

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

Tesis presentada para optar por el grado académico de Licenciatura en Ingeniería
Agronómica

“Patogenicidad del Mildiú Velloso (*Pseudoperonospora cubensis*) en Melón y otras
Cucurbitáceas en Costa Rica”

Rosaura Zamora Segura

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2011

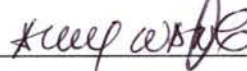
Tesis presentada para optar por el grado académico de Licenciatura en Ingeniería
Agronómica

Ph. D. Felipe Arauz Cavallini



Director de Tesis

M. Sc Amy Wang Wong.



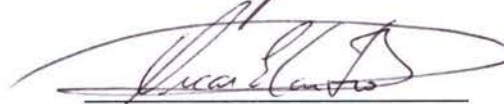
Lectora

M. Sc. Rodrigo Ríos Barboza



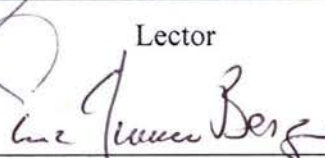
Lector

M. Sc. Oscar Castro Zúñiga



Lector

Ph. D. Eric Guevara Berger



Director, Escuela de Agronomía

Rosaura Zamora Segura



Candidata

*Dedico este trabajo
con mucho cariño
a la memoria de mi mamá,*

Catalina Segura Umaña

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Señor, por darme la capacidad de desarrollar este proyecto y por poner en mi camino a todas las personas que me facilitaron el llevarlo a cabo.

Al Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) por brindar el aporte económico necesario para el desarrollo de esta investigación.

A Eric Guevara y a María Vindas del Laboratorio de Biotecnología del CIGRAS, por colaborar con la reproducción *in Vitro* del material vegetal que no fue posible reproducir por semilla.

A Nelly Vásquez del Banco de Germoplasma de Cucurbitáceas del CATIE, por facilitar la semilla que fue necesaria para completar el grupo de plantas diferenciales.

A mis lectores de tesis Amy Wang, Rodrigo Ríos y Oscar Castro por sus útiles observaciones y recomendaciones.

Un agradecimiento especial a Felipe Arauz, por aconsejarme y por mantener la fe en el proyecto, a pesar de todas las dificultades que se presentaron en el transcurso del mismo.

A mis amigos; Ismael Segura, Michelle Marshall, Emilce Ulate, Geovanni Valerín, mis hermanos José y Marcello, y mis padres Catalina y Francisco; porque sin la ayuda que me brindaron, tanto espiritual como material, hubiera sido imposible la conclusión de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

COMITÉ ASESOR DE TESIS	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS	5
REVISIÓN DE LITERATURA	6
<u>Hospederos</u>	6
<u>Taxonomía</u>	6
<u>Morfología</u>	6
<u>Sintomatología</u>	7
<u>Ciclo de la enfermedad</u>	8
<u>Patogenicidad</u>	9
<u>Variabilidad en la relación hospedero-patogeno</u>	13
1. <i>Cucumis</i> sp.	13
1.1. <i>Cucumis sativus</i> (Pepino):	13
1.2 <i>Cucumis melo</i> (Melón):	14
2. <i>Cucurbita</i> sp.	15
3. Otras Cucurbitáceas	16
<u>Variabilidad en la Patogenicidad de <i>P. cubensis</i></u>	17
MATERIALES Y METODOS	19
1. Reproducción y almacenamiento de <i>P. cubensis</i>	19
1.1 Protocolo para la reproducción y mantenimiento de aislamientos de <i>P. cubensis</i>	20
2. Caracterización de los aislamientos.	23
3. Susceptibilidad del melón a otros aislamientos.	27
RESULTADOS	29
1. Reproducción y almacenamiento de <i>P. cubensis</i>	29

2. Caracterización de los aislamientos.	29
3. Susceptibilidad del melón a otros aislamientos.	30
DISCUSION	32
1. Reproducción y almacenamiento de <i>P. cubensis</i>	32
2. Caracterización de los aislamientos.	34
3. Susceptibilidad del melón a otros aislamientos.	35
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	37
LITERATURA CITADA	39
ANEXO	44

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Interacción de plantas cucurbitáceas con patotipos de <i>Pseudoperonospora cubensis</i> .	10
Cuadro 2. Características del grupo de variedades diferenciales para la determinación de la variabilidad patogénica de <i>P. cubensis</i> .	12
Cuadro 3. Tipos de reacción (RT) de plantas con repuesta diferencial al ataque del mildiú veloso de las cucurbitáceas (<i>P. cubensis</i>).	25
Cuadro 4. Conformación del código numérico para la caracterización de patotipos de <i>P. cubensis</i> de acuerdo al grupo de plantas diferenciales con respuesta de susceptibilidad.	26
Cuadro 5. Tipo de reacción (TR) del set de variedades diferenciales a la inoculación con diferentes aislamientos de <i>P. cubensis</i> .	29
Cuadro 6. Tipo de reacción (TR) del melón inoculado con aislamientos de <i>P. cubensis</i> colectados en cucurbitáceas diferentes al melón.	31

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

- Ilustración 1. Fotografía tomada en el microscopio de un esporangióforo junto a algunos esporangios (A) y un esporangio en proceso de germinación (B). 7
- Ilustración 2. Síntomas de mildiú vellosa en melón inoculado en laboratorio (A) y síntomas de la enfermedad en campo (B). 8
- Ilustración 3. Reacción de susceptibilidad (A) y reacción de resistencia (B) en plantas de melón inoculadas con *P. cubensis*. 26

RESUMEN

El mildiú vellosa de las cucurbitáceas causado por el oomicete *Pseudoperonospora cubensis*, es una enfermedad que produce serios daños alrededor del mundo. En Costa Rica, se considera que las pérdidas comerciales de melón debidas al mildiú vellosa ascienden hasta un 50% de la cosecha.

Para la reproducción y mantenimiento del patógeno se desarrolló un protocolo con el cual se distinguieron varios aislamientos de *P. cubensis* provenientes de dos fincas productoras de melón, ubicadas en Puntarenas y Guanacaste.

Utilizando el protocolo y un grupo de 12 plantas cucurbitáceas con respuesta diferencial (resistencia o susceptibilidad), fue posible la caracterización de cuatro aislamientos de *P. cubensis* proveniente de las fincas antes mencionadas. Dicha caracterización se llevó a cabo utilizando el código numeral propuesto por Lebeda & Widrlechner (2003a).

Con el fin de saber si el inóculo de otras cucurbitáceas es capaz de infectar las variedades de melón comercial se inocularon plántulas de melón procedentes de una finca productora, con aislamientos de *P. cubensis* obtenidos de *Cucumis sativus*, *C. melo* (una maleza común en las plantaciones comerciales conocida como meloncillo) y *Cucurbita* sp. Todos los aislamientos inoculados infectaron al melón, por lo tanto, se considera que otras cucurbitáceas diferentes al melón tienen la capacidad de albergar al patógeno y convertirse en reservorios de inóculo que probablemente servirá como inóculo primario para la infección en la siguiente temporada del cultivo.

INTRODUCCION

El mildiú veloso de las cucurbitáceas causado por el Oomicete *Pseudoperonospora cubensis*, es una enfermedad que produce serios daños alrededor del mundo. Se ha informado de pérdidas causadas por este patógeno en prácticamente todos los lugares húmedos y con temperaturas cálidas donde se cultivan cucurbitáceas de manera comercial (Palti & Cohen 1980; Zitter *et al.* 1996). Se conocen más de 60 especies como hospederas (Palti & Cohen 1980; Lebeda 1999; Lebeda & Urban 2004; Lebeda *et al.* 2006), siendo el pepino y el melón los más afectados (Chupp & Sherf 1960; Palti 1975).

El melón es uno de los cultivos no tradicionales más importante para Costa Rica. En el año 2009, la exportación de este producto generó cerca de \$75 millones (Chávez *et al.*, 2010), siendo Estados Unidos y la Unión Europea los principales mercados de destino. En el país, los productores de melón consideran que las pérdidas por mildiú veloso ascienden hasta un 50% de la cosecha (Guillermo Vargas productor de melón, comunicación personal 2008).

Pseudoperonospora cubensis se caracteriza por ser altamente dependiente de factores ambientales (Palti & Cohen 1980; Thomas *et al.* 1987b). Cuando se presentan condiciones ambientales óptimas y un hospedero susceptible, la enfermedad llega a ser muy destructiva. La combinación de periodos de mojadura foliar, temperaturas cálidas e inóculo viable son los factores que mayormente inducen la infección (Cohen 1976; Zitter *et al.* 1996). Cohen (1976) estudió los efectos combinados de la mojadura foliar, temperatura y concentración de inóculo y concluyó que el nivel óptimo de cada factor (para que ocurra la infección) depende al menos de uno de los demás factores estudiados. La oscuridad es otro factor importante para el desarrollo del patógeno porque cuando se presentan condiciones de alta humedad induce la producción de esporas (Cohen *et al.* 1971).

En Costa Rica, el mildiú veloso es una enfermedad que se presenta esporádicamente. Si bien el melón normalmente se cultiva durante la época seca, años con presencia de lluvias atípicas durante la estación seca inducen la infección. La presencia de melón voluntario, cucurbitáceas silvestres y cultivos de melón inverniz, son potenciales

fuentes de infección porque mantienen el inóculo viable para el siguiente ciclo de cultivo (Palti & Cohen 1980; Lebeda & Widrlechner 2004).

El combate del mildiú veloso comúnmente incluye la aplicación de fungicidas, prácticas culturales y el uso de variedades resistentes (Zitter *et al.* 1996). En países como el nuestro donde hay altos niveles de inóculo, alta humedad y temperaturas favorables para el desarrollo del patógeno (Araya 2008 datos sin publicar) (Anexo 1), la eficiencia del combate tiende a ser baja, lo que genera problemas de contaminación ambiental y mayores gastos para el productor.

Se han desarrollado fungicidas específicos para el combate de Peronosporomycetes, entre ellos los pertenecientes al grupo de las acilalaninas (metalaxil, furalaxil, benalaxil), el fosetil-Al, propamocarb, dimethomorph y cymoxanil (Samoucha & Cohen 1984; Arauz 1998). Debido a su gran capacidad de adaptación evolutiva, *P. cubensis* se considera un patógeno de “riesgo” porque es capaz de desarrollar rápidamente resistencia a los fungicidas (Lebeda & Urban 2007). FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) considera a *P. cubensis* y a *Plasmopara viticola* -agente causal del mildiú veloso de la vid- como dos de los 10 patógenos con un mayor riesgo asociado de desarrollo de resistencia a los fungicidas (Pathogen risk list, 2005).

Como era de esperar, el uso irracional de fungicidas sistémicos indujo el desarrollo de razas resistentes, por lo que en muchos lugares la eficiencia del combate químico es baja o nula (Arauz 1998; Urban & Lebeda 2006). El desarrollo de resistencia al metalaxil ha sido ampliamente registrado (Samoucha & Cohen 1985; Moss 1987). En un estudio realizado por Samoucha & Cohen (1984) se encontró que razas de *P. cubensis* resistentes al metalaxil, mostraban resistencia cruzada al phosethyl-Al, propamocarb, SAN371F y al cyprofuram + folpet en invernadero.

El uso de variedades comerciales con un nivel de resistencia aceptable es deseable por su impacto ambiental y económico positivo (Épinat & Pitrat 1994; Thomas & Caniglia 1997). Aunque se considera que *Cucumis sativus* y *C. melo* son altamente susceptibles a los patotipos de *P. cubensis* descritos hasta el momento (Zitter *et al.* 1996; Thomas & Caniglia 1997; Lebeda 1999; Lebeda & Gadasová 2002), hay estudios que demuestran la existencia de buenas fuentes de resistencia a la enfermedad en materiales de *C. melo*

(Lebeda 1999; Urban & Lebeda 2006), muchas veces proveniente de variedades silvestres (More *et al.* 2002). No obstante, el conocimiento sigue siendo limitado y solo se han logrado desarrollar variedades de melón con resistencia incompleta (Zitter *et al.* 1996; Thomas & Caniglia 1997; Lebeda 1999; Lebeda & Gadasová 2002).

El patógeno tiene la cualidad de dispersarse rápidamente (Celetti 2007). Este factor en conjunto con un periodo de latencia que lleva de 4 a 12 días, hace que la evaluación de la aparición de síntomas no sea un criterio efectivo para la aplicación de medidas de combate, por lo que ha sido necesaria la búsqueda de nuevas técnicas que permitan la detección temprana del patógeno.

Países como Ucrania y Estados Unidos han desarrollado sistemas de pronóstico temprano basándose en: la determinación de los días críticos para el desarrollo de *P. cubensis* (Chaban *et al.* 2000), el transporte de esporas del patógeno a larga distancia (Main *et al.* 2001), la evaluación de mojadura foliar y temperatura conocido como “Melcast” y que también se utiliza para el pronóstico de otras enfermedades del melón (Latin & Egel 2001) e incluso el uso de tecnología de termografía infrarroja digital para visualizar el efecto de la enfermedad sobre la tasa de transpiración de las plantas (Lindenthal 2005; Oerke *et al.* 2006). Sin embargo, no existe una metodología para control temprano de *P. cubensis* adecuada a las condiciones de nuestro país.

Otros factores que hacen al mildiú vellosa una enfermedad difícil de controlar son su especificidad con respecto al hospedero, su amplia variabilidad patogénica (Lebeda 1999; Lebeda & Widrlechner 2003a,b; Lebeda & Widrlechner 2004) y desde el punto de vista poblacional, su gran capacidad de adaptación evolutiva (Lebeda & Urban 2004, 2007; Lebeda *et al.* 2006). Un estudio realizado con aislamientos de *P. cubensis* provenientes de USA, Israel y Japón, demostró, con el uso de seis variedades de cucurbitáceas diferenciales (Cuadro 1), la existencia de al menos 5 patotipos o razas de *P. cubensis*, establecidas de acuerdo al nivel de compatibilidad entre el patógeno y el hospedero (Thomas *et al.* 1987b). Otros autores han establecido una variabilidad en la virulencia mucho mayor (Lebeda 1999).

Esta variación en la virulencia está delimitada tanto por la especificidad del patógeno al género, especie y subespecie del hospedero (Lebeda & Gadasová 2002; Lebeda &

Widrechner 2003a); así como por la frecuencia de ocurrencia del patotipo en la población del hospedero en diferentes lugares (Thomas & Jourdain 1992). Se debe notar sin embargo, que el conocimiento fitopatológico y genético acerca de la interacción *P. cubensis*-hospedero, y el amplio ámbito de hospederos naturales sigue siendo limitado (Lebeda *et al.* 2006; Lebeda & Cohen, 2010).

Con el fin de caracterizar de una manera más detallada la variación en la virulencia del patógeno, se creó un grupo de diferenciales mejorado compuesto por 12 variedades (Cuadro 2), el cual se desarrolló basándose en el propuesto por Thomas *et al.* (1987b) (Lebeda & Gadasová 2002; Lebeda & Widrechner 2003a,b), y se propuso un código numérico con una denominación única para designar a cada patotipo (Lebeda & Widrechner 2003a). Este nuevo grupo de diferenciales es además, una herramienta para el estudio de la variabilidad en las poblaciones del patógeno en distintos lugares y para la evaluación de la variación de resistencias en germoplasma de cucurbitáceas contra aislamientos definidos de *P. cubensis* (Lebeda & Widrechner 2003a).

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de esta investigación es establecer una metodología para la reproducción y mantenimiento del mildiú veloso (*Pseudoperonospora cubensis*) que permita la caracterización de los patotipos que afectan al melón en Costa Rica, así como el papel de otras cucurbitáceas como fuente de inóculo primario.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Reproducir y mantener los aislamientos del Oomicete por medio de inoculaciones de *P. cubensis* provenientes de melón y otras cucurbitáceas en plantas sanas del hospedero original.

- Caracterizar los aislamientos por medio de la inoculación de *P. cubensis* provenientes de melón en plantas diferenciales para determinar los patotipos presentes en el cultivo del melón.

- Determinar la susceptibilidad del melón a la inoculación con aislamientos de *P. cubensis* obtenidos de otras cucurbitáceas.

REVISIÓN DE LITERATURA

Hospederos

El Peronosporomycete *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & Curt.) Rostow, agente causal del mildiú veloso es un parásito obligado que ataca únicamente Cucurbitáceas (Palti & Cohen 1980). Afecta severamente a los géneros *Cucumis* sp. (melón y pepino), *Cucurbita* sp. (ayote, zapallo, zuchini, etc.) y *Citrullus* sp. (sandía) y es menos frecuente en 40 especies pertenecientes a otros 18 géneros (*Benincasa* sp., *Lagenaria* sp., *Luffa* sp., *Momordica* sp., etc.) (Chupp & Sherf 1960; Palti 1975).

Taxonomía

P. cubensis se clasifica en el orden y clase de los Peronosporales y Peronosporomycetes, pertenecientes al reino Chromista (Stramenopila) (Lebeda & Cohen, 2010). Dentro de los Peronosporomycetes se incluyen varios géneros de parásitos obligados como *Bremia* sp., *Peronospora* sp., *Plasmopara* sp., *Peronosclerospora* sp. y *Sclerospora* sp., todos causantes de mildiús velosos (Arauz, 1998).

Los Peronosporomycetes (descritos originalmente como Oomicetes) (Lebeda & Cohen, 2010) fueron considerados hongos verdaderos hasta alrededor de 1990, cuando fueron excluidos del Reino Fungi y reclasificados en el Reino Chromista. Sin embargo, estos organismos se siguen tratando como hongos verdaderos por sus muchas similitudes con éstos, principalmente su forma de causar enfermedades en las plantas (Agris 2005).

Morfología

Micelio hialino, cenocítico e intercelular que se desarrolla abundantemente en el mesófilo aunque también penetra el tejido de empalizada. Hifas con un diámetro de 5.4-

7.2 μ con haustorios pequeños y ovalados, algunas veces ramificados. Esporangióforos de 180-400 μ de longitud y 5-7 μ de ancho ensanchados en la base con tres ramificaciones dicotómicas que nacen en ángulos agudos en el extremo superior. Los esporangióforos emergen de los estomas en grupos de 1 a 5. Los esporangios varían de color grisáceo pálido a verde oliva o púrpura a negro y nacen uno a uno de las puntas de los esporangióforos. Son ovales a elipsoides (forma de limón) con una papila en el extremo distal y miden 20-40 μ x 14-25 μ . Cuando los esporangios germinan producen de 2-15 zoosporas biflageladas de 10-13 μ de diámetro y 50-95 μ de largo. Las oósporas (estructuras de resistencia) son globulares de color amarillo pálido de 22-42 μ de diámetro (Palti 1975; Palti & Cohen 1980) aunque su ocurrencia es rara en *P. cubensis* (Lebeda & Cohen 2010).

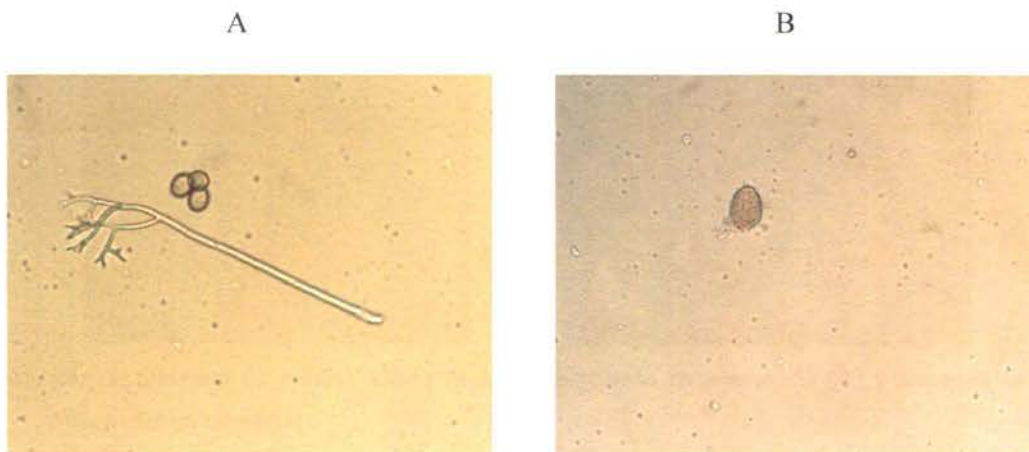


Ilustración 1. Fotografía tomada en el microscopio de un esporangióforo junto a algunos esporangios (A) y un esporangio en proceso de germinación (B).

Sintomatología

Los síntomas se presentan en hojas, raramente en frutos u otras partes de la planta. El síntoma inicial es un moteado color verde claro en las hojas (Palti 1975), que muchas veces tiene un aspecto acuoso (Celetti 2007). Este moteado se convierte en manchas amarillas delimitadas por las venas de las hojas; angulares en pepino o irregulares en el resto de especies (Main *et al.* 2001).

En el envés, los esporangióforos salen por los estomas llevando los esporangios en los extremos, lo que le da a la lesión un aspecto vellosito característico que varía de color blancuzco-gris (Palti 1975) a verde oliva-púrpura-negro. Con el tiempo las lesiones avanzan y se tornan necróticas (Bernhardt *et al.* 1988; Zitter *et al.* 1996). Las infecciones severas producen defoliación, decaimiento de la planta y pobre desarrollo de la fruta (Arauz 1998), dándole al cultivo un aspecto “encrepado” y un color café (Celetti 2007).

Los síntomas de la enfermedad varían considerablemente entre y dentro de las especies de cucurbitáceas (Zitter *et al.* 1996; Main *et al.* 2001).



Ilustración 2. Síntomas de mildiú vellosito en melón inoculado en laboratorio (A) y síntomas de la enfermedad en campo (B).

Ciclo de la enfermedad

El patógeno se disemina por medio de los esporangios que son acarreados a corta distancia por gotas de lluvia o se transmite a plantas sanas por trabajadores y herramientas contaminadas (Bernhardt *et al.* 1988). A distancias largas se diseminan por medio de corrientes de aire (Chupp & Sherf 1960; Main *et al.* 2001).

Cuando se presentan periodos prolongados de humedad y las temperaturas son frescas, los esporangios liberan las zoosporas que nadan en la lámina de agua hasta que encuentran los estomas y germinan (Zitter *et al.* 1996), produciendo un tubo germinativo y desarrollando abundante micelio en el tejido del hospedero.

El Peronosporomycete se desarrolla en un amplio rango de temperatura (5-30°C). La temperatura óptima para la producción de esporangios va de 15-20°C con presencia de elevada humedad y oscuridad (Celetti 2007).

Es posible que el patógeno subsista durante el invierno en hospederos silvestres o cultivados durante esta época (principalmente en invernadero), o desarrolle estructuras de resistencia e inclusive sobreviva por el inóculo que es transportado por corrientes de viento (Palti & Cohen 1980).

Los hospederos silvestres y los hospederos cultivados durante el invierno tienen un papel muy importante en el ciclo de la enfermedad porque mantienen el inóculo viable hasta el momento en que se cultive el hospedero estacional (Zitter *et al.* 1996).

Patogenicidad

El mildiú veloso de las cucurbitáceas causado por el Peronosporomycete *P. cubensis* fue reportado por primera vez en 1868 en Cuba y cerca de 20 años más tarde en Japón (Chupp & Sherf 1960; Palti & Cohen 1980).

En los años siguientes la enfermedad se encontró en Israel, India y USA y se expandió tanto como la producción comercial de cucurbitáceas. En la actualidad se considera que la enfermedad está distribuida alrededor del mundo (Lebeda & Widrechner 2003a).

Al día de hoy, se han realizado diversas investigaciones principalmente en Israel, Japón, India, USA y República Checa. Sin embargo, la información relacionada a la patogenicidad y virulencia de *P. cubensis* en otros lugares sigue siendo muy limitada. Yosito (sf) inoculó pepino (*Cucumis sativus*), calabaza (*Cucurbita moschata*) y otras cucurbitáceas cultivadas y silvestres con aislamientos de *P. cubensis* provenientes de pepino y calabaza. La respuesta de las plantas fue muy variada, por lo que el autor concluyó, sin duda, que los aislamientos estudiados representan razas fisiológicas del patógeno diferentes entre sí.

Shetty *et al.* (2002) tomó un grupo de híbridos de pepino que mostraban resistencia al mildiú vellosa, desarrollados en regiones particulares de USA, Polonia, China e India y las evaluó contra aislamientos de *P. cubensis* provenientes de USA, India y Polonia, tanto en condiciones de campo como invernadero. Los híbridos mostraron diferencias en la expresión de resistencia al patógeno proveniente de diferentes localidades, evidenciando que los aislamientos obtenidos localmente representaban diferentes patotipos del patógeno.

Thomas *et al.* (1987b) inoculó aislamientos de *P. cubensis* procedentes de Japón, Israel y USA, en 26 cultivares pertenecientes a 7 géneros y 13 especies de cucurbitáceas. Las plantas reaccionaron de manera distinta a los aislamientos procedentes de lugares diferentes por lo que se concluyó que existían diferentes razas fisiológicas o patotipos del patógeno.

Con base en los resultados obtenidos, este autor propuso un grupo de variedades diferenciales (cucurbitáceas) para determinar 5 patotipos del organismo, dependiendo de la interacción que tuviera el mismo con cada variedad (Cuadro 1). En esta investigación se concluyó que los aislamientos procedentes de Japón pertenecían a los patotipos 1, 2 y 3; el aislamiento de Israel al patotipo 3 y los aislamientos de USA a los patotipos 4 y 5. Además, se demostró que los resultados de otros autores en investigaciones anteriores calzaban dentro de la designación de patotipos propuesta.

Cuadro 1. Interacción de plantas cucurbitáceas con patotipos de *Pseudoperonospora cubensis*.

Hospedero	Patotipo				
	1	2	3	4	5
<i>Cucumis sativus</i>	+	+	+	+	+
<i>C. melo</i> var. <i>reticulatus</i>	+	+	+	+	+
<i>C. melo</i> var. <i>conomon</i>	-	+	+	+	+
<i>C. melo</i> var. <i>acidulus</i>	-	-	+	+	+
<i>Citrullus lanatus</i>	-	-	-	+	+
<i>Cucurbita</i> spp.	-	-	-	-	+

+ = Interacción hospedero-patógeno altamente compatible.

- = Interacción hospedero-patógeno incompatible o levemente compatible.

*Tomado de Thomas *et al.*, 1987b.

Utilizando este grupo de diferenciales Angelov *et al.* (2000) encontró que en Bulgaria existen los patotipos 1 y 2 en pepino (*Cucumis sativus*); en Italia Capelli & Buonario (2003) estudiaron cuatro aislamientos de *P. cubensis* en calabaza (*Cucurbita pepo*) provenientes de diferentes localidades. Al inocular el patógeno sobre diferentes variedades de cucurbitáceas, observaron los síntomas de la enfermedad en todas las plantas, por lo que concluyó que los aislamientos estudiados pertenecían al patotipo 5. Épinat & Pitrat (1994) utilizaron aislamientos de *P. cubensis* provenientes de Francia clasificados como el patotipo 3 para investigar la herencia de resistencia al patógeno en melón y Thomas & Jourdain (1992) utilizaron una subpoblación de un aislamiento de *P. cubensis* perteneciente al patotipo 5 para investigar el efecto de la presión de selección sobre la esporulación del patógeno.

Sin embargo, estudios recientes muestran que en la interacción hospedero-*P. cubensis* y la variabilidad en la virulencia del patógeno son amplias (Lebeda 1999), ya que se han encontrado patotipos que no necesariamente están dentro de la clasificación propuesta por Thomas *et al.* (1987b).

Cohen *et al.* (2003) encontraron *P. cubensis* atacando pepino y melón en Israel durante los años 1979-2001 y lo clasificaron como el patotipo 3. Sin embargo, en el año 2002 hubo un ataque severo en *Cucurbita moschata* y *Cucurbita pepo* subsp. *pepo*. Esta nueva población de *P. cubensis* fue clasificada como un nuevo patotipo (Patotipo 6) porque mostraba alta compatibilidad con pepino, melón y calabaza y baja compatibilidad con sandía.

Un estudio comparativo sobre la reacción de 26 genotipos representando 7 géneros de cucurbitáceas contra aislamientos de *P. cubensis* provenientes de USA, Israel y Japón, reveló la existencia de diferentes razas entre aislamientos (Lebeda 1999).

Con el uso de un grupo de plantas diferenciales pertenecientes a 5 géneros de cucurbitáceas, Lebeda & Gadasová (2002) reconocieron una diferencia sustancial en la expresión fenotípica de la virulencia, siendo los aislamientos de España y República

Checa los más virulentos. Lebeda (1999) y Lebeda & Gadasová (2002) concluyen que los aislamientos en estudio podrían estar representando nuevos patotipos de *P. cubensis*.

La posible existencia de una mayor cantidad de razas del patógeno, y tomando en cuenta que la investigación realizada por Thomas *et al.* (1987b) era preliminar y exponía carencias con respecto a las descripciones taxonómicas del grupo, la uniformidad en su respuesta diferencial y su disponibilidad; se desarrolló un grupo de diferenciales mejorado.

Lebeda & Gadasová (2002) y Lebeda & Widrlechner (2003a) proponen un nuevo grupo que incluye 12 genotipos de seis géneros de cucurbitáceas (*Cucumis* sp., *Citrullus* sp., *Cucurbita* sp., *Benincasa* sp., *Luffa* sp. y *Lagenaria* sp.) (Cuadro 2) para la caracterización de la variación de la virulencia de *P. cubensis*. La interacción hospedero-*P. cubensis* normalmente muestra una clara relación de compatibilidad o incompatibilidad, lo que permite la caracterización de los patotipos y razas del patógeno de acuerdo al patrón específico de respuesta (Lebeda & Widrlechner 2003a; Lebeda *et al.* 2006).

La investigación de Lebeda & Widrlechner (2003a,b) brinda una clara especificación acerca de cada miembro del grupo de plantas diferenciales y posibilita la adquisición de las mismas de un banco de genes. Asimismo, estos autores incluyen una amplia información sobre la caracterización taxonómica de los géneros, la especificidad de la interacción hospedero-*P. cubensis* y la variabilidad patogénica del Peronosporomycete.

Cuadro 2. Características del grupo de variedades diferenciales para la determinación de la variabilidad patogénica de *P. cubensis*.

Nº	Variedad	Nombre del Cultivar	Origen
1	<i>Cucumis sativus</i>	‘Marketer 430’	USA
2	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	‘Ananas Yokneam’	Israel
3	<i>C. melo</i> var. <i>conomon</i>	‘Baj-Gua’	Japón
4	<i>C. melo</i> var. <i>acidulus</i>		Myanmar
5	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i>	‘Dolmalik’	Turquía
6	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>		USA
7	<i>C. pepo</i> var. <i>fraterna</i> ^V		México

8	<i>C. máxima</i>	'Goliáš'	Checoslovaquia
9	<i>Citrullus lanatus</i>	'Malali'	Israel
10	<i>Benincasa hispida</i>		USA
11	<i>Luffa cylindrica</i>		?
12	<i>Lagenaria siceraria</i>		?

1/Descrita originalmente como *Cucurbita fraterna*.

*Tomado de Lebeda & Widrlechner 2003.

Utilizando este nuevo grupo de diferenciales, Lebeda & Gadasová (2002) describieron al menos 13 patotipos de *P. cubensis* encontrados en 22 aislamientos provenientes de República Checa, Francia, España y Holanda, de los cuales sólo el aislamiento proveniente de Francia se pudo clasificar dentro de los 5 patotipos descritos por Thomas *et al.* (1987b). Estos resultados demuestran una amplia variación en la patogenicidad de *P. cubensis*.

Variabilidad en la relación hospedero-patogeno

A continuación se presenta el estado actual del conocimiento acerca de la variabilidad en la interacción hospedero – patógeno, así como la especificidad de esta interacción.

1. *Cucumis* sp.

Este género está conformado por 32 especies (Kirkbridge 1993), de las cuales *Cucumis sativus* y *C. melo* son las más importantes económicamente.

1.1. *Cucumis sativus* (Pepino):

Se han realizado estudios para detectar la presencia de resistencia en materiales de *Cucumis sativus*, sin embargo, aún no ha sido posible encontrar una fuente efectiva de resistencia (Lebeda 1999; Lebeda & Widrlecher 2003). Investigaciones recientes sugieren que los híbridos de *C. sativus* generados por mejoramiento genético son altamente susceptibles a los aislamientos de *P. cubensis* provenientes de la República

Checa (Lebeda 1999). Por esta razón, los genotipos de *C. sativus* se usan únicamente como el control susceptible en la mayoría de investigaciones (Lebeda *et al.* 2006).

La interacción *C. sativus*-*P. cubensis* tiene una variación relativamente baja, lo que limita las oportunidades para el desarrollo de variedades resistentes al mildiú veloso (Lebeda 1999). El mecanismo de la interacción raza – específica de la interacción *C. sativus*-*P. cubensis* se desconoce (Lebeda *et al.* 2006).

A pesar de que aún no se ha encontrado resistencia al mildiú veloso en materiales de pepino, la búsqueda debe continuar porque existe la posibilidad de que haya resistencia en variedades no comerciales, silvestres (Shetty *et al.* 2002), o provenientes del mejoramiento genético (Thomas *et al.* 1988; Angelov & Krasteva 2000b).

1.2 *Cucumis melo* (Melón):

Cucumis melo posee una considerable variación intraespecífica a nivel morfológico, genético y molecular (Lebeda *et al.* 2006). Es la única especie dentro del género *Cucumis* sp. donde la interacción raza-específica hacia *P. cubensis* es conocida (Palti & Cohen 1980; Thomas *et al.* 1987b; Lebeda & Widrlechner 2003a) y existen fuentes de resistencia efectivas (Lebeda 1999).

Se ha logrado desarrollar híbridos de melón resistentes usando métodos de selección basados en la herencia de resistencia (Thomas *et al.* 1988; Épinat & Pitrat 1994) y se han identificado algunos genes responsables de la resistencia a *P. cubensis* en este cultivo (Angelov & Krasteva 2000a), abriendo la posibilidad de crear estrategias más rápidas para la creación de híbridos de melón comerciales altamente resistentes.

Lebeda *et al.* (2007) estudiaron 52 líneas de *C. melo* contra 8 aislamientos de *P. cubensis*, los cuales representaban 8 patotipos del patógeno con niveles de patogenicidad bajos, medios y altos. Hubo relativamente baja variabilidad en los patrones de respuesta a los aislamientos del patógeno utilizados. Del total de las líneas estudiadas 39 fueron altamente susceptibles y sólo un híbrido fue altamente resistente a 7 de los 8 aislamientos utilizados. El resto de híbridos mostró reacciones heterogéneas o resistencia incompleta.

2. *Cucurbita* sp.

Este género incluye 14 especies (Lebeda & Widrlechner 2004), de las cuales al menos cinco especies que se cultivan comercialmente para consumo vegetal, producción de aceites, forrajes y como ornamental. *Cucurbita* sp. posee una gran variabilidad taxonómica (Lebeda *et al.* 2006), sin embargo, sólo tres especies han sido reportadas como hospederas naturales de *P. cubensis* (Palti & Cohen 1980).

Las poblaciones silvestres de este género normalmente poseen genes de resistencia a enfermedades que son desconocidos o extremadamente raros en especies domesticadas. La investigación en el mejoramiento para el desarrollo de especies comerciales resistentes a la enfermedad es limitada (Lebeda & Widrlechner 2004).

Lebeda & Widrlechner (2004) investigaron la respuesta de un grupo de 97 variedades que representaban 14 especies de cucurbitáceas, la mayoría variedades silvestres y malezas contra 11 aislamientos de *P. cubensis* (representando 9 patotipos) con el fin de identificar genes de resistencia y definir la interacción *Cucurbita* sp. – *P. cubensis*. Hubo amplia variación en la respuesta de las plantas, de un total de 97 variedades estudiadas, 13 presentaron resistencia completa al patógeno y 12 fueron completamente susceptible.

Lebeda & Křístková (2000) estudiaron la respuesta al mildiú veloso y al mildiú polvoso de 8 cultivares de *Cucurbita pepo*, cada uno perteneciente a un morfotipo diferente relacionado con la forma del fruto comestible. El grado de resistencia/susceptibilidad a ambas enfermedades se expresó de acuerdo a la intensidad de esporulación. El zucchini, “cocozele” y “vegetable marrow” fueron altamente resistentes al mildiú veloso mientras que *C. pepo* fue el más susceptible a los mildiús estudiados. En general, se presentó una relación inversa en la respuesta a ambos mildiús. La mayoría de las variedades estudiadas demostró tener una interacción raza/patotipo-específica con *P. cubensis* (Lebeda & Křístková 2000; Lebeda & Widrlechner 2004).

3. Otras Cucurbitáceas

Los géneros *Citrullus colocynthis*, *C. lanatus*, *Benincasa hispida*, *Luffa acutangula*, *L. aegyptiaca*, *Lagenaria siceraria* y *L. sphaerica* han sido registrados como hospederos naturales de *P. cubensis* (Palti & Cohen 1980).

El género *Citrullus* sp. está representado por cuatro especies (Lebeda & Widrlechner 2003a). De éstas, *Citrullus colocynthis* y *C. lanatus* han demostrado tener altos niveles de resistencia o tolerancia a enfermedades fungosas, sin embargo, la presencia de resistencia a *P. cubensis* y el patrón de la interacción raza-específica con el patógeno aún no se conoce (Lebeda & Widrlechner 2003; Lebeda *et al.* 2006).

Los estudios realizados sobre *Benincasa hispida* son escasos (Lebeda & Widrlechner 2003a) sin embargo, la interacción raza-específica de *P. cubensis* ha sido demostrada (Thomas *et al.* 1987a) aunque no se cuenta con información acerca de la genética de la resistencia hasta el momento (Lebeda & Widrlechner 2003a).

El género *Luffa* sp. incluye 7 especies (Lebeda & Widrlechner 2003a). La interacción raza-específica con *P. cubensis* es conocida (Thomas *et al.* 1987b; Lebeda & Gadasová 2002). Existen registros que indican ataques severos de *P. cubensis* en *L. acutangula* y *Luffa* sp. en China (Cohen *et al.* 2003), sin embargo, el conocimiento acerca de la resistencia a la enfermedad es limitado.

Se han encontrado 6 especies dentro del género *Lagenaria* sp. (Lebeda & Widrlechner, 2003a). *Lagenaria siceraria* (“jícara” o “bottle gourd”) está reportada como hospedero natural de *P. cubensis* (Choi & Shin 2008). Este cultivo muestra una interacción raza-específica con el patógeno bien definida (Lebeda & Gadasová 2002; Cohen *et al.* 2003), sin embargo, el conocimiento acerca de la resistencia al patógeno sigue siendo limitado (Lebeda *et al.* 2006).

El grupo de diferenciales permite la caracterización de los patotipos de *P. cubensis*, no obstante, es importante recalcar que todavía no se ha desarrollado un grupo de plantas diferenciales para la caracterización de las razas. Los géneros *Cucumis* sp., *Cucurbita*

sp. y *Citrullus* sp. son candidatos para la ampliación de este grupo (Lebeda & Widrlechner 2003a).

Lebeda *et al.* (2003a) aclaran que la diferenciación de patotipos y razas de *P. cubensis* es un trabajo todavía en proceso y existen razones para creer que el grupo de diferenciales propuesto hasta ahora está incompleto, pues los registros de la variación patogénica de *P. cubensis* están disponibles sólo para algunos lugares como la República Checa, India, Israel, Japón y USA y se desconoce la variación del patógeno en otros lugares del mundo (Lebeda *et al.* 2006).

Variabilidad en la Patogenicidad de *P. cubensis*

Lebeda & Urban (2007) analizaron la variabilidad patogénica en 152 aislamientos de *Pseudoperonospora cubensis* en pepino provenientes de 10 regiones de la República Checa, colectados durante tres años consecutivos. Hubo un incremento considerable en la patogenicidad de *P. cubensis* que se expresó en una elevada complejidad de los patotipos que además, incrementaron en frecuencia, aunque la diversidad poblacional del patógeno decreció. *Cucumis sativus* y *C. melo* no mostraron resistencia a ninguno de los aislamientos estudiados, mientras que *Cucurbita pepo* y *Citrullus lanatus* mostraron gran variación en susceptibilidad, siendo de los géneros más resistentes. Los autores sugieren que un buen diagnóstico y buen conocimiento del cambio temporal de la patogenicidad y la resistencia a fungicidas pueden ser la base del manejo integrado para el cultivo de cucurbitáceas.

Thomas & Jourdain (1992) estudiaron el efecto que tiene la presión de selección influida por los hospederos sobre la virulencia de *P. cubensis*. Hubo pérdida de virulencia al mantener por 8 generaciones un aislamiento de *P. cubensis* proveniente de calabaza en melón. En esta investigación se concluye que mantener al patógeno en un hospedero particular (diferente al original), puede ejercer presión de selección sobre la virulencia del patógeno y alterar el espectro de virulencia de un aislamiento particular en pocas generaciones.

Existen dos sistemas en el ciclo de la enfermedad que también afectan la selección de virulencia hacia hospederos específicos. Estos son el hospedero estacional y el

hospedero invernal. Estos componentes estabilizan la selección de genes de virulencia en las poblaciones del patógeno. Así, un gen de virulencia que es muy alto en la población del patógeno disminuirá en frecuencia, y un gen que está en una baja proporción en dicha población tendrá la tendencia a aumentar en frecuencia, lo que explica en parte la ocurrencia de diferentes patotipos del patógeno en diferentes regiones geográficas (Thomas *et al.* 1987b; Thomas & Jourdain 1992). Cada genotipo de un hospedero puede diferir de otro por la presencia de alelos de resistencia, los cuales interactúan con el correspondiente gen de avirulencia del patógeno, influyendo en la variabilidad de virulencia del patógeno (Lebeda *et al.* 2006).

Por ejemplo, en Estados Unidos el inóculo es acarreado por corrientes de viento de los hospederos invernales hacia las zonas de cultivo. Conforme progresa la época de cultivo, las poblaciones de hospederos estacionales ejercen presión de selección sobre las poblaciones del patógeno que fueron acarreadas de los hospederos invernales, de manera que la virulencia cambia y difiere de la virulencia de la población del patógeno que fue acarreada (Main *et al.* 2001).

Thomas & Jourdain, (1992) encontraron que un aislamiento de *P. cubensis* del patotipo 5 proveniente de *Cucurbita pepo* perdió virulencia al ser mantenido en *Cucumis melo* por 61 generaciones, lo que ejemplifica la presión de selección ejercida por el hospedero. El autor agrega la frecuencia de ocurrencia de un determinado hospedero es un componente ambiental que contribuye a las divergencias en la distribución del patógeno en un cultivo en varios lugares diferentes.

MATERIALES Y METODOS

1. REPRODUCCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE *P. cubensis*

Material vegetal

Se cultivaron plantas sanas de melón en invernadero, bajo condiciones de humedad relativa superior al 85%, temperaturas entre los 17 y 29°C y con un fotoperiodo de 12 horas. Las plantas se sembraron directamente en potes de 6 x 6cm en suelo abonado y se regaron con agua potable cada día o cada dos días dependiendo de la humedad contenida en el suelo y se fertilizaron cuando fue necesario. Se les aplicó Bayleton (1.5g/L) en las ocasiones que hubo presencia de mildiú polvoso (*Erysiphe cichoracearum*, *Sphaerotheca fuliginea*) y Vertimec (1cc/L) cuando hubo infestación por ácaros.

Pseudoperonospora cubensis

Durante el año 2009 se colectaron aislamientos de *P. cubensis* en dos fincas productoras de melón. Una finca perteneciente a un productor independiente se ubica en Tárcoles de Puntarenas, la otra se ubica en Nandayure de Guanacaste y pertenece a la empresa Guanadulce.

En campo, se colectaron hojas de melón con síntomas de mildiú veloso y se colocaron en papel humedecido dentro de bolsas plásticas. Para evitar la deshidratación de las hojas, las muestras se colocaron en una hielera para ser transportadas de la finca al laboratorio, donde se mantuvieron en refrigeración (4°C) dentro de la bolsa de uno a tres días.

A partir de la metodología propuesta por Oerke *et al* (2006) y Thomas *et al* (1987a) se desarrolló un protocolo que permitiera aumentar y almacenar el inóculo traído del campo por medio de inoculaciones del patógeno en plantas sanas de melón.

1.1 Protocolo para la reproducción y mantenimiento de aislamientos de *P. cubensis*

Cultivo de plantas sanas

1. Sembrar plantas de melón directamente o en almácigo y luego trasplantar. Se deben cultivar en un sustrato o suelo libre de patógenos y deben contar con una nutrición adecuada.
2. Las plantas deben permanecer en el invernadero cerca de 22 días o hasta que desarrollen por completo la segunda hoja verdadera.

*Debido a que el ciclo desde la inoculación hasta la producción de nuevo inóculo dura de 4 a 7 días, se debe iniciar la siembra de nuevas plantas semanalmente.

Preparación de la suspensión de esporas

3. Colocar las hojas sintomáticas en una cámara húmeda. Colocar toallas de papel humedecido en el fondo de una caja plástica y sobre éstas colocar una rejilla para evitar que las hojas tengan contacto con las toallas húmedas. Colocar las hojas sintomáticas sobre la rejilla con el lado abaxial hacia arriba y tapar la caja de manera que cierre herméticamente.
4. Colocar la caja plástica en una cámara incubadora en oscuridad a 18°C durante 24 horas para inducir la esporulación.
5. Sacar la caja de la cámara incubadora. Colocar una hoja en un plato Petri agregándoles algunas gotas de agua ultra pura (bidestilada y bidesionizada) en una única lesión que tenga abundante esporulación. Es importante buscar una lesión aislada de otras para asegurar que se está obteniendo muestra de un único aislamiento.

6. Con ayuda de un pincel, desprender los esporangios de la lesión de manera que con una pipeta Pasteur pueda recoger el agua con esporangios del plato Petri y colocarla en un beaker. Identifique el aislamiento.

*Cuando ya se ha obtenido esporangios de hojas inoculadas con un único aislamiento, el paso 6 se puede realizar con ayuda de una unidad Preval Spray Gun (Precision Valve Corporation, Yonkers, NY): Colocar agua ultrapura en la unidad limpia del Preval Spray Gun y rociar las lesiones con el aparato para desprender los esporangios. Con una pipeta Pasteur traspasar el agua con esporangios del plato Petri a un beaker.

Cuantificación del inóculo

7. Colocar un cubreobjetos sobre un hematocímetro.
8. Agitar la suspensión de esporangios contenida en el beaker y con una pipeta Pasteur colocar una gota de la suspensión a cada lado del hematocímetro.
9. Colocar el hematocímetro en el microscopio para contar los esporangios. Se deben contar los esporangios de los 5 cuadrantes principales, o sea, el cuadrante central y los cuatro cuadrantes que se extienden de las esquinas del cuadrante central.
10. Para saber la concentración de la suspensión, se debe multiplicar la sumatoria de esporangios contados por 2000. La concentración de la suspensión se debe ajustar a 5×10^3 utilizando la ecuación:

$$\text{Concentración} \times \text{Volumen} = \text{Concentración}_1 \times \text{Volumen}_1$$

*Si al realizar el conteo de esporas la suspensión tienen una concentración menor a 5×10^3 , se deben repetir los pasos 5 y 6 para aumentar la cantidad de inóculo de la suspensión.

Inoculación de las plantas sanas

11. Colocar la suspensión de esporangios en una unidad Preval Spray Gun limpia y rocíe el lado abaxial de las hojas con el aparato de manera que queden humedecidas uniformemente.
12. Colocar las plantas inoculadas dentro de bolsas plásticas, asegurándose que tengan el sustrato con suficiente humedad. Cerrar las bolsas plásticas con un nudo para brindar a las plantas una humedad relativa del 100%.
13. Colocar las plantas en una cámara incubadora en oscuridad a 18°C durante 24 horas para facilitar la infección.
14. Pasado este tiempo, sacar las plantas de las bolsas y colocarlas en un invernadero con riego por aspersión. Se deben hacer riegos frecuentes de poca duración para proveer a las plantas un ambiente húmedo.
15. Las plantas deben permanecer en el invernadero hasta que muestren síntomas iniciales de la enfermedad, esto es cerca de 4 a 7 días después de la inoculación.
16. Cuando hay presencia de síntomas, poner la planta nuevamente en una bolsa plástica cerrada para crear un ambiente 100% húmedo y colocarla en una cámara incubadora en oscuridad a 18°C durante 24 horas para inducir la esporulación.
17. Cuando las hojas están esporuladas se deben almacenar o repetir los pasos 5 y 6 para hacer una suspensión de esporas y los pasos de 11 al 15 para inocular el patógeno nuevamente en plantas de melón sanas.

*Los pasos del 1 al 17 se realizan para reproducir y mantener el inóculo fresco.

Almacenamiento del patógeno

18. Colocar en el fondo de un plato Petri papel filtro seco. Colocar las hoja con lesiones esporuladas sobre el papel filtro, con el lado abaxial hacia arriba y sellar el plato Petri con papel parafilm. Cada muestra debe estar identificada.

19. Colocar los platos Petri a -20°C durante 24 horas y pasado este tiempo almacenar a -80°C . El patógeno almacenado tiene una viabilidad cercana a los 6 meses. Es importante antes de congelar el tejido esporulado asegurarse que no haya presencia de agua libre. Si la hubiese, la muestra se debe dejar secando un par de minutos para que el agua libre desaparezca antes de colocarla en refrigeración.

*El patógeno también se puede mantener en refrigeración a -20°C , con la desventaja que permanece viable por un periodo mucho menor a los 6 meses.

20. Para utilizar el material congelado se debe sacar de refrigeración y dejar descongelar por algunos minutos. Una vez que la hoja está descongelada se deben repetir los pasos 5 y 6 para preparar la suspensión de esporangios.

2. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS.

Material vegetal

Se utilizó el set de plantas diferenciales propuesto por Lebeda & Widrlechner (2003a) y Lebeda & Gadasová (2002) (Cuadro 2) que incluye cuatro especies del género *Cucumis*

sp., cuatro especies del género *Cucurbita* sp. y cuatro especies más pertenecientes a los géneros *Citrullus* sp., *Benincasa* sp., *Luffa* sp. y *Lagenaria* sp. Las variedades *Cucurbita pepo* var. *pepo* y *C. máxima* fueron facilitadas por el CATIE.

Los 12 hospederos se cultivaron en invernadero bajo las mismas condiciones en que se cultivaron las plantas de melón sanas. Antes de la siembra se aplicó Vitavax a las semillas de manera preventiva. Los diferenciales se cultivaron siguiendo la misma metodología que se describió anteriormente para el cultivo de las plantas de melón sanas.

Se cultivaron 10 repeticiones por cada uno de los cuatro aislamientos de *P. cubensis* a inocular. La siembra de las 40 plantas de cada variedad se realizó de manera escalonada (una variedad diferencial por semana), así que las inoculaciones también se realizaron de manera escalonada.

Una vez que las plantas tuvieron la segunda hoja verdadera totalmente expandida se llevaron al laboratorio para ser inoculadas.

Pseudoperonospora cubensis

Se utilizó el protocolo para la reproducción y mantenimiento de aislamientos de *P. cubensis* para desarrollar dos aislamientos de mildiú veloso procedente de la zona de Tárcoles (denominados T1 y T2) y dos aislamientos de la zona de Nandayure (denominados N1 y N2).

Las hojas sintomáticas traídas de campo se colocaron en cámara húmeda dentro de una incubadora con las condiciones necesarias para inducir la esporulación del Peronosporomycete (pasos 3 y 4).

Una vez esporuladas, se tomaron dos hojas enfermas por cada localidad y en cada una se buscó una única lesión aislada para hacer una suspensión de esporas (pasos del 5 y 6) que luego fue inoculada en plantas de melón sanas (pasos del 11 al 16).

La preparación de la suspensión de esporas, cuantificación del inóculo e inoculación de las doce variedades diferenciales se llevó a cabo siguiendo el protocolo de reproducción y mantenimiento de aislamientos de *P. cubensis* mencionado anteriormente en este trabajo.

Después del periodo de infección las plantas se sacaron de la bolsa y permanecieron en la cámara incubadora durante 6 días, con fotoperiodo de 12 horas con temperaturas de 21°C día/18°C noche y riego con agua potable cada dos o tres días. Al sexto día las plantas se colocaron nuevamente en bolsas y se dejaron 24 horas en la cámara en oscuridad a 18°C para inducir la esporulación.

Evaluación

Al sétimo día las plantas se sacaron de las bolsas y se evaluó la intensidad de la esporulación de manera visual siguiendo los parámetros descritos por Thomas *et al* (1987a) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tipos de reacción (RT) de plantas con repuesta diferencial al ataque del mildiú veloso de las cucurbitáceas (*P. cubensis*).

Tipo de reacción		Descripción
1	+	Lesión de 10-15mm, clorótica con abundante esporulación
2	(+)	Lesiones con características de reacción intermedias entre el Tipo 1 y el Tipo 3
3	(-)	Lesión de 3-4mm, con apariencia acuosa y escasa esporulación.
4	-	Lesión de 1mm, clorótica y esporulación extremadamente limitada o ausente.

*Tomado de Thomas *et al.* 1987a.

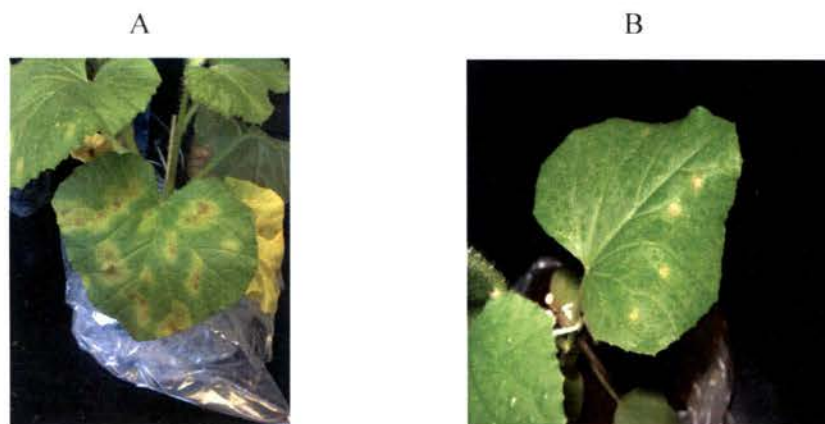


Ilustración 3. Reacción de susceptibilidad (A) y reacción de resistencia (B) en plantas de melón inoculadas con *P. cubensis*.

Cada aislamiento fue caracterizado con un código numérico (Lebeda & Widrlechner, 2003a) basado en el número de respuestas de susceptibilidad que presentó el grupo de plantas diferenciales al inocularse con cada uno de los aislamientos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Conformación del código numérico para la caracterización de patotipos de *P. cubensis* de acuerdo al grupo de plantas diferenciales con respuesta de susceptibilidad.

Subgrupos de Diferenciales	1. <i>Cucumis</i> spp.				2. <i>Cucurbita</i> spp.				3. Otras cucurbitáceas				Código único
	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Número del diferencial	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Valor	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8	

*Tomado de Lebeda & Widrlechner 2003a.

El código se compone de tres valores separados entre sí por puntos, debido a que el grupo de 12 diferenciales es subdividido en tres grupos (*Cucumis* sp., *Cucurbita* sp. y otras cucurbitáceas) (Cuadro 4), con el fin de que al ver el código se pueda inferir a cuales géneros es más virulento el aislamiento caracterizado.

Los códigos se asignaron de la siguiente manera:

1. Se identificaron las reacciones de susceptibilidad que presentó el grupo de diferenciales al inocular las plantas con un mismo aislamiento.

2. Luego, se asignó un valor (Cuadro 4) que corresponde a la(s) cucurbitácea(s) en donde se presentó la reacción de susceptibilidad.
3. Los valores fueron sumados para cada uno de los subgrupos establecidos en el cuadro 4, de manera que cada código quedó compuesto por tres dígitos, cada uno relacionado a los tres subgrupos de diferenciales, de la forma:

$$(\sum Cucumis spp.).(\sum Cucurbita spp.).(\sum Otras cucurbitáceas)$$

3. SUSCEPTIBILIDAD DEL MELÓN A OTROS AISLAMIENTOS.

Material vegetal

Se utilizaron plantas sanas de melón. El método de cultivo fue descrito anteriormente en este trabajo.

Pseudoperonospora cubensis

Se utilizaron aislamientos de *P. cubensis* provenientes de cucurbitáceas diferentes al melón, de diferentes zonas del país (Cuadro 6). De la zona de Cartago se colectaron muestras de mildiú veloso en zucchini y zapallo y proveniente de la Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno ubicada en la Provincia de Alajuela, se colectó en ayote. Estos tres cultivos pertenecen al género *Cucurbita* sp. En la finca Guanadulce en Guanacaste se encontró mildiú veloso en una maleza conocida como meloncillo (*Cucumis* sp.) y en la zona de Zarcero, cultivado en invernadero, se colectó *P. cubensis* en pepino.

La recolección de las muestras se realizó siguiendo la metodología descrita en el punto 1 de Materiales y Métodos.

La preparación de la suspensión de esporas y la inoculación de las plantas de melón para cada aislamiento se llevó a cabo siguiendo el protocolo de reproducción y mantenimiento de aislamientos de *P. cubensis* mencionado anteriormente en este trabajo.

Evaluación

Las plantas esporuladas fueron evaluadas de acuerdo al tipo de reacción que presentó el melón a la inoculación con *P. cubensis* (Cuadro 3).

La hoja 1 y hoja 2 de cada planta se evaluó por separado, así que a cada planta se le asignó un valor de RT compuesto por dos dígitos, donde el primer número representará el tipo de reacción de la hoja 1 y el segundo dígito el tipo de reacción de la hoja 2.

RESULTADOS

1. REPRODUCCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE *P. cubensis*

Siguiendo el protocolo para la reproducción y mantenimiento de aislamientos de *P. cubensis* se ha logrado mantener viable desde diciembre del año 2009 hasta el día de hoy el inóculo traído de Tárcoles y Nandayure. Además, se ha logrado con éxito la reproducción del patógeno después de haber estado almacenado en refrigeración a -20°C y a -80°C.

2. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS.

En la evaluación de las variedades diferenciales se presentaron los cuatro tipos de reacción propuestos por Thomas *et al* (1987a) (Cuadro 5) y no hubo presencia de reacciones heterogéneas.

Cuadro 5. Tipo de reacción (TR) del grupo de variedades diferenciales a la inoculación con diferentes aislamientos de *P. cubensis*.

Variedades diferenciales	Aislamiento			
	N1	N2	T1	T2
<i>Cucumis sativus</i>	-	+	(+)	(+)
<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	-	+	(-)	(+)
<i>C. melo</i> var. <i>conomon</i>	(+)	+	+	+
<i>C. melo</i> var. <i>acidulus</i>	-	+	(-)	+
<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i>	-	-	-	-
<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	+	(+)	-	-
<i>C. pepo</i> var. <i>fraterna</i>	-	-	-	-
<i>C. máxima</i>	-	-	-	-
<i>Citrullus lanatus</i>	-	(+)	-	(-)
<i>Benincasa hispida</i>	(+)	-	-	-
<i>Luffa cilíndrica</i>	-	-	-	-
<i>Lagenaria siceraria</i>	-	-	-	-
código	4.2.2	15.2.1	5.0.0	15.0.0

Donde; N1 y N2: Aislamientos procedentes de Nandayure. T1 y T2: Aislamientos procedentes de Tárcoles. TR: + = susceptible, (+) = resistencia incompleta o reacción heterogénea, (-) = esporulación muy limitada y - = resistente. Códigos establecidos por Lebeda & Widrlechner 2003a.

Hubo variabilidad en la patogenicidad de los aislamientos.

Al ser inoculado en las plantas diferenciales, el aislamiento N2 produjo la mayor cantidad de respuestas de susceptibilidad, por lo que se considera el aislamiento más patogénico, seguido por los aislamientos T2, N1 y T1.

La característica que comparten los cuatro aislamientos estudiados es que lograron infectar más hospederos del género *Cucumis* sp. que hospederos de los géneros *Cucurbita* sp., *Citrullus* sp., *Benincasa* sp., *Luffa* sp. y *Lagenaria* sp.

Los aislamientos de Tárcoles mostraron afinidad únicamente a los hospederos pertenecientes al género *Cucumis* sp., mientras que los aislamientos de Nandayure mostraron una variabilidad mayor en cuanto a la afinidad con los hospederos.

El patógeno también mostró variación en la expresión de virulencia hacia un hospedero específico.

Todos los aislamientos fueron compatibles con *Cucumis melo* var. *conomon*, sin embargo, el tipo de reacción que presentó el hospedero a los diferentes aislamientos no fue la misma. Tres de los cuatro aislamientos fueron compatibles con *Cucumis sativus* y en este caso también hubo variación en el tipo de respuesta del hospedero hacia los aislamientos.

3. SUSCEPTIBILIDAD DEL MELÓN A OTROS AISLAMIENTOS

Se evaluó la intensidad de la esporulación en la hoja 1 y hoja 2 visualmente, de manera que el valor numérico que corresponde al tipo de reacción (TR) está compuesto por dos dígitos. El primer dígito corresponde al TR de la hoja 1 y el segundo corresponde al TR de la hoja 2.

Los tipos de reacción que se presentaron fueron mayormente de susceptibilidad y resistencia incompleta. Las plantas de melón fueron infectadas por todos los aislamientos de *P. cubensis* colectados en cucurbitáceas hospederas diferentes al melón (Cuadro 6).

Cuadro 6. Tipo de reacción (TR) del melón inoculado con aislamientos de *P. cubensis* colectados en cucurbitáceas diferentes al melón.

Cultivo original	Cultivo inoculado	Procedencia	TR
Ayote	Melón	Estación Experimental Fabio Baudrit, UCR	1.1
Meloncillo	Melón	Nandayure, Guanacaste	3.2
Zucchini	Melón	Cartago	1.1
Zapallo	Melón	Cartago	2.1
Pepino	Melón	Zarcero	2.2

Donde; 1 = susceptible, 2 = resistencia incompleta o reacción heterogénea, 3 = esporulación muy limitada, 4 = resistente.

El melón fue susceptible a los aislamientos de *P. cubensis* provenientes de ayote y zucchini, y mostró una reacción de resistencia incompleta al aislamiento proveniente de pepino. En relación a los aislamientos colectados en meloncillo y zapallo, el melón mostró diferentes tipos de reacción dependiendo de la hoja evaluada: una esporulación limitada y resistencia incompleta al aislamiento proveniente de meloncillo y una resistencia incompleta y susceptibilidad al aislamiento de zapallo.

Independientemente del tipo de reacción presentada, el patógeno colectado en las cinco cucurbitáceas diferentes al melón completó su ciclo de desarrollo al ser inoculado en plantas de melón sanas.

DISCUSION

1. REPRODUCCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE *P. cubensis*

A pesar de que *P. cubensis* es un patógeno obligado, la utilización del protocolo desarrollado en esta investigación permite la reproducción y mantenimiento de esporas del patógeno en el laboratorio. Los alcances de la metodología desarrollada se enlistan a continuación:

- La metodología es sencilla.
- Es de bajo costo. Los materiales básicos necesarios son la muestra de campo, plantas sanas del hospedero y agua ultrapura.
- Requiere equipo básico de laboratorio (cristalería, una cámara incubadora y un congelador).
- Permite el desarrollo de aislamientos lo que posibilita la caracterización del patógeno en una localidad dada.
- La susceptibilidad del material inoculado a contaminarse por otros organismos patógenos es muy baja.
- Permite conservar aislamientos del patógeno viables sin hacer inoculaciones en plantas durante cerca de seis meses.

Quizás una de las mayores dificultades durante el desarrollo de este protocolo fue definir e integrar las condiciones óptimas para el desarrollo del patógeno sin contar con el equipo de laboratorio utilizado por otros investigadores en el desarrollo de sus metodologías.

La falta de un “phytotron” (unidad que permite la programación simultánea de variables como temperatura y luz) hizo que el desarrollo de la metodología de reproducción fuera un reto. Como no se contaba con el “phytotron”, el periodo en que las plantas debían estar en ambiente controlado con fotoperiodo y temperaturas alternadas fue sustituido por un periodo en invernadero, que gracias a las condiciones ambientales del país funcionó a la perfección.

El problema que se presentó con mayor frecuencia fue la pérdida del inóculo. Cuando no se contaba con la metodología adecuada, las inoculaciones frecuentemente no lograban reproducir el patógeno. Debido a que tampoco se contaba con una metodología para el mantenimiento de las esporas, cada vez que una inoculación resultaba negativa fue necesario ir al campo para recolectar inóculo nuevo.

Cuando se ajustó el protocolo fue relativamente fácil desarrollar y mantener los aislamientos, sin embargo; debido al sobrecalentamiento de una cámara incubadora, se perdieron los cuatro aislamientos obtenidos hasta el mes de junio del 2009. Ya que la temporada melonera de ese año había concluido, fue necesario esperar hasta el inicio de la temporada 2010 para coleccionar nuevo inóculo del campo y poder desarrollar nuevos aislamientos del patógeno. Esto representó un atraso en la investigación de aproximadamente 6 meses. Tiempo después, un problema con el abastecimiento eléctrico hizo que se perdieran los aislamientos que se mantenía en refrigeración, no obstante; el material que se mantenía fresco en plantas fue suficiente para reproducir los aislamientos nuevamente.

El último inconveniente que se presentó fue que la cantidad de semilla de las variedades diferenciales disponible no era suficiente para la caracterización de los cuatro aislamientos. La solución a este problema fue reproducir la semilla de cada variedad en invernadero. Las variedades no son híbridos así que la reproducción se realizó autofertilizando cada variedad. Cuando una flor femenina estaba a punto de abrirse, ésta se cubrió con una bolsa de papel para evitar que se contaminara con material genético no deseado y al día siguiente dicha bolsa fue retirada para fertilizar la flor con polen de flores macho de la misma planta. Una vez que el fruto estuvo maduro, se extrajo la semilla, se lavó con agua y se colocó a 40°C durante 24 horas. La semilla seca se almacenó en triple bolsa en refrigeración a una temperatura aproximada de 4°C.

La reproducción de semilla fue exitosa para nueve de las doce variedades. De las variedades *C. melo* subsp. *melo*, *Cucurbita pepo* var. *pepo* y *C. máxima* no fue posible la obtención de semilla, por lo que se pidió la colaboración de los investigadores del Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones en Granos y Semillas de la Universidad de Costa Rica (CIGRAS) para reproducir estas variedades *in Vitro*. De las tres variedades solamente *C. melo* subsp. *melo* se pudo reproducir por este método.

Las variedades *Cucurbita pepo* var. *pepo* y *C. máxima* fueron facilitadas por el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) ya que en esta institución cuentan con un banco de germoplasma de cucurbitáceas.

2. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS.

La inoculación de diferentes aislamientos de *P. cubensis* en el grupo de cucurbitáceas con respuesta diferencial evidenció variabilidad en ambas direcciones de la interacción patógeno-hospedero.

La caracterización de los aislamientos de Costa Rica difiere a la caracterización hecha por Lebeda & Gadasová (2002) y Lebeda & Widrlechner (2003a) de más de 22 aislamientos colectados en República Checa, España, Francia y Los Países Bajos. Esto significa que la variación en la población del patógeno en el país es diferente a la variación que se encontró en los aislamientos de Europa. Es muy probable que factores como la disponibilidad de hospederos, las condiciones climáticas del país y ciertas características propias del oomicete, como su gran potencial evolutivo, hayan influido en la especialización de la interacción *P. cubensis* – Cucurbitáceas en nuestro territorio.

Los aislamientos mostraron diferentes patrones con respecto al número de hospederos que exhibieron reacciones de susceptibilidad, por lo que se considera que hubo variación en la patogenicidad de *P. cubensis*.

Los dos aislamientos de Tárcoles y un aislamiento de Nandayure mostraron mayor afinidad por *Cucumis* sp. Los cultivos pertenecientes a este género son considerados por muchos autores como altamente susceptibles a los patotipos de *P. cubensis* (Zitter *et al.* 1996; Thomas & Caniglia 1997; Lebeda 1999; Lebeda & Gadasová 2002; Lebeda & Widrlechner 2003a), probablemente debido a que el patógeno en estudio desarrolló especificidad hacia especies o subespecies de este género (Lebeda & Widrlechner 2003a; Lebeda & Gadasová, 2002).

Las variedades pertenecientes a los géneros *Cucurbita* sp., *Citrullus* sp., *Luffa* sp., *Benincasa* sp. y *Lagenaria* sp., si bien son hospederos naturales del *P. cubensis*, mostraron poca afinidad con los aislamientos del patógeno. Géneros como *Cucurbita* sp. y *Citrullus* sp. muestran poca susceptibilidad con poblaciones de *P. cubensis* probablemente porque poseen genes de resistencia a muchas enfermedades fungosas (Lebeda & Widrlechner 2004; Lebeda *et al.* 2006). Sin embargo, para el resto de los géneros mencionados no se cuenta con la información de la genética de la resistencia hasta el momento. En su investigación, Colucci (2008) demostró que aislamientos provenientes de *Cucumis* sp. son altamente compatibles con melón y pepino, y tienden a causar menos infecciones en *Cucurbita* sp.

La reacción de la inoculación de los diferentes aislamientos en un hospedero específico no siempre presentó la misma intensidad, por lo que se concluye que además de la variación patogénica hubo variación en la virulencia de *P. cubensis*.

La selección de genes de virulencia es un proceso que puede ser afectado por la presión que ejercen las poblaciones de hospederos existentes. En este caso, se podría esperar que la siembra comercial de melón haya ejercido algún efecto sobre la selección de genes de virulencia del patógeno en las localidades estudiadas. La información genética sobre la resistencia es limitada dado que todavía no se ha identificado la base genética de la variación de la virulencia (Lebeda & Cohen, 2010).

La información que existe hasta el día de hoy con respecto a la interacción entre *P. cubensis* y sus hospederos no permite el establecimiento definitivo de patotipos o razas, pero deja en claro que la variación que presenta esta interacción es mucho mayor de la que expuso Thomas *et al* (1987b) basado en el uso del primer grupo de diferenciales propuesto.

3. SUSCEPTIBILIDAD DEL MELÓN A OTROS AISLAMIENTOS.

El objetivo de evaluar cada hoja por separado fue poder predecir el comportamiento que tendrían las plantas sembradas en campo a los aislamientos de *P. cubensis*. La evaluación del tipo de reacción que presentan plantas de melón jóvenes a la inoculación

en laboratorio con *P. cubensis* presenta una alta correlación (76% en la evaluación de la hoja 1 y 89% en la hoja 2) con el tipo de reacción que presentan plantas de melón cultivadas en campo, con un estado de desarrollo de 10 hojas (Thomas *et al.* 1987a). Se podría predecir entonces, que las plantas en campo presentarían mayormente reacciones de susceptibilidad y resistencia incompleta de haber inóculo procedente *Cucumis* sp. o *Cucurbita* sp.

El melón mostró mayor susceptibilidad a los aislamientos provenientes de *Cucurbita* sp. que de *Cucumis* sp. Aunque el tipo de reacción no siempre fue de susceptibilidad, es claro que los aislamientos provenientes de cucurbitáceas diferentes al melón tienen la capacidad de infectar al melón. En momentos en que el hospedero estacional (melón) no esté disponible, cualquiera de estas cucurbitáceas podría actuar como un hospedero alternativo, manteniendo las poblaciones de *P. cubensis* en el campo.

El hecho que fuera posible infectar plantas de melón con inóculo proveniente de una maleza que se encuentra comúnmente en el campo, como lo es el meloncillo, significa que esta planta tiene la capacidad de mantener inóculo en el campo durante la época en que no se siembra melón. Así, es posible que el meloncillo y el melón voluntario sean hospederos alternos de *P. cubensis* y funjan como reservorio y fuente de inóculo al principio de la etapa melonera.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados de esta investigación indican que la población del patógeno en el país es variable y que esta variabilidad puede ser caracterizada exitosamente con el grupo de diferenciales, indicando la existencia de poblaciones o patotipos diferenciados dentro del territorio nacional.

La alta susceptibilidad de *Cucumis* sp. a aislamientos de *P. cubensis* en el país concuerda con lo reportado en la literatura (Zitter *et al.* 1996; Thomas & Caniglia 1997; Lebeda 1999; Lebeda & Gadasová 2002) y podría representar que los patotipos encontrados en el país podrían tener un origen común con algunos de los reportados en otras latitudes.

Inclusive, los patotipos caracterizados en esta investigación podrían corresponder con los patotipos descritos por Thomas *et al.* (1987b), de acuerdo al grupo de variedades diferenciales propuesta por este autor. Así, el aislamiento N2 podría corresponder al patotipo 5 mientras que el aislamiento T2 correspondería al patotipo 3. Sin embargo, los aislamientos N1 y T1 no corresponden a ningún patotipo de los descritos por Thomas *et al.* (1987b).

Por lo anterior, hay que tener en cuenta algunos aspectos importantes a la hora de interpretar los datos obtenidos:

- La caracterización hecha de los patotipos estudiados no es definitiva pues no se han realizado pruebas de campo que permitan su validación.
- La variabilidad presentada por el patógeno y su interacción con los diferentes hospederos no se ha establecido a nivel molecular.
- La funcionalidad del grupo de diferenciales es limitada ya que al día de hoy no incluye todos los géneros de hospederos importantes de *P. cubensis* y algunos de los géneros que lo componen no están definidos al nivel de especie.

Se puede concluir que los resultados de esta investigación brindan conocimiento acerca de la conformación de la población de *P. cubensis* en el país, así como su interacción con el melón y demás hospederos; todos ellos cultivos importantes en nuestro país. Sin embargo, la información disponible acerca de la interacción *P. cubensis* – *Cucurbitaceae* sigue siendo limitada, por lo que se recomienda dirigir esfuerzos a los siguientes aspectos:

1. Mantener los aislamientos caracterizados en esta investigación con el fin de realizar pruebas moleculares para conocer las características genéticas de la población de *P. cubensis* y poder complementar la información obtenida en esta información.
2. Coordinar con alguna institución para que se responsabilice de la reproducción y mantenimiento de la semilla del grupo de diferenciales, para que este material esté a disposición de los investigadores.
3. La caracterización de los patotipos también se debe realizar a nivel de campo.
4. Se sugiere dar a conocer la información generada en esta investigación a los productores de melón, para que conociendo mejor el comportamiento del patógeno se pueda hacer un mejor manejo del mismo en campo.

LITERATURA CITADA

- AGRIOS, G. 2005. Plant Pathology. 5ta ed. ELSEVIER Academic Press. 922p.
- ANGELOV, D; GEORGIEV, P; KRASTEVA, L. 2000. Two Races of *Pseudoperonospora cubensis* on Cucumbers in Bulgaria. Proc. Cucurbitaceae. Eds. N. Katzir & H. S. Paris. Acta Hort 510, ISHS 81-83.
- ANGELOV, D; KRASTEVA, L. 2000a. Dominant Inheritance of Downy Mildew Resistance in Melons. Proc. Cucurbitaceae. Eds. N. Katzir & H. S. Paris. Acta Hort. 510, ISHS 273-275.
- ANGELOV, D; KRASTEVA, L. 2000b. Selecting Downy Mildew-Resistance Short-Fruited Cucumbers. Proc. Cucurbitaceae. Eds. N. Katzir & H. S. Paris. Acta Hort. 510, ISHS 135-137.
- ARAUZ, L. F. 1998. Fitopatología: Un Enfoque Agroecológico. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 467p.
- BERNHARDT, E; DODSON, J; WATTERSON, J. 1988. Cucurbit Diseases. A practical Guide for Seedsmen, Growers and Agricultural Advisors. Petoseed Company. Saticoy, CA. 48 p.
- CAPPELLI, C; BUONARIO, R. 2003. Ocurrence of *Pseudoperonospora cubensis* Pathotype 5 on Squash in Italy. The American Phytopathological Society. April, vol 87, N°4, 449.
- CELETTI, M. 2007. Downy mildew in cucurbits. Horticulture Crops Program Lead/OMAFRA; Elaine Roddy - Vegetable Crops Specialist/OMAFRA; Dr. Pitblado - Ridgetown Agriculture Technology College/University of Guelph. En línea www.opvg.org/OMAFRA%20FACT%20SHEETdowny-mildew-a.pdf consultado en Octubre 2008.
- CHABAN, V; OKHRIMCHUK, V; SERGIENKO V. 2000. Optimization of Chemical Control of *Pseudoperonospora cubensis* on Cucumber in Ukraine. EPPO Bulletin 30 (2): 213–215.
- CHÁVES, G.; CERDAS, V.; LÓPEZ, K.; TRISTÁN, A.; VARGAS, L. 2010. Estadísticas del comercio Exterior de Costa Rica. Dirección de Inteligencia Comercial. PROCOMER. San José, Costa Rica. 226p.
- CHOI, Y; SHIN, H. 2008. First record of Downy Mildew caused by *Pseudoperonospora cubensis* on Bottle Gourd in Korea. Plant Pathology 57(2): 371.
- CHUPP, C; SHERF, A. 1960. Vegetable Diseases and Their Control. The Ronald Press Company. N.Y., USA. 639p.

- COHEN Y. 1976. The Combined Effects of Temperature, Leaf Wetness, and Inoculum Concentration on Infection of Cucumbers with *Pseudoperonospora cubensis*. Can. J. Bot. 55:1478-1487.
- COHEN Y; MERON, I; MOR, N; ZURIEL, S. 2003. A New Pathotype of *Pseudoperonospora cubensis* Causing Downy Mildew in Cucurbits in Israel. Phytoparasitica 31(5): 458-466.
- COHEN Y; PERL, M; ROTEM, J. 1971. The Effect of Darkness and Moisture on Sporulation of *Pseudoperonospora cubensis* in Cucumbers. Phytopathology 61:594-595.
- COLUCCI, S. 2008. Host Range, Fungicide Resistance and Management of *Pseudoperonospora cubensis*, causal agent of Cucurbit Downy Mildew. Thesis for the degree of Master of Science. Faculty of North Carolina State University. 139p.
- ÉPINAT, C; PITRAT, M. 1994. Inheritance of Resistance to Downy Mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) in Muskmelon (*Cucumis melo*). I. Analysis of a 8x8 Diallel Table. Agronomie 14: 239-248.
- FRAC Fungicide Resistance Action Committee. Consultado en línea http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC_Pathogen_risk%20list.pdf
- KIRKBRIDE, J. H., Jr.. 1993. Biosystematic Monograph of the Genus *Cucumis* (*Cucurbitaceae*). Parway Publishers, Boone, North Carolina, 159p.
- LATIN, R; EGEL, D. 2001. Melcast. Melon Disease Forecaster. Publication BP-64-W Purdue Extension. En línea <http://www.ces.purdue.edu/extmedia/BP/BP-64-W.pdf> consultado en Abril 2008.
- LEBEDA, A. 1999. *Pseudoperonospora cubensis* on *Cucumis* spp. and *Cucurbit* spp. Resistance Breeding Aspects. Proc. 1st Int. Symp. on Cucurbits. ISHS Acta Hort. 492, 363-370.
- LEBEDA, A; COHEN, Y. 2010. Cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) –biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control. Eur J Planr Pathol. DOI 10.1007/s10658-010-9658-1. Publicación en línea.
- LEBEDA, A; GADASOVÁ, V. 2002. Pathogenic Variation of *Pseudoperonospora cubensis* in the Czech Republic and Some Other European Countries. Proc. 2nd IS on Cucurbits . Acta Hort. 588, ISHS.
- LEBEDA, A; KRÍSTKOVÁ, E. 2000. Interactions Between Morphotypes of *Cucurbita pepo* and Obligate Biotrophs (*Pseudoperonospora cubensis*, *Erysiphe cichoracearum* and *Sphaerotheca fuliginea*). Proc. Cucurbitaceae 2000 Eds. Katzir & H. S. Paris. Acta Hort. 510, ISHS.

- LEBEDA, A; ŠTĚPÁNKOVÁ, M; KRŠKOVÁ, M; WIDRLECHNER, M. 2007. Resistance in *Cucumis melo* Germplasm to *Pseudoperonospora cubensis* Pathotypes. *Advances in Downy Mildew Research*. 3:157-167.
- LEBEDA, A; URBAN J. 2004. Disease Impact and Pathogenicity Variation in Czech Populations of *Pseudoperonospora cubensis*. *Progress in Cucurbit Genetics and Breeding Research. Proceedings of Cucurbitaceae 2004, the 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding*. Eds A. Lebeda and H.S. Paris. Olomouc, Czech Republic: Palacky' University in Olomouc pp. 267–273.
- LEBEDA, A; URBAN, J. 2007. Temporal Changes in Pathogenicity and Fungicide Resistance in *Pseudoperonospora cubensis* Populations. *Proc. IIIrd IS on Cucurbits*. Eds. R. McConchie and G. Roger. *Acta Hort.* 731, ISHS.
- LEBEDA, A.; WIDRLECHNER, M. 2003a. A Set of *Cucurbitaceae* Taxa for Differentiation of *Pseudoperonospora cubensis* Pathotypes. *Journal of Plant Disease and Protection*. 110(4): 337-349.
- LEBEDA, A., WIDRLECHNER, M. 2003b. Differentiation of *Pseudoperonospora cubensis* (Cucurbit Downy Mildew) Pathogenicity. *Abstracts of the 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand, 2-7 February*. Abstract 634, Host/pathogen Interaction Session. (unpaged).
- LEBEDA, A; WIDRLECHNER, M. 2004. Response of Wild and Weedy *Cucurbita* L. to Pathotypes of *Pseudoperonospora cubensis* (Cucurbit Downy Mildew). *Advances in Downy Mildew Research* vol. 2:203-210.
- LEBEDA, A; WIDRLECHNER, M; URBAN, J. 2006. Individual and Population Aspects of Interactions Between Cucurbits and *Pseudoperonospora cubensis*: Pathotypes and Races. *Proceedings of Cucurbitaceae 2006* G. J. Holmes, ed Universal Press, Raleigh, NC. 453-467.
- LINDENTHAL, M. 2005. Visualisation of downy mildew development of cucumber due to *Pseudoperonospora cubensis* using thermography. *Proyecto de Graduación*. En línea <http://www.bba.de/veroeff/mitt/pdfs/mitt396.pdf> consultado en Junio, 2008.
- MAIN, C; KEEVER, T; HOLMES, G; DAVIS, J. 2001. Forecasting Long-Range Transport of Downy Mildew Spores and Plant Disease Epidemics. *APS Net Feature Story* April 26-May 22. En línea <http://apsnet.org/online/feature/forecast/top.htm> consultado en Agosto 2008.
- MORE, T; DHAKARE, B; SAWANT, S. 2002. Identification of Downy Mildew Resistant Sources in Muskmelon Genotypes. *Proc. 2nd on Cucurbits* Eds. Nishimura *et al.* *Acta Hort.* 588, ISHS.

- MOSS, M. 1987. Resistance to Metalaxyl in the *Pseudoperonospora cubensis* Population Causing Downy Mildew of Cucumber in South Florida. *Plant Disease* 71: 1045.
- OERKE, E-C; STEINER, U; DEHNE, H-W; LINDENTHAL, M. 2006. Thermal Imaging of Cucumber Leaves Affected by Downy Mildew and Environmental Conditions. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 57, No. 9; 2121–2132.
- PALTI, J. 1975. *Pseudoperonospora cubensis*. [Descriptions of Fungi and Bacteria]. *CMI Descriptions of Fungi and Bacteria* pg 46, 457p.
- PALTI, J; COHEN J. 1980. Downy Mildew of Cucurbits (*Pseudoperonospora cubensis*): The Fungus and His Hosts, Distribution, Epidemiology and Control. *Phytoparasitica* 8(2):109-146.
- SAMOUCHA, Y; COHEN Y. 1984. Differential Sensitivity to Mancozeb of Metalaxyl-Sensitive and Metalaxyl-Resistant Isolates of *Pseudoperonospora cubensis*. *Phytopathology* 74: 1437-1439.
- SAMOUCHA, Y; COHEN Y. 1985. Occurrence of Metalaxyl-Resistant Isolates of *Pseudoperonospora cubensis* in Israel: A 5- Year Survey. *EPPO Bulletin* 15(4): 419–422.
- SHETTY, V; WEHNER, T; THOMAS, C; DORUCHOWSKI, W; VASANTH, K. 2002. Evidence for Downy Mildew Races in Cucumber Tested in Asia, Europe, and North America. *Scientia Horticulturae* Vol. 94 Issue ¾, p231, 9p.
- THOMAS, C; CANIGLIA, E. 1997. Evaluation of U. S. Honeydew-Type Melons for Resistance Against Downy Mildew and *Alternaria* Leaf Blight. *HortScience* 32(6): 1114-1115.
- THOMAS, C; COHEN Y; JOURDAIN, E; EYAL, H. 1987a. Use of Reaction Types to Identify Downy Mildew Resistance in Muskmelons. *HortScience* 22(4):638-640.
- THOMAS, C; COHEN Y; McCREIGHT, J; JOURDAIN, E; COHEN S. 1988. Inheritance of Resistance to Downy Mildew in *Cucumis melo*. *Plant Disease* 72:33-35.
- THOMAS, C; INABA, T; COHEN Y. 1987b. Physiological Specialization in *Pseudoperonospora cubensis*. *Phytopathology* 77:1621-1624.
- THOMAS, C; JOURDAIN, E. 1992. Host Effect on Selection of Virulence Factors Affecting Sporulation by *Pseudoperonospora cubensis*. *Plant Dis.* 76:905-907.
- URBAN, J; LEBEDA, A. 2006. Fungicide Resistance in Cucurbit Downy Mildew-Methodological, Biological and Population Aspects. *Annals of Applied Biology* Vol 149, 1: 63-75.

YOSITO, I. SF. Specialization in *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rostow.: (I) Comparative Studies on the Pathogenicities of the Fungi from *Cucumis sativus* L. and *Cucurbita moschata* Duchesne. Annals of the Phytopathological Society of Japan Vol. 11, Nº3: 101-113.

ZITTER, T; HOPKINS, D; THOMAS, C. 1996. Compendium of Cucurbit Diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. Pág. 25-27.

ANEXO

Araya, Mariano. 2008. Sin publicar

En la finca Geli de Orotina S.A. dedicada al cultivo del melón, se presentaron serias pérdidas debido al ataque del mildiú veloso de las cucurbitáceas (*Pseudoperonospora cubensis*)(Bert. y Curt.) durante el periodo comprendido entre los años 2007-2008.

Esta finca está localizada en Bajo Capulín, Cantón de Garabito, Provincia de Puntarenas, en las márgenes del Río Grande de Tárcoles, rodeada de montañas.

Durante la época comercial del melón, comprendida de diciembre del 2007 a abril 2008, se registró la temperatura, humedad relativa, precipitación, mojadura foliar y número de esporangios de *P. cubensis*, con el fin de determinar los factores ambientales que influyen en el desarrollo de la enfermedad.

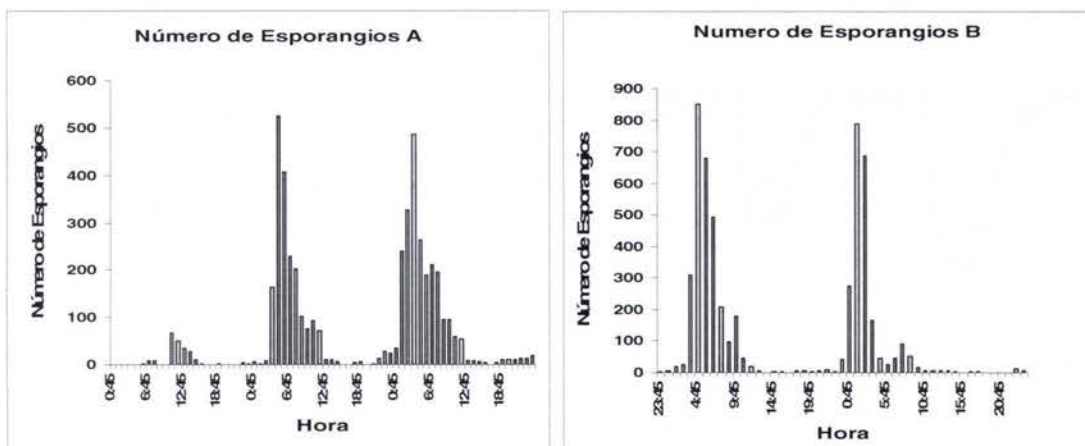


Figura 1. Número de esporangios contabilizados entre el 3 y 5 de febrero (A) y entre el 18 y 20 de febrero (B) del 2008 en la finca melonera Geli ubicada en Tárcoles de Garabito.

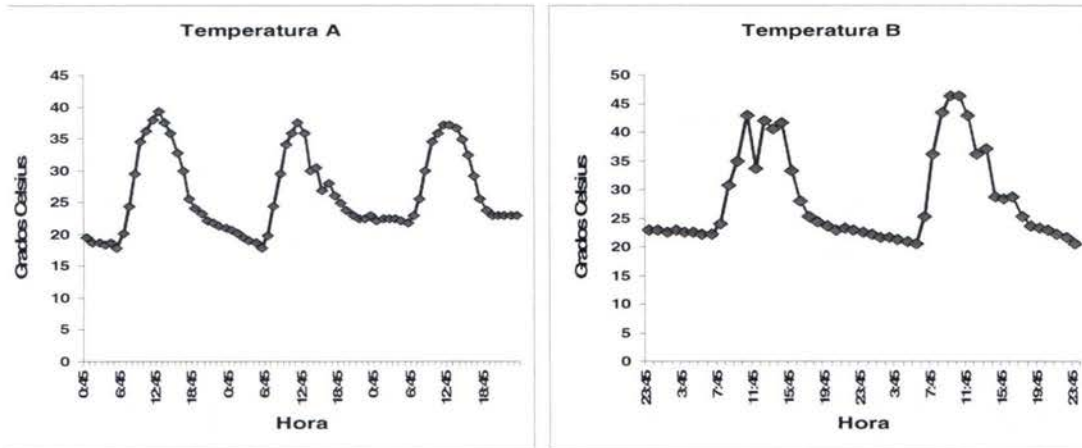


Figura 2. Temperatura en los periodos del 3 al 5 de febrero del 2008 (A) y del 18 al 20 de febrero del 2008 (B) en la finca melonera Geli ubicada en Tárcoles de Garabito.

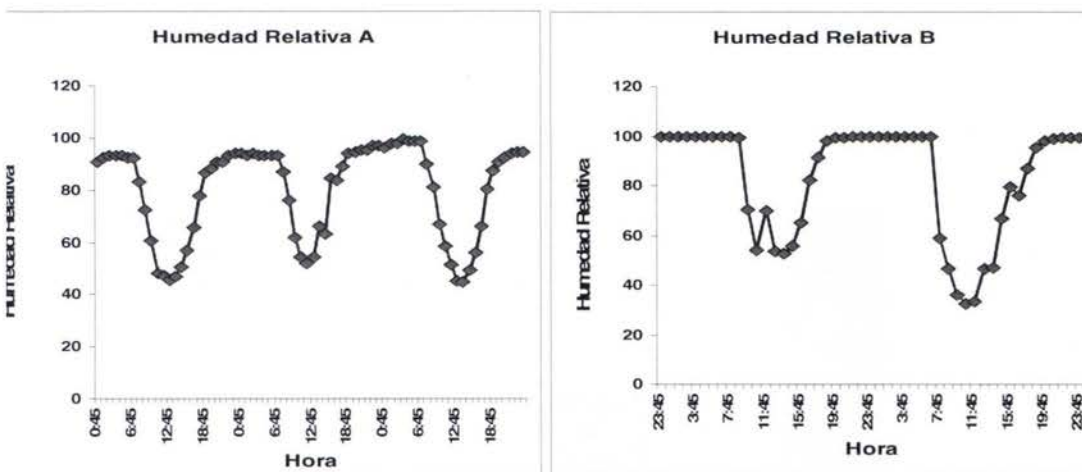


Figura 3. Humedad relativa en los periodos del 3 al 5 de febrero del 2008 (A) y del 18 al 20 de febrero del 2008 (B), en la finca melonera Geli ubicada en Tárcoles de Garabito.

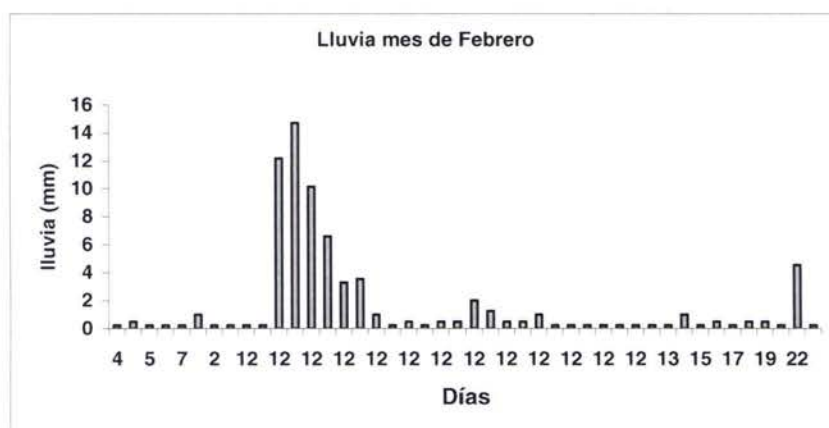


Figura 6. Milímetros de lluvia medidos durante el mes de febrero del año 2008 en la melonera Geli en Tárcoles de Garabito.

Cuadro 1. Temperatura, mojadura foliar y humedad relativa promedios en periodos del 3 al 5 de febrero del 2008 (A) y del 18 al 20 de febrero del 2008 (B), en la finca melonera Geli ubicada en Tárcoles de Garabito.

A	Temperatura °C	Mojadura	Humedad Relativa %
Promedio 9 Horas	20	11.71	92.53
Promedio 16 Horas	27.95	10.54	79.64
Promedio 4 Horas	22.37	14.95	98.57
B			
Promedio 8 Horas	22.71	13.71	100
Promedio 17 Horas	30.79	3.89	80.74
Promedio 6 Horas	21.7	10.33	100