

# INFECCIÓN DE *Spongospora subterranea* EN ESQUEJES DE PAPA (*Solanum tuberosum*) var. *Diacol Capiro* PROVENIENTE DE TRES FUENTES DE INÓCULO

*Spongospora subterranea* INFECTION ON POTATO (*Solanum tuberosum*) cuttings var.  
*Diacol Capiro* FROM THREE INOCULUM SOURCES

Julián Arango Restrepo<sup>1</sup> • Catalina Zuluaga Amaya<sup>1</sup> • José Miguel Cotes Torres<sup>2</sup> • Elena Paola González Jaimes<sup>3</sup>

## RESUMEN

La sarna polvosa causada por *Spongospora subterranea* (Wallroth) Lagerheim f. sp. *subterranea* Tomlinson es una enfermedad que disminuye los rendimientos y la calidad de tubérculos de papa. Es un parásito obligado el cual por sus características biológicas y reproductivas, posee una gran capacidad de sobrevivencia e infección no solo en su principal hospedero, sino también en diversas especies silvestres. Este patógeno es un protozoario, su infección ocurre por medio de zoosporas las cuales se liberan a partir de quistosoros y son el principal modo de dispersión de la enfermedad. Estos pueden encontrarse en tubérculos, raíces y en el suelo, donde permanecen como estructuras de resistencia por varios años, hasta que las condiciones ambientales favorecen la liberación de zoosporas, para dar inicio a nuevas infecciones. En el presente estudio se evaluó un método de bioensayo con el fin de establecer bajo condiciones controladas, la infección de quistosoros de *Spongospora subterranea* provenientes de suelo, raíz y de tubérculo, en la variedad comercial de papa Diacol Capiro, con el fin de determinar la fuente más infectiva. Las plantas fueron inoculadas con una solución que contenía una concentración de  $1 \times 10^4$  quistosoros/mL en condiciones de casa de malla. Las evaluaciones fueron realizadas a los 15 días después de ser inoculadas, en floración y tuberización. Los resultados mostraron diferencias significativas en las fuentes de inóculo empleadas, manifestándose mayor incidencia de *Spongospora subterranea* en las plantas inoculadas con quistosoros provenientes de tubérculo.

**Palabras clave:** Sarna polvosa, zoospora, quistosoro, agallas.

<sup>1</sup> Laboratorio de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid

<sup>2</sup> Profesor Asociado. Facultad Ciencias Agropecuarias, Departamento de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

<sup>3</sup> Profesor Asistente. Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Facultad de Ciencias Agrarias. Autor para correspondencia: epgonzalez@elpoli.edu.co

## ABSTRACT

Potato powdery scab produced by *Spongospora subterranea* (Wallroth) Lagerheim f. sp. *subterranea* Tomlinson is an important plant disease in potato because it has effect in yield and quality of tubers. *Spongospora subterranea* is an obligate parasite, because the biological and reproductive characteristic, it has a great survival and infection capacity in natural hosts. This pathogen is a plasmodiophorids; infections occur through zoospores which are inside resistance spores called sporeballs or cystosori which are the principal way of the disease dispersion. Sporeballs can remain on soil, roots and tubers as resistance structure, and can remain for many years until the weather conditions are favorable to zoospores release to start new infections on potato plants. In this study was evaluated a bioassay method with the aim to establish an infection method to Diacol Capiro potato variety on greenhouse conditions. It was carried out an experiment where three different inoculum sources: cystosori from soil, potato roots and tubers were evaluated, in order to identify the more efficient infectious source. The plants were inoculated by a cystosori infected solutions with a  $1 \times 10^4$  cystosori/mL concentration. The evaluations were made 15 days, on flowering and tuberization after inoculation. The results showed significant differences among the inoculum sources used, demonstrating higher incidence of *Spongospora subterranea* on plants inoculated from tuber cystosori.

**Key words:** Powdery scab, Zoospores, Cystosori, galls.

## INTRODUCCIÓN

La sarna polvosa causada por *Spongospora subterranea* (Wallroth) Lagerheim f. sp. *subterranea* Tomlinson es una enfermedad que disminuye los rendimientos y la calidad de tubérculos de papa (Harrison et al., 1997). En la actualidad, la sarna polvosa afecta las principales zonas productoras de papa del mundo en Europa, Asia y América (Harrison, et al. 1997). Esta enfermedad se expandió debido al uso de tubérculos semilla infectados y se consolidó por la falta de tratamientos efectivos (Merz, 2008). En Colombia, se ha observado un aumento en la distribución geográfica de *Spongospora subterranea*, sobre todo en aquellos departamentos de mayor producción papera como el altiplano Cundiboyacense, Nariño y Antioquia; lo cual puede convertirse en una seria amenaza, si no se toman las medidas necesarias para controlar

su diseminación (García y Navia, 2002). En los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Antioquia (Colombia), afecta severamente las variedades Parda Pastusa, Diacol Capiro y Criolla Colombia. Los síntomas se observan en raíces y tubérculos, pero hay variación en las zonas paperas en cuanto a la distribución de los síntomas entre los diferentes órganos de la planta. Así en Cundinamarca, Boyacá y Norte de Antioquia es más frecuente observar pústulas sobre los tubérculos de las variedades Parda Pastusa y Diacol Capiro, mientras que en el departamento de Nariño y Oriente de Antioquia es común observar agallas en raíces.

Hasta ahora no se sabe si estas diferencias se deben a variaciones en las condiciones ambientales de una región a otra, o quizás se deban a la

distribución regional de diferentes razas del patógeno, y/o a su interacción: huésped-patógeno-ambiente (Jaramillo y Botero, 2007). Se han implementado algunas estrategias de manejo de la enfermedad tales como, la aplicación de altas cantidades de carbonato de calcio, el uso del tiabendazol, la esterilización del terreno con yodo (entre otras técnicas de control químico) y la rotación de cultivos las cuales han presentado resultados poco esperanzadores. (Urquijo *et al.*, 1961).

*S. subterranea* es un protozooario, parásito intracelular obligado con división celular cruciforme, que forma estructuras de resistencia llamadas quis-

sistema radical del huésped. En la fase esporangial, el esporangio de paredes delgadas se desarrolla entre células hospederas, en las cuales se forman ocho zoosporas desde un plasmodio esporangiogéneo. Las zoosporas secundarias también son biflageladas y pueden salir de la célula infectada e iniciar otro ciclo de infección. Los quistosoros son de forma ovoide, color ocre oscuro, con un diámetro de 20 a 80  $\mu\text{m}$  con la apariencia de una pelota de golf; las zoosporas poseen dos flagelos de diferente tamaño insertados lateralmente en un ángulo de 180°, el flagelo largo mide entre 0,8-16,4  $\mu\text{m}$  y el pequeño entre 0,4-5  $\mu\text{m}$ . (Alzate *et al.*, 2008).

Según Hooker (1980), hay dos fases importantes del ciclo de vida de este patógeno, cada una iniciada por la infección de la célula huésped a través de un plasmodio unicelular. La fase esporogénica se presenta después de la división nuclear, produciendo esporas de pared gruesa, las cuales son altamente resistentes.

tosoros, los cuales según Merz (1997), son favorecidos por la presencia de condiciones medioambientales adecuadas como temperatura y humedad; estímulos inducidos por la planta y el período de latencia para la liberación de zoosporas.

Según Hooker (1980), hay dos fases importantes del ciclo de vida de este patógeno, cada una iniciada por la infección de la célula huésped a través de un plasmodio unicelular. La fase esporogénica se presenta después de la división nuclear, produciendo esporas de pared gruesa, las cuales son altamente resistentes. Cada espora libera una sola zoospora primaria biflagelada, la cual entra en el

La sarna polvosa afecta raíces, estolones y tubérculos. Las raíces de las plantas enfermas muestran agallas o tumores lisos, de 0,5 a 1,5 cm de tamaño y de forma más o menos irregular; al inicio las agallas son de color blanquecino y cuando alcanzan la madurez fisiológica se vuelven oscuras, debido al color marrón de las paredes de las estructuras de resistencia (Harrison *et al.*, 1997). El alto nivel de infección de las raíces tiene efecto detrimental sobre la toma de agua y nutrientes y sobre la producción, ya que en un estado avanzado de la enfermedad se desintegran las raíces con una liberación masiva de quistosoros al suelo. El período crítico de

la infección en tubérculos está establecido entre el desarrollo de los estolones siete días antes del inicio de la tuberización, hasta el 50% de tuberización, (21-28 días) cuando el 50% de los estolones se han engrosado en un diámetro de 5 mm. El período de susceptibilidad coincide con la tuberización y la formación de lenticelas en los tubérculos en desarrollo, pero antes de la suberización de las lenticelas, pues una vez suberizan se vuelven resistentes. La fluctuación de la humedad en este período, reduce el efecto de la enfermedad (Boer, 1991).

Las pústulas de *S. Subterranea* cuando maduran en los tubérculos de papa, forman masas polvorientas de estructuras de resistencia con paredes delgadas llamadas esporosoros o quistosoros, los cuales contienen un gran número de esporas de resistencia que son fuente de inóculo importante, ya que son muy persistentes y pueden sobrevivir en el suelo por décadas, haciendo de esta una enfermedad de difícil control (Boer, 2000). Bajo condiciones de humedad, los quistosoros producen zoosporas primarias que pueden infectar papa y un amplio rango de otras plantas hospedantes como tomate y varias arvenses como yerbamora (*Solanum nigrum*) (Heald, 1983), *Spinacea oleracea* (Jones y Harrison, 1969) y *Amaranthus retroflexus* (Qu y Christ, 2006) entre otras.

La persistencia de los quistosoros de *S. subterranea* en el suelo y tubérculos hace que la sarna polvosa sea una enfermedad de difícil manejo (Harrison *et al.*, 1997), estas estructuras de resistencia permanecen en el sustrato por más de seis años y sobreviven al paso por el tracto intestinal de los animales alimentados con tubérculos infectados (Torres, 2002). La prevalencia de socas de papa ha aumentado la contaminación de los suelos, por la supervivencia de los quistosoros (Wale, 2000), los cuales se distribuyen en parche, siendo el desarrollo de la enfermedad altamente dependiente de las condiciones ambientales (Lees, 2000).

En Australia Wale (2000). encontró quistosoros de *S. subterranea* en tubérculos almacenados, incluso procedentes de áreas donde antes no había sido observada la sarna polvosa; de otro lado Van de Graaf *et al.*, (2005) observaron tubérculos infectados en suelos no inoculados con quistosoros (testigo) posiblemente por una infección latente en los tubérculos, cuya severidad fue significativamente más baja que para cualquiera de los tratamientos inoculados, pero la incidencia fue del 52%.

El estado de infección radical de *S. subterranea* f.sp. *subterranea* durante su ciclo de vida sobre las plantas de papa y hospederos alternos, es muy importante para la epidemiología de la sarna polvosa, debido a que la infección de las raíces incrementa rápidamente las zoosporas y esporas de resistencia en estos suelos, especialmente si los genotipos son muy susceptibles a la infección radical y a la formación de agallas. Falloon *et al.* (2003) muestran que aunque algunas variedades de papa que presentan resistencia en los tubérculos son resistentes a la infección en raíces, no siempre es así, en un experimento realizado encontró que en 99 variedades de papa y 13 líneas de mejoramiento avanzadas evaluadas, ninguna presentó inmunidad a la infección radical, y por lo tanto, fue la fuente de inóculo mas importante.

Muchos factores han contribuido con el incremento de la enfermedad, pero la siembra de tubérculos contaminados con sarna polvosa, se ha convertido en un problema cada vez más importante en los últimos años, el cual se agrava con las herramientas de trabajo y maquinaria que se llevan de lotes contaminados a lotes sanos; también, a la popularidad de variedades de papa que son susceptibles a la enfermedad y el uso creciente de riego, como condición más importante del suelo para favorecer el desarrollo de la enfermedad. Además, la rotación inadecuada de las cosechas y la ausencia de un esquema eficaz de inspección sobre la

semilla-tubérculo, han favorecido el desarrollo de la sarna polvosa (Harrison *et al.*, 1997). Van der Graaf *et al.* (2005), manifiestan que en muchos tubérculos la infección es latente especialmente cuando las condiciones ambientales no son favorables.

Hasta el momento, las técnicas que se han implementado en suelo para la detección de *Spongopora subterranea* f.sp. *subterranea* incluyen bioensayos con plantas trampa (Merz, 1993), técnicas serológicas (Walsh *et al.*, 1996) y técnicas moleculares (Bell, *et al.*, 1999). La detección rápida y confiable de quistosoros tanto en tubérculos como en suelo, es una herramienta indispensable para el desarrollo de estrategias de manejo de la enfermedad (Rodríguez *et al.*, 2001).

Para la detección del patógeno se han evaluado varias alternativas que van desde el uso de plantas en suelos infectados por 4-5 semanas, hasta el uso de técnicas moleculares con detección por *primers* específicos de alta sensibilidad en pruebas de PCR, como lo son los pares SsF/SsR desarrollados por Qu y Christ, (2004) y Spo8/Spo9 de Bulman y Marshal, (1998), con los cuales pueden realizarse pruebas en tejidos vegetales y en suelo, permitiendo identificar de manera precoz el agente causal de la sarna polvosa en suelos y plantas. Bioensayos con tomate o microplantas de papa como cebos, se han utilizado con éxito para detectar y cuantificar *S. subterranea* en el suelo (Flett, 1983; Wale, 2000). Estos son más sensibles que los métodos basados en ELISA, pero son lentos, laboriosos, requieren el reconocimiento de la infección y puede ser incapaz de diferenciar los niveles de inóculo (Corrales, 2010)

Montero *et al.* (2004), determinaron y confirmaron la presencia de *S. subterranea* f. sp. *subterranea* en las principales zonas dedicadas al cultivo de papa en Costa Rica, así como su relación con el virus PMTV; utilizando las técnicas de microscopio de luz, bioensayo, ELISA y PCR detectando y confirmando la identidad del organismo.

Con el fin de avanzar en el conocimiento de aspectos biológicos de *S. subterranea* f. sp. *subterranea*, se hace necesario obtener una fuente de inóculo infectivo para ser utilizado en bioensayos; por lo tanto, en este trabajo se busca establecer bajo condiciones controladas, la inoculación con zoosporas en esquejes de papa var. Diacol Capiro, utilizando diferentes fuentes, como son quistosoros provenientes de suelo contaminado, de raíces de papa con agallas y de tubérculos con pústulas formadas por este parásito; con el fin de identificar el la fuente de inóculo más efectiva al momento de producir infección en papa, evaluando dicha infección en tres momentos diferentes del ciclo fenológico de la planta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el Centro Agropecuario "Paysandú", de La Universidad Nacional de Colombia, localizado en el corregimiento de Santa Elena, municipio de Medellín (Antioquia, Colombia), a 2550 msnm, con una temperatura media de 14°C. Los experimentos se realizaron en condiciones de casa de malla y los análisis de infección en el Laboratorio de Sanidad Vegetal del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, en la sede de Bello (Antioquia)

Los quistosoros fueron obtenidos a partir de suelos y tejidos vegetales (agallas de raíces y pústulas de tubérculos) infectados por el patógeno. Las muestras fueron tomadas en el municipio de la Unión (Antioquia) veredas Vallejuelito, La Cabaña y Mazorcal. Una vez obtenido el material se realizó una evaluación macroscópica (síntomas típicos causados por *S. subterranea* en raíces y tubérculos) y una microscópica mediante la observación y cuantificación a través de microscopio de los quistosoros en las diferentes muestras. La extracción de quistosoros de las tres diferentes fuentes a

evaluar (suelo, raíz y tubérculo) se realizó de acuerdo a la siguiente metodología: Para la obtención de quistosoros a partir de suelo infestado se utilizó la metodología propuesta por Jaramillo y Botero (2007) modificada por Alzate *et al.* (2008), en la cual 1 g de suelo seco, se pasa a través de un juego de tamices de 250, 90 y 25 micras, recogiendo los quistosoros presentes en el tamiz de 25µm.

Para el inóculo tubérculo se utilizó la metodología propuesta por Van de Graaf *et al.* (2005), en la cual se raspó la superficie de los tubérculos infectados, se secaron al aire libre durante 48 horas, para luego macerarse, con el fin de disminuir

referencia EXPLORER y luego se adicionaron 10 mL de agua destilada; la solución fue realizada en tubos tipo Falcon de 15 mL. Consecutivamente se desarrollaron 10 lecturas con dos repeticiones en la cámara, con los datos obtenidos se determinó la concentración de quistosoros por gramo de inóculo para establecer una concentración final de inoculación uniforme de  $1 \times 10^4$  quistosoros/mL.

Las inoculaciones en papa, se realizaron utilizando esquejes de tallo lateral de plantas de papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro con una edad aproximada de 30 días, siguiendo la metodología propuesta por Cotes y Ñustez (2001), la

Las inoculaciones en papa, se realizaron utilizando esquejes de tallo lateral de plantas de papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro con una edad aproximada de 30 días, siguiendo la metodología propuesta por Cotes y Ñustez (2001), la cual consistió en eliminar en la planta al mes de germinación la dominancia apical, estimulando la producción de brotes laterales.

el tamaño de las partículas. Finalmente el material obtenido de la maceración se pasó por el mismo juego de tamices empleado para suelo. Las raíces infectadas, se lavaron con agua corriente con el fin de retirar los excesos de suelo, se retiraron las agallas y se secaron durante 48 horas al aire libre, se maceraron y posteriormente se tamizaron para obtener los quistosoros.

La cuantificación de quistosoros se realizó siguiendo la metodología descrita por Alzate *et al.*, (2008), en la cual se efectuó el conteo de estructuras al microscopio en cámara de Neubauer, se pesó para cada inóculo 0,1 g en balanza analítica OHAUS

cual consistió en eliminar en la planta al mes de germinación la dominancia apical, estimulando la producción de brotes laterales. Una vez cosechados los esquejes se emplearon dos metodologías para el proceso de enraizamiento, con el fin de verificar cuál de las dos era más eficiente en el caso de los esquejes de las variedades de la especie *S. tuberosum*. La primera consistió en llevar los esquejes a bandejas plásticas con agua utilizando icopor como soporte, donde permanecieron por 20 días. Posterior a este tiempo, se evaluó la producción de raíces y la viabilidad del esqueje. En la segunda metodología, los esquejes cosechados

se impregnaron con ácido naftalenacético (ANA) y fueron llevados a bandejas para enraizamiento con turba previamente humedecida, permaneciendo por 20 días, a fin de evaluar la producción de raíces y viabilidad del esqueje.

Una vez determinada la mejor metodología y enraizados correctamente los esquejes, éstos fueron llevados a bandejas plásticas de 0,35 L, con 150 mL agua para su inoculación con el patógeno empleando las diferentes fuentes de quistosoros a una concentración de  $1 \times 10^4$  quistosoros/mL durante 12 días. Cuando las plantas completaron una semana de estar en la solución con quistosoros, se agregó solución nutritiva de Hoagland (Millner y Kilt, 1992) hasta completar el volumen inicial de la bandeja, con el fin de mantener las plantas saludables durante el proceso de infección. Doce días después de la inoculación se hizo el trasplante a macetas de 2,5 kg con suelo homogenizado libre del patógeno (verificado previa evaluación al microscopio), donde permanecieron las plantas bajo condiciones de casa de malla, hasta completar el estado de floración y tuberización.

El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y tres evaluaciones en el tiempo distribuidos de la siguiente manera: a) Plántulas de papa inoculadas con solución preparada a partir de quistosoros obtenidos de tubérculos infectados por *S. subterranea*; b) Plántulas de papa inoculadas con solución preparada a partir de quistosoros obtenidos de raíces infectadas por *S. subterranea*; c) Plántulas de papa inoculadas con solución preparada a partir de quistosoros obtenidos de suelo infestado por *S. subterranea*; d) plántulas sin inocular como testigo. Cada tratamiento se distribuyó en 30 macetas con suelo libre del patógeno (1 planta por maceta), para un total de 120 plantas en el experimento. A lo largo del ensayo se realizaron tres evaluaciones, a los 15 días después de inoculación, en floración

y tuberización (madurez fisiológica). Las evaluaciones se realizaron en 10 plantas de cada uno de los tratamientos y consistieron en a) observación de síntomas; b) tinción de raíces siguiendo la metodología de Villegas *et al.*, (2009).

Para analizar las estructuras asociadas con *S. subterranea* f. sp. *subterranea*, siguiendo el protocolo de Villegas *et al.* (2009), las raíces se lavaron suavemente con agua para retirar el exceso de suelo y luego fueron llevadas a un tubo tipo Falcon con solución de KOH al 10 % durante tres días para extraer el contenido celular. Posteriormente estas raíces fueron llevadas a un medio ácido (HCL al 10 %) durante 10 minutos para nivelar el pH. Luego de este tiempo, fueron lavadas con agua destilada e inmediatamente teñidas con azul de tripano el cual se aplicaba dentro del tubo hasta cubrirlas. Cuando las raíces lograron la tinción, de cada repetición se extrajeron cinco de ellas, las cuales se colocaron en portaobjetos para ser observadas al microscopio. En cada raíz se hizo un barrido completo con el fin de determinar la presencia de estructuras propias de *S. subterranea* f. sp. *subterranea*. Para las evaluaciones se utilizó un microscopio Nikon Eclipse E-200 en 10X y 40X. Las estructuras del patógeno observadas se clasificaron como quistosoros, células únicas y plasmodios, mientras que las otras estructuras que no pertenecían al patógeno se clasificaron como endófitos, micorrizas y otros, siguiendo la identificación realizada por Villegas *et al.* (2009). Los resultados arrojados fueron analizados determinando la incidencia de *S. subterranea* f. sp. *subterranea* al interior de las raíces. Debido a que la variable respuesta no se distribuyó normalmente, sino que resultó en una distribución binomial (presencia o ausencia de la estructura del patógeno), para la interpretación de los datos se utilizó un análisis de modelos lineales generalizados mixtos, el cual asume una distribución binomial de los datos y una función de ligamiento probit

(McCullagh y Nelder, 1989). Esto se hizo con el procedimiento GLIMMIX de SAS System versión 9,2.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mejor metodología para enraizamiento fue donde se empleó Acido Naftalenacético (ANA) como hormona de enraizamiento y turba humedecida, ya que produjo el mayor porcentaje de enraizamiento. El tratamiento de enraizamiento con el uso de agua solamente, presentó problemas de desnitrificación del esqueje y proliferación de algas, llevando a la muerte de éstos. El uso de turba en la metodología seleccionada, proporcionó un mayor soporte, un medio con más nutrientes y un adecuado suministro de agua, lo cual permitió tener los esquejes por más tiempo en las bandejas y obtenerlos con más vigor y mejor enraizamiento para iniciar la inoculación. Así mismo se observó que la implementación de esquejes de tallo lateral fue la adecuada para la multiplicación del material vegetal, coincidiendo así con los resultados obtenidos por Ramírez *et al.* (2009), quienes concluyeron que el mejor método de propagación rápida fue el uso de esquejes de tallo lateral, los cuales presentaron mayor número de explantes y mayor porcentaje de sobrevivencia.

A lo largo de las tres evaluaciones realizadas, no se observaron síntomas visibles como agallas en raíces y pústulas en tubérculos. Van de Graff *et al.* (2007), establecieron que las zoosporas de *S. subterranea* f. sp. *subterranea* afectaron raíces de papa donde eventualmente generaron zoosporangios los cuales produjeron zoosporas secundarias o plasmodios esporangiales. La aparición de estos últimos, se asocia con hiperplasias e hipertrofias de las células de la raíz, lo que genera la formación de agallas, que al igual que las pústulas de los tubérculos, pueden formar quistosoros que permanecen en el suelo. Así, la no manifestación de agallas y pústulas en el presente experimento posiblemente

fue consecuencia, de la baja formación de estructuras secundarias, debido probablemente al poco tiempo de contacto de la planta con el patógeno (12 días) comparado con el ambiente natural, en donde una planta que es sembrada en suelo infestado con *S. subterranea* f.sp. *subterranea* tiene la posibilidad de entrar en contacto con el patógeno en cualquier momento de su ciclo, llevando esto a múltiples infecciones en diferentes momentos y por lo tanto, a desarrollar síntomas visibles más fácilmente que cuando la planta solo está en contacto con el patógeno por un período corto).

Lo anterior contrasta con lo señalado por Merz, (1997) y Navia y García (2004), al realizar bioensayos en condiciones controladas en cámara de crecimiento, donde las plantas permanecieron en contacto con el patógeno por más tiempo, logrando el desarrollo de síntomas más fácilmente. Adicionalmente las condiciones físicas del suelo dentro de las macetas se fueron deteriorando, reduciendo la aireación y aumentando la retención de humedad, lo que pudo afectar la liberación de zoosporas secundarias y su penetración en las raíces. En este sentido, Harrison *et al.* (1997), comprobaron que la temperatura, la humedad y el genotipo de papa son factores determinantes en el desarrollo de la enfermedad, por lo que si uno de estos factores se alteran puede no resultar la infección, aún si el patógeno se encuentra presente.

En las observaciones de las raíces al microscopio se detectaron estructuras relacionadas con el patógeno como quistosoros de *S. subterranea*, en las tres evaluaciones realizadas, evidenciándose estructuras poliédricas, globosas u ovoides, huecas formadas por grupos de soros; cada soro o esporosoro da origen a ocho zoosporas (Hooker, 1980) y son la estructura más estudiada en términos de control y epidemiología de la enfermedad. Esto es explicable porque son comparativamente más sencillas de ver con respecto a plasmodios, zoosporas y zoosporangios o células únicas, tal

**Tabla 1.** Valores de p de la ANOVA para Q (quistosoros), P (plasmidios), C.U. (células únicas) y Estructuras totales.

Fuente de Variación	Q	P	C.U.	Estructuras totales
Inóculo	<0,0001	-- <sup>1</sup>	0,9999	<0,0001
Tiempo	<0,0001	--	0,9999	<0,0001
Tiempo x inóculo	<0,0001	--	0,5676	<0,0001

<sup>1</sup> No se observaron estas estructuras al microscopio.

como lo señalaron Villegas *et al.* (2009) y Gómez *et al.* (2008). Estructuras del tipo células únicas, se observaron en las evaluaciones correspondientes a floración y tuberización. Estas estructuras son procesos de transformación o cambios del patógeno dentro de su hospedante.

La presencia de células únicas del parásito en el bioensayo, validan el hecho de la no manifestación de síntomas visibles como agallas, de acuerdo a lo planteado por Villegas *et al.* (2009). Estos autores encontraron células únicas de *S. subterranea* con alta frecuencia, en raíces asintomáticas de papa; siendo estas observaciones, coincidentes con lo mencionado por varios autores en diferentes tipos de hospederos silvestres como Qu y Christ, (2006); Jones y Harrison, (1969) y Andersen *et al.* (2002), quienes detectaron estructuras como zoosporangios y células únicas, las cuales pasan inadvertidas, salvo en análisis y tinciones específicas, ya que las plantas infectadas tampoco manifiestan síntomas alternos a la presencia de agallas o pústulas; lo que puede indicar un relativo estado de equilibrio con sus hospedantes en la fisiología de la interacción planta-microorganismo o de homeostasis o bio-regulación de poblaciones de microorganismos como expuesto por Gilbert (2002).

La concentración empleada ( $1 \times 10^4$  quistosoros/mL) en el presente estudio, resultó ser eficiente

para la ocurrencia de la infección por los diferentes tipos de inóculo empleados, ratificando lo mencionado por Harrison *et al.* (1997) y Burgess y Wale (1994), quienes señalaron que los niveles iniciales de inóculo juegan un papel insignificante en la determinación de la cantidad de sarna polvosa en un cultivo, pues unos pocos quistosoros, pueden producir rápidamente gran número de zoosporas, si las condiciones ambientales son favorables, pero si son extremas el nivel de inóculo es irrelevante y el cultivo permanece libre de la sarna polvosa, al menos en sintomatología.

Por otra parte, Gómez *et al.* (2008), realizaron inoculaciones en papa en condiciones controladas con concentraciones de  $1,6 \times 10^5$  quistosoros/mL, identificando a lo largo del experimento algunas estructuras propias de *S. subterranea* f.sp. *subterranea* en un número muy reducido de muestras, ratificando lo antes mencionado por Van de Graff *et al.* (2007) y Burnett, (1991), quienes no encontraron diferencias significativas entre los distintos niveles de inóculo para la infección y severidad de *S. subterranea* f.sp. *subterranea* en cultivos de papa, incluso siendo estos bajos.

En las evaluaciones realizadas se encontró infección microscópica de *S. subterranea* f.sp. *subterranea* manifestándose un reconocimiento del patógeno hacia las plántulas de papa, validando

lo encontrado por Harrison *et al.* (1997) y Corrales (2010), quienes manifestaron que las zoosporas se sienten fuertemente atraídas por los exudados de las raíces de papa ejerciéndose una quimiotaxis positiva. Navia y García (2004), también afirmaron que la estimulación por los exudados radicales parece ser un factor importante en la liberación diferencial de zoosporas primarias en respuesta a distintas variedades de tomate, pues en el ensayo desarrollado por ellos se observó, que en el caso de las plántulas hubo diferencias de la concentración de zoosporas liberadas en tres variedades utilizadas. Esto sugiere que algo similar pudiera ocurrir en diferentes cultivares de papa, tomando en cuenta que Alzate *et al.* (2008) y Corrales (2010), encontraron una mayor liberación de zoosporas en solución de extracto de raíz de papa, cuando se comparó con agua y solución nutritiva.

De igual forma, Makarainen *et al.* (1994) comprobaron que la incidencia de *S. subterranea* f. sp. *subterranea* fue más alta en raíces de plantas que habían sido previamente inoculadas con una suspensión del patógeno, que aquellas que habían sido cultivadas en suelos infestados naturalmente. No obstante en un estudio realizado por Gómez *et al.* (2008), encontraron que la inoculación con *S. subterranea* en plántulas de papa a partir de semilla sexual recién germinada no fue exitosa, debido a que el número de raíces era muy reducido y presumiblemente estas

aún no generaban exudados suficientes para generar un estímulo que favoreciera la infección por parte de las zoosporas liberadas por *S. subterranea*. No obstante en esta investigación la inoculación artificial para inducir la infección de raíces fue eficiente para producir una infección microscópica pero insuficiente para la observación de síntomas a nivel de raíces y tubérculos.

En la Tabla 1 se observa que existe una interacción tiempo (momentos en los que se realizaron las evaluaciones) por fuente de inóculo para las estructuras quistosoros y estructuras totales (conjunto de estructuras del patógeno observadas). En las estructuras denominadas células únicas no se observó ningún efecto de inóculo, tiempo, ni de su interacción, lo que indica que este tipo de estructura puede estar presente en cualquier momento de las fases de infección del patógeno.

Es importante resaltar que no hay efecto del inóculo con respecto a la aparición de diferentes tipos de estructuras, ya que se observaron quistosoros y células únicas en las tres fuentes de inóculo estudiadas, lo que indica que cualquiera que sea la fuente de inóculo utilizada es capaz de producir infección en un tiempo de inoculación relativamente corto, si se comparan los 12 días en que en este ensayo estuvieron en contacto las plantas con el inóculo versus el tiempo que puede permanecer en contacto en condiciones de campo.

De igual forma, Makarainen *et al.* (1994) comprobaron que la incidencia de *S. subterranea* f. sp. *subterranea* fue más alta en raíces de plantas que habían sido previamente inoculadas con una suspensión del patógeno, que aquellas que habían sido cultivadas en suelos infestados naturalmente.

Es de resaltar que no hubo diferencias estadísticas en el tiempo en cuanto a la incidencia de *S. subterranea* f.sp. *subterranea* ni en estructuras microscópicas ni macroscópicas, siendo que este era un factor a esperar, pues en la medida que la planta crece, existe una mayor probabilidad que la infección inicial a nivel radical incrementa rápidamente la producción de las zoosporas y esporas de resistencia, en los suelos donde crecen las plantas, llegando a un alto nivel de infección en raíces y tubérculos. Esta situación, tiene un efecto detrimental sobre la toma de agua y nutrientes y sobre la producción, especialmente si los materiales de papa son muy susceptibles a la infección radical como lo es la variedad Diacol capiro. Así, esta respuesta en el ensayo pudo darse como ya se mencionó anteriormente, porque las plantas estuvieron en contacto con el inóculo un tiempo corto, el cual probablemente no permitió una reinfección posterior, por lo que no habría posibilidad de encontrar síntomas de la enfermedad especialmente en tubérculos.

De igual forma se observó que a los 15 días no hubo diferencias significativas entre el inóculo de tubérculo y suelo, siendo preferible usar inóculo de raíz, (Prueba Tukey  $\alpha=0.05$ ) (Figura 1) En el momento de floración, cuando se evaluó la aparición de agallas en las raíces, el inóculo de tubérculo fue tan efectivo en producir quistosoros como el de raíz mientras que en la tuberización se invirtió la tendencia, es decir el mejor inóculo fue tubérculo, presentando diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con raíz y suelo. En todos los casos el inóculo con el cual se observaron menor número de estructuras fue suelo presentando diferencias significativas con tubérculo y raíz ( $p < 0,05$ ).

Es posible que la similitud estadística entre las fuentes de inóculo provenientes de tubérculo y suelo a los 15 días, se deban a una posible dormancia de los quistosoros comparado con los provenientes de raíz, los cuales provienen de un proceso de infección más

reciente siendo estas estructuras posiblemente más activas para la liberación de zoosporas. Posiblemente las zoosporas de la fuente de quistosoros de raíz, pueden ser liberadas con mayor facilidad, ya que se encuentran en constante estimulación con exudados radicales. Por otra parte, las diferencias observadas en las fuentes de inóculo, se deben probablemente al hecho que, los quistosoros presentes en las raíces y en tubérculos son más jóvenes que los que se encuentran en suelo, teniendo posiblemente una mayor patogenicidad, ya que estos últimos permanecen como una reserva por largos períodos en el suelo en contacto con microorganismos, diferentes niveles de humedad y temperatura, además de una menor actividad biológica debido a la ausencia de señales de reconocimiento de su principal hospedante, lo que puede afectar la calidad y cantidad de zoosporas que se generan a partir de estos quistosoros y por lo tanto, disminuir la eficiencia de su inoculación.

Estos resultados coinciden con los encontrados por Corrales (2010), quien realizando pruebas de liberación de zoosporas de quistosoros obtenidos de tubérculo, raíz y suelo, determinó que de este último es donde se obtienen aquellos quistosoros que poseen menor capacidad de liberación de zoosporas, comparando con las otras dos fuentes de inóculo. Los resultados a los 15 días de inoculación muestran que en el caso de las plantas que fueron infectadas con inóculo de raíz, el 52% presentaron quistosoros de *S. subterranea* f.sp. *subterranea*, lo cual indica que en este corto tiempo, el patógeno fue capaz de formar este tipo de estructuras de resistencia en las raíces de la papa, mientras que aquellas infectadas con inóculo proveniente de tubérculo y suelo, solo presentaron el 32% de plantas infectadas.

Los resultados encontrados en la evaluación en la etapa de floración se observó, que el número de plantas donde se encontraron estructuras del patógeno (quistosoros y células únicas) aumentó, con respecto a la evaluación a los 15 días, siendo de

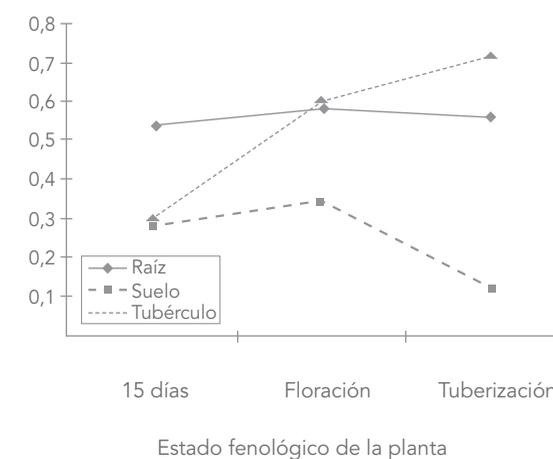
72% en las muestras inoculadas con quistosoros de tubérculos; 60% con inóculo de raíz y 32% con inóculo de suelo. Sin embargo, no se observó la formación de agallas en las raíces, lo cual puede deberse a un aumento inesperado de temperatura en los meses de octubre de 2009 a enero de 2010. Esta situación de acuerdo con Fallon (2004) y Lee (2002) puede afectar la manifestación visible de síntomas. En el momento de la tuberización se encontraron estructuras del patógeno al interior de las raíces en menor grado, 12% de las plantas cuando se utilizó inóculo de suelo, 56% con inóculo de raíz y 45% con inóculo de tubérculo, este porcentaje es importante, teniendo en cuenta que estas estructuras se formaron por la multiplicación de las primeras infecciones ya que no se hizo ninguna reinfección, lo que indica que 5 meses después de la inoculación el patógeno siguió activo al interior de las raíces de las plantas infectadas.

En esta evaluación no se observaron síntomas en las raíces ni en los tubérculos que se formaron. Esto probablemente se debió en primer lugar a la

disminución en el número de raíces en forma notoria, ya que para ese momento, la planta estaba favoreciendo la formación de tubérculo. En segundo lugar, porque al contrario de lo que ocurre en campo donde las plantas están en contacto con el suelo y por tanto con el patógeno, con probabilidades más altas de ocurrencia de infección, manifestación de síntomas y mayor número de estructuras del parásito, pueden ocurrir infecciones tanto a la raíz como al tubérculo durante mucho más tiempo, aumentando también la probabilidad de encontrar síntomas en la planta y un mayor número de estructuras en el interior de la planta, lo cual no ocurre en este bioensayo, en el cual solo se realizó una única inoculación durante 12 días y es el inóculo que consigue penetrar la raíz en este período, el encargado de hacer reinfecciones en la planta.

De esta forma, tomando en cuenta el comportamiento del parásito a lo largo de este bioensayo se puede sugerir la evaluación de resistencia hasta floración y no a tuberización, ya que a los 5 meses de evaluación, tampoco se observaron síntomas en los tubérculos. Lo anterior se podría explicar dado que este último órgano en formación, no entró en contacto directo con el patógeno, porque solo existía aquel que se encontraba al interior de las raíces, siendo poco probable que las zoosporas producidas al interior de la raíz, fueran capaces de desplazarse hacia afuera y entrar al tubérculo.

Así, en este bioensayo se determinó que el inóculo proveniente de agallas de raíz fue el de mayor capacidad para producir infección y generar mayor número de estructuras *S. subterranea* al interior de las raíces en apenas 15 días después de la inoculación, debido probablemente a la mayor viabilidad de los quistosoros que allí se encontraron, siendo este el tipo de inóculo ideal para ser utilizado en pruebas de infección con este patógeno.



**Figura 1.** Incidencia de *Spongopora subterranea* f. sp. *subterranea* (Quistosoros, Plasmodios o Células Únicas) en tres estados fenológicos de papa para tres fuentes de inóculo diferentes.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alzate D E, Hoyos L M y González E P. 2008. Factores que inciden en la liberación de zoosporas de *Spongospora subterranea* (Wallroth) Lagerheim f. sp. *subterranea* Tomlinson. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín 61(2): 4503-4510.
2. Andersen B A B, Nicolaisen M. y Nielsen S L. 2002. Alternative hosts for potato mop-top virus, genus pomovirus and its vector *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*. Potato research 45(1): 37-43
3. Bell K S., Roberts J, Verrall S, Cullen D W, Williams N A y Claxton J R. 1999. Detection and quantification of *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* in soils and on tubers using specific PCR primers. European Journal of Plant Pathology 105: 905-915.
4. Boer R F. 1991. Evaluation of the potato cultivars in the greenhouse and field for resistance to powdery scab. Australian Journal of Experimental Agriculture 31:609-703.
5. Boer R F. 2000. Research into the biology and control of powdery scab of potatoes in Australia. pp 19-83. In: Merz, U. and A.K. Less (eds.). Proceedings of first European powdery scab workshop, sac, Aberdeen, Scotland.
6. Bulman S R y Marshall J W. 1998. Detection of *Spongospora subterranea* in potato tuber lesions using the polymerase chain reaction (PCR). Plant Pathology 47: 759-766.
7. Burgess P J y Wale S J. 1994. Development of an integrated control strategy for powdery scab of potatoes. In: Brighton crop protection conference. Pests and diseases. 1994, (1) pp. 301-306
8. Burnett F. 1991. The biology and control of powdery scab (*Spongospora subterranea*) of potatoes. PhD thesis: University of Aberdeen, Aberdeen, UK.
9. Corrales C. 2010. Estudio de liberación de zoosporas y estandarización de la metodología de extracción de DNA a partir de quistosoros y zoosporas de *Spongospora subterranea*. Tesis de grado Programa Ingeniería Agropecuaria, Facultad Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín.
10. Cotes J M y Núñez C E. 2001. Evaluación de dos tipos de esquejes en la producción de semilla pre-básica de papa criolla (*Solanum phureja* J. et B) variedad "Yema de huevo". Agronomía Colombiana, XVIII (1-3): 71-78.
11. Donaldson S P y Deacon J W. 1993. Differential encystment of zoospores of *Pythium* species by saccharides in relation to establishment on roots. Physiological and Molecular Plant Pathology, 42:177-184.
12. Falloon R E, Russell A G, Wallace A R y Butler R C. 2003. Susceptibility of potato (*Solanum tuberosum*) cultivars to powdery scab (caused by *Spongospora subterranea*), and relationships between tuber and root infection. Australasian Plant Pathology 32:377-385
13. Flett S P, 1983. A technique for detection of *Spongospora subterranea* in soil. Transactions of the British Mycological Society, 81: 424-5.
14. Gilbert G S. 2002. Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. Annual Review Phytopathology, 40:13-43.
15. Gómez S, Hoyos L y González E P. 2008. Estudios de infección de *Spongospora subterranea* en papa (*Solanum tuberosum*) variedad comercial Diacol Capiro. Revista Politécnica, 7:9-18.
16. Harrison J G, Searle R J y Williams N A. 1997. Powdery scab disease potato a review. Plant Pathology, 46: 1-25 17. Heald F G. 1983. Manual of plant disease. McGraw-Hill. Segunda edición. New York. p 467 -475
18. Hooker W J. 1980. Compendium of Potato Diseases. American Phytopathological Society Press, St. Paul. MN. 125p.
19. Jaramillo S y Botero J M. 2007. Respuesta de diferentes poblaciones de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* a la rotación con dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* ssp *andigena*). Revista Facultad Nacional de Agronomía, 60:3859-3876.
20. Jones R A C y Harrison B D. 1969. The behavior of potato mop-top virus in soil, and evidence for its transmission by *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh. Annals of Applied Biology 63(1): 1-17.
21. Lees A K. 2000. Summary of the session on past and present research on powdery scab. Past and present Research: Powdery SCAF. En: Proceedings of the First European Powdery scab Workshop, 2000. Aberdeen, Scotland, July 20-22. (Merz U., Lees A.K., eds.) p. 55-57.
22. McCullagh P y Nelder J A. 1989. Generalized Linear Models. Chapman and Hall: London. (Mathematical Statistics of Generalized Linear Model).
23. Makarainen E, Ritha H, Teperi E y Valkonen J. 1994 Resistance to *Spongospora subterranea* in tuber-bearing and nontuber-bearing *Solanum* spp. Potato Research, 37:123-127.
24. Merz U. 1993. Epidemiological aspects of powdery scab of potatoes caused by *Spongospora subterranea*. pp. 104-106. En: Proceedings of the 2nd Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors. Montreal
25. Merz U. 1997. Powdery scab. Research in Switzerland. Past and present Research: Powdery Scab. En: Proceedings of the First European Powdery scab Workshop, 2000. Aberdeen, Scotland, July 20-22. (Merz U., Lees A.K., eds.) p. 67-71.
26. Merz U. 2008. Powdery scab of potato-occurrence, life cycle and epidemiology. Symposium paper. American Journal of Potato Research 85(4):241-246.
27. Millner P D y Kitt D G. 1992. The Beltsville method for soilless production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza 2: 9-15.
28. Montero M, Vásquez V y Rivera C. 2004. Potato powdery scab caused by *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*, in Costa Rica. Potato Research 47: 25-34.
29. Navia E y García C. 2004. Estudios en la biología y patología de *Spongospora subterranea* en papa. Revista Latinoamericana de la papa, suplemento especial. Marzo 38.
30. Qu X y Christ B J. 2004. Genetic variation and phylogeny of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* based on ribosomal DNA sequence analysis. American journal of Potato Research 81(6): 385-394.
31. Qu X y Christ B J. 2006. The host range of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* in the United States. American Journal of Potato Research, 83(4): 343-347.
32. Ramirez L, González P, Zuluaga C y Cotes J M. 2009. Evaluación de 3 metodologías de rápida multiplicación de 30 accesiones de *Solanum tuberosum* l. grupo. *phureja*. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, 62 (Suplemento 3), S1-64.
33. Rodríguez K, Rivero R y García C. 2001. Estudio de la incidencia de los principales patógenos en semilla de papa (*Rhizoctonia*, *Rosellinia*, *Spongospora*, *Erwinia*, *Streptomyces* y *Verticillium*). (Artículo en línea). Disponible en: <http://www.Redepapa.org/rodriguez1.pdf> (16 abr.2004).
34. Torres H. 2002. Roña (*Spongospora subterranea*). pp. 27-31. En: Torres, H. Manual de las enfermedades más importantes de la papa en el Perú. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Peru. 59 p.
35. Urquijo L P, Rodríguez S J y Santoalla A G. 1961. Patología Vegetal Agrícola. Salvat Editores. Barcelona. pp 153-157
36. Van De Graaf P, Lees A K, Wale S J y Duncan J M. 2005. Effect of soil inoculum level and environmental factors on potato powdery scab caused by *Spongospora subterranea*. Plant Pathology, 54: 22-28
37. Van De Graaf P, Lees A K y Wale S J. 2007. Factors affecting the incidence and severity of root infection and galling caused by *Spongospora subterranea* in potato. Plant Pathology, 56(6):1005.
38. Villegas M, Hoyos L M y González E P. 2008. Observaciones histológicas de estructuras celulares asociadas a *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* en papa. Revista Facultad Nacional de Agronomía, 62:5039-5045.
39. Wale S. 2000. Summary of the session on national potato production and the powdery scab situation. En: Proceedings of the First European Powdery scab Workshop, 2000. Aberdeen, Scotland, July 20-22. (Merz U., Lees A.K., eds.) p. 3-9.
40. Walsh J A, Merz U y Harrison J G. 1996. Serological detection of spore balls of *Spongospora subterranea* and quantification in soil. Plant Pathology 45: 884-895.