



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Análisis de la interacción *Solanum tuberosum* Grupo Phureja - *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*

Dayhana Clemencia Benavides Erazo

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Agronomía

Maestría en Ciencias Agrarias

Línea de investigación: Fitopatología

Bogotá, Colombia

2013



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Análisis de la interacción *Solanum tuberosum* Grupo Phureja - *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*

Dayhana Clemencia Benavides Erazo

Trabajo de tesis presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias Agrarias

Línea de investigación: Fitopatología

Directora

CELSA GARCÍA DOMÍNGUEZ, Ph.D.

Profesora Asociada Facultad de Agronomía

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Agronomía

Maestría en Ciencias Agrarias énfasis Fitopatología

Bogotá, Colombia

2013

De las muchas cosas buenas que he recibido en la vida ha sido la oportunidad de aprender por eso Agradezco a Dios, a él también por mis padres Ricardo y Soleymer, origen de mi existir, a mis hermanas Dalila y Daniela por sus consejos, gracias a ustedes por educarme y porque gracias a ustedes encontré mi vocación y realización de mi ser, a Efra por ser mi compañero en las derrotas y alegrías, A mi hijo Jerónimo motivación para salir adelante día a día, a ustedes por ser mi familia por forjar mi alma en la humildad, cúspide para llegar al éxito y felicidad.

Agradecimientos

A todas aquellas personas que compartieron su conocimiento conmigo para culminar exitosamente esta etapa de mi vida, especialmente agradezco a la profesora Celsa García por sus orientaciones precisas en el tema, al profesor Enrique Torres por sus correcciones y aportes durante la escritura del documento, al profesor Carlos Ñustez por su colaboración al facilitarme los tubérculos de las accesiones a evaluar y por su valiosa contribución como jurado de tesis, al grupo de investigación de *S. subterranea* de la Universidad Nacional sede Medellín liderado por el profesor José Miguel Cotes quienes con su experiencia y su conocimiento me brindaron información que me sirvió como punto de partida para dar inicio a esta investigación, a la profesoras Liliana Hoyos Carbajal y a la investigadora María Catalina Botero Larrarte por su importante contribución como jurados de tesis, a la Dirección de Investigación sede Bogotá por destinar recursos financieros que fueron de gran utilidad para el desarrollo de éste trabajo, a Edgar Benitez y Camilo Beltrán por su asesoría en la parte estadística y ayuda en el proceso Geoestadístico, a la Universidad Nacional de Colombia por la oportunidad que me brindó al formarme en sus aulas y por facilitarme el acceso y utilización de cada una de las instalaciones que necesité en el transcurso del desarrollo de mi proyecto, a Jesús León y Sandra Castillo por su apoyo en la elaboración de cortes histológicos y la toma de fotos, a Ángela Carreño por su disposición y voluntad para resolver inquietudes, a mis compañeros quienes con su esfuerzo diario demostraron estar dispuestos a correr riesgos necesarios para triunfar, porque requerí de su apoyo durante y después de la tesis; gracias por su amistad.

Especial reconocimiento a Clara Piñeros mi amiga y compañera quien compartió mis esfuerzos, entendía mis problemas y gozó con mis triunfos; a Deissy Juyo por su apoyo incondicional, por regalarme una sonrisa y todo su apoyo en los momentos cruciales de este proceso, a Don Rubén Cruz, Nathali Solano, Erika, Sandra, Wadith, a todos y cada uno de los amigos y compañeros del laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional quienes con su acompañamiento y ayuda hicieron posible esta investigación.

Resumen

Benavidez, D. 2013. Análisis de la interacción *Solanum tuberosum* Grupo Phureja - *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*

Spongospora subterranea f.sp. *subterranea* (Sss) causa la sarna polvosa de la papa, enfermedad que se ha expandido a todos los países productores de papa. En Colombia éste patógeno se reportó por primera vez en 1965 y desde entonces se registra en todas las zonas paperas afectando la apariencia y calidad del tubérculo por la presencia de pústulas y/o disminuyendo la producción por la formación de agallas en las raíces; a pesar de esto aún no existe un manejo efectivo de la enfermedad. El objetivo de ésta investigación fue analizar la interacción *S. tuberosum* Grupo Phureja (StP) y *S. subterranea* f.sp. *subterranea* en términos de especificidad por órgano de infección. Se estableció un ensayo con suelo naturalmente infestado bajo condiciones de campo en el primer semestre del año 2012, se evaluó resistencia y susceptibilidad en raíz y/o tubérculo en cuarenta y nueve genotipos de StP. Cuando el órgano evaluado mostraba la sintomatología típica de la enfermedad se tomaron muestras que se utilizaron para caracterizar al patógeno mediante PCR utilizando primers específicos para Sss que amplifican la región ITS 1-5.8 S-ITS 2 del ADNr. De los 49 genotipos, 32 presentaron agallas en raíz, 11 presentaron pústulas en tubérculo y 9 presentaron infección en ambos órganos. Se confirmó la especificidad del patógeno por órgano de infección. Se reporta que en las accesiones con síntomas en raíz y en tubérculo se identificaron las dos variantes del patógeno en una misma planta. Así también se encontraron mutaciones puntuales en la secuencia de nucleótidos corroborando que en Colombia la población de Sss es más variable genéticamente que las poblaciones del patógeno de otros países.

Palabras Claves: ITS, *Spongospora subterranea*, ADNr, interacción planta patógeno, *Solanum phureja*.

Abstract

Benavidez, D. 2013. Analysis of the *Solanum tuberosum* Grup Phureja - *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* interaction

Spongospora subterranea f.sp. *subterranea* (Sss) causes powdery scab of potato disease has spread to all potato producing countries. In Colombia Sss was reported in 1965 and since then is recorded in all areas affecting the appearance of tuber and quality by the presence of pustules and / or diminution the production by the formation of galls on roots, although this has not there is an effective management of the disease. The purpose of this study was to analyze the interaction *S. tuberosum* Grup (StP) and *S. subterranea* f.sp. *subterranea* in terms of organ specificity for infection. A trial was established with naturally infested soil under field conditions in the first semester of 2012, resistance and susceptibility was evaluated in root and / or tuber forty nine accessions of StP belonging to the National Collection of StP National University of Colombia. When the structure assessed showed typical symptoms of the disease were sampled that were used to characterize the pathogen by PCR using specific primers that amplify Sss - 5.8S – ITS 1 rDNA ITS 2. Of the 49 accessions, 33 had root galls, 11 had pustules on tuber and 9 had infection in both organs. Specificity confirmed by organ pathogen infection. It is reported that in the accessions with symptoms in root and tuber identified two variants of the pathogen in the same plant. And mutations were also found in the nucleotide sequence. They were found six mutation patterns reported sequences in GenBank corroborating that Sss Colombia 's population is genetically more variable pathogen populations worldwide.

Keywords: ITS, *Spongospora subterranea*, ADNr, plant-pathogen interaction, *Solanum phureja*.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	3
Abstract.....	4
Lista de figuras	8
Lista de tablas.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. OBJETIVOS.....	12
3. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN.....	12
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
4.1 Importancia de <i>Solanum tuberosum</i> L. en el mundo	14
4.2 Importancia de <i>Solanum tuberosum</i> Grupo Phureja en Colombia.....	14
4.3 La sarna polvosa de la papa.....	15
4.4 <i>Spongospora subterranea</i> el agente causal de la sarna polvosa de la papa y el camanduleo.....	17
4.5 Síntomas ocasionados por la sarna polvosa y el camanduleo en cultivos de papa.....	19
4.6 Rango de hospederos de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i>	22
4.7 Resistencia de hospedero a <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i>	23
4.8 Resistencia órgano- específica.....	25
4.9 Variabilidad patogénica de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i>	28

5.	METODOLOGÍA.....	31
5.1	Selección de genotipos de <i>Solanum phureja</i> a evaluar.....	31
5.2	Evaluación de la sarna polvosa y camanduleo en campo.....	33
5.3	Mapeo y distribución de inóculo de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i> en el lote experimental.....	34
5.3.1	Cuantificación del inóculo de Sss presente en las muestras de suelo.....	34
5.4	Evaluación de la resistencia de <i>Solanum tuberosum</i> Grupo Phureja a <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i>	35
5.5	Determinación de haplotipos de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i>	36
5.5.1	Extracción de ADN a partir de esporosoros de tejido vegetal infectado.....	36
5.5.2	Amplificación de la regiones ITS 1–5.8 S–ITS 2 del ADNr de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i>	38
5.5.3	Purificación de ADN a partir de producto de PCR	38
5.5.4	Observación de Polimorfismos mediante SSCP.....	38
5.5.5	Secuenciación.....	39
5.5.6	Análisis de secuencias	39
6.	RESULTADOS	40
6.1	Distribución espacial de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i> en el lote experimental	40
6.2	Resistencia de genotipos de <i>Solanum tuberosum</i> Grupo Phureja a <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i>	44
6.3	Extracción de ADNr de Sss y amplificación por PCR	53
6.3.1	Purificación de ADN	56

6.4 Variabilidad genética de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i>	56
6.5 Interacción <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i>–<i>Solanum tuberosum</i> Grupo Phureja	60
7. DISCUSIÓN	64
8. CONCLUSIONES	70
9. RECOMENDACIONES	70
10. BIBLIOGRAFÍA	72
11. ANEXOS	77

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Spongospora subterranea</i>	23
Figura 2: Síntomas de sarna polvosa en tubérculos de papa	24
Figura 3: Síntomas de sarna polvosa en tubérculos de papa, acercamiento.....	24
Figura 4: Síntomas de camanduleo en raíz de papa.	26
Figura 5: Calidad de ADN de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i> por dos protocolos de extracción.....	41
Figura 6. Kriging de distribución de esporosoros de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i> en lote experimental municipio Facatativá.....	46
Figura 7. Semivariograma de distribución de esporosoros de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i> en lote experimental.....	47
Figura 8: Mapa de asociación de distribución de sarna polvosa vs concentración de inóculo de esporosoros de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i> en el lote experimental	47
Figura 9: Formación de agallas en raíz de <i>Solanum tuberosum</i> Grupo Phureja debido a la infección de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i>	51
Figura 10: Genotipos de <i>Solanum tuberosum</i> Grupo Phureja susceptibles a la infección de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i> en raíz	54
Figura 11: Confirmación del agente causal, <i>Spongospora subterranea</i>	55
Figura 12: Diferencias en susceptibilidad a la infección de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i> en tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> Grupo Phureja.....	57
Figura 13: Observación microscópica de esporosoros de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i> obtenidos a partir de lesiones de tubérculo	57

Figura 14: Genotipos de <i>Solanum tuberosum</i> Grupo Phureja susceptibles a la infección de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i> en tubérculo y cantidad pústulas formadas por tubérculo.....	57
Figura 15: Amplificación de ADNr a partir de agallas de papa infectadas con <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i>	59
Figura 16: Amplificación de ADNr a partir de pustulas de tubérculos de papa infectados con <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i>	59
Figura 17: Patrones SSCP obtenidos de amplificaciones directas de ADN de agallas de raíz y lesiones en tubérculos causadas por <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i>	60
Figura 18: Alineamiento de secuencias de la región ITS de aislamientos de <i>S. subterranea</i> obtenidos de una misma planta	66

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i>	21
Tabla 2: Resistencia y/o susceptibilidad a la infección de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i> en raíz de genotipos de <i>Solanum tuberosum</i> Grupo Phureja	35
Tabla 3: Densidad óptica y concentración de esporosoros de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i> en lote experimental ubicado en la vereda el Corzo municipio Facatativá, Cundinamarca	46
Tabla 4: Accesiones de <i>Solanum tuberosum</i> Grupo Phureja susceptibles en raíz a la infección de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i> en lote experimental ubicado en Facatativá	51
Tabla 5. Accesiones de <i>Solanum tuberosum</i> Grupo Phureja susceptibles en tubérculo a la infección de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i> en lote experimental ubicado en Facatativá	57
Tabla 6: Resultados de identidad en alineamiento de secuencias de ADNr realizado a aislamientos Tipo I (AY604171) y Tipo II (AY604172).....	61
Tabla 7: Haplotipo de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i> identificado a partir de secuencias de ADNr muestras provenientes pústulas de tubérculo de <i>Solanum tuberosum</i> Grupo Phureja	63
Tabla 8: Haplotipo de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i> identificado a partir de secuencias de muestras provenientes de raíz de <i>Solanum tuberosum</i> Grupo Phureja	64
Tabla 9. Relación de polimorfismo y posición en la secuencias de las regiones ITS del ADNr de <i>Spongospora subterranea</i> f.sp. <i>subterranea</i> para población Colombiana reportadas por Carreño, 2009.....	64

1 INTRODUCCIÓN

La sarna polvorienta, cuyo patógeno es el protozooario plasmodioforomicete *Spongospora subterranea* (Wallr) Lagerh f. sp. *subterranea* Tomlinson (en adelante referido como Sss), es reconocida como una enfermedad limitante para el cultivo de papa a nivel mundial incluyendo Colombia (Merz & Falloon, 2009, Guerrero, 2002). En los tubérculos, los síntomas de la enfermedad se observan inicialmente como lesiones roñosas superficiales en la epidermis, las cuales evolucionan a pústulas eruptivas polvorientas que pueden convergir hasta deformaciones severas que afectan la apariencia y calidad cosmética del producto, generando pérdidas económicas para los agricultores (Jaramillo & Botero., 2007, Harrison *et al.*, 1997). Otra expresión de la enfermedad es la formación de agallas en las raíces, con lo que se afecta la absorción de agua, nutrientes y se disminuyen los rendimientos. Con la eventual desintegración de las raíces y durante la cosecha de los tubérculos infectados se presenta liberación de estructuras de resistencia y diseminación del patógeno conocidas como esporosoros.

Este patógeno se encuentra en todas las regiones productoras de papa de Colombia, observándose que los órganos afectados (Tubérculo y raíz) varían con la región y el cultivar establecido: en Cundinamarca, Boyacá y norte de Antioquia los síntomas en las variedades Parda Pastusa y Diacol Capiro se observan en tubérculos, en Nariño y el oriente antioqueño se presentan en las raíces. Esta diversidad en la sintomatología se ha atribuido a variaciones geográficas en las condiciones ambientales, a la existencia de variantes del patógeno con diferente distribución regional, o a factores genéticos o geográficos que afectan la interacción: hospedero-patógeno-ambiente (Jaramillo & Botero., 2007). Como Sss es parásito obligado, se puede albergar la hipótesis de que las diferencias en sintomatología correspondan a una especificidad por órgano infectado, como resultado de procesos coevolutivos entre poblaciones del patógeno y de la planta, como se ha probado para *Magnaporthe oryzae* (Tucker *et al.*, 2010). Carreño (2009) encontró variación genética en poblaciones colombianas de Sss, parte de esa variación se encontró asociada con el órgano de la planta infectado. La mayor parte de los estudios de interacción Sss-papa se han realizado con papas tetraploides del grupo

tuberosum pocos incluyen StP como material de evaluación, pese a que este material es un valioso recurso genético y de producción (Porrás, 2000; Pulgarín *et al.*, 2012).

Para ampliar el conocimiento de la variación genética de Sss, esta investigación se propuso verificar si hay variantes de Sss que difieran en especificidad por órgano infectado en su interacción con accesiones de StP, y, en caso positivo, describir la interacción diferencial

2 OBJETIVOS

Ojetivo general:

- Reconocer la interacción patogénica entre *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* y *Solanum tuberosum* Grupo Phureja

Objetivos específicos:

- Identificar genotipos de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja con resistencia a *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* en tubérculo y/o raíz.
- Explorar la posible especificidad por órgano afectado entre genotipos del hospedero y aislamientos del patógeno.

3 HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Hipótesis nula (ho):

Existen variantes genéticas de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* que difieren en especificidad por órgano infectado

Hipótesis alternativa (ha):

No existen variantes genéticas de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* que difieran en especificidad por órgano infectado

Contexto de la hipótesis:

Los fitopatógenos biótrofos como royas, carbones o mildes, o hemibiótrofos tales como oomicetos, establecen una relación especializada con sus hospederos, y el resultado de cada relación individual está determinada por la interacción entre los genes de resistencia en el hospedero y los efectores en el patógeno (Dodds & Rathjen, 2010). Para los patógenos mencionados se ha encontrado que los procesos coevolutivos con sus respectivos hospedantes han dado como resultado una diversidad de formas de resistencia en la planta y de efectores en los patógenos y de genes de resistencia en las plantas. En el caso de Sss, como resultado de observaciones y evaluaciones de campo, se afirma que no hay resistencia o inmunidad del tipo conferido por genes mayores, y que todos los cultivares de papa se comportan como susceptibles aunque en diferente grado (Falloon *et al.*, 2003) y la resistencia observada se asume que es conferida por genes menores (Rendón *et al.*, 2012). Sin embargo, estas evaluaciones se han realizado con plantas expuestas a poblaciones heterogéneas del patógeno por lo que no es fácil identificar interacción entre variantes específicas de Sss y genotipos resistentes. La evaluación de diferentes genotipos de StP permitirá identificar y caracterizar la posible gradación de respuestas en raíces y en tubérculos a este patógeno. Una eventual demostración de diversidad y especificidad de Sss en la interacción llevaría a modificar los protocolos de selección en los programas de mejoramiento.

Existe la posibilidad de que la gradación en susceptibilidad observada en cultivares comerciales de *Solanum tuberosum* sea la expresión del fenómeno de resistencia no específica o resistencia de campo (Falloon *et al.*, 2003) Ante esta situación se espera identificar aislamientos del patógeno más agresivos que pudieran utilizarse para selección en programas de mejoramiento.

4 REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Importancia de *Solanum tuberosum* L. en el mundo

La papa (*Solanum tuberosum* L.) forma parte importante del sistema alimentario mundial, hace parte de los cuatro cultivos básicos en la alimentación humana; uno de los factores que favorecen la expansión del cultivo es la capacidad de adaptación a los diferentes climas y sistemas de cultivo que presenta este tubérculo, su centro de origen se localiza en sur América específicamente en la región Andina. En Colombia éste cultivo es uno de los principales renglones agrícolas; según el DANE el área sembrada en papa fue de 147,796 Ha para el 2012 generando una producción anual de 1,8 millones ton /anuales (DANE, 2013); el 90 % de la producción del cultivo de papa para su comercialización se agrupa en los departamentos de Cundinamarca (37 %), Boyacá (27 %), Nariño (23 %) y Antioquia (10 %), la otra parte se distribuye en las partes altas de los departamentos como Caldas, Tolima, los Santanderes y otras zonas de menor importancia (DANE, 2011).

Según (Ñústez, 2011) en el país existen 43 variedades de papa registradas; pero sólo unas pocas son las más cultivadas a nivel nacional en las diferentes regiones productoras. La variedad Patusa Suprema ocupó el 34.3 % del área total sembrada a nivel nacional en el 2009, seguido por las variedades Diacol Capiro (27 %), Parda Pastusa (20,5 %), Tuquerreña (3,6 %), ICA Puracé (1,9 %), ICA única (2,3 %), Criolla (5,9 %); el hecho de limitar la siembra a unas pocas variedades de papa que resultan siendo susceptibles a diferentes patógenos ha incrementado la afectación por problemas fitosanitarios limitantes para el cultivo como es el caso de gota y sarna polvosa.

4.2 Importancia de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja en Colombia

Solanum tuberosum Grupo Phureja conocida comúnmente a nivel nacional como papa criolla fué recientemente clasificada como *Solanum tuberosum* Grupo Andigenum (Spooner *et al.*, 2007). Es una planta que se ha caracterizado por la adaptación a días cortos, es una especie diploide, con poco tiempo de reposo del tubérculo, corresponde a los morfotipos que presentan tubérculos con color de piel y carne amarillo (fenotipo yema

de huevo) se caracteriza por tener una producción precoz en comparación con variedades de *S. tuberosum* L (Rodríguez *et al.*, 2009).

Las condiciones agroecológicas para el cultivo de StP se encuentran en alturas entre los 1,800 y los 3,200 m.s.n.m, siendo óptimas para su cultivo las altura comprendidas entre los 2,300 y los 2,800 m.s.n.m, temperaturas promedio de 10 °C a 20 °C, precipitaciones promedio de 900 mm/añual; aunque, el cultivo se desarrolla bien con precipitaciones superiores; el mejor suelo para su cultivo es aquel que presenta una textura franca, suelta y profunda que evite la acumulación de humedad en la raíz, con una pendiente máxima del 30 %, un pH entre 5,2 y 5,9 y altos contenidos de materia orgánica (Cevipapa, 2008)

Colombia se ubica como el mayor productor, consumidor y exportador de papas diploides a nivel mundial (Rodríguez *et al.*, 2009); los principales departamentos productores son Nariño, Cundinamarca, Boyacá y en menor proporción Antioquia, Norte de Santander y Santander (Cevipapa, 2008). En Colombia el área cultivada con papa para el año 2008 fueron cerca de 138,315 Ha, de las cuales la papa diploide representa aproximadamente el 6 % del área sembrada, con exportaciones cercanas a 1.000 t/ año (Fedepapa, 2009). *Solanum tuberosum* Grupo Phureja para Colombia representa un recurso genético de gran importancia considerando las propiedades del cultivo a nivel nutricional, cualidades culinarias, economía, potencial de exportación (Porrás, 2000) y en investigación es utilizada desde 1998 en el programa de mejoramiento genético adelantado por la Universidad Nacional el cual se ha enfocado en buscar genotipos más redondos, con mayor reposo, aptos para el consumo en fresco o procesamiento industrial, con alto rendimiento y con resistencia a *Phytophthora infestans* uno de los principales problemas fitosanitarios del cultivo (Rodríguez *et al.*, 2009).

4.3 La sarna polvosa de la papa

La sarna polvosa es uno de los problemas fitosanitarios más relevantes en el cultivo de papa que ha sido reportada desde mediados del siglo 19 en países productores. Fue reportada por primera vez en 1841 en Alemania, cinco años después se registró en el Reino Unido y desde entonces el patógeno ha tenido una amplia distribución a nivel mundial. Se ha reportado en Checoslovaquia, Finlandia, Italia, Noruega, Rusia, Sicilia, Suiza, Países bajos, Australia, América del Norte y SurAmérica, según lo reportado por

Harrison *et al.*, (1997); es así como ésta enfermedad ha incrementado su importancia a nivel mundial en los últimos años.

En Colombia, éste patógeno se reportó por primera vez por Orjuela en 1965, diferentes factores pueden estar favoreciendo el incremento de la incidencia de la enfermedad a nivel nacional como: el transporte de semilla aparentemente sana de una región a otra, siembra constante de cultivares susceptibles, irrigación continua del cultivo cuando el suelo tiene alta capacidad de retención de agua propiciando condiciones favorables para que el patógeno pueda causar infección (Merz, 2008), así como la carencia de un sistema adecuado para la inspección de tubérculos y un manejo eficiente del patógeno.

En Colombia éste patógeno se encuentra ampliamente distribuido, está presente en todas las zonas productoras de papa (Jaramillo *et al.*, 2004) se han reportado pérdidas de hasta el 50% de las cosechas en las variedades Parla Pastusa, Diacol Capiro y papa criolla (Gilchrist y Reinaldy 2009). Ésta enfermedad es frecuente en zonas donde las condiciones de humedad en el suelo son altas, los suelos son mal drenados, con pH ácido y con bajas temperaturas, generalmente la enfermedad se desarrolla en regiones productoras que tienen climas fríos y húmedos con alturas superiores a 2800 m.s.n.m (Harrison *et al.*, 1997).

Un importante daño indirecto de *S. subterranea* en algunas zonas productoras de papa es ser vector de la enfermedad conocida como enanismo de los tallos de papa causada por el Potato Mop Top virus (PMTV), que provoca una marcada disminución de los rendimientos y afecta severamente la calidad comercial de los tubérculos. (Salazar, 1982) Éste virus se ha encontrado afectando cultivares de papa en las principales regiones productoras del norte de Europa, América del Sur, China, Japón y Australia, y recientemente se ha sido un brote en el norte de EE.UU y Canadá. En Colombia éste virus fue detectado por primera vez en cultivos de Zipaquirá y Subachoque por Vélez (2007).

4.4 *Spongospora subterranea* el agente causal de la sarna polvosa de la papa y el camanduleo

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *Spongospora subterranea*

Reino:	Protozoa
División:	<i>Myxomycota</i>
Clase:	<i>Plasmodiophoromycetes</i>
Orden:	<i>Plasmodiophorales</i>
Familia:	Plasmodiophoraceae
Género:	<i>Spongospora</i>

Los plasmodiophoridios son protozoos que se caracterizan por la producción de zoosporas y la formación de un extrusoma complejo. Son patógenos de plantas y causan enfermedades importantes. Incluye otros once géneros entre los cuales predominan *Spongospora* sp. *Plasmodiophora* sp. y *Polymyxa* sp. por ser patógenos en cultivos de importancia agrícola. El género *Spongospora* se caracteriza por ser parásito obligado y aunque Sss es ante todo un parásito de la papa, se reporta que también puede generar daños en las raíces de otros cultivos. Inicialmente se reportaba que *S. subterranea* contenía dos formas especiales, *S. subterranea* f.sp. *nasturtii* (Ssn) que infecta berro (*Nasturtium* sp.) pero no papa o tomate y puede transmitir virus en el cultivo Berro (Harrison *et al.*, 1997) mientras que *S. subterranea* f. sp. *subterranea* (Sss) infecta papa y tomate, pero no berro, y que estas dos formas especiales no se diferencian morfológicamente únicamente se distinguen por su capacidad de infectar a determinado hospedero. En estudios más recientes realizados por Dick (2001) y Down *et al.* (2002) se encontraron “distancias filogenéticas considerables” en lo que hasta el momento se había considerado como formas especiales de la especie subterranea; así que actualmente se tienen dos especies *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerheim y *Spongospora nasturtii*, sin embargo, es común encontrar en la literatura que se siga llamando a este patógeno como *S. subterranea* f.sp. *subterranea*. Según Lyman & Rogers (1915) *Spongospora subterranea* parece ser originaria de los Andes y su distribución a nivel mundial en gran parte se debe al transporte de tubérculos que contenían inóculo de Sss (Gau *et al.*, 2013). El ciclo de vida de *S. subterranea* inicia con la liberación de zoosporas a partir de los esporosoros cuando éstos se encuentran bajo estimulación de humedad y

exudados de la planta hospedera. Cuando las zoosporas germinan se mueven a través de la lámina de agua libre en el suelo con el movimiento de sus flagelos en búsqueda de su hospedero. Cuando la zoospora primaria entra en contacto con tejido de la planta hospedera la zoospora a través de un “aguijón” inyecta su contenido celular infectando las células epidermales de la raíz. Ahí empieza el crecimiento de un plasmodio multinuclear (fase esporangial), las células de la planta sufren un crecimiento debido a procesos de hiperplasia e hipertrofia que resultan en la formación de agallas. Si el patógeno no cuenta con condiciones favorables para su crecimiento y desarrollo el plasmodio puede enquistarse dentro de la célula del hospedero o de lo contrario continua su crecimiento presentando divisiones meioticas sucesivas hasta formar zoosporangios en células únicas, que se encuentran en diferentes estados de división del plasmodio. Cada célula única da origen a una zoospora secundaria (indistinguible de la zoospora primaria liberada a partir de esporosoros) que es infectiva en tejido nuevo (tubérculo, raíces, estolones) dentro del mismo huésped y producir más zoosporas que son liberadas al suelo incrementando el nivel de inóculo. Los tubérculos en su periodo de iniciación 2 a 3 semanas son más susceptibles a la infección aunque ésta también es posible en periodos tardíos como resultado de proliferación lenticelas en tubérculos maduros o un retraso en suberización en lenticelas debido a los niveles bajos de oxígeno en suelos húmedos. La espora secundaria puede volver a realizar el ciclo antes mencionado ó formar plasmodio esporogénico que sufrirá divisiones mitóticas cruciformes (fase esporogénica). Sss tiene la capacidad de producir estructuras de reposo llamados esporosoros, son de pared gruesa y altamente resistentes a condiciones desfavorables en el suelo y cuando germinan liberan zoosporas primarias que van a continuar con su ciclo de vida (Figura 1).

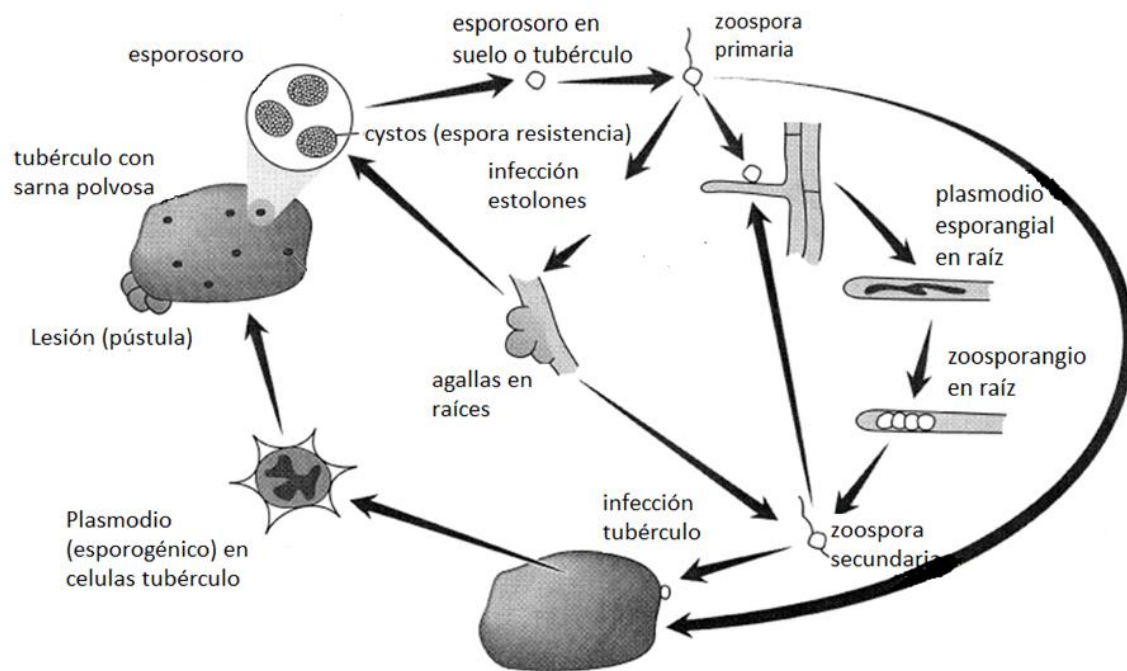


Figura 1. Ciclo de vida de *Spongospora subterranea* (Harrison *et al.*, 1997).

4.5 Síntomas ocasionados por la sarna polvosa y el camanduleo en cultivos de papa

Los primeros síntomas visibles de la sarna polvosa se presentan en la superficie de los tubérculos como pústulas (ampollas) pequeñas de color castaño, cuyo tamaño es de dos o más milímetros de diámetro, las cuales se observan con mayor frecuencia en la terminación distal de tubérculos jóvenes, éstas incrementan su tamaño y se extienden lateralmente debajo de la peridermis hasta que ocasiona la ruptura de la peridermis, formando unas proyecciones con apariencia de verrugas de color blanco; cuando las lesiones maduran dan lugar a la formación de depresiones superficiales ocupadas por masas pulverulentas de esporas de resistencia del patógeno (esporosoros), originando así una sarna de color marrón oscuro (Figura 2 y Figura 3). Al inicio de la infección las roñas son individuales pero cuando las condiciones son favorables para su desarrollo frecuentemente se unen produciendo grandes lesiones con contornos irregulares y pueden dar lugar a la formación de tumores en los tubérculos Harrison *et al.* (1997).

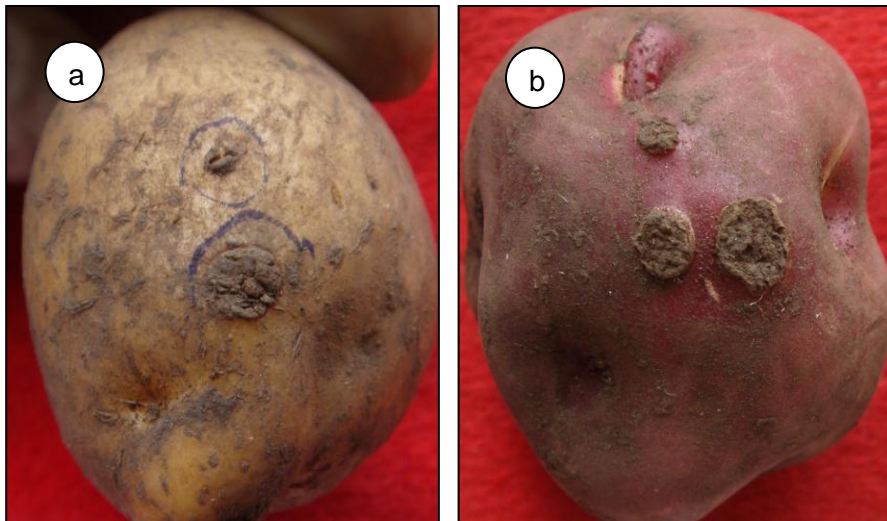


Figura 2. Síntomas de sarna polvosa en tubérculos de papa. (a) y (b) Lesiones roñosas en la epidermis de tubérculo de dos genotipos de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja por infección de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*.



Figura 3. Síntomas de sarna polvosa en tubérculos de papa. Estado maduro y apariencia polvosa de pústula de sarna polvosa en tubérculo de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja.

Raíces y estolones de papa también pueden ser infectados por *S. subterranea* mostrando inicialmente pequeñas manchas necróticas que se convierten en verrugas de color blanco lechoso que se transforman en agallas de color blanco crema; estas agallas pueden estar solitarias o consecutivas, cuando maduran se tornan a color castaño y finalmente liberan las masas de esporosoros, los cuales liberan zoosporas que van a iniciar una nueva infección si las condiciones ambientales son favorables (Figura 4). Cuando las plantas están jóvenes y la formación de agallas es alta, Sss puede ocasionar su marchitamiento y muerte. En ocasiones, las agallas pueden ser numerosas en las

raíces, mientras los tubérculos pueden permanecer absolutamente libres de infección (Harrison *et al.*, 1997). En Colombia se han reportado diferencias en los síntomas por órgano afectado dependiendo de los cultivares establecidos y de la zona papera, encontrando que algunos materiales son más susceptibles en raíz y otros en tubérculos. Por ejemplo, en Antioquia se han visto daños importantes en raíces y tubérculos de papa de la variedad Diacol Capiro, con algunas diferencias dependiendo de la zona donde se encuentre el cultivo; en Cundinamarca y Boyacá el ataque se presenta principalmente en los tubérculos, y en Nariño los daños que más se observan son la formación de agallas en raíces de las variedades susceptibles como Parda Pastusa (Jaramillo *et al.*, 2004).



Figura 4. Síntomas de camanduleo en raíces de papa. (a) y (b) Camanduleo en raíces de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja por infección de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*,

Aunque la respuesta diferencial de cultivares de papa ha sido demostrada en varios ensayos, existe poca información sobre la relación entre susceptibilidad de raíz y de tubérculo para un cultivar específico (Harrison *et al.*, 1997; Mishra y Srivastava, 2001; Merz *et al.*, 2004), y se desconoce si el grado de respuesta está determinado por poblaciones o patotipos de Sss con patogenicidad diferencial sobre genotipos de papa

(Harrison *et al.*, 1997; Qu y Christ., 2004). Así existen diversas hipótesis que podrían explicar el comportamiento diferencial de Sss sobre los cultivares de papa plantados mundialmente. Jaramillo & Botero (2007) plantean la posibilidad que estas diferencias sean el resultado de las variaciones en las condiciones ambientales de una región a otra, o quizás se deban a la distribución regional de diferentes variantes del patógeno, y/o a su interacción: hospedero-patógeno-ambiente. Falloon (2008) sugiere que diferentes mecanismos de resistencia pueden estar operando de acuerdo al órgano infectado de la planta, raíz o tubérculo, y para las diferentes variedades. Por lo tanto, la elección del cultivar a sembrar es de vital importancia puesto que los más susceptibles permiten la multiplicación y sobrevivencia del patógeno, y perpetúan la infestación de suelo (Merz *et al.*, 2004; Van de Graaf *et al.*, 2007; Falloon, 2008). La utilización de variedades con algún grado de resistencia a Sss puede ser un componente clave en el manejo de esta enfermedad.

4.6 Rango de hospederos de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*

En una investigación adelantada por Andersen *et al.*, (2002), encontraron diferentes tasas de infección desarrolladas por el patógeno en plantas de familias diferentes a la Solanaceae, como Alzooaceae, Apiaceae, Asteraceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Lamiaceae, Plantaginaceae, Papaveraceae, Poaceae, Polygonaceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Resedaceae, Solanaceae y Urticaceae. Un total de 17 especies que hacían parte de las diferentes familias se confirmaron como hospedantes de Sss; aparentemente Sss tiene un amplio rango de hospedantes, sin embargo, el desarrollo de los esporos nunca había sido observado en otros hospederos diferentes a *S. tuberosum*.

Qu y Christ (2006), evidenciaron la formación de quistosoros en seis especies de plantas: *Solanum ptycantum* D, *Datura stramonium* L., *Avena sativa* L., *Dactylis conglomerado* L., *Solanum lycopersicum* L., y *Brassica campestris* L., indicando así que Sss tiene la capacidad de completar su ciclo de vida en hospederos alternos a la papa, lo que representa un aspecto epidemiológico importante. Así mismo, en un estudio adelantado por Shah *et al.*, 2010 se encontró que las siguientes especies también son hospedantes del patógeno: *Fagopyrum esculentum* M, *Phleum pratense* L., *Raphanus sativus* L., *Brassica napus* L., *Trifolium pratense* L., *Secale cereale* L., *Ambrosia artemisiifolia* L.,

Chenopodium album L., *Amaranthus retroflexus* L. y *Cyperus esculentus* L. Recientemente, se ha encontrado que el patógeno puede producir agallas en *S. physalifolium* y *S. nigrum* y su patogenicidad fue confirmada por inoculación a plantas de tomate y de papa bajo condiciones de invernadero. A nivel nacional un estudio adelantado por Arcila *et al.*, 2011 registraron la presencia de estructuras del patógeno en plantas de las especies *Pennisetum clandestinum* (Hochst. ex Chiov.), *S. lycopersicum*, *S. betaceum* Cav., *S. quitoense* Lam., *Zea mays* L., *Coriandrum sativum* L., *Daucus carota* L., *Apium graveolens* L. y *Raphanus sativum* L. ésta información resulta importante considerarla para el manejo de la enfermedad cuando éste se enfoca en la rotación de cultivos, porque se debe tener en cuenta la existencia de especies vegetales cultivables y malezas que pueden ser infectadas por Sss que le permitan a éste patógeno mantenerse en campo así como multiplicar su inóculo.

4.7 Resistencia de hospedero a *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*

De acuerdo a estudios adelantados se ha encontrado que la resistencia de *S. tuberosum* a *S. subterranea* varía ampliamente en cuanto a la susceptibilidad de infección en tubérculos y raíces. Aunque éste patógeno afecta tubérculo y raíz, el tubérculo fue por muchos años el órgano de interés debido a la importancia comercial del mismo, por su parte la raíz había sido aislada durante mucho tiempo, sin embargo, actualmente se reconoce que la infecciones en raíces afectan el aprovechamiento de nutrientes y la producción de la planta, así como el incremento de inóculo en campo convirtiéndose en un factor de riesgo para el sistema productivo. A través del tiempo una serie de variedades comerciales y clones han sido evaluados bajo condiciones de campo e invernadero a nivel mundial que han arrojado información importante respecto a los diferentes niveles de resistencia de sus progenies. Actualmente se registra que la resistencia a la sarna polvosa es controlada poligenicamente y que la resistencia de las raíces y tubérculos está bajo un control genético independiente Bhattacharya *et al.*, (1985) citado por Brierley *et al.*, (2008) y Fornier (citado por Harrison *et al.*, 1997).

La sarna polvosa no se había considerado en los programas de mejoramiento de la papa hasta hace relativamente poco tiempo. En Nueva Zelanda se obtuvo el primer cultivar resistente a sarna polvosa “Gladiator” resultado de un cruce entre dos líneas, una con

resistencia al virus X de la papa, *P. infestans*, *G. rostochiensis* y *S. scabies* y la otra con la resistencia a los nematodos del quiste a partir de tubérculos de la especie silvestre *Solanum vernei* (Genet *et al.*, 1995). Con las diferentes evaluaciones realizadas bajo condiciones de campo se ha podido corroborar que el comportamiento de los materiales en cuanto a susceptibilidad a Sss en algunos casos varía de un año a otro y en diferentes lugares; dichas variaciones han sido atribuidas a las condiciones climáticas y posiblemente la distribución en focos del patógeno en el suelo, por lo que se ha sugerido realizar evaluaciones por varios años para lograr resultados confiables. Nitzan *et al.*, 2008, Merz & Falloon, 2009 realizan reportes donde confirman que en el cultivo de papa la herencia de la característica de la resistencia a Sss es de tipo Poligénica y adicionalmente es un carácter fácilmente heredable y bastante estable (Nitzan *et al.*, 2010).

Actualmente se sabe que la mayoría de variedades comerciales de papa son altamente susceptibles a enfermedades limitantes como es el caso de la sarna polvosa. Una estrategia esencial a largo plazo para evitar la propagación del patógeno en campo es la disponibilidad de cultivares de papa resistentes a Sss acompañado de otras características agronómicas, sin embargo, actualmente no hay disponibilidad de materiales con estas características. En Colombia aunque la enfermedad es limitante los trabajos adelantados sobre la resistencia a *S. subterranea* f.sp. *subterranea* son mínimos, dentro de los primeros acercamientos está el estudio realizado por Cótes (2012) cuyo material de trabajo fue la Colección de StP de la Universidad Nacional, se evaluó la respuesta fenotípica y genotípica por resistencia a *Spongospora subterranea* en diferentes zonas productoras de papa; encontrando grandes diferencias en la susceptibilidad y resistencia de las genotipo evaluados tanto en tubérculo como en raíz, así también pudieron concluir que las variables climáticas que más influyeron en el desarrollo de la enfermedad fueron temperatura y humedad del suelo. Otro estudio realizado con estos genotipos es el realizado por Orozco (2012) quien estimó valores de heredabilidad de la resistencia a sarna polvosa en una población de StP de 49 familias de medios hermanos, los ensayos se establecieron en dos veredas de la Unión (Antioquia) donde concluyó que los valores de heredabilidad son medianos a bajos, independiente del método de selección empleado durante la evaluación, el efecto aditivo de los genes no tuvo gran peso en la proporción de la variabilidad fenotípica observada,

mientras que el ambiente si realizó un efecto bastante marcado en el desarrollo de la enfermedad.

4.8 Resistencia órgano - específica

La resistencia en una planta es determinada por su capacidad para reconocer al patógeno y la subsecuente activación de respuestas de defensa. Existen diferentes tipos de resistencia: cualitativa (determinada por genes mayores), cuantitativa (controlada por varios o pocos genes) y de no hospedero (determinada por varios niveles de defensa que incluyen barreras físicas como inducidas). Actualmente conocemos existen diferentes patrones de interacción planta- patógeno que son el resultado de procesos coevolutivos que se reflejan en diferencias en rango de hospederos, en la especialización de hospedero y en la infección de órganos específicos. Visualmente identificamos los órganos de la planta que son infectados por los patógenos y los síntomas de la enfermedad resultante, pero aún no entendemos porque un patógeno prefiere infectar un órgano determinado mientras otras partes de la planta no son afectadas por el mismo, o las razones de porque otros patógenos tienen la capacidad de infectar la planta entera, por eso la necesidad de estudiar las interacciones a un nivel más profundo (Balmer & Mauch, 2013). Son escasos los estudios adelantados comparando en una misma planta la susceptibilidad de dos órganos diferentes, sin embargo, éstos han permitido aclarar un poco el panorama en algunos modelos como los adelantados por:

Hermanns *et al.*, 2003 evaluaron la susceptibilidad a *Hyaloperonospora parasitica* en hojas y raíces de *Arabidopsis* en materiales previamente reportados como resistentes en hojas. Observaron que las plantas resistentes a *H. parasitica* respondían con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la estimulación de muerte celular programada (HR) en hojas, pero en raíces no se encontró ningún tipo de respuesta de defensa activa en comparación con las respuestas expresadas en hojas. Sin embargo, al realizar RT-PCR del ADN total se encontró que tanto en raíz como en hojas se estaban expresando genes R (RPP 1) y componentes de la ruta de señalización mediados por genes R (NDR 1 y EDS), éstos resultados descartaron por completo la hipótesis de que la resistencia en hojas se debía a la expresión de un gen específico en órgano o tejido, por lo tanto, concluyeron que en raíces no es suficiente la expresión de estos genes R y sus componentes para que haya una inducción completa y se active de la defensa en la

planta. Es posible que adicional a los genes R otros mecanismos de defensa estén implicados en la resistencia.

Lanoue *et al.*, 2010 llevaron a cabo estudios sobre los metabolitos secundarios induciendo resistencia en raíces en el modelo *Gladiolus – Fusarium oxysporum* exudados radicales de compuestos fenólicos y ácido t-cinámico en cultivares resistentes inhibieron la germinación de esporas, mientras que exudados a partir de cultivares susceptibles no lo hicieron.

Balmer & Mauch, 2013 estudiaron el modelo *Colletotrichum gramminicola* en maíz debido a que éste patógeno puede infectar diferentes órganos en la planta simultáneamente. Éste estudio se realizó con el fin de identificar las respuestas químicas y moleculares que se presentaban tanto en hojas y raíces. Se encontró que la expresión de genes y patrón hormonal era similar en los dos órganos, sin embargo, las raíces responden más rápido a la infección del hongo que las hojas y exhibiendo niveles más altos de hormonas asociadas a defensa como ácido salicílico (AS), ácido jasmonico (AJ), ácido abscísico (ABA) y compuestos flavonoides. La infección tanto en hojas como en raíz activó la resistencia sistémica sobre la parte aérea de la planta, ésta respuesta de defensa sistémica se asoció con adaptaciones transcripcionales elevados niveles de ABA y AS. La composición de metabolitos secundarios en hojas y raíces difirió por lo tanto se concluyó que estos órganos emplean sistemas de defensa químicos distintos.

Es así como surge la necesidad de explicar que es lo que está sucediendo en el patosistema *S. tuberosum* Grupo Phureja- *spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* ya que el patógeno puede causar dos enfermedades diferentes al afectar tubérculo y raíz en una misma planta, sin embargo son muy limitados los estudios adelantados respecto al tema.

Gao *et al.*, 2013 evaluaron la respuesta de defensa en papa ante la infección de *P. infestans* un patógeno que tiene la facultad de infectar tubérculos y parte aérea de la planta. Ésta investigación se centró en descifrar el transcriptoma de los tuberculos de papa de un material silvestre (WT) y una línea mejorada (+RB gen que confiere resistencia foliar a los principales aislamientos de *P. infestans*) bajo infección por *P. infestans*. Éste se convierte en el primer estudio que trata de descifrar el transcriptoma de tubérculo a la infección de patógenos. La línea (+RB) resultó siendo resistentes a la

infección de *P. infestans* tanto en tubérculo como en follaje, mientras que (WT) fue susceptible en los dos órganos. La dinámica del transcriptoma en los dos materiales al mismo tiempo mostró un comportamiento diferente en cuanto a la expresión de genes ya que WT tenía una expresión alta de genes, mientras que la línea mejorada fue estable después de la inoculación. Se estableció que tanto WT y + RB utilizan el mismo conjunto de genes de respuesta al ataque de *P. infestans* pero que hay diferencias significativas en la regulación temporal de estos. Se concluyó que la línea +RB difiere del WT en la transcripción constitutiva de regulación de los genes relacionados con la defensa. Un total de 11 genes fueron relacionados con la respuesta rápida de activación de la defensa en tubérculos, se encontraron genes involucrados en la respuesta etileno, genes de factores de transcripción como ERF1, elemento clave en la integración de rutas JA (ácido jasmónico) y ET (etileno) importantes en la regulación de las respuestas de defensa.

El pensamiento científico ha defendido y según estudio adelantado por Hermanns *et al.*, 2003 es que la reacción hipersensible HR está asociada con reacciones incompatibles para biotrofos y hemibiotrofos presentándose siempre esta respuesta por encima del suelo pero está ausente en las raíces a pesar de la transcripción de genes R en ambos órganos. En el trabajo de Gao *et al.*, 2013 claramente se observaron los síntomas de esta respuesta inducida en los tubérculos aunque el órgano sea subterráneo aclarando que es un tallo modificado y no una raíz.

Bittara *et al.*, 2013 caracterizó molecular y fitoquímicamente ocho genotipos de papa (cinco clones avanzados desarrollados por el Centro Internacional de la Papa -CIP y tres cultivares comerciales 'Granola', 'Esperanza', 'Kennebec') y relacionó estas características con su respuesta frente a la infección de Sss, la caracterización molecular se realizó mediante el uso de secuencias sencillas repetidas SSR un análisis cualitativo y cuantitativo de los metabolitos secundarios (MS) extraídos a partir de tubérculos/estolones, raíces y parte aérea de la planta. Este trabajo arrojó que en plantas infectadas por Sss las antraquinonas estuvieron ausentes en todos los genotipos estudiados, mientras que los aceites esenciales estuvieron siempre presentes. De forma general se observó que la distribución de los grupos de MS varió según el órgano y el genotipo. El cultivar 'Granola' fue el genotipo con los niveles más altos de polifenoles y taninos en hojas, tallos aéreos, éstos han sido asociados a la defensa de la planta contra el ataque de plagas y enfermedades, sin embargo, este genotipo es reportado como

altamente susceptible a gota por lo que puede pensarse que este grupo estaría relacionado con otros caracteres. Los genotipos que presentaron un mayor grado de infección por Sss se caracterizaron por la presencia de polifenoles y taninos, mientras que aquellos que presentaron menor grado de infección estuvieron relacionados con la presencia de flavonoides y alcaloides. Dos de los clones evaluados, aunque tenían un alto grado de similitud genética, no respondieron de igual manera a la enfermedad, por lo que otros mecanismos de defensa de la planta podrían estar actuando. Falloon *et al.*, (2003) señalaron que, así como la resistencia por parte de *S. tuberosum* a *S. subterranea* parece estar determinada por asociación aditiva de varios genes, es muy probable que dichos genes respondan de manera diferente según genotipo y su interacción con el ambiente.

Resulta interesante en el patosistema StP-Sss cuestionar la importancia de que *S. subterranea* sea un patógeno de naturaleza parásito obligado (Harrison *et al.*, 1997) y que su rango de hospedero para completar su ciclo de vida sea estrecho (Andersen *et al.*, 2002; Qu y Chirst 2006; Shah *et al.*, 2010); muy posiblemente éstas características han permitido que exista una co-evolución de genes de resistencia y de efectores debido a la búsqueda de mecanismos que prevengan, detengan o toleren la presencia de Sss en la planta y por parte del patógeno el desarrollar de mecanismos para colonizar y completar el ciclo de vida tratando de escapar del reconocimiento en la planta. Por lo tanto, ésta co-evolución puede ser la responsable de la resistencia en los diferentes genotipos de papa y la preferencia del Sss para infectar un órgano en particular.

4.9 Variabilidad patogénica de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*

Con el fin de determinar si en una misma planta que es susceptible a la infección de Sss en tubérculo y raíz existen variantes genéticas del patógeno por órgano infectado y para confirmar la existencia de haplotipos de la población colombiana de Sss reportados por Carreño (2009), se realizó un análisis de secuencia de la regiones ITS del rADN de *Spongospora subterranea*.

Éstas regiones han sido ampliamente utilizadas para aclarar la filogenia de los plasmodioforidos ya que la mayoría de primers específicos han sido diseñados a partir de éstas (Neuhauser *et al.*, 2010). Las regiones ITS (Región espaciadora de transcripción

interna) se encuentran ubicadas entre los genes que codifican para el RNA ribosomal, cada gen ribosomal codifica para tres genes, el gen de la subunidad menor 18 S, el gen 5.8 S y el gen de la subunidad mayor 28 S separados cada uno del otro por una región espaciadora de transcripción interna ITS, ITS 1 e ITS 2 respectivamente, y separados entre sí por regiones espaciadoras intergénicas IGS. Las regiones 18 S, 5.8 S y 28 S se caracterizan por ser más conservados que las regiones ITS e IGS, por ello son utilizadas para estudiar relaciones en los niveles superiores de jerarquía taxonómica. Las ITS son regiones de evolución rápida y con mayor probabilidad de éxito en estudios de identificación para un rango más amplio de hongos debido a que muestra diferencias evolutivas que permiten obtener una buena información genética y taxonómica de los individuos a nivel de especie en un mismo género (Schoch *et al.*, 2012) al ser regiones de gran variabilidad, permite el diseño de sondas específicas para especie, son ampliamente usadas por ser secuencias relativamente cortas de tamaños entre 500-800 pb, fácilmente amplificadas por PCR mediante iniciadores universales y por requerir pequeñas cantidades de ADN.

Éstas regiones se han utilizado en estudios de evaluación de la variación genética de las secuencias de ADN de *Sss*, dichos estudios han arrojado información importante respecto a la existencia de diversidad entre las secuencias de ITS de los aislamientos; Bulman & Marshall (1998) amplificaron y secuenciaron regiones ITS del ADNr identificando dos agrupaciones de *Sss* en Australia y Europa (Tipo I y II). Qu y Chirst (2004) identificaron dos grupos genéticamente diferentes (I y II) se reportó que la secuencia del ITS tipo I difiere del tipo II por tener tres diferencias nucleotídicas en las posiciones 60, 127 y 157 y una inserción de cinco nucleótidos en la posición 129 a 133 en la región ITS 1, y seis diferencias nucleotídicas en la posición 348, 367, 399, 402, 461 y 475 y dos posiciones donde ocurrió delección de una base en posición 356 y 474 en la región ITS 2. En 2006 éstos investigadores llevaron a cabo un estudio más detallado con 24 muestras de esporosoros provenientes de USA y Canadá usando marcadores moleculares RAPS y RFLPs evidenciando así variación genética entre localidades geográficas, pero no entre individuos de una misma localidad, el análisis de agrupamiento, permitió separar los aislamientos en dos grupos: el grupo I que incluyó aislamientos del oeste de Norteamérica (exceptuando aislamientos de Colorado) y el grupo II incluyó aislamientos originarios del este de Norteamérica y de Colorado. En Colombia, Jaramillo *et al.*, (2004) desarrolló un estudio sobre la variabilidad genética del

patógeno encontrando un 99 % de similitud con las secuencias de los tipos de ITS I y II reportadas en el Genbank, por lo tanto, no se detectó variación genética del patógeno a nivel de secuencias de ADN. En 2009 Carreño utilizó estas regiones para evaluar la variabilidad genética de Sss encontrando homología de secuencia con el Tipo I para aislamientos de tubérculo y con el Tipo II para aislamientos de agallas, al comparar las secuencias obtenidas a partir de éstas regiones éste trabajo permitió identificar mutaciones puntuales en las secuencias de Sss así como también se sugirió la especificidad del patógeno por órgano de infección. Así también se descartó la presencia de patotipos o ecotipos de Sss en Colombia, puesto que en ninguno de los casos se observó una asociación entre la variación genética y el cultivar hospedero o zona geográfica, se comprobó, que en el país existen variantes genéticas de Sss, que difieren de las reportadas en otros países, registrándose la presencia de cinco haplotipos del patógeno. Ramírez (2010) citado por Giraldo *et al.*, (2012) realizó un estudio sobre la variabilidad genética de aislamientos de Sss provenientes de La Unión- Antioquia, utilizando cebadores específicos Spo8/Spo9 y SsF/SsR encontrando en los análisis de secuencias de la región ITS del ADNr altos niveles de similitud con cepas obtenidas del Departamento de Nariño, así como con secuencias de referencia de cepas del tipo II de Sss. En 2012 Osorio *et al.*, evaluaron la variabilidad genética de aislamientos provenientes de las principales zonas paperas de Colombia con el fin de apoyar la selección de aislamientos que puedan ser evaluados en programas de mejoramiento genético de papa así como en el diseño de pruebas de detección asintomática del patógeno; utilizaron ampliación de regiones ITS del ADNr mediante la técnica PCR-RFLPs y encontraron tres variantes principales de Sss de las cuales el Tipo I y II ya están reportadas en el GenBank y debido a las diferencias en las secuencias encontradas en este estudio respecto, se propone un nuevo subgrupo el Tipo III que incluye indistintamente aislamientos provenientes de suelo, raíces y pústulas de tubérculos, éste es el primer reporte para Colombia de este grupo.

5 METODOLOGÍA

5.1 Selección de genotipos de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja a evaluar

Como resultado de evaluaciones previas de la colección de *SrP ja* de la Universidad Nacional de Colombia realizadas durante 2010 y 2011 en el marco del proyecto de investigación “Evaluación fenotípica y genotípica de la colección de *SrP* de la Universidad Nacional de Colombia por resistencia a *Spongospora subterranea*” liderado por la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y financiado por el Ministerio de Agricultura fueron seleccionados los genotipos con mayor resistencia y mayor susceptibilidad a la infección de *S. subterranea* en raíz. Para el presente trabajo las accesiones a evaluar fueron conformadas por las cabezas y las colas de resistencia y susceptibilidad a *Sss* según la información antes mencionada (Tabla 2).

Tabla 2. Resistencia y/o susceptibilidad a la infección de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* en raíz de los genotipos de la Colección de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja de la Universidad Nacional seleccionados para esta investigación.

N°	Genotipo de la colección	Respuesta fenotípica a infección por <i>Sss</i> en raíces ¹
1	Col 86	Altamente resistente
2	Col 63	Altamente resistente
3	Col 79	Altamente resistente
4	Col 6	Altamente resistente
5	Col 59	Altamente resistente
6	Col 143	Altamente resistente
7	Col 36	Altamente resistente
8	Col 94	Altamente resistente
9	Col 65	Altamente resistente
10	Col 126	Altamente resistente
11	Col 141	Altamente resistente
12	Col 122	Altamente resistente
13	Col 100	Altamente resistente
14	Col 72	Altamente resistente
15	Col 101	Altamente resistente

Continuación Tabla 2...

N°	Genotipo de la colección	Respuesta fenotípica a infección por Sss en raíces¹
16	Col 53	Altamente resistente
17	Col 51	Altamente resistente
18	Latina	Altamente resistente
19	Col 43	Altamente resistente
20	Col 92	Altamente resistente
21	Col 35	Altamente resistente
22	Col 3	Altamente resistente
23	Col 102	Altamente resistente
24	Col 98	Altamente resistente
25	Col 127	Medianamente susceptible
26	Guaneña	Medianamente susceptible
27	Col 117	Medianamente susceptible
28	Col 34	Medianamente susceptible
29	Col 96	Medianamente susceptible
30	Col 69	Altamente susceptible
31	Col 128	Altamente susceptible
32	Colombia	Altamente susceptible
33	Col 13	Altamente susceptible
34	Col 124	Altamente susceptible
35	Col 37	Altamente susceptible
36	Col 71	Altamente susceptible
37	Col 110	Altamente susceptible
38	Col 133	Altamente susceptible
39	Col 70	Altamente susceptible
40	Col 73	Altamente susceptible
41	Col 5	Altamente susceptible
42	Col 23	Altamente susceptible
43	Galeras	Altamente susceptible
44	Col 15	Altamente susceptible
45	Col 103	Altamente susceptible
46	Col 99	Altamente susceptible
47	Col 74	Altamente susceptible
48	Col 106	Altamente susceptible
49	Col 32	Altamente susceptible

¹ Caracterización realizada en el marco del proyecto de investigación “Evaluación fenotípica y genotípica de la colección de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja de la Universidad Nacional de Colombia por resistencia a *Spongospora subterranea*” liderado por la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y financiado por el Ministerio de Agricultura.

5.2 Evaluación de la sarna polvosa y camanduleo en campo

El ensayo se estableció en el primer semestre de 2012 en la finca Esplendor, ubicada en la vereda el Corzo municipio Facatativá, Cundinamarca, donde se conocía su registro de alta severidad de sarna polvosa, se estableció un total de 49 genotipos. Teniendo en cuenta que en campo las condiciones no son homogéneas y que se desconoce el patrón de comportamiento de las diferentes variables del suelo que puedan afectar la expresión de la enfermedad, el diseño experimental utilizado fue de bloques completos al azar con 3 bloques y 4 unidades experimentales por genotipo. En cada sitio donde se sembró un genotipo se sembraron cuatro plántulas contiguas con una distancia de 0.25 cm entre ellas (provenientes de tubérculos previamente emergidos bajo condiciones de invernadero), 1 metro de distancia entre surcos y 0.65 cm de distancia entre genotipos.

Inicialmente se obtuvieron los tubérculos de los 49 genotipos de StP y se dispusieron en bolsas de papel bajo condiciones de penumbra para estimular la brotación. Con el fin de adelantarse en la brotación de los tubérculos la semilla se sembró en vasos plásticos que contenían suelo naturalmente infestado con Sss del mismo lote donde se estableció el ensayo. A los 15 días de emergidas las plántulas éstas se llevaron para su siembra definitiva en el lote. Durante el ciclo del cultivo se realizaron actividades de manejo, control y prevención de plagas y enfermedades.

Los materiales fueron evaluados cuando estaban en fase de floración a los 60 días y en época de cosecha a los 120 días después de la siembra en el lote experimental. La resistencia a Sss en éste ensayo se evaluó por la presencia y ausencia de síntomas característicos de la infección de Sss tanto en tubérculo como en raíz y tubérculo.

Durante el periodo permanencia de los genotipos bajo condiciones de campo fueron tomados los datos de precipitación y temperatura máxima y mínima diaria (Anexo 1).

5.3 Mapeo y distribución de inóculo de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* en el lote experimental

Con el fin de cuantificar la concentración inicial del inóculo de Sss y de determinar la distribución del inóculo en el lote experimental, se tomaron 64 muestras de suelo en puntos distanciados de 2.0 X 1.3 m. Se dejó un 0,50 cm de borde en los cuatro costados del lote. Las coordenadas de los puntos de muestreo se tomaron con Magelan meridian GPS (Anexo 2). El proceso de muestreo dentro de los lotes se realizó descartando la capa superficial del suelo, las muestras fueron tomadas entre los 15 y 30 cm de profundidad y se llenaron en bolsas plásticas debidamente etiquetadas. El suelo se conservó a -80 °C para cuantificación de esporos utilizando la técnica de DAS-ELISA (Doblé Antibody Sandwich).

5.3.1 Cuantificación del inóculo de Sss presente en las muestras de suelo.

Para cuantificar el nivel de inóculo presente en suelo, se utilizó la técnica de DAS-ELISA utilizando el kit comercial de la marca Bioreba. La técnica utiliza anticuerpos monoclonales específicos para Sss ya que reconocen únicamente esporos del patógeno y ninguna otra forma del patógeno ni patógenos que muestren una sintomatología similar en tubérculo a la sarna polvosa de la papa; ratificando así la especificidad de la técnica. Para el procesamiento de las muestras se siguió lo establecido en el protocolo del Kit BIOREBA (Anexo 3). Para esta prueba se utilizaron como controles positivos y negativos los reactivos propios del kit y como blanco se utilizó el buffer de extracción.

Rodríguez *et al.*, (2002) establecieron un protocolo para la estimación de la concentración de esporos en suelos productores de papa utilizando como base la técnica de DAS-ELISA y establecieron una ecuación de regresión cuadrática que permite transformar valores de DO medidos a 405 nm en concentración de esporos por gramo de suelo.

Ecuación de regresión cuadrática establecido por Rodríguez *et al.*, (2002):

$$(\log (DO + 1))^{0.4} = 2.553 - 1.0793 \log Q + 0.13062 \log Q^2$$

Donde:

Q: concentración de esporosoros

DO: Densidad optica arrojada por el espectofotómetro a 405 nm

A partir de la concentración de inóculo calculada en cada uno de los puntos muestreados se analizó la distribución espacial del patógeno en el lote con un análisis geostadístico, encontrando un patrón agregado del inoculo a los 90 C es mayor en comparación con los demás puntos.

5.4 Evaluación de la resistencia de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja a *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*

Después del establecimiento de las plantas en campo cuando se encontraban en estado de floración, dos meses después de la emergencia de las mismas, se realizó un muestreo de raíces para establecer la presencia o no de agallas como resultado de la infección de Sss en dos plantas de cada genotipo, las agallas encontradas fueron cosechadas y almacenadas en tubos eppendorf debidamente etiquetados, en laboratorio se pesó la cantidad de agallas colectadas por cada planta. Una vez colectado este material, se almacenó a -20 °C y posteriormente se realizó la caracterización molecular del patógeno. Las plantas que fueron muestreadas en raíces nuevamente se volvieron a sembrar para evaluarlas en época de cosecha. Cuando las plantas estaban en estado de madurez y senescencia alrededor de los 120 días, fueron colectados los tubérculos que se habían formado en cada planta; los mismos fueron evaluados bajo estereoscopio para comprobar la presencia de síntomas de sarna polvosa, posteriormente se realizaron raspados de los posibles síntomas corroborando la presencia de esporosoros cuando se realizaron montajes en láminas con agua destilada estéril y se observaron en microscopio de luz a 10 X y 40 X. En los tubérculos que se presentaban los síntomas característicos de la infección de *S. subterranea* se contaron el número de pústulas formados y posteriormente se colectaron la pústulas de cada tubérculo y se almacenaron

en tubos eppendorf a -20 °C. Los esporos obtenidos de tubérculos se procesaron y analizaron de la misma manera que los provenientes de raíz.

5.5 Determinación de haplotipos de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*

5.5.1 Extracción de ADN a partir de esporos de tejido vegetal infectado

Se evaluaron dos protocolos de extracción de ADN: Protocolo de extracción de Rodríguez *et al.*, 2002 modificado por Carreño 2009 y el protocolo del kit power soil DNA isolation MoBio; con el fin de identificar el más eficiente en cuanto a calidad y limpieza de ADN extraído teniendo en cuenta que todas las muestras colectadas para el caso de tubérculo estaban por debajo de los pesos iniciales de las muestras establecidas por los protocolos probados. El primer protocolo que se evaluó fue el reportado por Rodríguez *et al.*, (2002) siguiendo la modificación realizada por Carreño (2009) como se detalla en el Anexo 5; se procesaron 12 muestras provenientes de pústulas de tubérculos con diferentes pesos que iban desde 0,005 g hasta 0,5 g. Para el segundo protocolo (kit power soil DNA isolation- laboratorio MoBio) se procesaron ocho de las 12 muestras anteriores con pesos que iban 0,005g hasta 0,25 g (Anexo 5). La valoración de la calidad y cantidad del ADN extraído se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% (Figura 5).

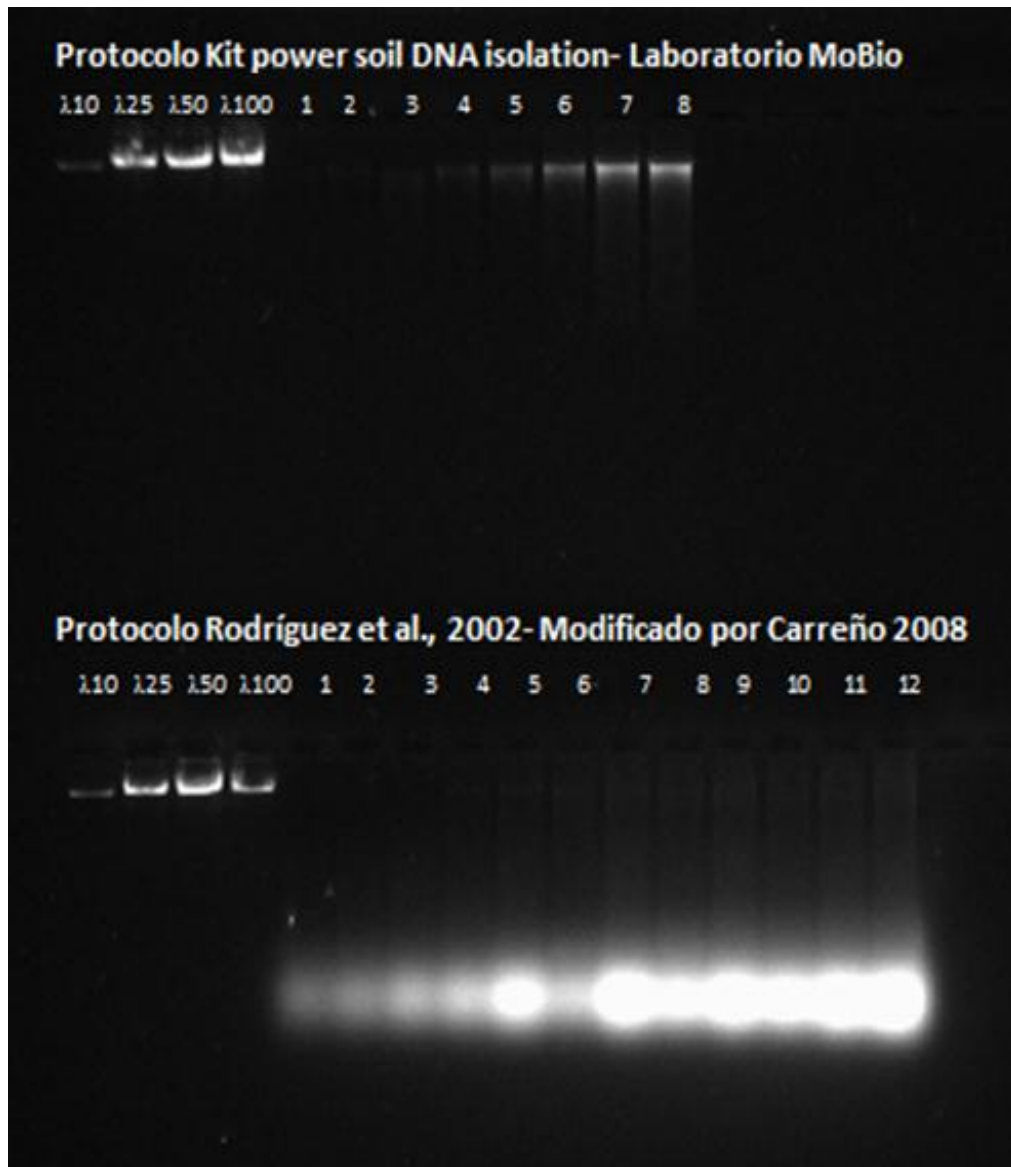


Figura 5. Calidad de ADN de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* por protocolo de extracción. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para cuantificación y calidad de ADN extraído a partir de muestras de tubérculo de papa con lesiones de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*. Parte superior de la figura: protocolo kit power soil DNA isolation MoBio, pozo 1 a 4 fago lambda 10, 25, 50 y 100 ng, pozo 5 a 12 ADN extraído a partir de muestras de tubérculo. Parte inferior de la figura: Protocolo Rodríguez *et al.*, (2002)-Modificado por Carreño 2009, pozo 1 a 4 fago lambda 10, 25, 50 y 100 ng, pozo 5 a 16 ADN extraído a partir de muestras de tubérculo.

Después de realizar la comparación de la cantidad y la calidad de ADN extraído por los dos protocolos se decidió utilizar el kit power soil DNA isolation toda vez que en el gel de agarosa se evidencia que la calidad de ADN extraída con éste último era más alta ya que

no mostraba tantos dímeros como el ADN extraído con el protocolo de Rodríguez *et al.*, (2002) modificado por Carreño 2009. En total se extrajo ADN de 55 muestras de agallas de raíz (provenientes de 32 genotipos que fueron susceptibles a la infección) y 11 muestras de pústulas de tubérculo.

5.5.2 Amplificación de la regiones ITS 1 – 5.8 S – ITS 2 del ADNr de Sss

Con el fin de realizar la caracterización molecular del patógeno después de haber extraído el ADN de las muestras provenientes de agallas de raíces y pústulas de tubérculo se utilizó la técnica de PCR empleando dos pares de primer específicos (ambos amplían la región ITS 1 y 2 del ADNr de *S. subterranea*), Spo8 (5'CTG GGT GCG ATT GTC TGT TG 3') y Spo9 (5' CAC GCC AAT GGT TAG AGA CG 3') reportados por Bulman & Marshall (1998) para amplificar una región de ADNr de 390pb. Las amplificaciones fueron realizadas en un volumen final de 60 µL conteniendo 1 X de buffer PCR, 2 mM de MgCl₂, 0.25 mM de cada dNTP, 0.5 µM de cada primer, 0.2 µg/µl de albúmina bovina, 0.6 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen) y 5 µL de ADN. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador (Thermal Cycler Biorad), programado con las siguientes condiciones: denaturación inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de amplificación con denaturación a 95 °C por 30 segundos, hibridación de cebadores a 55 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 50 segundos; con un ciclo final de 72 °C por 10 minutos. Luego de la amplificación, se tomaron 5 µL de los productos de reacción y se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio. La visualización de las bandas se realizó bajo luz ultravioleta. Para la determinación de peso molecular de cada uno de los productos amplificados, se utilizó como marcador de peso molecular una escalera de 100 pb (Invitrogen - Fermentas).

5.5.3 Purificación de ADN a partir de producto de PCR

Con el fin de realizar una purificación de producto de PCR por centrifugación y teniendo en cuenta la disponibilidad del kit (Promega) se optó por realizar la purificación de ADN a partir de producto de PCR procedimiento que mostró ser eficiente con el objetivo en menor tiempo (Anexo 6).

5.5.4 Observación de polimorfismos mediante SSCP

Los polimorfismos en las secuencias amplificadas con los primers Spo8 y Spo9 en aislamientos colombianos fueron confirmados mediante la técnica SSCP (single strand conformational polymorfism). Ésta técnica detecta diferencias de un solo nucleótido, es altamente sensible, de implementación rápida y económica (Estrada *et al.*, 2006). En este estudio se utilizó para el corrido un gel de acrilamida usando la Matriz MDE® (Mutation Determination Enhancement) no denaturante, se dejó correr en cámara BIORAD Sequi-Gen Sequencing Cell) a 6 watts constantes durante 16 horas identificando cambios en la movilidad de la banda a través de un gel de poliacrilamida indicando que en la secuencia de nucleótidos existen polimorfismos o mutaciones que alteran la estructura secundaria de la molécula.

5.5.5 Secuenciación

Finalmente los productos de PCR seleccionados para secuenciar, previamente purificados y cuantificados, fueron enviados a SIGMOL (Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia), donde se utilizó un secuenciador Applied Biosystems™ 3500 Series Genetic Analyzer. El proceso de secuenciación se requirió en ambas direcciones (Forward y Reverse), las cuales fueron comparadas con el fin de obtener mayor confiabilidad de los polimorfismos encontrados.

5.5.6 Análisis de secuencias

Las muestras secuenciadas fueron editadas en el software Chromas Lite MFC versión 2.1.2.0. Para confirmar la identidad de las secuencias con Sss se realizó Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La secuencias consensos fueron sometidas a un alineamiento múltiple mediante Clustal W2 con las accesiones AY604171 y AY604172 reportadas en el GenBank correspondientes a los tipo de ITS I y II. Los haplotipos de *S. subterranea* fueron identificados y confirmados mediante alineamiento de acuerdo a secuencias trabajadas por Carreño (2009).

6 RESULTADOS

6.1 Distribución espacial de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* en el lote experimental

Los valores de densidad óptica arrojados por la prueba de DAS-ELISA representan la concentración de esporosoros de *S. subterranea* presente en cada muestra de acuerdo al protocolo establecido por Rodríguez *et al.*, 2002, los valores de Densidad óptica (DO) variaron en un rango máximo de 0,764 DO y mínimo 0,146 DO. El promedio del control negativo fue de 0,2015 DO y el control positivo fue de 1,151 DO, controles que hacían parte del Kit Bioreba. Para las muestras analizadas se consideraron como positivos valores cuya densidad óptica fue dos veces el promedio del valor negativo 0,4 (siguiendo lo establecido en el protocolo del Kit); por lo tanto únicamente 18 puntos de los 64 muestreados se consideraron lecturas positivas para Sss de acuerdo al valor de corte establecido por el Kit (Tabla 3).

Tabla 3: Clasificación de densidad óptica y concentración de esporosoros de *S. subterranea* f.sp. *subterranea* en el lote experimental ubicado en la vereda el Corzo municipio Facatativá, Cundinamarca.

Rango densidad óptica	concentración de esporosoros / gramo suelo ¹	Clasificación ²	Número de puntos muestreados
0,146 -0,390	14222 – 146154	Negativo	46
0,401 - 0,764	147132 – 322387	Positivo	18

¹ Concentración de inóculo obtenida con la transformación de DO en la ecuación de regresión cuadrática establecida por Rodríguez *et al.*, (2002)

² Clasificación siguiendo umbral establecido en el protocolo del Kit Bioreba ($DO \geq 0,4$ positivas)

Las densidades ópticas arrojadas por la técnica DAS-ELISA (Anexo 3) permitieron realizar el mapa que ilustra la distribución del patógeno en el lote donde se estableció el ensayo; a partir del análisis espacial se observó un patrón agregado de inóculo en el lote, se observan parches donde la concentración de inóculo fue más alta (Figura 6).

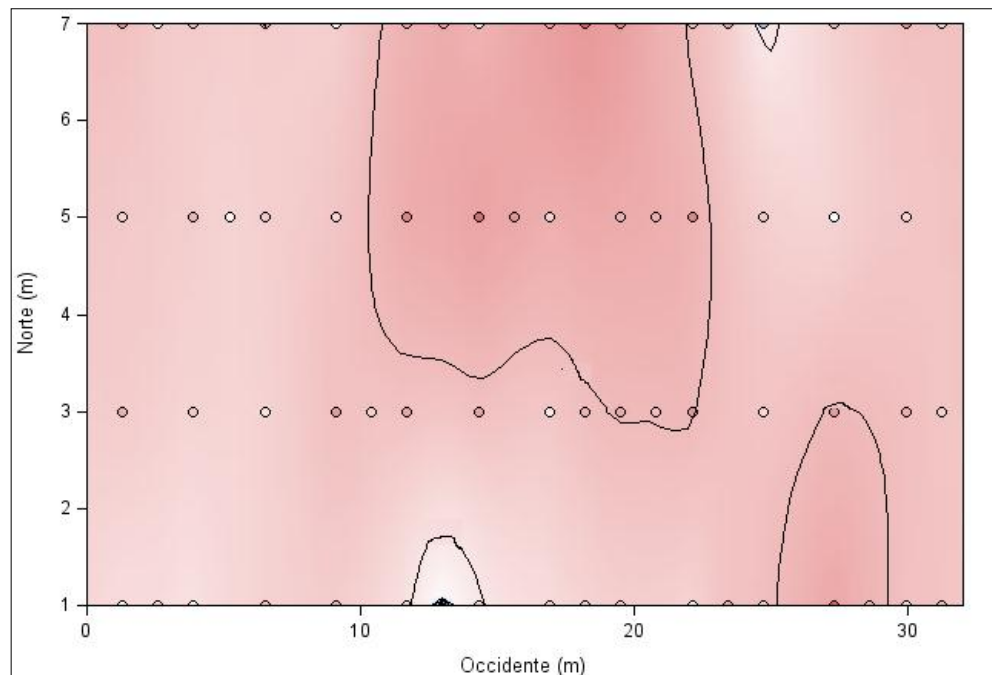


Figura 6. Kriging de distribución de esporos de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* en lote experimental municipio Facatativá. Los círculos representan los puntos de muestreo del suelo. La intensidad de color en el mapa representa la concentración del inóculo, a mayor intensidad mayor concentración de inóculo; las líneas de delimitación encierran los puntos que fueron muestreados y que presentaron las DO más altas.

Se estimaron semivariogramas que se ajustaron al modelo robusto. Se observó una correlación espacial hasta los 8 metros y de ahí en adelante independencia cuando la semivarianza se estabilizó, véase que a partir de los 8 metros se visualiza la meseta en la asíntota superior, el valor nugget fue de 0,2559 lo que indica que no hay probabilidad de una mayor estructura espacial a menores distancias de las muestreadas (Figura 7) indicando que después de los ocho metros fue frecuente encontrar un patrón agregado del inóculo en el lote experimental. En el variograma omnidireccional estimado se identificó anisotropía a los 0° y 45° mientras que en los 90° y 135° la semivarianza se estabilizó a desde el punto 0,5 m lo que corrobora el supuesto de anisotropía y el patrón agregado del inóculo en campo.

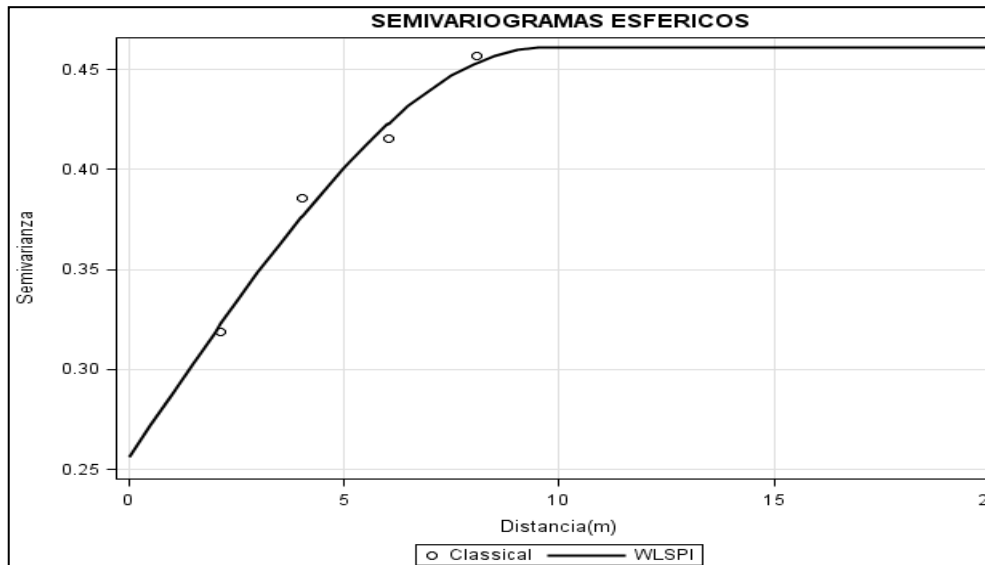


Figura 7. Semivariograma de distribución de esporos de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* en lote experimental para evaluación de materiales de papa diploide a *S. subterranea*. Lote ubicado en el municipio Facatativá.

Al comparar los datos de densidad óptica reportados por Rodríguez *et al.*, (2002) obtenidos en los diferentes muestreos se evidenció que los valores de densidad óptica de las muestras de suelo de ésta investigación son menores, debido a que el lote experimental donde se estableció el ensayo tiene un programa de rotación con cultivos como maíz, zanahoria, repollo, lechuga, lenteja y generalmente se siembra papa cada tercer semestre. Los datos de densidad óptica de Rodríguez *et al.*, (2002) registran absorbancias a partir de muestreos realizados en lotes provenientes de cultivo de papa con promedio de 2,265 DO correspondiente a concentración promedio de 938832 esporos/gramo de suelo, en lotes recién cosechados de papa se encontró un valor promedio de 1,761 DO equivalente a una concentración de 750595 esporos/gramo de suelo, sin embargo, Merz & Falloon (2009) concluyeron que suelos que presenten más de 500 esporos por gramo de suelo están altamente infestados por Sss y el riesgo de desarrollo de sarna polvosa es alto. En ésta investigación únicamente se consideraron positivos las muestras que tenían una DO superior a 0,4 equivalente a 147625 esporos/gramo de suelo pudiéndose considerar como concentraciones altas. Se realizó un mapa para ilustrar la asociación de distribución de la enfermedad vs la concentración de inóculo de Sss en el lote (Figura 8); al analizar los datos de muestreo de plantas susceptibles a la infección de Sss en tubérculo y raíz, se encontró que tanto los puntos muestreados en suelo considerados como DO positivas ($DO \geq 0,4$) y negativos

(DO < 0,4) según el punto de corte de Kit estuvieron asociados al desarrollo de la enfermedad y que fue más frecuente encontrar el desarrollo de la enfermedad en los puntos catalogados como negativos (Figura 8). Así también se encontró que los puntos considerados como positivos (concentraciones de esporos más altas) no estuvieron relacionados exclusivamente con las severidades más altas de la enfermedad encontrada en campo tanto en tubérculo como en raíz por lo tanto, severidades altas también se encontraron en los puntos que habían sido consideradas como negativos por el kit de Bioreba.

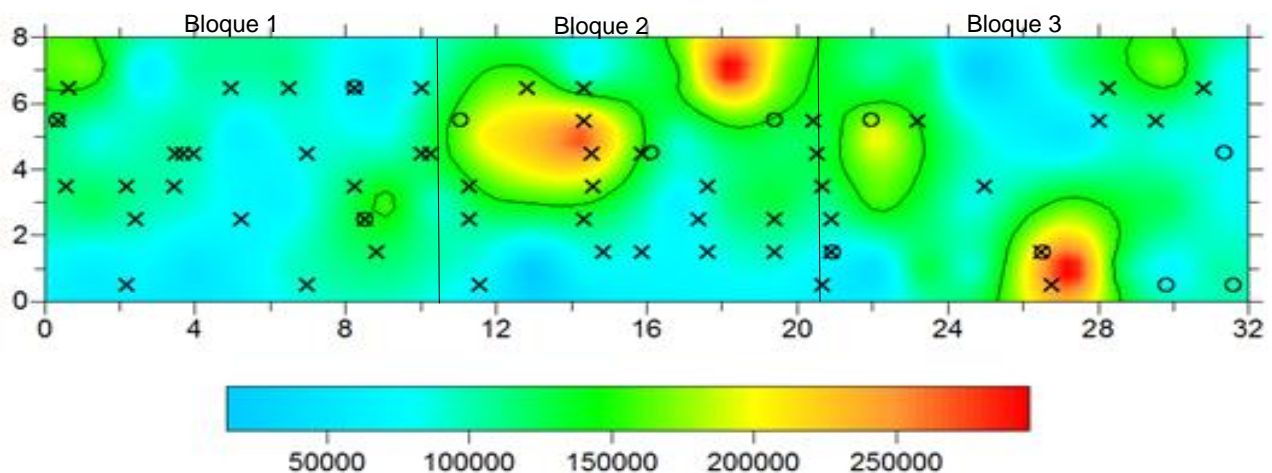


Figura 8: Mapa de asociación de distribución de sarna polvosa y el camanduleo vs concentración de inóculo de esporos de *Spongospora subterranea* en el lote experimental. Los colores en el mapa representan las concentraciones de Sss que tomaron valores desde 14222 a 322387 esporos/gramo de suelo, (x) plantas que presentaron infección en raíz (camanduleo en raíces), (o) plantas que mostraron infección en tubérculo (sarna polvosa), (⊕) plantas que presentaron infección en tubérculo y raíz (--) línea de delimitación a ± 147000 esporos/gramo de suelo equivalente a DO de 0,4 valor considerado como positivo según kit Bioreba.

Con el fin de comprobar si tanto valores altos y bajos de DO estuvieron asociados con el desarrollo de la enfermedad en campo o por el contrario, la enfermedad se desarrolló exclusivamente en los puntos catalogados como altas DO, se llevó a cabo una prueba de independencia de las variables concentración de inóculo vs incidencia y severidad de la enfermedad encontrada bajo las condiciones propias del ensayo; utilizando el software SAS versión 8.2. la variable concentración de esporos se obtuvo como resultado de transformar el valor de DO arrojado por el espectrofotómetro en la ecuación de regresión

establecida por Rodríguez *et al.*, 2002, la variable incidencia se calculó en porcentaje sobre el total de plantas evaluadas en el experimento (6 plantas evaluadas en raíces y 12 plantas evaluadas en tubérculo por cada genotipo). Este análisis para un nivel de significancia del 0,05% arrojó P valores de 0,4067 cuando se analizó la concentración vs incidencia de la enfermedad en raíz y un P valor de 0,3817 cuando se analizó concentración de inóculo vs severidad de la enfermedad). así también, cuando se analizó la severidad de la enfermedad en tubérculo vs concentración de inóculo se encontró un P valor = 0,3007 confirmando la Independencia de las variables (Anexo 4) corroborando lo reportado en la literatura donde se registra que niveles bajos de inóculo han logrado desarrollar la enfermedad y con severidades altas cuando las condiciones ambientales y de suelo son favorables para el desarrollo del patógeno.

6.2 Resistencia de genotipos de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja a *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*

Al realizar la evaluación se encontró que un total de 32 accesiones de las 49 establecidas en campo mostraron ser susceptibles en raíz ya que formaron agallas. Al evaluar las cuatro repeticiones de éstas 32 accesiones no en todas se pudo observar la presencia de agallas obteniendo un total de 55 muestras de agallas de raíz; al momento de la evaluación se encontraron agallas en estado inmaduro de color blanco lechoso. Durante el almacenamiento a temperatura ambiente que se realizó en suelo, estas se tornaron marrón a medida que iban madurando, permitiendo así la liberación de esporosoros. La susceptibilidad a la infección en raíz por Sss entre accesiones varió entre genotipos, la formación de agallas difirió en tamaño, forma y cantidad (Figura 9).

El grupo de genotipos más susceptibles a la infección en raíz (Colombia, col 69, 37, 74 y 133) también fue clasificado como altamente susceptible de acuerdo a la información recibida inicialmente del grupo de investigación de la UNAL, Medellín (Cótes 2011, Comunicación personal y Cotes (2012) quienes trabajaron en el proyecto "Evaluación fenotípica y genotípica de la Colección Colombiana de StP por resistencia a *Spongospora subterranea*". Sin embargo, dentro del grupo de genotipos más susceptibles en este ensayo estuvieron Latina, col 98, 43, 53, 72, 122 y 86 los cuales habían sido reportados como genotipos altamente resistentes a la infección de Sss en raíz (Cotes, 2012) . Por otro lado, dentro del grupo de genotipos que no presentaron

formación de agallas en raíces estuvieron los genotipos (col 71, 23, 5, 15 y Galeras), los cuales habían sido clasificados inicialmente como altamente susceptibles. Sin embargo, dentro del grupo que no hubo formación de agallas (col 79, 59, 143, 36, 94, 65, 100, 51, 92, 35 y 3) fueron clasificados por Cótes (2012) como altamente resistentes.

Genotipos como Colombia, col 69, col 37, col 74 y col 133 mostraron ser los materiales más susceptibles a la infección en raíz en esta evaluación (Tabla 4 y Figura 10) confirmando su comportamiento de acuerdo a lo reportado en evaluaciones previas realizadas por el grupo de investigación de Sss de la UNAL, Medellín (Cótes, 2012) (Tabla 2). Dentro de las accesiones menos susceptibles a la infección en raíz se encontraron col 6, 126 y 101 reportadas como altamente (Cótes, 2012); accesiones col 96, 127, 5 y 99 también se mostraron resistentes aún cuando éstas se habían reportado como altamente susceptibles a la infección de Sss (Cótes, 2012) (Tabla 2 y Tabla 4).



Figura 9. Formación de agallas en raíz de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja debido a la infección de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* (a) accesión muy susceptible, (b) accesión moderadamente susceptible (c) y (d) diferencias en tamaño y densidad de agallas de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* en raíces de StP.

Tabla 4. Accesiones de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja susceptibles a la infección de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* en raíz en lote experimental ubicado en Facatativá., plantas de 60 días después de siembra.

Genotipo	Cantidad de agallas colectadas- Peso fresco (g)	Total agallas colectadas por accesión	Promedio agallas/ planta (g)
Col 69 – planta 1	0.32	0.67 g	0,335
Col 69- planta 2	0.35		
Col 86	0.25	0,25	0,25
Col 128	0.21	0,21	0,21
Colombia – planta 1	1.53	1.77	0,855
Colombia –planta 2	0.42		
Col 13 – planta 1	0.25	0.50	0,25
Col 13- planta 2	0.25		
Col 124	0.03	0,03	0,03
Col 37 – planta 1	0.25	0,65	0,325
Col 37 – planta 2	0.40		
Col 63- planta 1	0.25	0,45	0,225
Col 63- planta 2	0.20		
Col 6	0.12	0,12	0,12
Col 110	0.04	0,04	0,04
Col 127	0.14	0,14	0,14
Col 133 – planta 1	0.25	0,79	0,26
Col 133 – planta 2	0.25		
Col 133 – planta 3	0.29		
Col 70 – planta 1	0.25	0,71	0,24
Col 70 – planta 2	0.22		
Col 70 – planta 3	0.24		
Col 73 – planta 1	0.25	0,50	0,25
Col 73- planta 2	0.25		
Capiro **	0.25	0,50	0,25

Continuación Tabla 4...

Genotipo	Cantidad de agallas colectadas- Peso fresco (g)	Total agallas colectadas por accesión	Promedio agallas/ planta (g)
Capiro **	0.25		
Col 126	0.07	0,07	0,07
Col 141	0.20	0,20	0,20
Col 122- planta 1	0.25	0,75	0,25
Col 122- planta 2	0.25		
Col 122- planta 3	0.25		
Col 72 – planta 1	0.25	0,25	0,25
Col 5- planta 1	0.13	0,13	0,13
Col 101- planta 1	0.05	0,05	0,05
Col 53- planta 1	0.25	0,25	0,25
Latina – planta 1	0.25	0,75	0,25
Latina – planta 2	0.25		
Latina – planta 3	0.25		
Col 43 – planta 1	0.25	0,25	0,25
Col 103- planta 1	0.25	0,71	0,24
Col 103- planta 2	0.17		
Col 103- planta 3	0.29		
Col 99- planta 1	0.08	0,08	0,08
Col 74 – planta 2	0.25	0,77	0,26
Col 74 – planta 3	0.27		
Col 74 – planta 1	0.25		
Col 106- planta 1	0.01	0,01	0,01
Col 102 – planta 1	0.25	0,53	0,18
Col 102 – planta 2	0.28		
Col 98- planta 1	0.25	0,25	0,25
Col 32- planta 1	0.25	0,54	0,18

Continuación Tabla 4...

Genotipo	Cantidad de agallas colectadas- Peso fresco (g)	Total agallas colectadas por accesión	Promedio agallas/ planta (g)
Col 32- planta 2	0.29		
Col 117 – planta 1	0.25	0,47	0,235
Col 117- planta 2	0.22		
Col 96- planta 1	0.08	0,08	0,08

** *Solanum tuberosum* cv. Diacol Capiro: plantas emergieron como resultado de la brotación de semilla que quedó después de la cosecha anterior que ejecutó el agricultor, dichas plantas se utilizaron como testigos susceptibles a Sss.

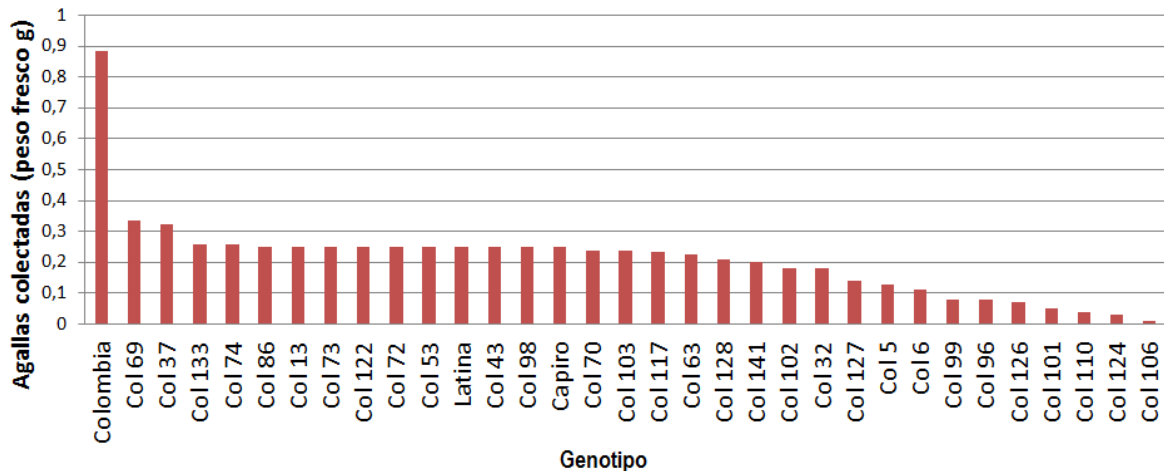


Figura 10: Genotipos de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja susceptibles a la infección de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* en raíz y cantidad promedio de agallas colectadas por planta.

En la comparación de los resultados de evaluación de resistencia entre el trabajo realizado por el grupo de investigación de Sss de la UNAL, Medellín Cótes (2012) y este trabajo, encontramos que de las 24 accesiones reportadas como altamente resistentes en raíz, ocho mostraron sintomatología en raíces en nuestro trabajo. De las 25 accesiones reportadas como altamente susceptibles y moderadamente susceptibles 7 se

encontraron en este ensayo como resistentes a la infección de Sss. En la Tabla 4 y Figura 10. se detallan accesiones de StP que mostraron ser susceptibles a la infección de *S. subterranea* f.sp. *subterranea* en raíz. Para confirmar el agente causal se llevaron a cabo cortes histológicos y observaciones al microscopio a 10 X y 40 X (Figura 11).

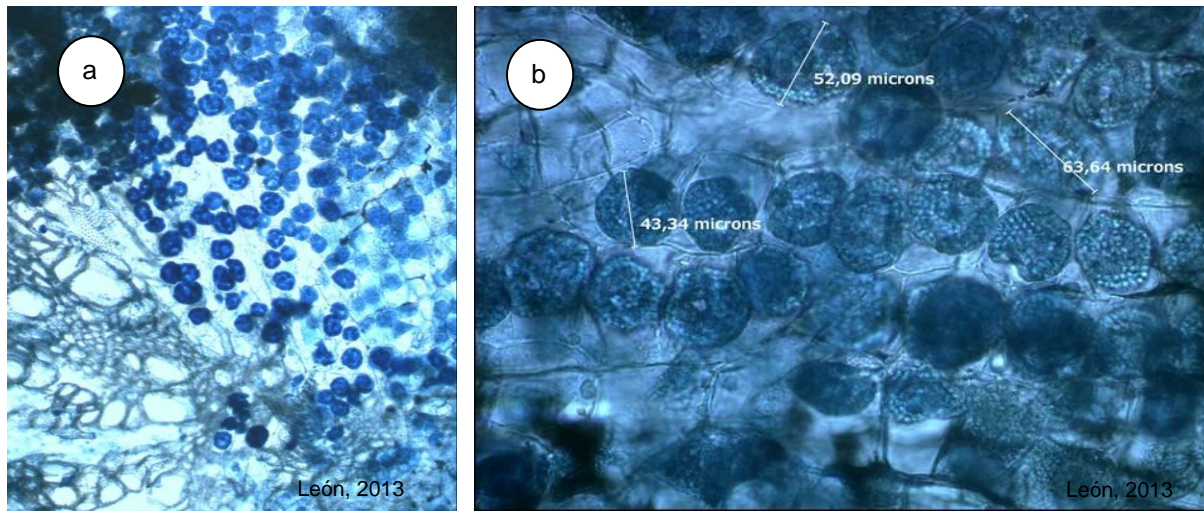


Figura 11: Confirmación del agente causal a través de observaciones microscópicas (a) Observación microscópica a 10 X de un corte transversal de raíz que presentaba formación de estructuras típicas de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* y (b) Observación microscópica a 40 X de esporosoros en el interior de las células de raíces infectadas por Sss.

Con el fin de comprobar si tanto valores altos y bajos de DO estuvieron asociados con el desarrollo de la enfermedad en campo o por el contrario, la enfermedad se desarrolló exclusivamente en los puntos catalogados como altas DO, se llevó a cabo una prueba de independencia de las variables concentración de inoculo vs incidencia y severidad de la enfermedad encontrada bajo las condiciones propias del ensayo; utilizando el software SAS versión 8.2. la variable concentración de esporosoros se obtuvo como resultado de transformar el valor de DO arrojado por el espectrofotómetro en la ecuación de regresión establecida por Rodríguez *et al.*, 2002, la variable incidencia se calculó en porcentaje sobre el total de plantas evaluadas en el experimento (12 plantas evaluadas en tubérculo por cada genotipo). Este análisis arrojó P valor de 0,05% valores de 0,4067 confirmando la Independencia de las variables (Anexo 4) y existencia de genotipos más y menos susceptibles a la infección corroborando lo reportado en la literatura donde se registra que niveles bajos de inoculo han logrado desarrollar la enfermedad y con severidades

altas cuando las condiciones ambientales y de suelo son favorables para el desarrollo del patógeno.

En 11 genotipos de *StP* evaluados en éste ensayo se observó la formación de pústulas en la epidermis de los tubérculos, éstos presentaron pústulas levantadas que tenían una coloración marrón oscura, no se presentó una deformación considerable del tubérculo ya que la sintomatología se observó en la epidermis de los tubérculos (Figura 12).



Figura 12. Diferencias en susceptibilidad a la Infección de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* en tubérculos *Solanum tuberosum* Grupo Phureja.

Para confirmar el agente causal de la enfermedad se realizó un raspado con bisturí en el síntoma que se estaba observando y bajo microscopía óptica se confirmó la presencia de estructuras del patógeno (Figura 13).

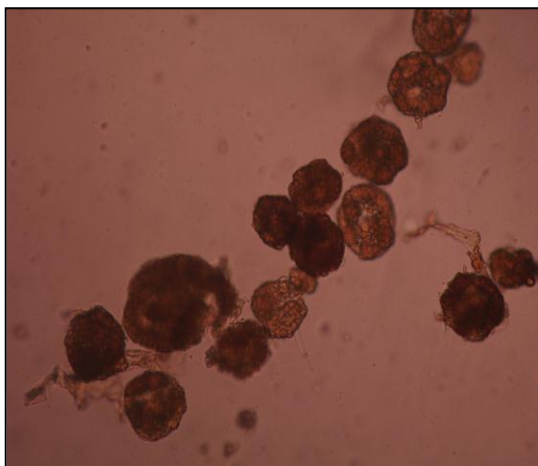


Figura 13. Observación microscópica a 40 X de esporosoros de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* obtenidos a partir de lesiones de tubérculo

Las pústulas formadas sobre la epidermis de los tubérculos fueron utilizadas para la amplificación de ADNr con la técnica PCR empleando primers específicos para Sss. Los genotipos más susceptibles a la infección en tubérculo fueron col 63, col 102 y col 106, latina y guaneña (Figura 14, Tabla 5).

Figura 14. Genotipos de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja susceptibles a la infección de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* en tubérculo y cantidad pústulas formadas por tubérculo.

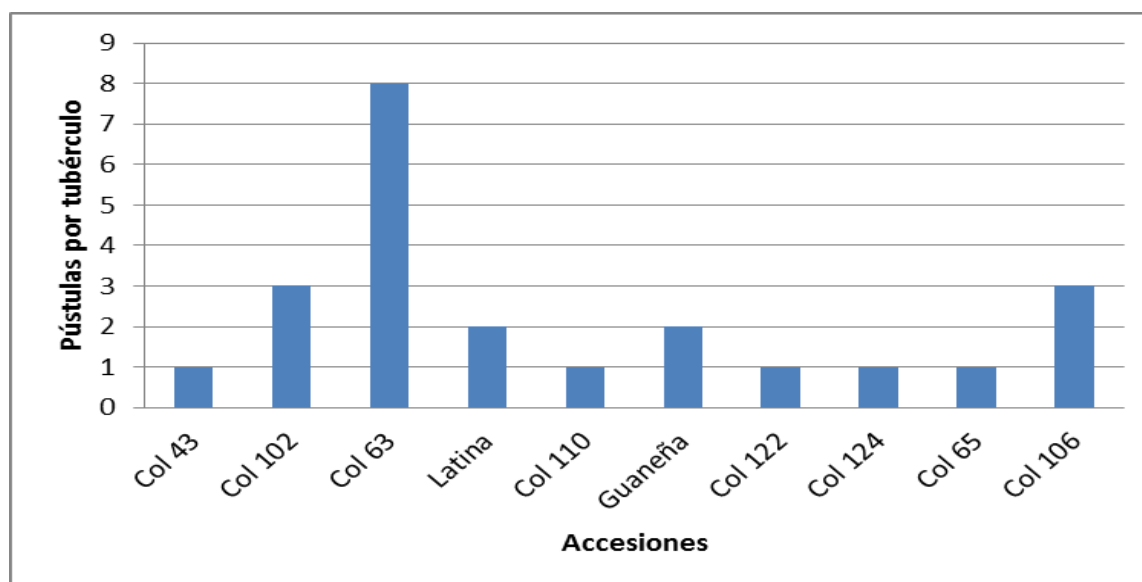


Tabla 5: Accesiones de *Solanum phureja* susceptibles a la infección de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* en tubérculo en lote experimental ubicado en Facatativá.

Muestra N°	Accesión	Número de pústulas /Tubérculo
1	Col 43	1 pústula
2	Col 102	3 pústulas
3	Col 63	8 pústulas
4	Latina	2 pústulas
5	Col 110	1 pústula

Continuación Tabla 5...

Muestra N°	Accesión	Número de pústulas /Tubérculo
6	Guaneña	2 pústulas
7	Col 122	1 pústula
8	Col 124	1 pústula
9	Col 65	1 pústula
10	Col 106	3 pústulas
11	Col 37	1 pústula

De los 49 genotipos evaluados en campo en este ensayo, un total de 32 presentaron síntomas en raíz (65,30 %) y 11 fueron susceptibles a la infección en tubérculo (22,44 %) pero a su vez 9 genotipos mostraron ser susceptibles a la infección de Sss en los dos órganos (18,36 %).

6.3 Extracción de ADN de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* y amplificación por PCR

Según el protocolo para extracción de ADN utilizado en este estudio, se requiere un peso inicial de la muestra de 0.25 g, sin embargo, en algunos casos de las muestras de agallas y en la totalidad de las muestras provenientes de pústulas de tubérculos no se contaba con esta cantidad, en razón de lo anterior se dispuso la totalidad de muestra que se tenía con el fin de lograr extraer la mayor cantidad de ADN posible. Después de realizar la extracción de ADN de las 66 muestras (55 muestras de agallas + 11 muestras de pústulas de tubérculo) se llevó a cabo la cuantificación del mismo utilizando la escalera de fago lambda mediante electroforesis en gel de agarosa al 3 % con el fin de conocer la concentración de ADN para la estandarización de la PCR; obteniendo concentraciones de ADN entre 10 y 200 ng/μl a partir de agallas y de 10 ng/μl a partir de pústulas de tubérculo.

A partir de las 66 muestras de ADN extraído, se logró amplificar la regiones ITS de ADN de Sss, empleando los cebadores específicos Spo8 - Spo9. Con el producto de PCR

obtenido se realizó la verificación de la banda esperada mediante electroforesis en gel de agarosa al 3 % utilizando un marcador de peso de 100pb (invitrogen); encontrando que todas las muestras tanto las provenientes de tubérculo y raíz amplificaron una banda cercana a los 400pb con los dos pares de primers; todos las muestras mostraron un perfil electroforético similar (Figura 15 y Figura 16).

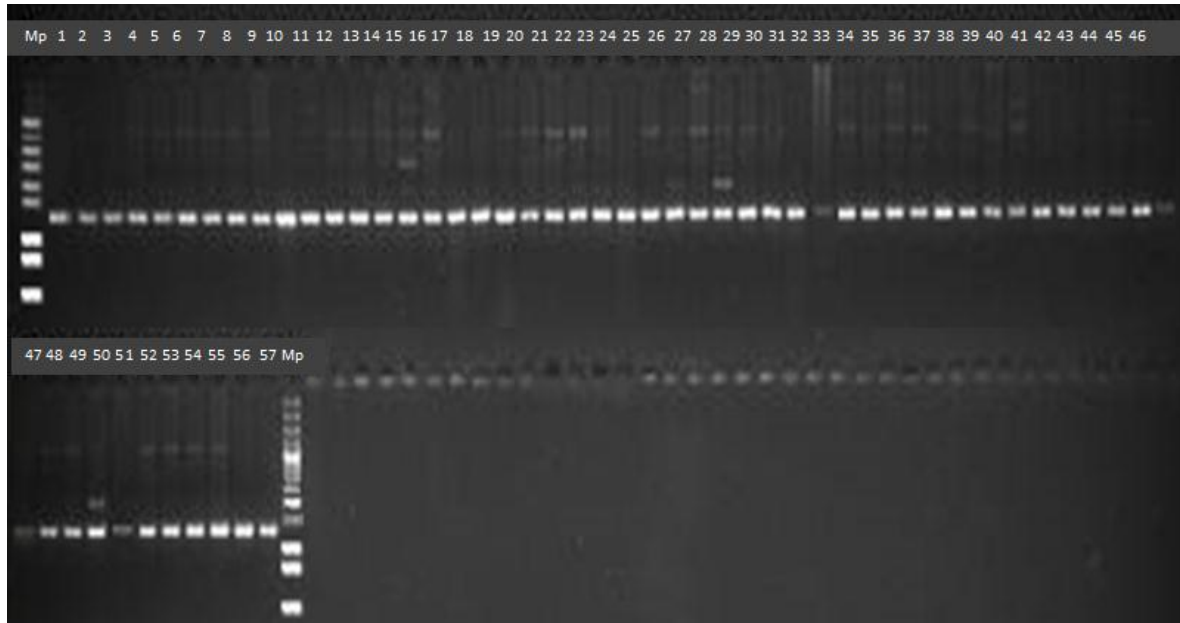


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 3 %. Productos de amplificación de la región ITS del ADNr de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*, obtenidos empleando los cebadores Spo8/Spo9 a partir de agallas de raíces. Pozo 1 y 58 marcador de peso 100pb (invitrogen) pozo 2 control positivo (ADN extraído a partir de agallas), pozo 3 a 57 ADN muestras de agallas.

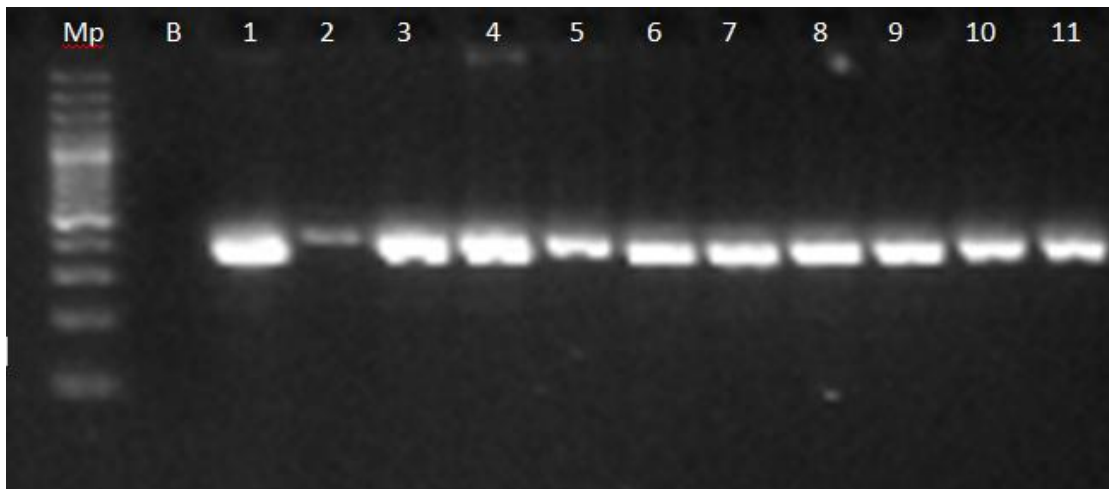


Figura 16: Electroforesis en gel de agarosa al 3 %. Productos de amplificación de la región ITS del ADNr de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*, obtenidos empleando los cebadores Spo8/Spo9 a partir de pústulas de tubérculos. Pozo 1 marcador de peso 100pb (invitrogen), pozo 2 blanco, pozo 3 a 13 ADN proveniente de pústulas de tubérculo.

Después de verificar que las bandas obtenidas corresponden al peso esperado Spo8/Spo9: 390 pb (Bulman & Marshall, 1998) se purificaron las bandas que fueron amplificadas teniendo en cuenta que estos primers amplifican las regiones ITS 1 y 2 de Sss obteniendo así la secuencia completa.

Con el fin de identificar polimorfismos se comparó la conformación espacial de las muestras procedentes de tubérculo y raíz utilizando la técnica SSCP. (*Single Strand Conformational Polymorphism*) donde se logró identificar patrones de migración electroforético diferentes para las muestras de raíz y tubérculo analizadas, dicho patrón estuvo directamente relacionado con el órgano de procedencia y difirió totalmente en los aislamientos procedentes de raíz y los aislamientos procedentes de tubérculos (Figura 17). Cuando se compararon los patrones electroforéticos obtenidos a partir de las muestras procedentes de agallas de raíces no fue posible detectar patrones de migración diferentes entre ellas, mientras que para las muestras procedentes de pústulas en tubérculos se identificaron dos patrones de migración diferente y el 80 % de las muestras tenían una alineación similar logrando identificar dos muestras que mostraron un patrón electroforético diferente correspondientes a los pozos 5 y 10; evidenciando así la

existencia de polimorfismos a nivel de secuencias, por lo tanto se solicitó el servicio de secuenciación de las muestras para su análisis.

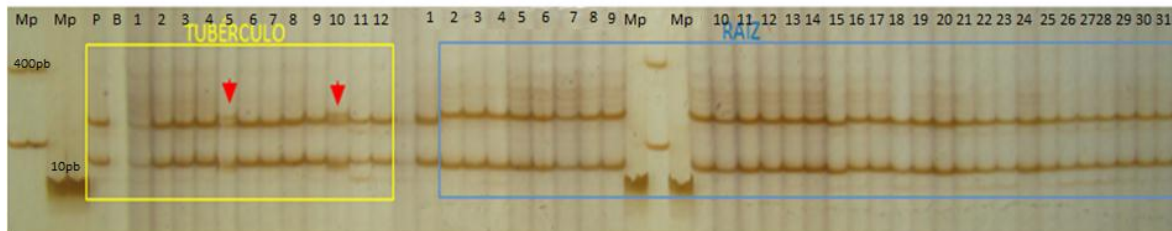


Figura 17. Patrones SSCP obtenidos de amplificaciones directas de ADN de agallas de raíz y ADN de lesiones en tubérculos, empleando el par de cebadores Spo8/9. Electroforesis en gel de poliacrilamida 0.5X MDE no denaturante y tinción con nitrato de plata. Las cabezas de flecha (Rojas) indican los patrones de migración diferentes (en amarillo de izquierda a derecha muestras procedentes de tubérculo accesiones col 124 y col 34, en azul muestras procedentes de agallas de raíz col 63 planta 1 y colombia planta 2).

6.3.1 Purificación de ADN

A partir de producto de PCR se llevó a cabo la purificación del ADN con el protocolo de purificación de ADN por centrifugación (Promega) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (Anexo 6) permitiendo obtener bandas definidas que tenían un peso aproximado de 390 pb y con un perfil electroforético similar, al realizar la cuantificación con la escalera de fago lambda se encontró una concentración de ADN menor a 10 ng/μl.

6.4 Variabilidad genética de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*

En este estudio se analizaron 24 secuencias consenso (14 secuencias provenientes de raíz y 10 secuencias provenientes de pústulas de tubérculos), cuando se realizó BLAST con las secuencias reportadas en el GenBank se encontró que todas las secuencias provenientes de tubérculo presentaron homología con la accesión AY604171 correspondiente a la regio ITS Tipo I y todas las secuencias provenientes de agallas de raíces alinearon con la accesión AY604172 correspondiente a aislamientos Tipo II (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) confirmando lo reportado por Qu y Christ (2004). Los porcentajes de identidad fueron de 96 a 99 % para los aislamientos de agallas de raíz y del 99 a 100 % para los aislamientos de tubérculo (Tabla 6). Cuando se analizaron

las secuencias se encontraron variaciones en nucleótidos que fueron reportadas por Carreño (2009) para la población colombiana de Sss.

Tabla 6. Resultados de identidad en el alineamiento realizado en el software Clustal W2 de 24 secuencias de estudio con secuencias reportadas en el GenBank para los aislamientos Tipo I (AY604171) y Tipo II (AY604172).

Secuencia de estudio	Genotipo	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession de Identidad en el GenBank
1	Latina T	603	603	100%	4,00E-169	99%	AY604171.1
2	Col 110 T	632	632	100%	6,00E-178	99%	AY604171.1
3	Col 102 T	553	553	100%	4,00E-154	99%	AY604171.1
4	COL 37 T	680	680	98%	5,00E-152	99%	AY604171.1
5	Col 34 T	429	429	98%	5,00E-117	100%	AY604171.1
6	Col 63 T	688	688	100%	2,00E-135	99%	AY604171.1
7	Col 122 T	418	418	89%	1,00E-113	99%	AY604171.1
8	Col 65 T	510	510	99%	2,00E-141	100%	AY604171.1
9	Col 69 T	427	486	100%	2,00E-116	100%	AY604171.1
10	Col 124 T	549	549	100%	5,00E-153	99%	AY604171.1
11	Latina R	597	597	100%	2,00E-167	96%	AY604172.1
12	Col 110 R	623	623	100%	3,00E-175	99%	AY604172.1
13	Col 102 R	641	641	100%	3,00E-132	99%	AY604172.1
14	Col 37 R	564	564	100%	2,00E-157	98%	AY604172.1
15	Col 43 R	649	649	100%	3,00E-142	98%	AY604172.1
16	Col 106 R	656	656	100%	2,00E-124	99%	AY604172.1
17	Col 69 Rp1	503	503	100%	4,00E-139	99%	AY604172.1
18	Col 13 R	507	507	100%	3,00E-140	99%	AY604172.1
19	Col 37 Rp2	411	411	99%	2,00E-111	99%	AY604172.1
20	Col 141 Rp2	490	490	100%	3,00E-135	99%	AY604172.1
21	Col 70 Rp3	448	448	100%	2,00E-122	98%	AY604172.1
22	Col 73 R	549	549	100%	5,00E-153	99%	AY604172.1
23	Capiro Rp2	466	466	100%	5,00E-128	98%	AY604172.1
24	Col 126 R	529	529	100%	6,00E-147	99%	AY604172.1

De las diez secuencias provenientes de pústulas de tubérculo seis presentaron una mutación puntual en el nucleótido 108 donde se observa una transición de una guanina por una adenina en la región ITS 1 confirmando la presencia de un haplotipo, mientras

que las otras cuatro secuencias fueron idénticas al Tipo I reportado en el GenBank (AY604171) (Tabla 7 y Anexo 7).

Tabla 7. Haplotipo de *Spongospora subterranea* identificado a partir de secuencias de muestras provenientes pústulas de tubérculo de *Solanum phureja*.

SECUENCIA HOMOLOGA	MUTACIONES ENCONTRADAS		TOTAL DE SECUENCIAS CON HOMOLOGÍA
	REGIÓN ITS 1	REGIÓN ITS 2	
	Transición G – C posición 108	X	
Haplotipo 36ATQ133-T	✓	X	6
Accesion AY604172 TIPO II	x	X	4

Donde: (x): secuencia que no tiene la mutación y (✓): secuencia que cuenta con la mutación.

Secuencias provenientes de agallas de raíces se caracterizaron por tener dos mutaciones puntuales en la región ITS 1: 13 secuencias mostraron una inserción de una timina en la posición 116, así como también se encontró que contaban con una transición de una timina por una citosina en la posición 129. En la región ITS 2, presentaron la transición de una adenina por una guanina y una transversión de una guanina por una citosina en la posición 345, mutaciones que coinciden con uno de los haplotipos reportados por Carreño (2009), adicionalmente una secuencia fue idéntica a la secuencia reportada en el GenBank para el aislamiento Tipo II como se detalla en la Tabla 6 y Anexo 7.

Tabla 8. Haplotipo de *Spongospora subterranea* identificado a partir de secuencias de muestras provenientes de raíz de *Solanum phureja*.

SECUENCIA HOMOLOGA	MUTACIONES ENCONTRADAS					TOTAL DE SECUENCIAS CON HOMOLOGÍA
	REGIÓN ITS 1			REGIÓN ITS 2		
	Inserción T posición 116	Transición T – C posición 129	Transversión A – C posición 161	Transición A – G posición 340	Transversión G – C posición 345	
Haplotipo 15CAU17_A	✓	✓	✓	✓	✓	-
Haplotipo 28VP07_Am	✓	✓	X	✓	✓	13
Accesion AY604171 TIPO I	X	X	X	X	X	1

Donde: (x): secuencia que no tiene la mutación y (✓): secuencia que cuenta con la mutación.

Con este estudio se demuestra invariablemente que en una misma planta se presentan los dos Tipos de asilamientos, infectando órganos distintos, Tipo I infectando tubérculo y Tipo II infectando raíz. Así también se encontraron secuencias homologas a las reportadas por Carreño (2009) (Tabla 7, Tabla 8, Tabla 9). Estas variaciones genéticas podrían estar implicadas en el éxito de adaptación de Sss a condiciones ecológicas adverdadas garantizando así su supervivencia, condición que podría explicar los reportes de infecciones en raíz y tubérculo que se han reportado e forma diferencial en diferentes zonas paperas a nivel nacional. Por ser un patógeno obligado Sss debe co-evolucionar con su hospedero y por lo tanto éstas variaciones pueden ser el resultado de adaptaciones que se han generado ante alguna presión ejercida por diferentes factores, sin embargo, en este trabajo no se pudo identificar algún tipo de interacción específica de Sss con algún genotipo de StP en particular.

Tabla 9. Relación de polimorfismo y posición en la secuencias de las regiones ITS del ADNr de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* para población Colombiana reportadas por Carreño, 2009.

Procedencia de Muestra	Homología con secuencia	POSICIÓN DEL POLIMORFISMO ENCONTRADO	
		ITS 1	ITS 2
Agalla de raíz	Aislamiento Tipo II (AY604172)	116: Inserción de una Timina	340: Transición de una adenina por una guanina
		129: Transición de una timina por citosina	345: Transversión de una guanina por una citosina
Pústula de tubérculo	Aislamiento Tipo I (AY604171)	108: Transición de una guanina por una adenina	-

6.5 Interacción *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* – *Solanum tuberosum* Grupo Phureja

Para estudiar la interacción patógeno hospedero únicamente se analizaron secuencias de cinco accesiones de las 11 que mostraron ser susceptibles en los dos órganos debido a que al momento de analizar las secuencias provenientes de tubérculo y de raíz de la misma planta no fue posible alinearlas debido a la baja calidad de la secuencia. El alineamiento de las secuencias realizadas permitió confirmar que las secuencias procedentes de agallas de raíces alinearon con aislamientos Tipo II del ADNr de Sss con un porcentaje de 96 a 99 % de identidad y las secuencias procedentes de pústulas de tubérculo únicamente alinearon con el aislamiento Tipo I con un porcentaje de 99 a 100 % de identidad. En el alineamiento no fue posible identificar los cambios en las posiciones 461 y 474 debido a que en nuestras muestras no se logró amplificar esa región. En secuencias provenientes de agallas de raíz se identificó una secuencia idéntica a la reportada en el GenBank y tres secuencias idénticas al haplotipo (36ATQ133-T) que corresponde a secuencias que tienen una inserción de una timina en la posición 116. En tubérculo las cuatro secuencias analizadas mostraron ser idénticas al haplotipo 828VP07-Am) reportado por Carreño (2009) que consisten en la transición de una guanina por una adenina en la posición 108. Los anteriores resultados permiten confirmar la especificidad de Sss respecto al órgano a infectar en su hospedero debido a que en el alineamiento se observó el agrupamiento de las secuencias por órgano. así

como también deja en evidencia la susceptibilidad de los órganos a ciertas variaciones del patógeno debido a que los materiales fueron evaluados en el mismo suelo con una población de Sss donde se pudo identificar los dos tipos de ITS a partir de órganos enfermos, adicionalmente éste alineamiento permitió a la vez identificar puntos de mutación particulares para grupos de aislamientos según su procedencia por órgano infectado (Figura 18).

Figura 18. Alineamiento de secuencias provenientes de genotipos susceptibles a la infección de *S. subterranea* en tubérculo y raíz. Color verde (región del gen subunidades 18S, 5.8S, 28S), color azul (mutaciones características reportadas por Carreño, 2009 para haplotipos de la población colombiana de Sss), Gris (diferencias entre aislamientos Tipo I y Tipo II reportados en el GenBank), Rojo (secuencias de referencia reportadas en el GenBank: Tipo I y Tipo II, secuencias de referencia para identificar variabilidad genética reportadas por Carreño, 2009)

TipoII	GGAAGGATCATTTACACTGAGTCGGTTCTACCGGCAGACCCCAAAAACCATGAGAACCT	60
Col110R	GGAAGGATCATTTACACTGAGTCGGTTCTACCGGCAGACCCCAAAAACCATGAGAACCC	60
Col102R	GGAAGGATCATTTACACTGAGTCGGTTCTACCGGCAGACCCCAAAAACCATGAGAACCC	60
Col137R	GGAAGGATCATTTACACTGAGTCGGTTCTACCGGCAGACCCCAAAAACCATGAGAACCC	60
28VP07_Am	GGAAGGATCATTTACACTGAGTCGGTTCTACCGGCAGACCCCAAAAACCATGAGAACCT	60
15CAU17_A	GGAAGGATCATTTACACTGAGTCGGTTCTACCGGCAGACCCCAAAAACCATGAGAACCC	60
latinaR	GGAAGGATCATTTACACTGAGTCGGTTCTACCGGCAGACCCCAAAAACCATGAGAACCC	60
50SUELO18	GGAAGGATCATTTACACTGAGTCGGTTCTACCGGCAGACCCCAAAAACCATGAGAACCT	60
TipoI	GGAAGGATCATTTACACTGAGTCGGTTCTACCGGCAGACCCCAAAAACCATGAGAACCC	60
LatinaT	GGAAGGATCATTTACACTGAGTCGGTTCTACCGGCAGACCCCAAAAACCATGAGAACCC	60
Col110T	GGAAGGATCATTTACACTGAGTCGGTTCTACCGGCAGACCCCAAAAACCATGAGAACCC	60
36ATQ133_T	GGAAGGATCATTTACACTGAGTCGGTTCTACCGGCAGACCCCAAAAACCATGAGAACCT	60
Col102T	GGAAGGATCATTTACACTGAGTCGGTTCTACCGGCAGACCCCAAAAACCATGAGAACCC	60
Col137T	GGAAGGATCATTTACACTGAGTCGGTTCTACCGGCAGACCCCAAAAACCATGAGAACCC	60
TipoII	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTT-ATGC	119
Col110R	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTT-ATGC	119
Col102R	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTTATGC	120
Col137R	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTTATGC	120
28VP07_Am	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTTATGC	120
15CAU17_A	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTTATGC	120
latinaR	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTTATGC	120
50SUELO18	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTT-ATGC	119
TipoI	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTT-ATGC	119
LatinaT	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTT-ATGC	119
Col110T	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTT-ATGC	119
36ATQ133_T	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTT-ATGC	119
Col102T	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTT-ATGC	119
Col137T	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTT-ATGC	119

Continuación Figura 18...

TipoII	AAACCGTAT-----TACTGAACTTACTAAAGTGGATCGTTTAACTAAATACA	ACTCTTAA	174
Col110R	AAACCGTAT-----TACTGAACTTACTAAAGTGGATCGTTTAACTAAATACA	ACTCTTAA	174
Col102R	AAACCGTAC-----TACTGAACTTACTAAAGTGGATCGTTTAACTAAATACA	ACTCTTAA	175
Col37R	AAACCGTAC-----TACTGAACTTACTAAAGTGGATCGTTTAACTAAATACA	ACTCTTAA	175
28VP07_Am	AAACCGTAC-----TACTGAACTTACTAAAGTGGATCGTTTAACTAAATACA	ACTCTTAA	175
15CAU17_A	AAACCGTAC-----TACTGAACTTACTAAAGTGGATCGTTTAACTCAATACA	ACTCTTAA	175
LatinaR	AAACCGTAC-----TACTGAACTTACTAAAGTGGATCGTTTAACTAAATACA	ACTCTTAA	175
50SUELO18	AAACCGTAT-----TACTGAACTTACTAAAGTGGATCGTTTAACTAAATACA	ACTCTTAA	175
TipoI	AAACCGTTTTTCGGATACTGAACTTACTAAAGTGGATCATTTAACTAAATACA	ACTCTTAA	179
LatinaT	AAACCGTTTTTCGGATACTGAACTTACTAAAGTGGATCATTTAACTAAATACA	ACTCTTAA	179
Col110T	AAACCGTTTTTCGGATACTGAACTTACTAAAGTGGATCATTTAACTAAATACA	ACTCTTAA	179
36ATQ133_T	AAACCGTTTTTCGGATACTGAACTTACTAAAGTGGATCATTTAACTAAATACA	ACTCTTAA	179
Col102T	AAACCGTTTTTCGGATACTGAACTTACTAAAGTGGATCATTTAACTAAATACA	ACTCTTAA	179
Col37T	AAACCGTTTTTCGGATACTGAACTTACTAAAGTGGATCATTTAACTAAATACA	ACTCTTAA	179

TipoII	CAGTGGATATCTTGGTTCCCACAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCG		234
Col110R	CAGTGGATATCTTGGTTCCCACAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCG		234
Col102R	CAGTGGATATCTTGGTTCCCACAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCG		235
Col37R	CAGTGGATATCTTGGTTCCCACAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCG		235
28VP07_Am	CAGTGGATATCTTGGTTCCCACAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCG		235
15CAU17_A	CAGTGGATATCTTGGTTCCCACAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCG		235
LatinaR	CAGTGGATATCTTGGTTCCCACAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCG		235
50SUELO18	CAGTGGATATCTTGGTTCCCACAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCG		234
TipoI	CAGTGGATATCTTGGTTCCCACAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCG		239
LatinaT	CAGTGGATATCTTGGTTCCCACAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCG		239
Col110T	CAGTGGATATCTTGGTTCCCACAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCG		239
36ATQ133_T	CAGTGGATATCTTGGTTCCCACAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCG		239
Col102T	CAGTGGATATCTTGGTTCCCACAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCG		239
Col37T	CAGTGGATATCTTGGTTCCCACAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCG		239

TipoII	AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTTCGAGATATCC		294
Col110R	AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTTCGAGATATCC		294
Col102R	AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTTCGAGATATCC		295
Col37R	AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTTCGAGATATCC		295
28VP07_Am	AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTTCGAGATATCC		295
15CAU17_A	AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTTCGAGATATCC		295
LatinaR	AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTTCGAGATATCC		295
50SUELO18	AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTTCGAGATATCC		294
TipoI	AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTTCGAGATATCC		299
LatinaT	AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTTCGAGATATCC		299
Col110T	AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTTCGAGATATCC		299
36ATQ133_T	AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTTCGAGATATCC		299
Col102T	AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTTCGAGATATCC		299
Col37T	AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCAAGTTGCGCTTTTCGAGATATCC		299

TipoII	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTGCGGT	TTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTGGA	354
Col110R	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTGCGGT	TTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTGGA	354
Col102R	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTGCGGT	TTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTGGA	355
Col37R	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTGCGGT	TTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTGGA	355
28VP07_Am	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTGCGGT	TTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTGGA	355
15CAU17_A	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTGCGGT	TTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTGGA	355
LatinaR	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTGCGGT	TTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTGGA	355
50SUELO18	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTGCGGT	TTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTGGA	354
TipoI	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTGCGGT	TTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTG-A	358
LatinaT	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTGCGGT	TTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTG-A	358
Col110T	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTGCGGT	TTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTG-A	358
36ATQ133_T	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTGCGGT	TTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTG-A	358
Col102T	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTGCGGT	TTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTG-A	358
Col37T	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTGCGGT	TTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTG-A	358

7 DISCUSIÓN

El manejo de la sarna polvosa en países cultivadores de este tubérculo es deficiente, una estrategia de manejo promisorio es la disponibilidad de cultivares de papa resistentes a Sss (Nitzan *et al.*, 2010), sin embargo, la información reportada a nivel mundial en los estudios adelantados sobre resistencia de cultivares a Sss muestra discrepancias respecto a la resistencia reportada para diferentes cultivares (Falloon *et al.*, 2003). Merz *et al.*, 2011 plantean que para disminuir errores en la evaluación de materiales se sugiere que los diferentes genotipos sean evaluados en locaciones y ambientes diversos utilizando el mismo tipo de protocolos y escalas de medición; los dos últimos aspectos no pudieron tenerse en cuenta en esta investigación toda vez que la severidad de la enfermedad en campo se evaluó mediante el peso de agallas colectadas por planta y no con la escala de la severidad utilizada por investigadores de Medellín. Al comparar los resultados de ésta investigación con la información de referencia Cótes (2012); se presentó variación en cuanto a la susceptibilidad reportada para algunos genotipos: col 98, 43, 53, 72, 122 y 86 que se decían eran resistentes a la infección de Sss en raíz se comportaron como altamente susceptibles. Éste comportamiento puede ser atribuido a que en las localidades donde se estableció el ensayo existen variantes patogénicas capaces de causar infección a genotipos que se habían comportado como resistentes en otras localidades, dichas variantes fueron confirmadas en este trabajo mediante secuenciación de ADN extraído a partir de muestras colectadas de órganos infectados por Sss corroborando el reporte de variabilidad genética de Sss para Colombia realizado por Carreño, (2009) Otros autores plantean este mismo panorama Merz *et al.*, (2011) y Falloon *et al.*, (2003) citan la evaluación de cultivares de papa en Perú que fueron clasificados como resistentes a Sss, pero al evaluarlos en otras localidades se determinaron como cultivares susceptibles o muy susceptibles, sugiriendo que el cambio en el comportamiento de los cultivares puede ser el resultado de la presencia de un patotipo de *S. subterranea* en Perú diferente al presente en las otras zonas donde se llevaron a cabo el resto de ensayos, evidencia fuerte de la variación en la virulencia de *S. subterranea* en papa, así como también refieren que el efecto ambiente juega un rol importante durante el desarrollo de la enfermedad.

La concentración de inóculo en muestras catalogadas como positivas de acuerdo al valor de DO establecido por el Kit estuvo en un rango de 148606 a 322387 esporosoros/

gramo considerándose muy altas tomando como referencia lo reportado por Merz *et al.*, (2005) donde estableció que suelos con 500 esporosoros/ gramo ya se consideran altamente infestados por Sss y con alto riesgo de manifestación de la enfermedad. La severidad de la enfermedad encontrada en campo tanto en tubérculo como en raíz fue baja, al observar la distribución de la enfermedad en el lote se encontró que el desarrollo de la misma no estuvo asociada únicamente a los puntos muestreados y catalogados como positivos, puntos con concentraciones de esporosoros de Sss “bajas -. Estos resultados confirman lo reportado en 2009 por Gilchrist y Reinaldy quienes concluyen que no sólo el nivel del inóculo es determinante en relación al desarrollo de la enfermedad. El hecho de que la severidad de la enfermedad haya sido baja puede deberse a que durante el periodo de evaluación de los materiales en campo, las condiciones climáticas tuvieron un promedio de temperatura ambiente máxima 18 °C, así como también las precipitaciones fueron mínimas y eventuales con promedio de 4 mm/ durante el periodo de evaluación reduciendo la humedad de suelo (Anexo 1), de acuerdo a lo reportado por Van de Graaf *et al.*, (2007) la temperatura óptima para la liberación de zoosporas es 5 °C a 25 °C pero para la infección de raíces el óptimo es de 17 °C y para la infección de tubérculo es 13 °C, otros reportes hablan que por debajo de 11 °C también se genera infección de raíces según (Harrison *et al.*, 1997; Navia y García, 2004) citado por Van de Graaf *et al.*, (2007); sin embargo aunque la temperatura estuvo dentro del rango óptimo, debido a la poca precipitación la humedad en el suelo era baja aspecto que no favoreció la liberación de zoosporas y el movimiento del patógeno en el suelo a través de la película de agua hasta encontrar al hospedero, la infección de Sss se vio reducida aunque las concentraciones de esporosoros por gramo de suelo hayan sido alta. Otros investigadores como Van de Graaf & Lees (2005), Lees *et al.*, (2008), Van de Graaf *et al.*, (2007), Baldwin *et al.*, (2008), Merz & Falloon, (2009) han concluido que la concentración del inóculo para el caso de Sss no tiene un efecto directamente proporcional con el desarrollo de la enfermedad en campo y que factores como tipo de suelo, humedad y temperatura afectan el desarrollo de la enfermedad ya que bajas concentraciones de inóculo acompañado de condiciones favorables al patógeno desarrollan síntomas severos de la enfermedad ya que cantidades bajas de esporosoros pueden rápidamente liberar altas cantidades de zoosporas que van a causar infección y que continuarán con el ciclo del patógeno multiplicándose rápidamente.

En campo se observaron genotipos que exhibían diferentes respuestas en la interacción StP – *S. subterranea*, se encontró accesiones susceptibles en tubérculo, accesiones susceptibles en raíz y accesiones susceptibles en los dos órganos. Diversos trabajos reportan respuesta diferencial de los cultivares de papa, pero aún no se logra establecer la relación entre la susceptibilidad de raíz y/o de tubérculo para un cultivar específico (Harrison *et al.*, 1997; Merz *et al.*, 2004; Falloon *et al.*, 2008), tampoco se conoce con claridad por que el patógeno prefiere infectar algún órgano en particular, factores como la naturaleza obligada del patógeno, la alta influencia de las condiciones ambientales en el desarrollo de la enfermedad y que los órganos de interés en este patosistema son subterráneos hacen que la investigación en este sentido sea ardua. Son pocos los estudios adelantados en este patosistema tratando de aclarar el proceso de interacción papa – Sss. Carreño (2009) sugirió que estas diferencias en susceptibilidad podían explicarse por interacciones donde se estaba presentando especificidad por órgano de infección. Los resultados de ésta investigación al analizar las secuencias amplificadas de tubérculo y agallas de raíces procedentes de una misma planta, revelan que el patógeno si tiene especificidad por órgano de infección, ya que se encontraron los dos Tipos de Sss reportados en la misma planta, pero secuencias provenientes de muestras de raíz alinearon únicamente con la secuencia Tipo II y las secuencias provenientes de tubérculo únicamente alinearon con secuencia Tipo I del ADNr de Sss confirmando la especificidad por órgano de infección sugerida por Carreño (2009). ésta variabilidad biológicamente podría evidenciar las ventajas que tiene el patógeno para adaptarse y garantizar su supervivencia como resultado de la coevolución de Sss con su hospedero. Adicionalmente, no fue posible confirmar en parte la asociación realizada por Osorio *et al.*, (2012) donde refiere que secuencias de muestras procedentes de tubérculo y suelo alinearon únicamente con el Tipo I y que el Tipo II alineó indistintamente secuencias procedentes de raíz, tubérculo y suelo; aunque en esta investigación no se caracterizó molecularmente el inóculo presente en suelo se espera que en suelo las secuencias que se obtengan sean las correspondientes al Tipo de Sss que está causando infección en determinado órgano como resultado de la liberación de esporosoros de cada órgano infectado cuando la enfermedad está en estados avanzadas, entonces si en un mismo lote encontramos la expresión diferencial de síntomas esperaríamos que las secuencias alinearan indistintamente con las dos accesiones de referencia reportadas en el GenBank pero el resultado de éste estudio solamente reporta que la secuencia Tipo II únicamente

alineó con muestras provenientes de agallas de raíces y el Tipo I únicamente con secuencias procedentes de tubérculo, las secuencias resultantes de dicho trabajo no fueron publicadas en GenBank y por tanto no pudieron ser incluidas en los análisis presentados. Eso podría estar sucediendo en parte con el patógeno pero en la planta deben suceder procesos de reconocimiento del patógeno que tiene como fin activar los mecanismos de defensa, hasta ahora lo que se ha propuesto es que la resistencia de la planta a la infección de Sss es de tipo cuantitativo por lo que varios o pocos genes contribuyen de manera parcial o aditiva a la expresión de defensa. Hasta el momento no se han logrado identificar genes que estén asociados con la resistencia en este patosistema. Bittara *et al.*, (2013) reportó que materiales de *S. tuberosum* que eran infectados por Sss en raíz tenían una expresión diferencial de metabolitos secundarios y asoció la producción de flavonoides y alcaloides con materiales que eran menos susceptibles a la infección de Sss, materiales más susceptibles a la infección de Sss se caracterizaron por tener una producción más alta de polifenoles y taninos. Ésta puede ser una evidencia fuerte de la participación de éstos compuestos en los procesos de señalización para la activación de los mecanismos de defensa de la planta contra Sss. Ahora bien, otros autores han utilizado modelos de patosistemas diferentes para tratar de dilucidar la interacción órgano específica donde se han concluido que en una planta que es susceptible en dos órganos al someterla bajo el estrés de una infección de un patógeno se observa que en los dos órganos generalmente la expresión génica es muy similar pero varía en cuanto a la activación más rápida en la expresión de algunos en un órgano determinado y que aunque se expresen los mismos genes es probable que en cada órgano el mecanismo de defensa utilizado sea diferente y complementario a la expresión de los genes R, por lo tanto no es suficiente únicamente la alta expresión de un gen en particular si no que varios genes están implicados en múltiples pasos de los procesos para la activación de la defensa en la planta (Balmer & Mauch, 2013).

Al evaluar las 36 secuencias de Sss se encontraron que tienen homología con las secuencias reportadas en el GenBank por Qu y Christ (2004), sin embargo, el 99 % de las secuencias analizadas contienen al menos una de las mutaciones puntuales reportadas por Carreño (2009) para aislamientos colombianos, confirmando así que la población de Sss en Colombia es más variable genéticamente en las regiones ITS del ADNr que poblaciones existentes en otras regiones del mundo; por lo tanto este estudio corrobora la información reportada por Carreño (2009) y la reportada por Gau (2013)

cuando evaluó poblaciones de Sss Suramericanas y de otras regiones de mundo, consistentemente las muestras provenientes de Suramérica fueron más diversas genéticamente en comparación con todas las muestras provenientes de las demás regiones evaluadas. Qu y Christ (2004) refieren que la región ITS 2 del ADNr de *S. subterranea* es la más variable en comparación con la región ITS 1 en poblaciones foráneas, sin embargo, al analizar las secuencias se encontró que la mayoría de polimorfismos que caracterizan a la población colombiana de Sss se encuentran en la región ITS como lo reporta Carreño (2009).

Los estudios adelantados en *Spongospora subterreanea* f.sp. *subterranea* hasta la fecha han sido valiosos para conocer la biología del patógeno, los factores que benefician el desarrollo de la enfermedad, los procesos de estandarización de técnicas para diagnóstico y detección, sin embargo, unos pocos se han enfocado en abordar temas como resistencia de hospedero y la variación genética de Sss (Gau, 2013); con el presente estudio se confirma la variabilidad genética de la población colombiana de Sss respecto a otros países productores de papa como se reportó por Carreño, 2009 y Gau 2013; con esta confirmación surge una nueva pregunta respecto a la importancia biológica de esta variación genética para *Spongospora* ya que ésta podría estar asociada con características de patogenicidad, adaptabilidad, reproducción, supervivencia y capacidad de transmisión de virus. Smith *et al.*, (2013) reportan la posibilidad de asociaciones entre ribotipos de *Polymyxa graminis* - hospedero y transmisión de virus; encontrando que el aislamientos Tipo II son más comunes en la transmisión de virus como SBCMV/ SBWMC y se reportó por primera vez que el Tipo I podría estar transmitiendo uno ó ambos virus ya que plantas de cebada que mostraban infección de los dos virus únicamente mostraron el ribotipo I aunque su capacidad de transmisión es menor, sin embargo, no pudo realizarse ninguna asociación de especificidad de ribotipos con hospedero; por tanto este tipo de estudios deben realizarse para Sss teniendo en cuenta que *Polymyxa graminis* también hace parte de los plasmodioforomycetes y que se conoce el reporte de diferentes ribotipos para Sss , así como su reconocimiento como vector natural del PMTV. (Carreño, 2009, Qu y Chirst, 2004).

Pruebas de detección serológicas como DAS-ELISA se reportan como altamente sensibles y específicas (Merz *et al.*, 2005; Merz *et al.*, 2009). En 2005, Merz *et al.*, desarrollaron anticuerpos monoclonales que identifican únicamente esporas de

resistencia de Sss por lo tanto no muestran reacción cruzada con patógenos diferentes a Sss, éstos anticuerpos detectaron todos los aislamientos probados originarios de diferentes países productores de papa, sin embargo, considerando que la población del patógeno en Colombia muestra mayor diversidad genética según el presente estudio y los diferentes reportes (Carreño, 2009; Gau, 2013) se debería considerar diseñar anticuerpos para nuestros haplotipos con el fin de obtener mayor sensibilidad en la pruebas, lo anterior teniendo en cuenta que el valor del punto de corte de las muestras control negativo se determinó como DO iguales a 0,4 tal como lo sugiere el protocolo del kit (Bioreba), por lo tanto el título de las muestras consideradas positivas debían tener valores $DO > 0,4$. Sin embargo, Rodríguez *et al.*, (2002) realizaron ensayos inoculando esporosoros de Sss a suelo encontrando que DO iguales a 0,155 equivalen a 1×10^4 esporosoros/gramo de suelo, adicionalmente reportaron que en este sentido aunque los valores de $DO < 0,4$ hayan sido considerados como negativos en la prueba DAS-ELISA no necesariamente están indicando la no presencia de Sss en la muestra, por lo tanto esta técnica resulta siendo de aplicación limitada en nuestro medio, al no estar diseñadas con base en los genotipos locales del patógeno presentes en las regiones productoras de nuestro país corroborando lo reportado por (Rodríguez *et al.*, 2002, Giraldo *et al.*, 2012). Adicionalmente, en un estudio adelantado por Wright (2012), se realizó la comparación de diferentes técnicas como PCR convencional, ELISA, PCR real-time para la detección de Sss donde se encontró que la PCR convencional fue la técnica más sensible y eficaz para la detección de Sss seguida de PCR real time y por último la ELISA; en razón de que la PCR convencional fue capaz de detectar inóculo de Sss en diferentes etapas del ciclo del patógeno a partir de muestras provenientes de diferentes órganos, así como también permitió detectar los diferentes tipos de Sss, por otro lado la PCR real time detectó a Sss y permitió cuantificar el ADN del patógeno registrando una alta sensibilidad de detección de 1 a 10000 esporosoros/ml presente en cada muestra así como el tipo de Sss presente, mientras que la ELISA permite cuantificar el inóculo pero limita su detección a esporosoros de Sss y no a otras etapas del ciclo de vida del patógeno.

8 CONCLUSIONES

- Se evidenció infección órgano específica de *Spongospora subterranea* en genotipos de la colección de StP de la Universidad Nacional.

Se encontró que los aislamientos Tipo I y Tipo II reportados en el GenBank como accesiones AY604171 y AY604172 respectivamente; estuvieron relacionados con el órgano infectado, secuencias de la región ITS del ADNr obtenidas a partir de pústulas de tubérculo únicamente alinearon con el aislamiento Tipo I mientras que secuencias provenientes de agallas de raíces únicamente alinearon con el aislamiento Tipo II.

- Se encontraron haplotipos de *Spongospora subterranea* reportados por Carreño (2009) confirmando la variabilidad genética de la población colombiana de Sss.

Al comparar las secuencias consenso obtenidas a partir de muestras de agallas de raíces y pústulas de tubérculo, se encontró mutaciones puntuales que fueron reportadas por Carreño (2009) y que son características de haplotipos de la población colombiana de Sss.

- Se identificaron genotipos de la colección de StP de la universidad Nacional susceptibles a la infección de Sss en tubérculo, en raíz y genotipos susceptibles en los dos órganos.

9 RECOMENDACIONES

Con la confirmación de la especificidad de Sss por órgano infectado se sugiere para futuros estudios:

- Investigar con mayor profundidad como es la interacción de *S. subterranea* y StP por lo tanto es importante conocer como es la expresión génica de la planta ante la infección de este patógeno cuando una misma planta es susceptible a la infección en los dos órganos a la vez.
- Hacer un seguimiento a la evolución de la población de Sss bajo diferentes historias siembra de cultivares de papa. El hecho de conocer que variantes del patógeno existen en diferentes historias de uso de cultivares permitirá conocer si puede o no haberse establecido una interacción específica con algún genotipo en particular. Esta información puede facilitar la toma de decisiones respecto al material a sembrar en cada zona reduciendo el riesgo de infección.
- Continuar con la estandarización de la manipulación in vitro del patógeno con el fin de establecer metodologías fácilmente reproducibles que permitan incrementar

fácilmente el inóculo para realizar las diferentes pruebas moleculares que se requieren en los diferentes trabajos de investigación, puesto que en algunos casos como esta investigación la severidad de la enfermedad es baja dificultando y disminuyendo la cantidad y calidad de ADN extraído, así como también permitirá garantizar que el inóculo sea el resultado de un solo esporosoros.

- Desarrollar anticuerpos acordes a la variación genética del patógeno presente en las zonas productoras a nivel nacional con el fin de mejorar la sensibilidad de técnicas que pueden implementarse en programas de monitoreo del patógeno a nivel nacional.

10 BIBLIOGRAFÍA

Andersen, A.B., M. Nicolaisen and S.L. Nielsen. 2002. Alternative hosts for *Potato mop-top virus*, genus *Pomovirus*, and its vector *Spongospora subterranea*. *Potato Research* 45: 37-43.

Arcila, I., J. Ochoa, C. Zuluaga y E.P. González. 2011. Inoculación de especies cultivables para la identificación de hospederos de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*. En: XXX Congreso Colombiano y XVI Latinoamericano de Fitopatología. Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines - ASCOLFI, Bogotá, Colombia.

Baldwin S. J., Genet R. A., Butler R. C & Jacobs. 2008. A Greenhouse Assay for Powdery Scab (*Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*) Resistance in Potato. *Potato Research* 51:163–173

Balmer & Mauch. 2013. More beneath the surface? Root versus shoot antifungal plant defenses. On line: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3709096/>

Bittara, F., Rodríguez, D., Hernández, A., Sanabria, M.E y Méndez, N. 2013. Caracterización molecular y fotoquímica de ocho genotipos de papa (*Solanum tuberosum* L) y su relación con la infección por *Spongospora subterranea* (Wallr) Lagerh. *Bioagro* 25: 11-22

Bulman S.R, & Marshall J.W. 1998. Detection of *Spongospora subterranea* in potato tuber lesions using the polymerase chain reaction (PCR). *Plant Pathology* 47: 759-766

Brierley, J. Less, A. y Wale, S. 2008. Powdery scab-Strains anconducive conditions. Research review. Online:<http://www.potato.org.uk/sites/default/files/%5Bcurrentpage%3Aarg%3A%3F%5D/Powder%20Scab%20Review%20Dec%202008.pdf>

Carreño, A.J. 2009. Evaluación de la variabilidad genética de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* mediante la comparación de regiones ITS del ADN ribosomal de cepas procedentes de las regiones Productoras de papa en Colombia. Tesis para optar el título de Magister en Ciencias agrarias con énfasis en fitopatología.

Cevipapa. 2008. Centro de Desarrollo Tecnológico de la Cadena Agroalimentaria de la papa. On line: <http://www.cevipapa.org.co/publicaciones/publicaciones.php>

Cotes, J.M. 2012. Informe técnico final - PROYECTO: "Evaluación fenotípica y genotípica de la Colección Colombiana de *Solanum phureja* por resistencia a *Spongospora subterranea*". 94p.

DANE 2013. Resultado encuesta nacional Agropecuaria -ENA. 2012 On- line: http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/ena/boletin_ena_2012.pdf

DANE 2011. Resultado encuesta nacional Agropecuaria -ENA. 2011 On- line: http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/ena/doc_anexos_ena_2011.pdf

Dick, M. W. 2001. Straminipilous Fungi. Systematics of the Peronosporomycetes Including Accounts of the Marine Straminipilous Protists, the Plasmodiophorids and Similar Organisms, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Dodds, P. N. & Rathjen J. P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11:539–548

Down, G. J., L. J. Grenville & J. M. Clarkson. 2002. Phylogenetic analysis of *Spongospora* and implications for the taxonomic status of the plasmodiophorids. *Mycol. Res.* 106: 1060–1065.

Estrada A., Cuzcano .J, Sandoval, M.L., Fujita R. 2006. Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano. *Revista peruana de Biología* 12 versión On-line ISSN 1727-9933.

Falloon R.E. 2008. Control of Powdery Scab of Potato: Towards Integrated Disease Management. *American Journal of Potato Research*. Symposium Paper

Falloon R.E, Genet R.A, Wallace A.R, y Butler R.C. 2003. Susceptibility of potato (*Solanum tuberosum*) cultivars to powdery scab (caused by *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*), and relationships between tuber and root infection. *Australian Plant Pathology* 32: 377-385

FEDEPAPA 2009. Agenda prospectiva investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de la papa en Colombia con énfasis en papa criolla.pdf. On line: <http://www.fedepapa.com/wp-content/uploads/pdf/AGENDA-PROSPECTIVA-INVESTIGACION.pdf>

Gao, L., Tu, Z., Millett, B and Bradden, J., 2013. Insights into organ-specific pathogen defense responses in plants: RNA-seq analysis of potato tuber-Phytophthora infestans interaction. *BioMED Central*. On line: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/340>

Gau, R.D, Merz ,U, Falloon ,R.E, Brunner ,P.C. 2013. Global Genetics and Invasion History of the Potato Powdery Scab Pathogen, *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*. *PLoS ONE* 8(6): e67944. doi:10.1371/journal.pone.0067944

Genet, R.A., Braam, W.F., Gallagher, D.T., Anderson, J., Lewthwaite, S.I. 1995. “Gladiator”: a new potato cultivar with high resistance to potato cyst nematode and powdery scab suitable for French fries and fresh market. *N Z J Crop. Hortic* 23:105–107

Gilchrist, R. y Reinaldy S. 2009. RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO DE *Spongospora subterranea* Y LOS EFECTOS DE LA SARNA POLVOSA. Primer Seminario de Investigaciones Agrarias 2009 - Ciencia para la Docencia

Giraldo, I., Gutiérrez. P., Marín. M. 2012. Revisión: *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* y su virus asociado *Potato mop-top virus* (PMTV), Dos Patógenos Reemergentes en los Cultivos de Papa de Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 65: 6361-6378.

Guerrero, O. 2002. Descripción y manejo de las principales enfermedades de la papa. ICA-subgerencia de Protección y Regulación Agrícola seccional Nariño. San Juan de Gil, Pasto.

Harrison, J.G, Searle R.J & Williams N.A. 1997. Powdery scab disease of potato- a review. *Plant pathology* 46: 1-25.

Hermanns, M., Slusarenko, A., Schlaich, N. 2003. Organ-Specificity in a Plant Disease is Determined Independently of R Gene Signaling. *The American Phytopathological Society* 16:752–759.

Jaramillo, S., Calderón, H., Hincapié, L.A., y Afanador, L. 2004. Caracterización de la variabilidad molecular de *Spongospora subterranea* (*wellr*) *lagerh.* f.sp.*subterranea* en las principales zonas paperas de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Medellín, Colombia. Centro Virtual de Investigaciones en Papa (CEVIPAPA). www.cevipapa.org.co. [Consulta: 3 marzo 2012]

Jaramillo, S & Botero, J.M. 2007. Respuesta de diferentes Poblaciones de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* a la rotación entre dos Variedades De Papa (*Solanum tuberosum* Ssp. *Andigena*) *Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín*.60:3859-3876.

Lanoue, A., Burlat, V., Henkes, G.J., Koch, I., Schurr, U and Rose, R.2010. De novo biosynthesis of defense root exudate sin response to *Fusarium* attack in barley. *New Phytol.* 185:577-588.

Lees, A. K., Van de Graaf, P., Wale, S. 2008. The Identification and detection of *Spongospora subterranea* and factors affecting infection and disease. *American Journal of Potato Research* 85:247–252

Lyman, G.R. and J.T. Rogers. 1915. The native habitat of *Spongospora subterranea*. *Science* 42: 940-942.

Mishra KK, y Srivastava JS. 2001. Screening potato cultivars for common scab of potato in a naturally infested field. *Potato research* 44: 19-24

Merz U., A. K. Lees, L. Sullivan, R. Schwärzel, T. Hebeisen, H. G. Kirk, K. Boucek-Mechiche and H. R. Hofferbert. 2011. Powdery scab resistance in *Solanum tuberosum*: an assessment of cultivar x environment effect. *Plant Pathology*

Merz U., & R. E. Falloon .2009. Review: Powdery Scab Of Potato—Increased Knowledge Of Pathogen Biology And Disease Epidemiology For Effective Disease Management . Pag 17- 37.

Merz U. 2008. Powdery Scab of Potato-Occurrence, Life Cycle and Epidemiology. *American Journal of Potato Research* 85:241–246

Merz, U., Walsh J.A., Boucek K., Oberhänsli T.H. and Bitterlin W. 2005. Improved immunological detection of *Spongospora subterranea*. *European Journal Plant Pathology* 111: 371-379.

Merz U., Martinez V.and Schwärzel R. 2004. The potential for the rapid screening of potato cultivars (*Solanum tuberosum*) for resistance to powdery scab (*Spongospora subterranea*) using a laboratory bioassay. *European Journal of Plant Pathology* 110:71–77.

- Merz U., 2000. *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*. On line. www.spongospora.ethz.ch/. (Abril 2010)
- Navia, E y García, C. 2004. Estudios en la biología y patología de *Spongospora subterranea* en papa. Revista Latinoamericana de la Papa. Pag 38.
- Neuhauser S, Bulman S, and Kirchmair Martin. 2010. Plasmodiophorids: The Challenge to Understand Soil-Borne, Obligate Biotrophs with a Multiphasic Life Cycle. Chapter 3. Pag 51 - 77
- Nitzan, N., Kathleen G., Miller E. 2010. Genetic Stability in Potato Germplasm for Resistance to Root Galling Caused by the Pathogen *Spongospora subterranea*
- Nitzan, N., Cummings, T. F., Johnson, D. A., Miller, J. S., Batchelor, D. L., Olsen, C., Quick, R. A., And Brown, C. R. 2008. Resistance To Root Galling Caused By The Powdery Scab Pathogen *Spongospora Subterranea* In Potato. Plant Dis. 92:1643-1649.
- Ñústez, C.E. 2011. Variedades colombianas de papa. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. ISBN 978-958-761-100-7.
- Orozco, L.F., 2012. Evaluación de la heredabilidad y selección combinada en una población de *Solanum phureja* juz et buk por resistencia a *Spongospora subterranea* (Wallr) lagerh f. sp. *Subterranea* Tomlinson y *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: Magíster en Ciencias Agraria con énfasis en Genética y fitomejoramiento.
- Osorio, I.O., Orozco, M., Gutierrez, P., Gonzalez, P y Marin, M. 2012. Variabilidad Genética de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* en Colombia. Bioagro 24: 151 -162.
- Porras, P. 2000. Guía para la papa criolla. Clon 1. En: Papas colombianas con el mejor entorno ambiental, 2 edición. FEDEPAPA, Bogotá. pp. 44-47, 65-69.
- Pulgarin T.M., López J.B., Pineda T.R., Galindo L.F., Arango R., Morales J.G. 2012. Caracterización Citogenética de Cinco Genotipos de Papa Criolla, *Solanum phureja* (Juz. et Buk.). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. Vol 65, No 1.
- Qu X.S, y Christ B.J.2006. Detection and Quantification of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* by PCR in Host Tissue and Naturally Infested Soils. American Journal of potato Research 83:21-30
- Qu X.S, 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 81:3685-394
- Rendón V.A, González E. P, Cotes J. M.2012. Heredabilidad de la resistencia a *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* en una población de *Solanum phureja* a través bioensayos. revista facultad de ciencias básicas 8:70-83

Rodríguez , K., Maldonado, Y., Murcia, L., Huertas, W., Vásquez, M., Zambrano, A., Rivero, R., García, C. 2002. Evaluación de protocolos para la detección de patógenos del suelo en papa (*Rhizoctonia*, *Rosellinia* y *Spongospora*). On line: <http://www.todopapa.com.ar/pdf/protocolos.pdf>

Rodríguez L. E., Ñustez C.E., Estrada N. 2009. Criolla Latina, Criolla Paisa y Criolla Colombia, nuevos cultivares de papa criolla para el departamento de Antioquia (Colombia). *Agronomía Colombiana* 27: 283-303.

Salazar, L. 1982. Manual de enfermedades virósicas de la papa. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. 226p.

Shah, F.A., R.E. Falloon and S.R. Bulman. 2010. Nightshade weeds (*Solanum* spp.) confirmed as hosts of the potato pathogens *Meloidogyne falax* and *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. *Australasian Plant Pathology* 39: 492-498

Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, Vincent., Spouge, J., Levesque, A. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. vol. 109, no. 16 Pag 6241–6246 On line: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1117018109

Smith, M. J., Adams M. J., and E. Ward. 2013. Ribosomal DNA analyses reveal greater sequence variation in *Polymyxa* species than previously thought and indicate the possibility of new ribotype-host-virus associations. *Environmental Microbiology Reports* (2013) 5(1), 143–150

Spooner, D.M., J. Núñez, G. Trujillo, M. del R. Herrera, F. Guzmán y M. Ghislain. 2007. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *PNAS* 104, 19398-19403.

Tucker S.L., Besi M.I., Galhano R., Franceschetti M., Goetz S., Lenhert S., Osbourn A., Sesma A. 2010. Common Genetic Pathways Regulate Organ-Specific Infection-Related Development in the Rice Blast Fungus. *The Plant Cell*, Vol. 22: 953–972

Van de Graaf P & Lees A. 2005. Epidemiology, autecology and control of *Spongospora subterranea*, cause of potato powdery scab – Project report. On line <http://www.potato.org.uk/>. (Junio 2013)

Van de Graaf P, Wale SJ, y Lees AK. 2007. Factors affecting the incidence and severity of *Spongospora subterranea* infection and galling in potato roots. *Plant Pathology* 56: 1005–1013

Vélez B. 2007. Detección e identificación del Potato mop-top virus (PMTV) en áreas de producción de papa donde se encuentra *Spongospora subterranea* en dos departamentos de Colombia. Tesis Magister en Ciencias Agrarias. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 115 p.

Wright, J. 2012. Studies on powdery scab on Potato in South Africa. Tesis Magister scientiae (Agriculture) plant pathology. Universidad de Pretoria.

11 ANEXOS

Anexo 1: Datos de precipitación y temperatura presentados durante periodo de evaluación Marzo- Agosto 2013 en el lote experimental ubicado en la vereda el Corzo (Facatativá, Cundinamarca)

		MARZO																																
Día		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	Promedio	
Precipitación (mm)		22	0	0	17	0	0	0	0	0	0	15	21	8	15	0	0	10	24	23	0	14	20	11	0	18	0	0	0	25	20	11	8,84	
Temperatura aire max(°C)		20	18,3	19	19,8	21,3	20,6	20,5	20	19,5	17,5	18,4	18,5	19	19,8	25	20,4	19	19	19,2	17	18,7	18,7	19	19,4	18,8	17	20	20	19,1	18,8	26,7	19,61	
Temperatura aire min(°C)		10,5	9,5	10,1	11,7	7,7	9	10	7,3	9,5	10	10,6	9,9	10,6	9	9,3	11	9,8	9	9,3	9	9,4	10,4	10,8	6,5	7,8	11	8	11	10	22,8	11	10,05	
		ABRIL																																
Día		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	-	Promedio	
Precipitación (mm)		0	0	0	0	0	0	6	3	9	2	61	32	7	1	28	0	0	0	0	0	40	8	3	4	0	0	2	2	3	4	-	6,94	
Temperatura aire max(°C)		18	19,7	20	19,8	18,6	18,5	18	17,5	17	18,8	18,6	17,6	19	20,5	18	17,5	16,7	17,2	18,5	18,6	18,9	18	18,1	19,7	21	21,5	20	21,7	20	19,7	-	18,28	
Temperatura aire min(°C)		9	7,9	8	6,2	7	9,5	11	10	10,3	11,5	10,5	9,9	10	7	8,6	10	11	10	10	10	10	11	10	7,5	9	8,9	8	10	11	10,5	9,4	-	9,12
		MAYO																																
Día		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	Promedio	
Precipitación (mm)		17	2	3	0	3	2	0	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	2	0	0	1	1,35	
Temperatura aire max(°C)		20	19	20	21	20,8	17,9	19	18	18,2	18,8	19	19,4	18,9	19	19,6	20	29	29,6	19,9	17,8	18,2	19,5	19,3	21	19,7	20	20	19	20	19,5	19,8	20,03	
Temperatura aire min(°C)		9	10	11	9,8	11,7	11	11,8	9	9	8,6	6,9	11	10,7	10	7,5	9	11	11	11,4	11	9	10,3	11	11,3	10	9	9,4	9	10	7,8	9,9	9,91	
		JUNIO																																
Día		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	Promedio	
Precipitación (mm)		0	5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	5	1	0	0	11	0	9	0	0	2	0	0	10	2	3	0	1	0	0	-	1,61	
Temperatura aire max(°C)		18	18,5	17	21	21,7	20	20	19,8	18,3	18,8	19,4	18	17,9	18,3	20	20,4	20	22	21	22	22	20	19,8	18,5	18	19	18,5	19	18,7	18	-	18,83	
Temperatura aire min(°C)		10	10	7	6	7	6	11	11	10,1	10	11	9,3	8	10	11	8	7	8	10	9	9	6	6	7	8	9	9	11	6	9,8	-	8,39	
		JULIO																																
Día		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	Promedio	
Precipitación (mm)		0	5	0	0	1	0	0	0	0	0	4	0	0	9	0	0	0	0	6	0	0	2	0	1	1	0	4	0	1	3	3	1,29	
Temperatura aire max(°C)		18,5	17,9	18	18,6	18,7	18	18	19	19	18,5	18,7	18	19	18,6	19	19	19	18,7	19	18,7	19	19,5	19	18,9	18	17	19	18	17,2	17	20	18,53	
Temperatura aire min(°C)		9	8,5	6	8	9	7	8,7	10	9	11	10	10,5	9	9,5	8,7	7	6	8	7	7,8	8	7	9	9,1	5,4	8	8,5	8,3	9,3	9,2	8,5	8,39	
		AGOSTO																																
Día		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	Promedio	
Precipitación (mm)		4	1	0	10	8	0	1	3	1	1	0	0	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	6	0	0	1	0	1	0	1,39	
Temperatura aire max(°C)		19,6	19	18	18,7	18,5	19	20	21	20	19	19	18,7	18	18	17,6	19,2	20,3	18	19	18	18,5	18	18,1	18,5	19	18,6	18,4	18,2	17	17,2	16,8	18,61	
Temperatura aire min(°C)		11	7	6,7	11	10,1	10,5	9	10,8	9,8	10,2	9,8	8,5	9,9	9	7	7	9,5	10	6,2	8,9	10	11	10	11	10,3	10,5	11	9,8	10	7,6	7	9,36	

Anexo 2: Coordenadas de muestreo y concentración de esporos presentes en muestras de suelo halladas con la ecuación de regresión cuadrática establecida por Rodríguez *et al.*, 2002.

Muestra	X (m)	Y (m)	Coordenada GPS	Altura (msnm)	Densidad óptica	Concentración esporosoros
1	1.3	1	04°47'15N 074°18;26W	2581	0.217	56393,1032
2	3.9	1	04°47'15N 074°18;26W	2579	0.196	45752,227
3	5.2	1	04°47'15N 074°18;26W	2581	0.293	94059,5064
4	18.2	1	04°47'15N 074°18;26W	2585	0,267	81171,0945
5	19.5	1	04°47'15N 074°18;26W	2584	0.764	322357,624
6	20.8	1	04°47'15N 074°18;26W	2584	0.329	111719,745
7	22.1	1	04°47'15N 074°18;26W	2584	0,239	67332,5605
8	23.4	1	04°47'16N 074°18;26W	2582	0.315	104846,419
9	24.7	1	04°47'16N 074°18;26W	2584	0,360	126973,936
10	26	1	04°47'16N 074°18;26W	2582	0,290	92497,4276
11	27.3	1	04°47'16N 074°18;26W	2581	0,238	66845,8779
12	28.6	1	04°47'16N 074°18;26W	2585	0,436	164426,758
13	29.9	1	04°47'16N 074°18;26W	2585	0,271	83176,4544
14	31.2	1	04°47'16N 074°18;26W	2584	0,384	138808,196
15	1.3	3	04°47'15N 074°18;26W	2588	0,405	149100,72
16	2.6	3	04°47'15N 074°18;26W	2590	0,224	60015,3737
17	3.9	3	04°47'15N 074°18;26W	2589	0,341	117638,344
18	5.2	3	04°47'15N 074°18;26W	2589	0,374	133858,309
19	6.5	3	04°47'15N 074°18;26W	2589	0,310	102362,72
20	7.8	3	04°47'15N 074°18;26W	2587	0,437	164862,239
21	9.1	3	04°47'15N 074°18;26W	2587	0,259	77273,8214
22	10.4	3	04°47'15N 074°18;26W	2587	0,422	157489,164
23	11.7	3	04°47'15N 074°18;26W	2587	0,360	126983,866
24	13	3	04°47'15N 074°18;26W	2587	0,269	82145,2495
25	14.3	3	04°47'15N 074°18;26W	2587	0,265	80162,6869
26	15.6	3	04°47'15N 074°18;26W	2586	0,329	111713,481
27	20.8	3	04°47'15N 074°18;26W	2587	0,530	210570,443
28	22.1	3	04°47'15N 074°18;26W	2587	0,688	286478,516
29	23.4	3	04°47'16N 074°18;26W	2588	0,457	174804,694
30	24.7	3	04°47'16N 074°18;26W	2586	0,271	83201,8627

31	26	3	04°47'16N 074°18;26W	2587	0,345	119593,453
32	27.3	3	04°47'16N 074°18;26W	2587	0,354	124016,763
33	28.6	3	04°47'16N 074°18;26W	2587	0,530	210493,985
34	29.9	3	04°47'16N 074°18;26W	2588	0,290	92705,5177
35	31.2	3	04°47'16N 074°18;26W	2588	0,199	47481,9797
36	1.3	5	04°47'15N 074°18;26W	2588	0,262	78848,5345
37	2.6	5	04°47'15N 074°18;26W	2586	0,457	174713,196
38	3.9	5	04°47'15N 074°18;26W	2586	0,206	51240,8749
39	5.2	5	04°47'15N 074°18;26W	2588	0,316	105362,679
40	6.5	5	04°47'15N 074°18;26W	2588	0,327	110724,84
41	7.8	5	04°47'15N 074°18;26W	2589	0,198	47103,734
42	9.1	5	04°47'15N 074°18;26W	2588	0,402	147678,262
43	10.4	5	04°47'15N 074°18;26W	2588	0,405	149100,72
44	11.7	5	04°47'15N 074°18;26W	2587	0,224	60012,4938
45	13	5	04°47'15N 074°18;26W	2588	0,396	144760,908
46	14.3	5	04°47'15N 074°18;26W	2587	0,764	322387,446
47	15.6	5	04°47'15N 074°18;26W	2589	0,457	174713,196
48	16.9	5	04°47'15N 074°18;26W	2588	0,299	96972,9963
49	18.2	5	04°47'15N 074°18;26W	2588	0,361	127034,625
50	19.5	5	04°47'15N 074°18;26W	2587	0,146	14388,4095
51	20.8	5	04°47'15N 074°18;26W	2587	0,331	112716,434
52	22.1	5	04°47'15N 074°18;26W	2589	0,474	183070,103
53	23.4	5	04°47'15N 074°18;26W	2589	0,267	81161,8794
54	24.7	5	04°47'15N 074°18;26W	2588	0,290	92514,3323
55	26	5	04°47'15N 074°18;26W	2587	0.217	56393,1032
56	27.3	5	04°47'15N 074°18;26W	2586	0.254	74728,3275
57	28.6	5	04°47'16N 074°18;26W	2586	0.196	45752,227
58	29.9	5	04°47'16N 074°18;26W	2586	0.293	94059,5064
59	7.8	7	04°47'15N 074°18;26W	2588	0.275	85101,0645
60	9.1	7	04°47'15N 074°18;26W	2587	0.177	35783,2104
61	10.4	7	04°47'15N 074°18;26W	2587	0,382	138036,284

62	11.7	7	04°47'15N 074°18;26W	2589	0,267	81171,0945
63	13	7	04°47'15N 074°18;26W	2589	0.764	322357,624
64	14.3	7	04°47'15N 074°18;26W	2588	0.329	111719,745

ANEXO 3: Protocolo Técnica DAS-ELISA (Kit comercial Bioreba)

DAS-ELISA es una técnica serológica que permite capturar el antígeno (patógeno) usando dos láminas de anticuerpo, la primera encargada de sensibilizar la placa y la segunda con el anticuerpo conjugado a una enzima; la intensidad de color en la reacción del substrato con el anticuerpo conjugado permite diferenciar concentraciones del antígeno presente en cada muestra. Como se reporta en el protocolo del Kit BIOREBA utilizado en éste estudio se utiliza anticuerpos monoclonales específicos para Sss ya que reconocen únicamente esporosoros del patógeno y ninguna otra forma del patógeno ni patógenos que muestren una sintomatología similar en tubérculo a la sarna polvosa de la papa; ratificando así la especificidad de la técnica. La implementación DAS-ELISA arroja valores de absorbancia referentes a la cantidad de esporosoros presentes/gramo de suelo.

Protocolo preparación de muestras:

- Secar el suelo a temperatura ambiente, tamizarlo por tamiz de 80 micras
- Pesar 2 g de suelo y disponerlo en morteros para su posterior maceración con buffer de extracción y tomar el sobrenadante.
- Realizar diluciones seriadas de las muestras y para la cuantificación en plato de ELISA se usó la dilución más alta de 10^3 con el fin de poder obtener absorbancias de las muestras en caso de que la concentración de esporosoros en éstas fueran altas y evitando que se salieran del rango de lectura.

Preparación del buffer de cubrimiento

- Disolver la tableta de coating buffer (Art N 110110) en 100 ml de agua doblemente destilada

Preparacion del buffer de extraccion:

- Tomar 900 ml de agua doblemente destilada y adicionar 100 ml del buffer de extraccion del kit (Concentración resultantes 1 X), agitar bien.

Preparacion del buffer de lavado:

- Disolver el contenido de una bolsa de 500 ml de agua doblemente destilada (Solucion stock 10 X)
- Diluya la solución stock para su uso: tome 100 ml de la solución stock en 900 ml de agua doblemente destilada.

Preparación de positivos y negativos [1g/1ml]

- Adicionar 2,5 ml de agua miliQ en los frascos positivos y negativos para resuspender
- Agitar bien y disponer alícuotas de 50 μ l de cada frasco en eppendorf autoclavados para evitar contaminar todo el material y almacenar los frascos originales a -20°C .
- Medir 50 μ l de agua destilada disponerlo en tubos eppendorf para utilizarlo como blanco de la prueba.

Día 1: sensibilización de la placa

- Tomar el Anti Sss IgG concentrado a 1000 x y medir 20 μ l disponerlo en tubo falcon, completar con el buffer de cubrimiento a 20 ml y agitar bien.
- Disponer el preparado anterior en caja de lavado de Elisa (>200 μ l)
- Tapar la placa de Elisa con papel parafinado y disponerlo en caja plástica que contiene servilleta húmeda en la base, sellar con vinipel y dejar overnight a 4°C

Día 2: Adición de muestras

- Desechar con fuerza el contenido de la placa de Elisa que estuvo overnight
- Hacer cuatro lavados sucesivos a la placa de Elisa con el buffer de lavado 1 X
- En cada pozo disponer 200 μ l de muestra (resultado de la maceración de las muestras con el buffer de extraccion y las diluciones seriadas)
- Tapar con parafina y disponerlo en caja plástica que contiene servilleta húmeda en la base u sellar con vinipel y dejar overnight a 4°C

Día 3: Preparación de la solución de enzima conjugada

- Tomar 2.5 ml del buffer conjugado y completar a 25 ml en tubo falcon con agua destilada estéril (revolver con la punta de micropipeta)
- Tomar 25 μ l del Anti Sss IgG conjugated y disponerlo en la preparación anterior (se dispone en la nevera mientras se hacen los lavados)
- Disponer el buffer de lavado 1 X en caja de lavado de ELISA y realice cuatro lavados consecutivos (200 μ l/pozo)
- Desechar el contenido de la placa
- Lavar 4 veces seguidas con el buffer de lavado (verificar al final con una servilleta que la placa este bien lavada)
- Disponer en caja de lavado de Elisa la solución de enzima conjugada que se preparó anteriormente, con puntas nuevas disponer 200 μ l de la solución en cada pozo.
- Tapar la placa con papel parafinado y colocarla en caja plástica que contiene servilleta húmeda en el fondo, colocarla a 30 °C x 5 horas en el hibridador (tomar el tiempo a partir de la estabilización de la temperatura a 30 °C).

Después de las 5 horas:

- Tomar del buffer sustrato 4 ml y colocarlo en tubo falcon y completar a 20 ml con agua destilada estéril (tapar el tubo con aluminio)
- Tomar la pastilla PNPP y diluirla bien en la preparación anterior (almacenada a -20 °C)
- Lavar la placa 4 veces seguidas con el buffer de lavado disponiendo 200 μ l/pozo
- Disponer 198 μ l del preparado anterior en cada pozo
- Tapar la placa con papel parafinado y colocarla a temperatura ambiente
- Después de media hora se realizan las lecturas de las densidades ópticas durante 2 horas.

La reacción final se determina por colorimetría en un espectrofotómetro Biorad 550 TM, a una longitud de onda de 405 nm. La lectura obtenida en el espectrofotómetro es una medida de la densidad óptica o absorbancia que se refiere a la fracción de luz incidente que es transmitida.

Anexo 4: Análisis estadístico de datos - salida software SAS versión 8.2: Prueba de Chi² para corroborar la independencia de variables.

15:56 Saturday, October 16, 2013 1

Procedimiento FREQ

Estadísticos para Tabla de Concentraci_n_sporosoros_suelo por incidencia_en_raiz

Estadístico	DF	Valor	Probabilidad
////////////////////			
Chi-cuadrado	60	61.9404	0.4067
Ratio chi-cuadrado de la verosimilitud	60	84.9782	0.0186
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	1.2745	0.2589
Coeficiente Phi		0.9688	
Coeficiente de contingencia		0.6958	
V de Cramer		0.9688	

Procedimiento FREQ

Estadísticos para Tabla de Concentraci_n_sporosoros_suelo por incidencia_en_raiz

Test exacto de Fisher

////////////////////

Table Probability (P)	8.943E-19
Pr <= P	0.4995

Tamaño de la muestra = 66

Estadísticos para Tabla de Concentraci_n_sporosoros_suelo por severidad_en_ra_z__peso_gramos_

Estadístico	DF	Valor	Probabilidad
////////////////////////////////////			
Chi-cuadrado	480	488.7162	0.3817
Ratio chi-cuadrado de la verosimilitud	480	141.5029	1.0000
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	2.3185	0.1278
Coeficiente Phi	2.7212		
Coeficiente de contingencia	0.9386		
V de Cramer	0.9621		

Test exacto de Fisher

////////////////////////////////////

Table Probability (P) 2.274E-28

Pr <= P 0.6982

Tamaño de la muestra = 66

Estadísticos para Tabla de tratamiento por severidad_en_ra_z__peso_gramos_

Estadístico	DF	Valor	Probabilidad
////////////////////////////////////			
Chi-cuadrado	200	487.9189	<.0001
Ratio chi-cuadrado de la verosimilitud	200	140.4564	0.9995
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	19.7114	<.0001
Coeficiente Phi	2.7190		
Coeficiente de contingencia	0.9385		

V de Cramer 0.9613

Test exacto de Fisher

ff

Table Probability (P) 3.410E-28

Pr <= P 2.358E-15

Tamaño de la muestra = 66

Procedimiento FREQ

Estadísticos para Tabla de tratamiento por severidad_en_ra_z__peso_gramos_

Estadístico	DF	Valor	Probabilidad
Chi-cuadrado	154	187.8409	0.0329
Ratio chi-cuadrado de la verosimilitud	154	56.5247	1.0000
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	6.9470	0.0084
Coeficiente Phi		2.5450	
Coeficiente de contingencia		0.9307	
V de Cramer		0.9619	

Test exacto de Fisher

ffffffffffffffffffffffffffffffffffff

Table Probability (P) 2.542E-10

Pr <= P 0.1314

Estadísticos para Tabla de tratamiento por severidad_en_ra_z__peso_gramos_

Estadístico	DF	Valor	Probabilidad
-------------	----	-------	--------------

////////////////////////////////////

Chi-cuadrado	200	487.9189	<.0001
Ratio chi-cuadrado de la verosimilitud	200	140.4564	0.9995
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	19.7114	<.0001
Coeficiente Phi	2.7190		
Coeficiente de contingencia	0.9385		
V de Cramer	0.9613		

Test exacto de Fisher

////////////////////////////////////

Table Probability (P) 3.410E-28

Pr <= P 2.358E-15

Tamaño de la muestra = 66

Procedimiento FREQ

Estadísticos para Tabla de Concentraci_n_sporosoros_suelo por severidad_en_tub_rculo__numero_p

Estadístico	DF	Valor	Probabilidad
Chi-cuadrado	12	14.0000	0.3007
Ratio chi-cuadrado de la verosimilitud	12	11.1484	0.5162
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	0.0001	0.9913
Coeficiente Phi	1.4142		
Coeficiente de contingencia	0.8165		
V de Cramer	1.0000		

Estadísticos para Tabla de Concentraci_n_sporosoros_suelo por severidad_en_tub_rculo__numero_p

Test exacto de Fisher
~~~~~  
Table Probability (P) 0.0238  
Pr <= P 1.0000

Tamaño de la muestra = 7

Estadísticos para Tabla de tratamiento por severidad\_en\_tub\_rculo\_\_numero\_p

| Estadístico                            | DF | Valor   | Probabilidad |
|----------------------------------------|----|---------|--------------|
| Chi-cuadrado                           | 12 | 14.0000 | 0.3007       |
| Ratio chi-cuadrado de la verosimilitud | 12 | 11.1484 | 0.5162       |
| Chi-cuadrado Mantel-Haenszel           | 1  | 0.9324  | 0.3342       |
| Coeficiente Phi                        |    | 1.4142  |              |
| Coeficiente de contingencia            |    | 0.8165  |              |
| V de Cramer                            |    | 1.0000  |              |

Procedimiento FREQ

Estadísticos para Tabla de tratamiento por severidad\_en\_tub\_rculo\_\_numero\_p

Test exacto de Fisher  
~~~~~  
Table Probability (P) 0.0238
Pr <= P 1.0000

Tamaño de la muestra = 7

Anexo 5: Protocolo Extracción de ADN a partir de tejido vegetal – Rodríguez *et al.*, 2002 (Modificado por Carreño 2009)

1. Mezclar en tubos de 2 ml 0.5 g de esporosoros + 0.3 g de perlas previamente enfriadas
2. Adicional 800 µl de tampón de lisis de Sss
3. Someter a disrupción celular durante 3 minutos
4. Incubar a 25 °C durante 10 minutos
5. Adicionar 800 µl de fenol saturado pH 8.0 a cada muestra
6. Mezclar por vortex e incubar a 25 °C por 5 minutos
7. Centrifugar a 10000 g durante 20 minutos
8. Transferir el sobrenadante a tubos de micro centrifuga, mezclar con volumen igual de cloroformo isoamilico 24:1 mediante vortex, incubar a 25 °C durante 5 minutos
9. Centrifugar a 10000 g durante 15 minutos
10. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y adicionar volumen igual de etanol al 100 %
11. Mezclar por inversión y almacenar a -20 °C overnight
12. Centrifugar a 10000 g durante 15 minutos
13. Desechar la fase acuosa y el pellet de ADN resultante debe lavarse 3 veces consecutivas con etanol frio a 70 %
14. Dejar secar y resuspender en 50 µl de agua HPLC estéril
15. Valorar la calidad y cantidad de ADN extraído por electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

Almacenar el ADN a -20 °C o utilizar directamente para PCR

- **Tampón de lisis para *S. subterranea***

Tampón TE (Tris- EDTA).

Tris-HCl	50 mM pH 8.0
EDTA	50 mM
SDS	4 %

Preparación Tris- HCl 50 mM pH 8.0: Tris 1 M pH 8.0. Disolver 121.1 g de tris base en 800 ml de agua, ajustar el pH a temperatura ambiente al valor requerido por adición de HCl, ajustar con agua al volumen requerido.

Preparación EDTA 50 mM: EDTA 0.5 M pH 8.0. Disolver 186.1 g de EDTA en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8 con NaOH.

Preparación SDS 4 %: SDS al 10 %. Disolver 100 g de SDS (sodio dodecil sulfato) en 100 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.2 con HCl. Ajustar el volumen a un litro con agua. Esterilizar por filtración.

Anexo 5: protocolo Extracción de ADN a partir de muestras de suelo (Kit Power soil DNA isolation – Laboratorio MoBio).

1. En tubos Power bead agregar 0.25 g de muestra
2. Mezclar por vortex
3. Observar la solución C1 (si esta precipitada se debe calentar a 60 °C hasta disolverla para su uso)
4. Adicionar 60 µl de la solución C1 y pasar por vortex en HoBio vortex adopter con la boca hacia adentro durante 10 minutos a velocidad máxima
5. Centrifugar a 10000 g durante 30 segundos
6. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml del kit

7. Adicionar 250 μ l de la solución C2 y llevar a vortex por 5 segundos e incubar a 4 °C durante 5 minutos
8. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10000 g
9. Transferir 600 μ l del sobrenadante a tubos limpios de 2 ml del kit
10. Adicionar 200 μ l de la solución C3 y someter a vortex e incubar a 4 °C durante 5 minutos
11. Centrifugar a temperatura ambiente por 1 minuto a 10000 g
12. Transferir hasta 750 μ l del sobrenadante en tubos limpios de 2ml del kit
13. Agregar 1200 μ l del mix de la solución C4 al sobrenadante y vortex durante 5 segundos
14. Tomar aproximadamente 675 μ l del sobrenadante y colocarlo en tubo que contiene spinfilter y centrifugar a 10000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente
15. Descartar lo que se filtra y repetir el proceso 3 veces
16. Adicionar 500 μ l de la solución C5 y centrifugarlo a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10000 g
17. Descartar lo que se filtra
18. Centrifugar a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10000 g
19. Cuidadosamente tomar el filtro y pasar a tubo limpio de 2 ml del kit
20. Adicionar 100 μ l de la solución C6 en el centro de la membrana
21. Centrifugar a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10000 g
22. Descartar filtro spin

El DNA en el tubo se encuentra listo para su amplificación (para su conservación es almacenado a -20 °C)

Anexo 6: Protocolo de purificación de ADN por centrifugación (Promega)

1. Adicionar un volumen igual al volumen del producto de PCR de la solución Binding membrana.
2. Insertar una minicolumna SV en un tubo de 2.0 ml
3. Transferir el producto de PCR preparado al tubo que contiene la minicolumna SV e incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto y centrifugar a 16,000 g por 1 minuto
4. Descarte el sobrenadante y disponga nuevamente la minicolumna SV en el tubo
5. Agregue 700 µl de la solución de lavado a la membrana y centrifugar a 16000 g durante 1 minuto
6. Descarte el sobrenadante y nuevamente disponga la minicolumna SV dentro del tubo
7. Repita el paso cinco pero esta vez adicionando 500 µl de la solución de membrana y centrifuge nuevamente a 16000 g durante 5 minutos

8. Descartar el sobrenadante e introduzca nuevamente la minicolumna SV al tubo
9. Centrifuge a 16000 g durante 1 minuto la minicolumna SV con la tapa de la centrifuga abierta
10. Transfiera cuidadosamente a un tubo nuevo la minucolumna
11. Adicione 40 µl de la solución libre de nucleasa en el centro de la minicolumna, incube a temperatura ambiente durante 1 minuto y centrifugue nuevamente a 16000 g durante 1 minuto
12. Repita el paso numero 11 pero adiciones 30 µl
13. Descarte la minicoluma y en el tubo se encuentra el producto de amplificación ya purificad, almacenar a -20 °C para su conservación

Anexo 7. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE LA REGIÓN ITS 1 –5.8S-ITS 2 CON LA SECUENCIA TIPO I Y TIPO II DEL ADNr DE *Sss*

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

TipoII	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTCCGGTTTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTGGA	354	
Col110R	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTCCGGTTTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTGGA	354	
Col1102R	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTCCGGTTTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTGGA	355	
Col37R	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTCCGGTTTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTGGA	355	
28VP07_Am	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTCCGGTTTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTGGA	355	
15CAU17_A	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTCCGGTTTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTGGA	355	
LatinaR	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTCCGGTTTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTGGA	355	
50SUELO18	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTCCGGTTTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTGGA	354	
TipoI	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTCCGGTTTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTG-A	358	
Ti LatinaT	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTCCGGTTTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTG-A	358	
Co Col110T	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTCCGGTTTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTG-A	358	
Co 36ATQ133_T	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTCCGGTTTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTG-A	358	
Co Col1102T	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTCCGGTTTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTG-A	358	
Co Col37T	TTGAAAGCATGCCTCTTTGAGTGTCCGGTTTCTATTCTCCCGGAAACGCCCTGTGCGTG-A	358	
28			
15	TipoII	AGGGGACTATGAGCTCTGGTCCGTCATGGCTTGAAAGATTATCCAACCCGGTGCGCGTCT	415
la Col110R	AGGGGACTATGAGCTCTGGTCCGTCATGGCTTGAAAGATTATCCAACCCGGTGCGCGTCT	415	
50 Col1102R	AGGGGACTATGAGCTCTGGTCCGTCATGGCTTGAAAGATTATCCAACCCGGTGCGCGTCT	416	
Ti Col37R	AGGGGACTATGAGCTCTGGTCCGTCATGGCTTGAAAGATTATCCAACCCGGTGCGCGTCT	416	
La 28VP07_Am	AGGGGACTATGAGCTCTGGTCCGTCATGGCTTGAAAGATTATCCAACCCGGTGCGCGTCT	416	
Co 15CAU17_A	AGGGGACTATGAGCTCTGGTCCGTCATGGCTTGAAAGATTATCCAACCCGGTGCGCGTCT	416	
36 LatinaR	AGGGGACTATGAGCTCTGGTCCGTCATGGCTTGAAAGATTATCCAACCCGGTGCGCGTCT	416	
Co 50SUELO18	AGGGGACTATGAGCTCTGGTCCGTCATGGCTTGAAAGATTATCCAACCCGGTGCGCGTCT	415	
Co TipoI	AGGGGACTCTGAGCTCTGGTCCGTCATGGCTTGAAAGATTATCCAACCCGGTGCGCGTCT	419	
Co LatinaT	AGGGGACTCTGAGCTCTGGTCCGTCATGGCTTGAAAGATTATCCAACCCGGTGCGCGTCT	419	
Ti Col110T	AGGGGACTCTGAGCTCTGGTCCGTCATGGCTTGAAAGATTATCCAACCCGGTGCGCGTCT	419	
Cc 36ATQ133_T	AGGGGACTCTGAGCTCTGGTCCGTCATGGCTTGAAAGATTATCCAACCCGGTGCGCGTCT	419	
Cc Col1102T	AGGGGACTCTGAGCTCTGGTCCGTCATGGCTTGAAAGATTATCCAACCCGGTGCGCGTCT	419	
Cc Col37T	AGGGGACTCTGAGCTCTGGTCCGTCATGGCTTGAAAGATTATCCAACCCGGTGCGCGTCT	419	
28			
15CAU17_A	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTTTATGC	120	
LatinaR	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTTTATGC	120	
50SUELO18	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTT-ATGC	119	
TipoI	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTT-ATGC	119	
LatinaT	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTT-ATGC	119	
Col110T	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTT-ATGC	119	
36ATQ133_T	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTT-ATGC	119	
Col1102T	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTT-ATGC	119	
Col37T	GGGTGCGATTGTCTGTTGAAGGGTGACGCCCGCTCTGGGGCTAGCTCGAAACCTT-ATGC	119	
TipoII	AAACCGTAT-----TACTGAACTTACTAAAGTGGATCGTTTAACTAAATACAACCTTTAA	174	
Col110R	AAACCGTAT-----TACTGAACTTACTAAAGTGGATCGTTTAACTAAATACAACCTTTAA	174	
Col1102R	AAACCGTAC-----TACTGAACTTACTAAAGTGGATCGTTTAACTAAATACAACCTTTAA	175	
Col37R	AAACCGTAC-----TACTGAACTTACTAAAGTGGATCGTTTAACTAAATACAACCTTTAA	175	
28VP07_Am	AAACCGTAC-----TACTGAACTTACTAAAGTGGATCGTTTAACTAAATACAACCTTTAA	175	
15CAU17_A	AAACCGTAC-----TACTGAACTTACTAAAGTGGATCGTTTAACTCAATACAACCTTTAA	175	
LatinaR	AAACCGTAC-----TACTGAACTTACTAAAGTGGATCGTTTAACTAAATACAACCTTTAA	175	
50SUELO18	AAACCGTAT-----TACTGAACTTACTAAAGTGGATCGTTTAACTAAATACAACCTTTAA	175	
TipoI	AAACCGTTTTTCGGATACTGAACTTACTAAAGTGGATCATTTAACTAAATACAACCTTTAA	179	
LatinaT	AAACCGTTTTTCGGATACTGAACTTACTAAAGTGGATCATTTAACTAAATACAACCTTTAA	179	
Col110T	AAACCGTTTTTCGGATACTGAACTTACTAAAGTGGATCATTTAACTAAATACAACCTTTAA	179	
36ATQ133_T	AAACCGTTTTTCGGATACTGAACTTACTAAAGTGGATCATTTAACTAAATACAACCTTTAA	179	
Col1102T	AAACCGTTTTTCGGATACTGAACTTACTAAAGTGGATCATTTAACTAAATACAACCTTTAA	179	
Col37T	AAACCGTTTTTCGGATACTGAACTTACTAAAGTGGATCATTTAACTAAATACAACCTTTAA	179	

