quinua y se remojó en agua destilada durante 60 minutos, con agitación cada diez minutos durante tres minutos. Posteriormente, cinco mililitros de la suspensión se centrifugaron durante seis minutos a 2500 rpm. El sedimento se resuspendió en agua destilada y se examinaron dos gotas al microscopio con un aumento de 100×.

2.3. Extracción y evaluación del ADN

El ADN se obtuvo de estructuras del patógeno recolectadas de hojas de quinua con síntomas de

mildiú veloso y de material procedente de plantas inoculadas en invernadero. Se evaluaron cuatro protocolos modificados en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal de la UNSCH: Möller et al. (1992), Lee y Taylor (1990), Ristaino et al. (1998) y Huanca-Mamani et al. (2014).

Los procedimientos comprendieron la trituración del material biológico, la lisis celular, la separación de componentes mediante centrifugación, la recuperación de la fase acuosa y la precipitación del ADN. Dependiendo del protocolo, se utilizaron soluciones con CTAB, proteinasa K, cloroformo, fenol, alcohol isoamílico, acetato de sodio e isopropanol. El ADN precipitado se lavó con etanol al 70 %, se secó y se resuspendió en solución TE o agua, según el procedimiento aplicado.

La concentración del ADN se determinó mediante espectrofotometría a 260 nm y su pureza se evaluó con la relación de absorbancia A260/A280, considerando como referencia valores entre 1,8 y 2,0. La integridad del material genético se examinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, con visualización ultravioleta. Antes de la PCR, las muestras se diluyeron con agua libre de nucleasas hasta alcanzar una concentración de 15 ng/μL.

2.4. Amplificación molecular mediante PCR

La amplificación se efectuó mediante PCR utilizando el marcador molecular PV6 y los cebadores PV6F y PV6R descritos por Testen et al. (2014). La mezcla de reacción incluyó agua libre de nucleasas, tampón, MgCl₂, dNTP, cebadores, ADN polimerasa Taq y ADN molde.

Tabla 2.1

Mezcla maestra para amplificación en PCR, para 13 reacciones.

Reactivos	°	f	Vol. 1Rx (μL)	Vol. 13 Rx(μL)
Agua libre de nucleasas (NFW)			11.8	141.6
Buffer 5X	5 X	1 X	5.00	60
MgCl ₂	25 mM	4 mM	3.00	36
DnTPs	10 mM	0.4 mM	1.00	12
Directo (PV6F)	10 μM	0.2 μM	0.50	6
Inverso (PV6R)	10 μM	0.2 μM	0.50	6
ADN Taq polimerasa	5 U/μl	0.04 U/μl	0.20	2.4
DNA			3.00	36
Vol. final			25	300

Nota. (*) Al realizar la amplificación por PCR. 1Rxx: 1 reacción, 13 Rxx: 13 reacciones, por El-Assiuti et al. (2019).

La amplificación se realizó en un termociclador Eppendorf Pro S. El programa térmico comprendió una desnaturalización inicial a 94 °C durante dos minutos, seguida de 32 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación con un gradiente de 56 a 66,4 °C durante 45 segundos y extensión a 72 °C durante 95 segundos. Se finalizó con una extensión a 72 °C durante cinco minutos.

Tabla 2.2

Cebadores utilizados en el estudio (Testen et al., 2014)

Nombre de cartilla	Secuencia (5' a 3')	Fuente
PV6F	GTTGCTGGTTGTGAAGGCTG	Testen, 2014
PV6R	ATGCTACGCAACCGAAGTCA	Testen, 2014
DC6	GAGGGACTTTTGGGTAATCA	Cooke, 2000
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White, 1990
ITS6	GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG	White, 1990
Peronosporomycete adelante	GGCAAATGGGTTTCAAGATCC	Hudspeth, 2000
Peronosporomycete reverso	CCATGATTAATACCACAAATTTCAC	Hudspeth, 2000

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,8 %. Se mezclaron 3 µL del producto amplificado, 1 µL de tampón de carga 6X y 2 µL de agua libre de nucleasas. Se incorporó un marcador de peso molecular para estimar el tamaño de los fragmentos. La electroforesis se desarrolló durante dos horas a 100 V y las bandas se visualizaron con un transiluminador ultravioleta de 312 nm. Finalmente, se fotografiaron los geles para documentar los fragmentos obtenidos.

2.5. Evaluación de la presencia de *Peronospora* spp. en semillas de quinua

Para evaluar la posible presencia endógena del patógeno, se utilizaron 20 accesiones del banco de germoplasma de quinua de la UNSCH. La prueba de germinación se efectuó con 100 semillas por accesión durante 48 horas a 20 °C, utilizando seis mililitros de agua por recipiente.

Accesiones	Accesiones	Accesiones
BLANCA JUNIN		
441	SALXPAN 165 C4	SALXCOL 46 - C6
T201	T144	ALTIPLANO
T139	SALXPAN 171 C4	SEÑOR DEL HUERTO
T163	AMARILLA	PASANKALLA
	MARANGANI	
NARANJITA	T141	NEGRA QUITO - T33
T170	INIA SALCEDO	HUAXKCA 53 - C1
T143	BOLIVIANO	

Las accesiones se sembraron en bandejas de cinco litros con un sustrato de tierra agrícola, tierra negra y arena en proporción 2:1:1/2. El sustrato se sometió a pasteurización en autoclave a 120 °C. Las plantas se mantuvieron con riego constante y condiciones de 15–20 °C y 90–95 % de humedad relativa, con el propósito de favorecer el desarrollo de la enfermedad. Cuando alcanzaron un crecimiento foliar adecuado, fueron inoculadas con el patógeno.

Las hojas con síntomas se recolectaron y colocaron en placas de Petri con papel de filtro húmedo para favorecer la esporulación. Se observaron las estructuras presentes en el envés de las hojas mediante microscopía óptica. Para detectar oosporas en las semillas, se procesó un gramo de quinua mediante remojo, centrifugación y observación microscópica a 100×, siguiendo el método de Risco (2014).

La evaluación molecular se efectuó con semillas de las accesiones Roja Pasankalla y Blanca Junín. Estas se lavaron con agua corriente, se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 0,1 %, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron en remojo durante 24 horas. Posteriormente, se trituraron con perlititas de acero y se extrajo el ADN mediante el protocolo de Möller. La detección continuó con la preparación del ADN molde y la amplificación por PCR, de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Identificación morfológica del agente causal de mildiú veloso

3.1.1 Esporangióforos

Los esporangióforos (n=60) midieron entre 239.5 y 659.01 µm de longitud y 7.22 y 11.9 µm de diámetro, con forma arborescente, los esporangios se ramificaron dicotómicamente que terminan en 2 - 3 extremos flexuosos dispuestos en ángulo recto o agudo, en los que se insertan los esporangios. Las ramillas terminales se curvan y se estrechan en la punta.

¹ Escuela Profesional de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga - Perú

Tabla 3.1

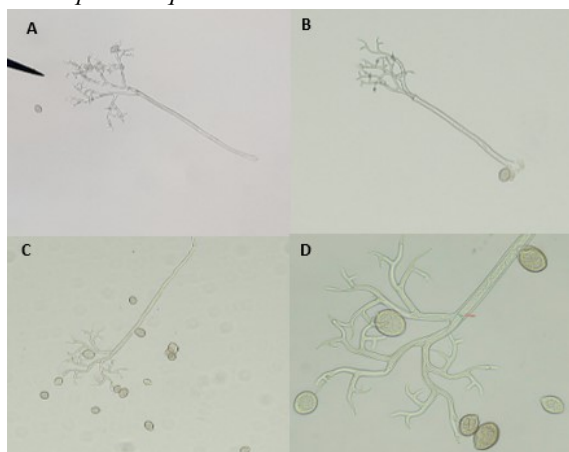
Micrometría de esporangióforo de Peronospora sp. en Chenopodium quinoa Willd.

Nº	Largo	Diámetro	Nº	Largo	Diámetro	Nº	Largo	Diámetro
	µm	µm		µm	µm		µm	µm
1	260.73	9.89	21	454.26	11.10	41	454.06	8.27
2	319.78	8.20	22	384.57	8.32	42	354.81	7.88
3	444.48	8.02	23	247.18	10.38	43	379.67	7.70
4	347.36	8.22	24	256.47	8.41	44	302.31	8.32
5	659.01	11.73	25	286.25	9.71	45	400.28	8.87
6	375.67	8.15	26	628.04	10.05	46	270	8.1
7	332.24	10.23	27	647.16	10.95	47	270	8.19
8	324.65	8.66	28	651.55	10.71	48	367.4	8.1
9	267.30	7.22	29	361.64	9.53	49	239.5	8.14
10	386.90	9.60	30	400.24	8.60	50	336.8	10.8
11	350.36	9.31	31	387.25	10.82	51	275.4	8.1
12	487.30	11.12	32	324.53	8.95	52	256.5	8.13
13	367.60	7.39	33	431.33	11.35	53	483.5	8.1
14	333.23	7.25	34	523.43	10.46	54	278.1	10.2
15	428.85	9.87	35	539.01	11.90	55	310.5	10.8
16	414.65	11.17	36	391.48	9.96	56	297	10.8
17	392.28	10.21	37	257.02	8.90	57	294.3	9.45
18	393.34	9.01	38	386.05	9.70	58	243	9.18
19	373.45	10.06	39	316.25	8.58	59	270	8.12
20	440.44	10.77	40	438.05	9.23	60	370.3	9.4

Nota (*). Datos de largo de esporangióforo: Promedio=374.4, máximo=659.01, mínimo=239.5, desviación estándar=±102.87; Datos de ancho de esporangióforo: Promedio=9.34, máximo=11.9, mínimo=7.22, desviación estándar=±1.23.

Figura 3.1

Esporangióforo del Peronospora sp. en Chenopodium quinoa Willd.



Notas. (*) En la figura A, B y C: se observan la forma arborescente de los esporangióforos a una escala de 7.278 µm. D: se observan las ramificaciones y extremos terminales del esporangióforo a un aumento de 10X.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se encuentran dentro del rango mencionado por Choi et al. (2010) que nos indican que los esporangióforos emergen de los estomas, son incoloros, rectos a levemente curvados, 320–630 µm de largo (n = 89); extremo recto a ligeramente curvado, extremo basal no diferenciado, raramente bulboso, 8-14 µm de ancho debajo la primera rama, a menudo ligeramente ahusada hacia arriba, raras veces presenta tapones callosos; ramas subdicotómica o monopodialmente ramificadas en 5-7 órdenes, ligeramente curvadas, elaboradas, pared a

menudo engrosada; ramillas finales mayormente en pares, con diferentes longitudes. Por otro lado, Choi et al. (2008) señala que los esporangióforos tuvieron una medida de 240 a 580 µm de largo, delgados; tronco subrecto a ligeramente curvado, raramente bulboso, de hasta 15 µm de ancho, 8–10 lm de ancho debajo de la primera rama; ramas ramificadas subdicotómicamente en 5–6(–7) órdenes ligeramente curvadas a sigmoideas; ramitas últimas en pares o individuales, flexuosas a curvadas, ápice obtuso.

Kara et al. (2020) en su trabajo de investigación realizado en Turquía, menciona que los esporangióforos (n = 50) emergiendo a través de estomas, fueron incoloros, rectos a ligeramente curvados de 230.0 a 550.0 µm de largo; tronco sub-recto a ligeramente curvado, de 110.0 a 370.0 µm de largo, extremo basal no diferenciado, raramente bulboso, hasta 15.0 µm de ancho, de 11.0 a 15.0 µm de ancho en la base, de 7.5 a 10.0 µm de ancho debajo de la primera rama, ramillas finales en pares o individuales. Estos datos se asemejan a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, indicando que el agente causal de mildiú vellosa en quinua es *Peronospora variabilis* Gaum.

Así mismo, Baiswar et al. (2010), en su trabajo de investigación realizado en India, señala que los esporangióforos eran rectos o curvos y median de 390 a 810 µm. La ramificación fue monopodial, las ramillas finales estaban en pares, curvadas, midiendo de 6.5 a 16 µm y anchos en la base de 2 a 4 mm.

Danielsen y Ames (2014) señalan que el patógeno ataca principalmente a la hoja, produciendo esporangióforos en el envés que miden entre 11,0 y 14,8 µm de diámetro y entre 167 y 227 µm de longitud. Los esporangióforos arborescentes terminan en 2 o 3 puntas sinuosas dispuestas en ángulos rectos o agudos, donde se fijan los esporangios. Se ramifican dicotómicamente de cuatro a cinco veces en ángulos agudos.

Aguilar et al. (2020) indica que los esporangióforos midieron entre 156 y 231 µm de longitud y 8,0 y 12,3 µm de diámetro, presenta una forma arborescente, ramificados

dicotómicamente que terminan en 2 - 3 extremos flexuosos dispuestos en ángulo recto o agudo.

Danielsen y Ames (2014) y Aguilar et al. (2020) lograron resultados diferentes al trabajo de investigación, esto se debe a las distintas condiciones edafoclimáticas y genéticas.

3.1.2 Esporangios

Los esporangios (n=60) son deciduos (a la madurez se desprenden del esporangióforo), ovales, con una papila apical translúcida, son de color, miden entre 25.02 a 34.2 μm de largo y 18.72 y 26.89 de diámetro, los esporangios presentaron pedicelo.

Tabla 3.2

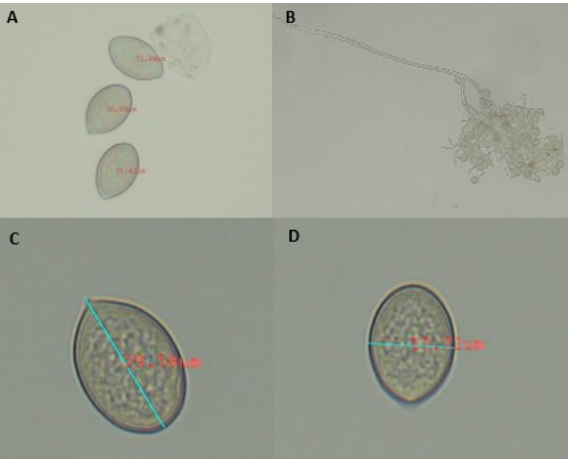
Micrometría de esporangios de Peronospora sp. en Chenopodium quinoa Willd.

N°	Largo	Ancho	N°	Largo	Ancho	N°	Largo	Ancho
	μm	μm		μm	μm		μm	μm
1	33.33	23.54	21	27.01	19.89	41	31.60	23.36
2	28.42	20.11	22	31.67	21.86	42	29.56	22.71
3	29.68	20.26	23	31.79	22.63	43	31.40	20.87
4	29.52	23.13	24	29.65	22.10	44	30.07	21.01
5	32.42	22.07	25	27.09	21.28	45	25.95	18.97
6	28.29	22.13	26	33.35	22.25	46	27.01	19.54
7	30.08	25.82	27	29.21	20.81	47	32.67	21.23
8	32.49	24.34	28	32.29	22.97	48	30.66	23.41
9	32.73	20.68	29	31.39	21.94	49	28.87	19.98
10	30.19	19.10	30	26.71	19.75	50	28.76	18.81
11	30.68	20.44	31	30.44	21.67	51	29.09	18.77
12	27.74	19.78	32	29.71	21.75	52	28.14	22.86
13	33.21	20.01	33	28.08	21.87	53	28.05	21.79
14	25.02	18.72	34	30.66	21.82	54	27.92	20.62
15	29.58	19.86	35	29.26	24.54	55	32.72	20.91
16	30.91	19.10	36	32.09	26.89	56	27.87	21.06
17	27.37	18.99	37	29.02	24.47	57	29.80	20.16
18	27.89	20.65	38	30.42	26.87	58	28.48	20.81
19	28.77	20.66	39	25.71	23.70	59	29.65	19.25
20	33.01	21.60	40	34.20	24.15	60	28.36	19.53

Nota (*). Datos de largo de esporangio: Promedio=29.8, máximo=34.2, mínimo=25.02, desviación estándar=±2.13; Datos de ancho de esporangio: Promedio=21.5, máximo=26.89, mínimo=18.72, desviación estándar=±1.95.

Figura 3.2

Esporangios del Peronospora sp. en Chenopodium quinoa Willd.



Notas. (*) A, C y D: medición de los esporangios a una escala de 18.24 μm ; B: esporangios insertados en el esporangióforo a un aumento de 40X.

Los resultados coinciden con varios estudios realizados por distintos autores que se mencionan a continuación:

Choi et al. (2010) describe a los esporangios de color marrón pálido a oliváceo, de forma variada, en su mayoría ampliamente elipsoidales a elipsoidales, señala que a veces aparecen en forma obovoide debido a un pedicelo distintivo, subglobosas en los jóvenes, mediana o submediana de mayor ancho, 24.5 a 35.0 μm de largo, 20.5 a 27.3 μm de ancho, relación largo/ancho de 1.18 a 1.56 (n = 96), punta redondeada, base redondeada o gradualmente estrecha; pedicelo mayormente presente, cónico corto o cilíndrico.

Choi et al. (2008) señala que los esporangios son oliváceos con un tinte grisáceo, ampliamente elipsoidales a elipsoidales, a veces aparecen como obovoides o napiformes debido al pedicelo, el ancho máximo es mediano en la mayoría de los esporangios, rara vez supra o submediano, 24-35 μm de largo, 22-26 μm de ancho, relación l/w = 1.2-1.5, pedicelo presente y luego cónico corto, ligeramente posicionado excéntricamente en la base de los esporangios.

Kara et al. (2020), en su trabajo de investigación realizado en Turquía indica que los esporangios (n = 50) eran oliváceos con un tinte grisáceo, ampliamente elipsoidales a elipsoidales, a veces aparecían como obovoides o napiformes debido al pedicelo, ancho máximo mediano, 25.0–35.0 μm de largo, 22.5–27.5 μm de ancho, con una relación largo/ancho de 1.2–1.4.

Baiswar et al. (2010), en su trabajo de investigación realizado en India, señala que los esporangios eran de color marrón pálido, ampliamente elipsoidales a elipsoidales y median 25.5–32.5 x 18–21 μm (relación longitud: anchura, 1,2: 1,7). El pedicelo también estaba presente en los esporangios. Las observaciones de microscopía electrónica de barrido revelaron puntas cónicas truncadas de las ramillas finales y ensanchamiento de los esporangióforos hacia las ramificaciones.

Danielsen y Ames (2014) muestra que los esporangios son ovalados, tienen una papila apical translúcida, son caducos (se desprenden del esporangióforo al madurar) y miden entre

25.7 y 31.9 μm de largo y entre 19.3 y 24.3 μm de ancho. Su protoplasma es granular y su pared es bastante rugosa. También mencionan que son translúcidos, de color marrón claro y que germinan directamente mediante la formación de un tubo germinativo; a diferencia de otros oomicetos, no producen zoosporas. Debido a esta característica, se les conoce como esporangios, esporas o conidios cuando germinan.

3.1.3 Oosporas

Así mismo, se observó las oosporas ($n=60$) de forma esférica, con doble pared, oscuras, ligeramente rugosa y ondulada en la parte externa, protoplasma granulado. El diámetro de las oosporas osciló entre 22.09 y 32.3 μm .

Tabla 3.3

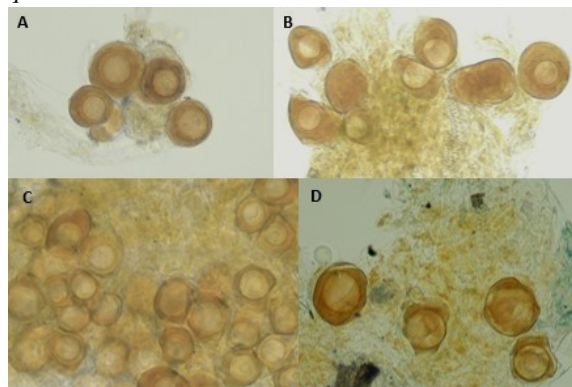
Micrometría de oosporas de Peronospora sp. en Chenopodium quinoa Willd.

N°	Diámetro μm	N°	Diámetro μm	N°	Diámetro μm
1	24.49	21	23.63	41	25.36
2	23.91	22	24.84	42	28.52
3	24.49	23	32.30	43	28.73
4	22.66	24	23.03	44	26.22
5	24.02	25	22.39	45	27.25
6	24.22	26	22.15	46	25.98
7	23.21	27	23.72	47	23.74
8	23.64	28	22.94	48	25.51
9	23.74	29	23.74	49	29.85
10	23.26	30	23.16	50	26.26
11	25.02	31	22.71	51	23.87
12	23.11	32	22.55	52	23.36
13	22.43	33	24.24	53	31.25
14	23.15	34	27.74	54	24.77
15	22.09	35	24.86	55	25.02
16	22.45	36	28.23	56	26.11
17	23.25	37	25.83	57	25.37
18	22.50	38	27.02	58	28.29
19	22.66	39	26.47	59	23.94
20	22.72	40	25.76	60	25.47

Nota (*). Diámetro: Promedio=24.82, máximo=32.3 mínimo=22.09, desviación estándar=+/-2.27.

Figura 3.3

Oosporas del Peronospora sp. en Chenopodium quinoa Willd.



Notas. (*) En la figura se observan la morfología de oosporas a un aumento de 40X

El presente estudio, se encuentra dentro del rango obtenido por Choi et al. (2008), quienes señalan que los órganos de reposo a menudo están presentes y son claramente visibles como puntos de color marrón oscuro a amarillentos en la superficie inferior de la hoja; oosporas globosas, 22,5–32,5 μm de diámetro, de color marrón dorado a marrón, pared de 1,5–3,5 μm de espesor. Así mismo, Kara et al. (2020) en su trabajo de investigación realizado en Turquía, señala que los órganos en reposo ($n=50$) estaban frecuentemente presentes y eran claramente visibles como puntos de color marrón oscuro a amarillento en la superficie inferior de la hoja; oosporas globosas, de 20,0 a 30,0 μm de diámetro.

El-Assiuty et al. (2019) indica que las oosporas tienen forma esférica, con doble pared, oscuras, ligeramente rugosa y ondulada en la parte externa, protoplasma granulado, cuyo tamaño fue de 35 a 50 μm de diámetro. El diámetro de las oosporas globosas osciló entre 14 y 22 μm , mientras que las ovoides tenían un tamaño de 14,2 a 19,2 μm de ancho y 16,6 a 22,2 μm de largo. Coincidiendo con Danielsen y Ames (2014), quienes señalan que La pared externa de la oospora, o episporio, es gruesa, ondulada e hialina cuando se forma inicialmente, pero también se oscurece a medida que la oospora envejece y adquiere un color marrón dorado. El diámetro de la oospora varía entre 39 y 50 μm . Khalifa y Thabet (2018), realizaron la evaluación de las variedades “CICA” y “Real”, y tuvieron como resultado que las oosporas presentan un color marrón oscuro con pared gruesa, midiendo entre 30 y 55 μm de diámetro. Así mismo, indican que mediante el método de lavado de semillas se logró observar oosporas relativamente transparentes en la variedad “Real”. Estos resultados coinciden con Baiswar et al. (2010), quienes señalan que las oosporas eran de color marrón oscuro con paredes gruesas, con un promedio de 30 a 55 μm de diámetro. Además, se encontraron algunas oosporas relativamente transparentes en el lavado de semillas.

3.1.4 Descripción morfológica de mildiú vellosa en el cultivo de quinua

Tabla 3.4

Descripción morfológica de *Peronospora variabilis* en *Chenopodium quinoa* Willd.

Morfología	<i>Peronospora variabilis</i>
Esporangióforos (n=60)	
• Longitud	239.5 - 659.01 μ m
• Ancho del tronco (por debajo de la primera rama)	7.22 - 11.9 μ m
• Tipo de ramificación	Dicotómica
• Forma	Arborescente, dicotómicamente ramificado
• Número de ramificaciones	4 a 5 veces
Esporangios (n=60)	
• Longitud	25.02 - 34.2 μ m
• Ancho	18.72 - 26.89 μ m
• Forma	Ovoide
• Color	Color castaño claro translúcido
• Pedicelo	Presente y de forma cónica
Oosporas (n=60)	
• Diámetro	22.09 - 32.3 μ m
• Forma	Esférica, la pared externa o episporio es gruesa y ondulada. Recién formada: Pared externa hialina.
• Color	Madura: Marrón dorado, la pared se oscurece.

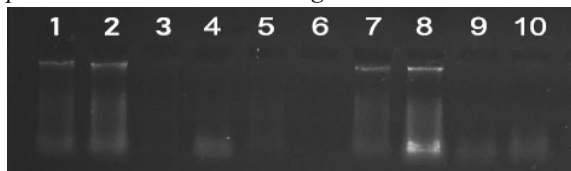
3.2. Resultados de la caracterización molecular del agente causal de mildiú vellosa

En las figuras 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8 se muestran pruebas fotográficas del ADN extraído del mildiú vellosa de la quinua utilizando los métodos de Moller, Taylor, Ristaino y Huanca-Mamani, respectivamente. La mayor calidad y la mayor cantidad de ADN obtenido hicieron que las técnicas de Moller y Huanca-Mamani tuvieran más éxito.

3.2.1 Protocolo Moller-Bahnweg et al. (1992)

Figura 3.4

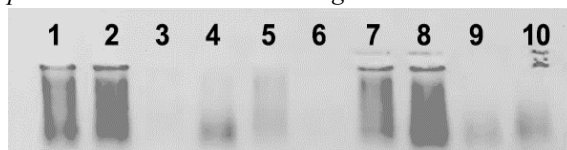
Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Möller al 1% de agarosa



Nota. (*) Muestras de ADN extraído de hongos que causan el mildiú vellosa en quinua en gel de agarosa al 1%, corrida de gel 90 voltios durante 40 minutos. Se agregó 5 μ l de proteinasa K a las muestras 1, 3, 5, 7 y 9. 1 y 2: muestras de semilla remojada por 4 días; 3, 4, 9 y 10: muestras de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Blanca Junin; 5 y 6: muestras de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Roja Pasankalla; 7 y 8: muestras de semillas remojadas por 24 horas. Se utilizó perlita en todas las muestras.

Figura 3.5

Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Möller al 1.8% de agarosas



Nota. (*) Muestras de ADN extraído de hongos que causan el mildiú vellosa en quinua en gel de agarosa al 1.8%, corrida de gel 90 voltios durante 40 minutos. Se agregó 5 μ l de proteinasa K a las muestras 1, 3, 5, 7 y 9; 1 y 2: muestras de semilla remojada por 4 días; 3, 4, 9 y 10: muestras de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Blanca Junin; 5 y 6: muestras de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Roja Pasankalla; 7 y 8: muestras de semillas remojadas por 24 horas.

Resultados de la cuantificación de ADN mediante Espectofotometría

Tabla 3.5

ADN extraído (diluído 10 μ l ADN/10 μ l NFW)

Código de muestra	ng/ μ l	A260/280
1	452.7	1.97
2	509.1	202.2
3	28.6	1.02
4	184.5	1.93
5	257.4	1.68
6	3.3	1.52
7	182.9	2.04
8	299.3	2.06
9	150.3	1.83
10	127.3	2.06

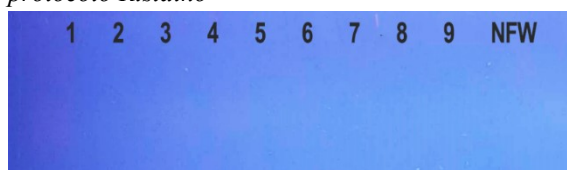
Datos. (*) Las muestras fueron diluidas en 200 ml de TE.

Möller et al. (1992) indica que este método es adecuado para el procesamiento simultáneo de numerosas muestras, ya que todos los pasos pueden realizarse en tubos Eppendorf. Realizó un tratamiento con metanol con 0,1 % de mercaptoetanol antes de la extracción de ADN cuando los basidiocarpos y los tejidos vegetales contenían grandes cantidades de compuestos reactivos (resinas, fenólicos) que interferían con la solubilización del ADN. Se observó que la extracción con metanol era superior. De esta manera, aislaron ADN de una amplia variedad de hongos, como y raíces y acículas de coníferas.

3.2.2 Protocolo Ristaino et al. (1998)

Figura 3.6

Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Ristaino



Nota. (*) Muestras de ADN extraído de hongos que causan el mildiú vellosa en quinua en gel de agarosa al 1.8% a 90 voltios por 50 minutos. 1 y 2: muestras de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Roja Pasankalla, 3 y 4: muestras de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Blanca Junin. 6, 7, 8 y 9: muestras de semillas Blanca Junin.

Resultados de la cuantificación de ADN mediante Espectrofometría

Tabla 3.6

ADN extraído (diluído 10 µl ADN/10 µl NFW)

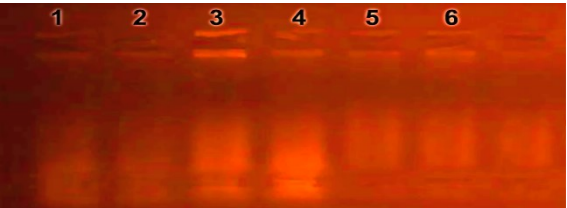
Código de muestra	ng/µl	A260/280
1	546.4	1.54
2	210.5	1.754
3	54.9	1.78
4	86	1.785
5	65.1	1.62
6	22.1	1.42
7	26	1.694
8	6.3	1.83
9	13.4	1.74
10	297.4	1.83

Ristaino et al. (1998) adoptaron un procedimiento rápido de extracción de ADN y una técnica de PCR fiable para la amplificación de ADN de especies de *Phytophthora*. Este método se basa en los procedimientos desarrollados por Lee y Taylor para especies de *Phytophthora* e implica la amplificación del gen ITS y del ADN_r 5.8S. El ADN amplificado se cortó entonces con una serie de enzimas de restricción para desarrollar patrones de fragmentos de restricción específicos de cada especie para la rápida identificación de las importantes especies fitopatógenas de *Phytophthora* de todos los diferentes grupos taxonómicos del género que infectan a huéspedes de importancia económica.

3.2.3. Protocolo Lee y Taylor (2024)

Figura 3.7

Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Lee y Taylor.



Nota. (*) Muestras de ADN extraído de hongos que causan el mildiú velloso en quinua en gel de agarosa al 1.8% a 90 voltios por 60 minutos. 1, 2, 3 y 4: muestras de semillas Blanca Junín; 5 y 6: muestra de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Blanca Junín.

Resultados de la cuantificación de ADN mediante Espectrofometría

Tabla 3.7

ADN extraído (diluído 10 µl ADN/10 µl NFW)

Código de muestra	ng/µl	A260/280
1	324.5	2.37
2	337.3	2.18
3	799.1	2.09
4	748	2.36
5	214.1	2.27
6	269.6	2.27

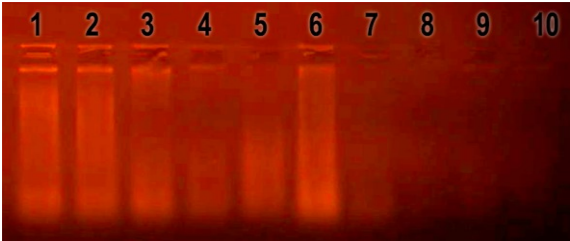
Lee & Taylor (1990) simplificaron el método de aislamiento de ADN total y lo utilizaron para amplificar genes multicopia a partir de pequeñas cantidades de micelio fresco y liofilizado. Se han utilizado con éxito diluciones de mil a diez mil veces de ADN total en minipreparaciones en reacciones de amplificación, obteniendo productos bicatenarios y monocatenarios. Este método ha funcionado con hongos de todos los grupos estudiados hasta la fecha, incluyendo los quidiomicetos, oomicetos, zigomicetos, deuteromicetos, ascomicetos y basidiomicetos.

3.2.4 Protocolo Huanca-Mamani et al. (2024)

Las muestras se sometieron a un procedimiento de extracción de ADN. Se utilizó electroforesis en gel de agarosa al 1,8 % para confirmar la eficacia del procedimiento. Esta técnica permitió extraer de manera eficaz ADN de alta calidad en cantidades adecuadas para cada aislado examinado, lo que demostró ser más útil y eficaz que otros métodos. Registro fotográfico del ADN aislado mediante el procedimiento de Huanca-Mamani (Figura 3.8).

Figura 3.8

Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Huanca Mamani.



Nota. (*) Muestras de ADN extraído de hongos que causan el mildiú velloso en quinua en gel de agarosa al 1.8% a 90 voltios por 60 minutos. 1 y 2: muestras de semillas Blanca Junín; 3 y 4: muestra de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Roja Pasankalla; 5 y 6: muestra de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Blanca Junín; 7, 8, 9 y 10: muestra de semilla Roja Pasankalla.

Resultados de la cuantificación de ADN mediante Espectrofometría

Tabla 3.8

ADN extraído (diluído 10 µl ADN/10 µl NFW)

Código de muestra	ng/µl	A260/280
1	799.1	2.09
2	748	2.36
3	195.6	2.3
4	360	2.28
5	324.5	2.37
6	337.3	2.18
7	230.7	2.34
8	303.3	2.35
9	125.4	2.29
10	220.8	2.34

¹ Escuela Profesional de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga - Perú

Huanca-Mamani et al. (2014), para aplicaciones como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), modificaron una técnica sencilla para extraer y purificar ADN de hongos filamentosos aislados del suelo. La metodología que se presenta es rápida y económica. Considerando, que la extracción de ADN de alta calidad de hongos puede ser afectada debido a la presencia de una pared celular compleja, alto contenido de polisacáridos o metabolitos secundarios.

3.2.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los resultados de la PCR obtenidos mediante la amplificación con los cebadores PV6 e ITS6/ITS4 se muestran en la Figura 3.9. Los resultados demuestran la amplificación de fragmentos de ADN de 278 pb procedentes del micelio fúngico presente en las muestras a una temperatura de hibridación de 63,3 °C.

Tabla 3.9

Homogenización de la concentración de ADN

Nº	Concentración ADN inicial (ng/ul)	ADN muestra (ul)	NFW (ul)	VF (ul)	Concentración de trabajo para PCR (20 ng/ul)
1	214.1	46.7	453	500	
2	269.6	37.1	463		
3	195.6	51.1	449		
4	360.9	27.7	472		
5	799.1	12.5	487		
6	748	13.4	487		
7	324.5	30.8	469		
8	337.3	29.6	470		
9	940.4	10.6	489		
10	303.3	33.0	467		
11	220.8	45.3	455		

Figura 3.9

PCR de las muestras obtenidas en el protocolo Lee & Taylor, Huanca Mamani y Moller



Nota. (*) Muestras de ADN extraído de hongos que causan el mildiú vellosa en quinua en gel de agarosa al 1.8% a 100 voltios por 2 horas y 30 minutos. 1, 2, 8, 9 y 10: muestra de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Roja Pasankalla; 3 y 7: muestra de semillas de quinua Blanca Junin; 5 y 6: muestras de semilla Roja Pasankalla; 4, 8 y 11: muestra de hongos obtenidas por raspado en el envés de las hojas enfermas de Blanca Junin.

La banda obtenida confirma la funcionalidad del protocolo de PCR y de extracción de ADN,

confirmando que el agente causal de mildiú vellosa en quinua es *Peronospora variabilis* Gaum, ya que representa un amplicón generado con secuencias específicas para la especie.

Testen et al. (2014) diseñaron cebadores específicos para *P. variabilis* (PV6) con el fin de desarrollar un método rápido de detección de *P. variabilis* en semillas de quinua, incluyendo semillas importadas para consumo humano. Este método, basado en PCR, se centraron en la región ITS y complementaron con un método de secuenciación para la detección del patógeno del mildiú vellosa de la quinua en semillas. El conjunto de cebadores PV6 solo amplificó ADN de *P. variabilis* y produjo consistentemente un amplicón de 278 pb. La PCR de baja frecuencia (TPP) también permitió una alta sensibilidad del cebador, con un límite de detección para el ADN de *P. variabilis*. Esta sensibilidad del cebador se refiere al ADN puro de *P. variabilis* y puede verse reducida en presencia de otro ADN, como ADN vegetal o fúngico.

Por otro lado, EI-Assiuty et al. (2019) realizaron la PCR con PV6F y PV6R que dio productos de amplificación del tamaño esperado (278 pb) con ADN de todas las partes de la semilla (perianto, cubierta de la semilla y embrión).

Choi et al. (2008) extrajeron ADN genómico utilizando esporangióforos y esporangios formados en la superficie inferior o superior de las hojas infectadas o utilizando el tejido huésped infectado de especímenes de herbario. La extracción de ADN genómico se llevó a cabo según el método de Lee y Taylor. Se utilizaron cebadores DC6 y ITS4 para la amplificación selectiva de la región ITS completa del ADNr. Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% y se purificaron utilizando un kit de extracción en gel QIAquick.

3.3 Comprobación de la presencia o ausencia endógena de *Peronospora* en las semillas de quinua del germoplasma de Ayacucho

3.3.1 Prueba de germinación

Tabla 3.10

Prueba de germinación de 20 accesiones de quinua

Nº	Accesión	Prom	V	Nº	Accesión	Prom	V
1	BLANCA JUNIN 441	83.0	B	11	AMARILLA MARANGANI	93.0	B
2	T201	83.3	R+	12	T141	93.3	B
3	T139	84.7	B	13	INIA SALCEDO	93.7	R+

¹ Escuela Profesional de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga - Perú

4	T163	85.0	B	14	BOLIVIANO	94.0	B
5	NARANJITA	88.0	B	15	SALXCOL 46 - C6	94.0	B
6	T170	88.3	R+	16	LTIPLANO	95.0	B
7	T143	88.5	B	17	SEÑOR DEL HUERTO	95.3	B
8	SALXPAN 165 C4	89.0	B	18	PASANKALLA	96.0	B
9	T144	92.0	B	19	NEGRA QOITO - T33	97.0	B
10	SALXPAN 171 C4	93.0	B	20	HUAXKCA 53 - C1	98.0	B

Nota. (*) Para fines del trabajo de investigación se utilizó accesiones con un porcentaje de germinación por encima del 80 % y de buen vigor. B: Buen Vigor, crecimiento y formación de primeras hojas, R+: De vigor regular con formación de las primeras hojas en la mayoría, R-: De vigor regular con formación de las primeras hojas en la minoría, M: vigor bajo con emisión solamente radicular.

3.3.2 Resultados de comprobación endógena del agente causal de mildiú veloso

Tabla 3.11

Presencia de oosporas en quinua sembradas en condiciones de invernadero.

Nº	Accesión	Presencia de oosporas	Observación de la sintomatología
1	BLANCA JUNIN 441	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
2	T201	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
3	T139	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
4	T163	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
5	NARANJITA	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
6	T170	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
7	T143	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
8	SALXPAN 165 C4	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
9	T144	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
10	SALXPAN 171 C4	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
11	AMARILLA MARANGANI	No	No existe presencia de signos y síntomas de la enfermedad.
12	T141	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y

13	INIA SALCEDO	Sí	moho grisáceo en el envés de la hoja Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
14	BOLIVIANO	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
15	SALXCOL 46 - C6	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
16	ALTIPLANO	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
17	SEÑOR DEL HUERTO	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
18	PASANKALLA	No	No existe presencia de signos y síntomas de la enfermedad.
19	NEGRA QOITO - T33	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja
20	HUAXKCA 53 - C1	Sí	Presencia de mancha clorótica en el haz y moho grisáceo en el envés de la hoja

Treinta días después de la siembra, en condiciones de alta humedad, aparecieron pequeñas manchas amarillentas y esporas grisáceas en el envés de las hojas. Tres o cuatro días después, se formaron manchas cloróticas irregulares, rodeadas por las nervaduras principales y laterales de la hoja.

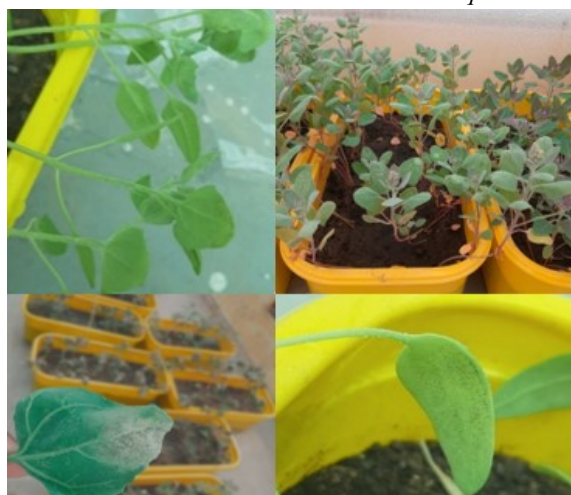
En la tabla 3.9 se observa la infestación de oosporas en 18 de las 20 accesiones de quinua, que fueron determinadas mediante observación microscópica. Así mismo, se observó presencia de plántulas con síntomas y signos causados por mildiú veloso de quinua.

Danielsen y Ames (2014) señala que, cuando la humedad relativa era alta, se observó un moho de aspecto algodonoso y grisáceo, formado por esporangios y esporangióforos, en el envés de las hojas y dentro de las zonas cloróticas.

Saravia et al. (2014), Demuestran que la esporulación, que es abundante en las variedades susceptibles y escasa o inexistente en las resistentes, está relacionada con el grado de resistencia de las variedades. Además, demuestran que la variedad Salcedo del INIA se comportó como sensible en Piura y presentó una esporulación abundante.

Figura 3.10

Síntomas observados en las accesiones de quinua

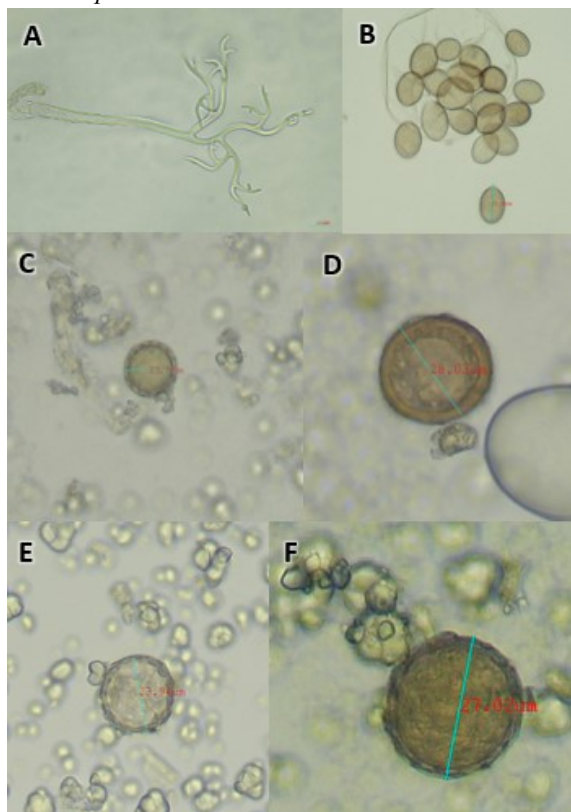


3.3.3 Observación microscópica

Además de los síntomas observados en el invernadero, las observaciones microscópicas mostradas en la figura 3.11 de las estructuras extraídas, indican que se trata del agente causal de mildiú vellos en quinua. Dando a entender que las semillas son portadoras de oosporas y fuente de inóculo.

Figura 3.11

Observación microscópica de las estructuras de Peronospora variabilis Gaum



Nota (*). A: esporangióforo (aumento 10X); B: esporangios; C, D, E Y F: Oosporas aisladas de acuerdo al protocolo Risco (2014) a un aumento de 40X.

Aguilar et al. (2020) Descubrieron que las oosporas de *P. variabilis* estaban presentes en el 100 % de las 15 muestras que examinaron. Salcedo INIA-ECOSAC y Pasankalla contenían la menor cantidad de oosporas (10 y 8 por cada 100 unidades de semilla), mientras que INIA-Altiplano, Salcedo INIA-Lambayeque y Kolicu tenían la mayor cantidad (96, 80 y 64, respectivamente).

Khalifa y Thabet (2018) observaron varias oosporas en los fragmentos de lavado de semillas en las variedades CICA y Real, lo que sugiere que las oosporas transmitidas por las semillas son probablemente la principal fuente de inóculo en Egipto.

El-Assiuty et al. (2019) En Egipto se ha informado que el 90 % de las oosporas se encuentran en el pericarpio, el 87 % en la cubierta de la semilla y el 3 % en el embrión. De manera similar, una investigación realizada por Testen et al. (2014) muestra que las semillas de quinua son una fuente de inóculo primario y una vía de propagación de las oosporas del mildiú vellos.

Danielsen y Ames (2014) indican que las semillas de quinua actúan como la fuente inicial del patógeno que causa la enfermedad en una próxima temporada de cultivo, por lo que para garantizar que se comienza una investigación con material sin ningún tipo de infección, es fundamental examinar las semillas en busca de oosporas. Además, la identificación de oosporas en semillas es un componente clave en las investigaciones sobre el rol de estas estructuras en el comienzo y evolución de la enfermedad.

Chuchon (2023), realizaron un trabajo de investigación en la población del distrito de Los Morochucos, donde encontraron oosporas de *Peronospora variabilis* Gaum. directamente en las semillas de *Chenopodium quinoa* Willd. (“quinoa”). Esto indica que el 100 % de las muestras presentan oosporas en la superficie de la semilla (pericarpio), lo cual constituye una fuente de inóculo para la aparición del mildiú

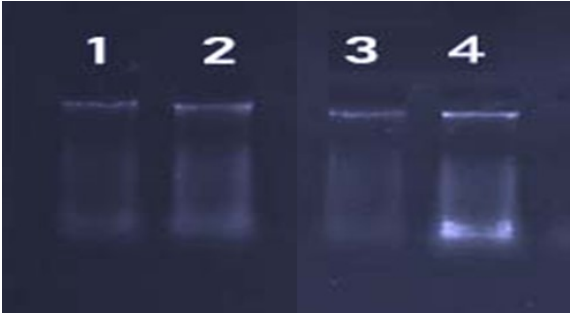
velloso. De manera similar, al sembrar plántulas de quinua en suelo estéril, se detectaron indirectamente oosporas de *Peronospora variabilis* Gaum en la etapa de vivero. Se ha demostrado que las semillas de quinua contienen oosporas de *P. variabilis* Gaum, basándose en los síntomas y en la observación microscópica de los esporangióforos y los esporangios en el envés de las hojas.

Danielsen et al. (2004) analizaron ciento veintiocho muestras de semillas de quinua de diferentes provincias del Perú con el fin de detectar la presencia de oosporas. Se encontraron oosporas en 19 muestras de semillas y cortes ultramicrotómicos de semillas fijas mostraron que las oosporas se encuentran en el pericarpio. Las semillas de las muestras infectadas con oosporas se sembraron en el invernadero a dos niveles de humedad relativa. En la humedad más baja, se observó una fuerte esporulación en los cotiledones de 12 muestras. A mayor humedad, se encontró esporulación en cotiledones de 18 muestras. En Cajamarca, se encontró que el 50 % de las muestras eran infectadas por oosporas.

3.3.4 Electroforesis

Figura 3.12

Bandas de ADN de semillas de quinua obtenidas mediante el protocolo de Moller.



Nota. (*) Muestras de ADN extraído de hongos que causan el mildiú velloso en quinua en gel de agarosa al 1%, corrida de gel 90 voltios durante 40 minutos. Se agregó 5 µl de proteinasa K a las muestras 1 y 3; 1 y 2: muestras de semilla remojada por 4 días; 3 y 4: muestras de semillas remojadas por 24 horas. Se utilizó perlita en todas las muestras.

3.3.5 Resultados de la cuantificación de ADN de semillas de quinua mediante Espectrofotetría

Tabla 3.12

ADN extraído (diluído 10 µl ADN/10 µl NFW)

Código de muestra	ng/µl	A260/280
1	799.1	2.09
2	748	2.36
3	230.7	2.34
4	303.3	2.35

3.3.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En la figura 3.13 se muestra el resultado de PCR empleando los cebadores PV6 en la amplificación a partir de tejido (semilla con superficie desinfectada). No se observó bandas de ADN en ninguna de las 4 muestras de semillas de quinua.

Figura 3.13

PCR de las muestras de ADN de semillas de quinua obtenidas en el protocolo Moller



Nota. (*) Muestras de ADN extraídas de semillas desinfectadas (tejido endógeno) de quinua en gel de agarosa al 1.8% a 100 voltios por 2 horas y 30 minutos.

Testen et al. (2014) en su trabajo de investigación, desarrollaron un método de detección de oosporas transmitidas por semillas mediante el diseño de un cebador específico para detectar *P. variabilis* a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y para verificar el método basado en la PCR, utilizaron una técnica basada en la secuenciación. Se detectó *P. variabilis* en 32 de los 33 lotes de semillas de quinua mediante el método basado en la secuenciación y en 31 de los 33 lotes de semillas de quinua mediante el método basado en la PCR. El-Assiuty et al. (2019) realizaron detecciones histológicas de oosporas mediante PCR utilizando primers específicos PV6F y PV6R desarrollado por Testes et al. (2014), que dio productos de amplificación del tamaño esperado (278 pb) con ADN de todas las partes de la semilla (perianto, cubierta de la semilla y embrión).

Choi et al. (2010), evaluaron treinta y seis aislamientos de *Peronospora* de quinua con diferentes orígenes geográficos, incluidos Argentina, Bolivia, Dinamarca, Ecuador y Perú, comparándolos molecularmente con especies de *Peronospora* de otras especies de *Chenopodium*. Sus estudios indican que el patógeno

¹ Escuela Profesional de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga - Perú

responsable del mildiú veloso de la quinua es idéntico a *Peronospora variabilis* y que no debe agruparse con *P. farinosa* como se afirma anteriormente en la mayoría de los estudios.

CONCLUSIONES

1. Se identificó a través de las características morfológicas que el agente causal del mildiú veloso en quinua es *Peronospora variabilis* Gaum. en la región de Ayacucho, presentando esporangióforos entre 237.8 y 659.01 μm de longitud y 11.9 y 7.22 μm de diámetro. Los esporangios midieron entre 25.02 a 34.2 μm de largo y 18.46 y 26.93 de diámetro. Así mismo, el diámetro de las oosporas osciló entre 22.05 y 31.25 μm .
2. Se identificó y confirmó molecularmente que el agente causal de mildiú veloso en quinua es *Peronospora variabilis* Gaum., mediante PCR utilizando un cebador específico PV6, que mostró una banda de ADN de 278 pares de bases a una temperatura de 63.3 °C de Hibridación.
3. Se detectó de forma indirecta la presencia de oosporas de *Peronospora variabilis* Gaum. posiblemente en la superficie de la semilla de quinua, mediante el crecimiento de plántulas de *Chenopodium quinoa* Willd. en condiciones de invernadero.
4. Se comprobó la ausencia endógena de *Peronospora variabilis* dentro de las semillas de quinua, mediante procedimiento molecular de PCR.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, R., More-Yarleque, M., Rafael-Rutte, R., & Maldonado, E. (2020). Inductores de defensa en el control del mildiú (*Peronospora variabilis* Gaum.) en el cultivo de quinua: Detección, epidemiología, síntomas, características y control. *Scientia Agropecuaria*, 11(4), 555–563. doi:10.17268/sci.agropecu.2020.04.11
- Baiswar, P., Chandra, S., Kumar, R., & Ngachan, S. (2010). *Peronospora variabilis* on *Chenopodium murale* in India. India. <https://link.springer.com/article/10.1007/DN10017>
- Choi, Y.-J., Danielsen, S., Lübeck, M., Hong, S.-B., Delhey, R., & Shin, H.-D. (2010). Morphological and molecular characterization of the causal agent of downy mildew on Quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Mycopathologia*, 169(5), 403–412. doi:https://doi.org/10.1007/s11046-010-9272-y
- Choi, Y.-J., Denchev, C., & Shin, H.-D. (2008). Morphological and Molecular Analyses Support the Existence of Host-specific *Peronospora* Species Infecting *Chenopodium*. *Mycopathologia*, 165(3), 155-164. doi:10.1007/s11046-007-9087-7
- Chuchon, S. (2023). *Oosporas de Peronospora variabilis* Gaum. en semillas de *Chenopodium quinoa* Willd. “quinua”, Ayacucho 2023 [Tesis de grado, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga]. Repositorio institucional, Ayacucho, Perú. <https://repositorio.unsch.edu.pe/items/cee9b3f4-b6a1-4fe6-80a1-1dd3aab0d94d>
- Danielsen, S., & Ames, T. (2014). El mildiú (*Peronospora farinosa*) de la quinua (*Chenopodium quinoa*) en la zona andina. Manual técnico para el estudio de la enfermedad y el patógeno. Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP) royal danish ministry of foreign affairs the royal veterinary and agricultural university.
- Danielsen, S., Mercado, V., Ames, T., & Munk, L. (2004). Seed transmission of downy mildew (*Peronospora farinosa* f. sp. *Chenopodii*) in quinoa and effect of relative humidity on seedling infection. *Seed Science and Technology*, 32(1), 91-98. doi:10.15258/sst.2004.32.1.10
- El-Assiuty, E., Fahmy, G., Taha, E., Fahmy, Z., Ismael, A., Abd-Elghany, W., & Kafsheer, D. (2019). Microscopic visualization of *Peronospora variabilis* Gäum., the cause of quinoa downy mildew in plant tissues at different stages of plant growth. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 10(9), 1022-1033.

- El-Assiuty, E., Taha, E., Fahmy, Z., & Mohammad Fahmy, G. (2019). Histological and Molecular Detections of *Peronospora variabilis* Gäum Oospores in Seeds of Quinoa (*Chenopodium quinoa* L.). *The Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany)*, 15(2), 197-203. doi:10.5455/egyjebb.20190620115158
- Huanca-Mamani, W., Salvatierra, R., & Sepúlveda, G. (2014). A fast and efficient method for total DNA extraction from soil filamentous fungi. *IDESIA*, 32(2), 75-78. doi:http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292014000200010
- Kara, M., Soylu, E., Uysal, A., Kurt, Ş., Choi, Y.-J., & Soylu, S. (2020). Morphological and molecular characterization of downy mildew disease caused by *Peronospora variabilis* on *Chenopodium album* in Turkey. *Australasian Plant Disease Notes*, 15(10), 1-3. doi:https://doi.org/10.1007/s13314-020-0381-2
- Khalifa, W., & Thabet, M. (2018). Variation in downy mildew (*Peronospora variabilis* Gäum) resistance of some quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) cultivars under Egyptian conditions. *Middle East Journal of Agriculture Reasearch*, 7(2), 671-682.
- Lee, S., & Taylor, J. (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia an single spores. *Academic Press*. doi:DOI: 10.1016/b978-0-12-372180-8.50038-x
- Möller, E., Bahnweg, G., Sanderman, H., & Geiger, H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res*, 20(22), 6115-6116. doi:10.1093/nar/20.22.6115
- Mujica, Á., & Jacobsen, S. (2006). La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y sus parientes silvestres. 449-457.
- Risco Mendoza, A. (2014). *Severidad de Peronospora variabilis Gäum. en Chenopodium quinoa Willd. 'Pasankalla' como respuesta a aplicaciones de fungicidas sintéticos y bioestimulantes*. Repositorio institucional, Lima, Perú.
- Ristaino, J., Madritch, M., Trout, C., & Parra, G. (1998). PCR Amplification of Ribosomal DNA for Species Identification in the Plant Pathogen Genus *Phytophthora*. *Applied And Environmental Microbiology*, 64(3), 948-954. https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/aem.64.3.948-954.1998
- Saravia, R., Plata, G., & Gandarillas, A. (2014). Plagas y enfermedades del cultivo de quinua. https://www.proinpa.org/publico/libro_pla gas_quinua/files/res/downloads/download_0144.pdf
- Testen, A., Jiménez-Gasco, M., Ochoa, J., & Backman, P. (2014). Molecular Detection of *Peronospora variabilis* in Quinoa Seed and Phylogeny of the Quinoa Downy Mildew Pathogen in South America and the United States. *Phytopathology*, 104(4), 379-386.

¹ Escuela Profesional de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga - Perú