



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Caracterización de los factores de riesgo asociados a la hernia de las crucíferas en los sistemas de producción de hortalizas en Colombia**

**Fabián Leonardo Padilla Huertas**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agrarias,  
Departamento Agronomía  
Bogotá, D.C. Colombia  
2020



# **Caracterización de los factores de riesgo asociados a la hernia de las crucíferas en los sistemas de producción de hortalizas en Colombia**

**Fabián Leonardo Padilla Huertas**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
Magister en Ciencias Agrarias

Directora:  
PhD Celsa García Domínguez  
Co-directora:  
MSc Andrea Botero Ramírez

Línea de Investigación: Fitopatología  
Grupo de Investigación: Horticultura

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agrarias,  
Departamento de Agronomía  
Bogotá, D.C., Colombia  
2020



*A mis padres, los responsables de que haya llegado a este punto de mi carrera profesional, han sido el motor de todo lo que soy*

*A mis amigos, facilitaron el camino haciéndolo ameno y lleno de aprendizajes.*

*A mis profesores, sus enseñanzas se ven reflejadas en este documento y en el profesional que hoy soy, su ejemplo seguirá acompañándome el resto de mi vida.*

*A la Universidad Nacional de Colombia, el lugar universal y público donde todo y todos cabemos, el lugar donde viví los mejores años de mi vida, donde tengo los mejores recuerdos, el lugar responsable de mi sentido crítico y social, el lugar que me ofreció la oportunidad de crecer como persona y de formarme profesionalmente, el lugar que defenderé sin dudas y al que le retribuiré todo lo posible desde las posiciones que asuma.*



## Agradecimientos

A mis padres, Zoraida Huertas y William Padilla, sin su sacrificio y entrega no hubiera llegado a este punto. Su amor y ejemplo siempre me inspiraron a ser mejor, les debo mi vida y todo lo que he logrado y lograré con ella. A mis hermanos Sygrid Padilla y William Andrés Padilla, hicieron parte del recorrido que he llevado hasta acá.

A la profesora Celsa García, mi directora, quien con su ejemplo y sus consejos a través de esta investigación logró demostrarme que siempre podía dar un poco más de mí, gracias por la paciencia y esa preocupación por lo personal, que va más allá de su papel como tutora.

A Andrea Botero, mi amiga, mi confidente, la persona que me puso en este camino y que no dejó de creer en mí y de apoyarme a su manera para recorrerlo y culminarlo.

A mis amigos, esas personas que, sin involucrarse directamente en la investigación, aportaron todo lo demás necesario para terminarla, quienes fortalecen los otros aspectos de la vida que soportan la academia: Francisco Acevedo, Diego Sua, David Sánchez, Álvaro Castellanos, Laura Benavides, y a todo el #NF.

Al grupo de investigación en *P. brassicae*, fueron fundamentales apoyando las labores y las ideas que sirvieron para culminar esta investigación: Cristian Traslaviña, Rubén Méndez, Camilo Rincón, Sebastián Navas, Camilo Gómez, Deisy Urbano, José Miguel Sarmiento, Diana Martínez y Margarita López.

Al laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias y a sus miembros y usuarios, quienes facilitaron los espacios, materiales, insumos y guía para la culminación de los ensayos.

Al laboratorio de Caracterización Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN), en especial a Ibonne García, quien acompañó el uso de los equipos y espacios necesarios para una parte importante de esta investigación.

*Al universo por conspirar a favor de esta aventura.*



## Resumen

La hernia de las crucíferas, causada por *Plasmodiophora brassicae*, es una de las principales limitantes en la producción comercial de crucíferas en el país. En Colombia se desconocen la distribución de la enfermedad y los principales factores que afectan su desarrollo. El objetivo de la investigación fue evaluar el papel de las características de los sistemas de producción de hortalizas como factores de riesgo asociados al desarrollo de la enfermedad. Se visitaron lotes de las principales zonas de producción de crucíferas (Cundinamarca, Boyacá, Nariño, Caldas, Antioquia, Cauca, Valle del Cauca y Norte de Santander) donde se indagó vía encuesta sobre los posibles factores asociados a la presencia y desarrollo de la enfermedad. Además, se cuantificó el inóculo presente en los lotes mediante qPCR, lo que permitió determinar que el patógeno está presente en todos los departamentos visitados. En Antioquia no se observaron síntomas típicos de la enfermedad en repollo blanco ya que mayoritariamente se cultiva el híbrido resistente 'Tekila'. Con respecto a los residuos de cosecha, el 88.3% de los agricultores los reincorpora favoreciendo el aumento de la densidad de inóculo. La mayor densidad de inóculo se encontró en Norte de Santander, los demás departamentos no mostraron diferencias entre sí. Los resultados mostraron que los factores que más influyen en la aparición de la hernia de las crucíferas son el contenido de calcio, sodio, fósforo, boro, cobre, aluminio y limos en suelo, además del pH, la capacidad de intercambio catiónico efectiva (CICE), el promedio de días con lluvia al año y respecto al manejo fueron la aplicación de materiales encalantes, la inclusión de crucíferas en el sistema de rotación y la resistencia a la enfermedad del material sembrado. Por otro lado, la densidad de inóculo del patógeno en Colombia está determinada principalmente por el sistema de propagación, las concentraciones en suelo de manganeso, boro y fosforo, además de la precipitación, los días con lluvia al año y la temperatura media y máxima. Este es el primer estudio de este tipo en Colombia, sus resultados pueden ser utilizados para la toma de decisiones de manejo de la enfermedad y son la base para estudios que permitan conocer mejor las poblaciones del patógeno y las particularidades de la enfermedad en Colombia y en el trópico.

**Palabras clave:** Prevalencia, patógeno de suelo, PCR en tiempo real, patrones espaciales.

## Abstract

Clubroot disease is caused by *Plasmodiophora brassicae* and is one of the most limiting diseases of cruciferous crops in Colombia. Clubroot distribution in the country and the main factors related with the disease development are unknown. This research was aimed at evaluating the role that horticultural production systems play in disease development. For that purpose, the main productive areas of cruciferous crops were visited (Cundinamarca, Boyacá, Nariño, Caldas, Antioquia, Cauca, Valle del Cauca and Norte de Santander) and the possible factors related to disease presence and development were assessed through farmer surveys. Pathogen inoculum density was measured by qPCR, allowing us to determine if the pathogen was present in all departments visited. In Antioquia, disease symptoms were not observed in white cabbage because most of the production relies on the use of the resistant hybrid 'Tekila'. Regarding harvest residues, 88.3% of the farmers incorporate them back into the soil, favouring increases in inoculum density. The highest inoculum density occurred in Norte de Santander while all other departments did not show differences between them. The results showed that the factors that most affect clubroot disease development are calcium, sodium, phosphorus, boron, copper, aluminium and lime content in the soil, in addition to pH, effective cation exchange capacity and average of rainy days per year. With respect to crop management practices, relationships between the application of liming materials, inclusion of cruciferous crops in the rotation scheme, and the resistance of the cropped cultivar were also found. On the other hand, the inoculum density was found to be favoured by the propagation material, concentrations in the soil of manganese, boron and phosphorous, plus the average precipitation, the number of rainy days per year and the mean and maximum temperatures. This is the first study of its kind in Colombia, and these results can be useful for disease management decision making and serve as the basis for future research to allow a better understanding of *P. brassicae* and the peculiarities of the clubroot in Colombia and the tropics.

**Key words:** Prevalence, soilborne pathogen, real-time PCR, spatial patterns.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XIV</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>XV</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
Fabián Leonardo Padilla Huertas .....	I
Fabián Leonardo Padilla Huertas .....	III
<b>1. Marco teórico</b> .....	<b>7</b>
1.1 Plasmodiophora brassicae .....	7
1.1.1 Taxonomía .....	7
1.1.2 Hospederos .....	7
1.1.3 Distribución e importancia económica .....	8
1.1.4 Ciclo de vida .....	9
1.2 Síntomas de la enfermedad .....	11
1.3 Especialización fisiológica .....	12
1.4 Factores asociados al desarrollo de la enfermedad .....	16
1.5 Manejo de la enfermedad .....	21
1.6 Distribución geoespacial de patógenos del suelo .....	24
1.6.1 Dispersión de Plasmodiophora brassicae .....	25
<b>2. Factores de suelo, clima y manejo agronómico relacionados con la prevalencia de la hernia de las crucíferas en sistemas hortícolas de Colombia</b> .....	<b>27</b>
2.1 Introducción .....	27
2.2 Materiales y Métodos .....	29
2.2.1 Determinación de la presencia de la enfermedad .....	30
2.2.2 Muestras de suelo .....	30
2.2.3 Colección de información de manejo agronómico .....	31
2.2.4 Análisis estadístico .....	31
2.3 Resultados .....	31
2.3.1 Sistema de producción de crucíferas en Colombia .....	31
2.3.1.1 Antioquia .....	32
2.3.1.2 Nariño .....	33
2.3.1.3 Norte de Santander .....	34
2.3.1.4 Valle del Cauca .....	35
2.3.1.5 Boyacá .....	35

2.3.1.7 Caldas.....	36
2.3.1.8 Cauca .....	37
2.3.2 Presencia de la enfermedad en las principales zonas productoras de crucíferas .....	37
2.3.3 Correlación de variables de suelo y variables medioambientales con la prevalencia de la enfermedad .....	40
2.3.4 Correlación de variables de manejo agronómico con la presencia de la enfermedad.....	40
2.3.5 Descripción de las variables correlacionadas .....	41
2.4 Discusión .....	44
<b>3. Factores de suelo, clima y manejo agronómico relacionados con la densidad de inóculo de <i>P.brassicae</i> en sistemas hortícolas de Colombia .....</b>	<b>47</b>
3.1 Introducción .....	47
3.2 Materiales y métodos.....	49
3.2.1 Muestras de suelo.....	49
3.2.2 Colección de información de manejo agronómico .....	50
3.2.3 Información climática .....	50
3.2.4 Extracción y dilución de ADN .....	50
3.2.5 Estandarización de las condiciones de PCR .....	51
3.2.6 Curva estándar .....	52
3.2.7 Cuantificación de inóculo de <i>P. brassicae</i> en muestras de suelo .....	53
3.2.8 Análisis estadístico.....	54
3.3 Resultados .....	54
3.3.1 Densidad de inóculo en las principales zonas de producción de crucíferas ....	54
3.3.2 Relación entre las características ambientales y del suelo con la densidad de inóculo .....	55
3.3.3 Relación entre factores del manejo del sistema productivo y la densidad de inóculo .....	56
3.4 Discusión.....	56
<b>4. Patrones espaciales de <i>plasmodiophora brassicae</i> en Colombia.....</b>	<b>61</b>
4.1 Introducción .....	61
4.2 Materiales y métodos.....	62
4.2.1 Cuantificación de inóculo .....	62
4.2.2 Análisis estadístico.....	63
4.3 Resultados .....	63
4.3.1 Patrones espaciales de la densidad de inóculo en los departamentos de Cundinamarca, Antioquia y Nariño.....	63
4.4 Discusión.....	64
<b>5. Conclusiones generales y recomendaciones .....</b>	<b>69</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>73</b>



# Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Países donde está confirmada la presencia de <i>Plasmodiophora brassicae</i> (Dixon, 2009).	8
<b>Figura 2.</b> Prevalencia de la hernia de las crucíferas en las principales zonas de producción de crucíferas de Colombia. En verde los departamentos visitados donde no se observaron ni reportaron síntomas de la enfermedad; en rojo los departamentos donde se observaron y/o se reportaron síntomas de la enfermedad.	38
<b>Figura 3.</b> Prevalencia de la enfermedad en los principales departamentos productores de crucíferas de Colombia.	39
<b>Figura 4. Curva estándar para la cuantificación de <i>P. brassicae</i> en lotes de Colombia.</b> Se muestra la ecuación de la curva y el $R^2$ .	52
<b>Figura 5.</b> Boxplot para la densidad de inóculo en términos de esporas de resistencia por gramo de suelo (ER)	55
<b>Figura 6.</b> Mapa de calor que presenta la densidad de inóculo de <i>P. brassicae</i> en términos de esporas de resistencia por gramo de suelo en el departamento de Cundinamarca.	65
<b>Figura 7.</b> Mapa de calor que presenta la densidad de inóculo de <i>P. brassicae</i> en términos de esporas de resistencia por gramo de suelo en el departamento de Antioquia.	65
<b>Figura 8.</b> Mapa de calor que presenta la densidad de inóculo de <i>P. brassicae</i> en términos de esporas de resistencia por gramo de suelo en el departamento de Nariño.	66
<b>Figura 9.</b> Prácticas de manejo del sistema productivo de crucíferas en Colombia que aumentan el riesgo de dispersión de ER por el viento. A)	67

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Correlación biserial puntual de la presencia de la enfermedad con variables de suelo y medioambientales en los principales departamentos productores de crucíferas de Colombia.	42
<b>Tabla 2.</b> Correlación biserial puntual de la presencia de la enfermedad con las variables de manejo agronómico, en los principales departamentos productores de crucíferas de Colombia.	43
<b>Tabla 3.</b> Concentración y volúmenes en la reacción final de los reactivos para PCR de punto final con el set de primers TC2/ITS	51
<b>Tabla 4.</b> Concentración y volúmenes de la reacción de qPCR con los cebadores DC1m	53
<b>Tabla 5.</b> Correlación de <i>Spearman</i> entre la densidad de inóculo de <i>P. brassicae</i> y variables de suelo y medioambientales en los principales departamentos productores de crucíferas de Colombia.	57

## **Lista de Símbolos y abreviaturas**

<b>AIA</b>	Ácido indol acético
<b>CCD</b>	Canadian Clubroot Differential
<b>CICE</b>	Capacidad de intercambio catiónica
<b>CR</b>	Cultivares resistentes
<b>ER</b>	Esporas de resistencia
<b>ECD</b>	European Clubroot Differential
<b>fg</b>	Femtogramo
<b>g</b>	Gramos
<b>ha</b>	Hectárea
<b>ml</b>	Mililitro
<b>min</b>	Minutos
<b>s</b>	Segundos
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>XTH</b>	Xiloglucan endo-transglucosilasa/hidrolasa



# Introducción

La hernia de las crucíferas es una enfermedad causada por el parásito obligado *Plasmodiophora brassicae* Woronin, un protozoo habitante natural del suelo; el patógeno forma esporas de resistencia (ER) que son liberadas en grandes cantidades al suelo y tienen una vida media de 3.6 años (Wallenhammar, 1996b) lo que dificulta el manejo de la enfermedad. A nivel mundial la enfermedad es considerada como un problema grave para la producción de crucíferas y está asociada con pérdidas considerables en el rendimiento (Anders et al., 2016; Strelkov & Hwang, 2014). Dixon (2009) reportó un promedio de pérdidas a nivel mundial entre el 10% y el 15%, para Colombia se reportan pérdidas entre el 42.5% y el 74.5% en cultivos de repollo, brócoli y coliflor con densidades de inóculo de  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^6$  ER por gramo de suelo (Gómez et al. 2016 datos sin publicar). Los síntomas típicos de la enfermedad se asocian con la formación de agallas en las raíces de las plantas, lo que impide la absorción de nutrientes y agua, causando retraso en el crecimiento, marchitez foliar, clorosis, e incluso la muerte cuando los síntomas son severos (Dixon, 2009b). El ciclo de esta enfermedad se encuentra dividido en tres etapas principales. Durante la infección primaria, las esporas de resistencia del patógeno perciben la presencia de una planta hospedera, lo que induce su germinación dando lugar a la liberación de una zoospora primaria que viaja hasta los pelos radicales. Una vez en los pelos radicales, ocurre la penetración del patógeno que posteriormente produce un zoosporangio primario el cual libera nuevas zoosporas que inician la segunda fase del ciclo. La fase secundaria ocurre con la infección cortical, durante la cual se observa la aparición de síntomas. Finalmente, se da la formación de esporas de resistencia dentro de las agallas, las cuales son liberadas al suelo tras la degradación bacteriana y fúngica; dichas esporas constituyen el inóculo primario en infecciones futuras (Burki *et al.*, 2010).

En Colombia las investigaciones sobre la hernia de las crucíferas son limitadas y se han enfocado principalmente en el estudio de estrategias de manejo de la enfermedad

(Botero et al., 2015; Botero, 2017 Velandia et al., 1998); por consiguiente, se requiere de nuevas investigaciones que profundicen en diversos aspectos de la enfermedad para así lograr diseñar e implementar nuevas y mejores prácticas de manejo. Dentro de la información requerida para el alcance de tal objetivo se destacan: la prevalencia de la enfermedad a nivel nacional, los principales factores asociados al suelo, al clima y al sistema de producción que afectan su desarrollo en las principales especies crucíferas cultivadas en Colombia que incluyen repollo, brócoli y coliflor, así como la densidad de inóculo en las principales zonas de producción y los patrones espaciales asociados a esta.

Con respecto a los factores que afectan el desarrollo de la enfermedad, estos se pueden agrupar en los elementos que componen el triángulo de la enfermedad (hospedero, ambiente y patógeno) (Agrios, 2005).

En el caso de la hernia de las crucíferas, el primer elemento a revisar es el *fitness* del patógeno. El *fitness* de un patógeno generalmente se mide en términos de la fecundidad, la cual se compone de dos grandes elementos: la multiplicación dentro del hospedero y la transmisión entre hospederos. La fecundidad de los parásitos se estima con mayor frecuencia como la multiplicación dentro del hospedero, por ejemplo, la producción de esporas por área foliar o la acumulación de virus en tejidos infectados (Sacristán & García- Arenal, 2008). Para *P. brassicae*, el principal factor que modula la intensidad de la enfermedad son las ER. Las ER se convierten en el único medio de dispersión del patógeno. Existe una relación directa entre la concentración de inóculo de *P. brassicae* en el suelo y la severidad de la enfermedad. Murakami *et al.* (2000) así lo determinaron, tras encontrar índices de severidad del 10% y del 62% en un andisol háplico y en un andisol con bajos contenidos de ácidos húmicos, respectivamente, a una concentración de  $1 \times 10^2$  ER·g de suelo e índices de severidad para los mismos suelos del 60% y 99% respectivamente a una concentración de  $1 \times 10^6$  ER·g de suelo.

Las variaciones genéticas en las poblaciones de *P. brassicae* aparecen como otro factor asociado al patógeno de importancia. Por procesos de presión de selección ejercida por la siembra recurrente de cultivares resistentes de canola (estrategia más efectiva para el control de hernia de las crucíferas) en las praderas canadienses, se ha identificado una población divergente a las previamente establecidas en estas zonas, que es capaz de

sobrepasar la resistencia de estos cultivares (la cual es monogénica) disminuyendo su vida útil (Strelkov et al., 2016; Strelkov et al. 2018; Holtz et al., 2018).

En segundo lugar, respecto al ambiente, las principales características que modifican el desarrollo y la aparición de la enfermedad son aquellas asociadas al suelo, destacándose el pH, los contenidos de boro y calcio, y la saturación de agua en el suelo. Con respecto al pH, se ha establecido que el óptimo para el establecimiento de *P. brassicae* y el desarrollo de la enfermedad se encuentra entre 5 y 6,5 (Gossen et al., 2013; Narisawa et al., 2005; Niwa et al., 2008; Niwa et al., 2007; Rashid et al., 2010; Webster & Dixon, 1991). Con relación a los contenidos de calcio y boro, se ha concluido que el incremento de las concentraciones de calcio en suelo disminuye las tasas de infección primaria además de inhibir la dehiscencia de los plasmodios (Webster & Dixon, 1991a). Además, se ha reportado que el boro, aplicado en dosis entre 20 y 30 ppm reduce la tasa de maduración de plasmodios primarios además de disminuir la expresión de los síntomas (Webster & Dixon, 1991a). Se ha establecido que un contenido de agua entre 60 y 70% favorece el desarrollo de la enfermedad cuando la temperatura es óptima (Hwang et al., 2014; Iwama et al., 1994). En resumen, con respecto a la temperatura, el desarrollo óptimo de la enfermedad ocurre entre los 20 y 25 °C con un pH del suelo entre 5 y 5,6 y una densidad de inóculo de  $1 \times 10^6$  esporas de resistencia por planta (Gossen et al., 2012; Gossen et al., 2013; Sharma et al., 2011). Por último, el hospedero también genera diferencias en la aparición de la enfermedad y en su intensidad. Hwang et al. (2011) encontraron que materiales resistentes presentan de dos a tres veces menos incidencia en la infección de pelos radicales en comparación con materiales susceptibles.

Detectar y cuantificar el patógeno o la enfermedad que este causa son componentes fundamentales en el manejo de enfermedades (Strandberg, 1986; Faggian & Strelkov, 2009). Debido a las dificultades del manejo de la hernia de las crucíferas cuando ya está presente en el lote de producción, se han desarrollado métodos para detectar y cuantificar el inóculo de *P. brassicae* con el fin de implementar la exclusión como medida de manejo, al evitar la siembra de crucíferas en lotes con altos niveles de infestación, esta se convierte en una de las estrategias más efectiva de control. Determinar la concentración de ER en el suelo contribuye a una óptima selección de las estrategias de manejo de la enfermedad (Stewart 2007).

A la fecha, diversos autores han desarrollado métodos basados en PCR en tiempo real (qPCR) para la cuantificación de *P. brassicae*, ofreciendo diversas variaciones que van desde la selección de primers diferentes hasta la modificación de la reacción de amplificación, entre otras (Cao, Tewari, & Strelkov, 2007; Deora et al., 2015; Hwang et al., 2011; Li et al., 2013; Rennie et al., 2011; Wallenhammar et al., 2012). Sin importar la variación en la técnica de qPCR, el éxito y la confiabilidad de los métodos de cuantificación basados en PCR dependen de la calidad del muestreo, esto se debe a la frecuente distribución en parches del patógeno en los lotes (Cao et al., 2007), lo que genera una alta probabilidad de tener una baja representatividad en la muestra de la real situación de la densidad de inóculo en la zona muestreada.

Además de conocer la densidad de inóculo, comprender las características espaciales de una población de patógenos o población de plantas enfermas es esencial para desarrollar programas de manejo de enfermedades (Madden et al., 2007).

Con resultados de anteriores bioensayos Wallenhammar et al. (2000) lograron asociar cantidades de ADN de *P. brassicae* con pérdidas observadas en rendimiento donde, para  $<5$  fg de ADN de plásmido·g de suelo<sup>-1</sup>, existe un riesgo de pérdida de rendimiento  $<10\%$  en cultivos susceptibles; con un rango entre de 5 a 200 fg de ADN plasmídico·g de suelo<sup>-1</sup> (correspondiente a  $3 \times 10^3$  y  $1.3 \times 10^4$  esporas·g de suelo<sup>-1</sup>, respectivamente), existe un riesgo de pérdida en rendimiento  $> 10\%$  en cultivos susceptibles, pero variedades resistentes pueden ser cultivadas sin riesgo alguno. A niveles  $>200$  fg de ADN del plásmido·g de suelo<sup>-1</sup>, el uso intensivo de cultivares resistentes no es recomendable debido al riesgo de que seleccionen poblaciones del patógeno que quiebren la resistencia generado por la presión de inóculo. Respecto al patrón espacial del patógeno dentro de los lotes, Wallenhammar et al. (2012) encontraron una distribución en parches independientemente de la metodología de muestreo usada. Esta distribución irregular enfatiza el hecho de que uno de los principales desafíos involucrados en detección en un lote particular de *P. brassicae* es la selección de la técnica de muestreo (Cao et al., 2007).

Se han desarrollado estudios de distribución y monitoreo de las poblaciones del patógeno en Australia, China, Canadá y Suecia (Anders et al., 2016; Cao et al., 2009; Chai et al.,

2014; Donald et al., 2006; Faggian & Parsons, 2002; Gossen et al., 2015; Wallenhammar, 1996). El caso de la región de Alberta, Canadá es uno de los más estudiados. La zona se consideraba libre del patógeno hasta 2003, a pesar de que en la enfermedad se había reportado en otras regiones de Canadá y principalmente en cultivos de hortalizas crucíferas (Gossen et al., 2015). En 2003 se desarrolló un estudio en aproximadamente 70 lotes de canola de Alberta, el cual reveló la presencia no confirmada antes del patógeno (Tewari et al., 2005). El reporte prendió las alarmas en la región y permitió generar políticas públicas para el control de la enfermedad y su dispersión (Cao et al., 2009).

El estudio de la enfermedad causada por *P. brassicae* en Colombia es muy limitado y se ha concentrado principalmente en estrategias de manejo (Botero et al., 2015; Botero, 2017; Velandia et al., 2011). La producción de especies crucíferas suele estar alternada con el cultivo de otras hortalizas, además de estar situada en departamentos diferentes, lo que resulta en condiciones edafo-climáticas y en prácticas de manejo variables. Por sus características biológicas, *P. brassicae* genera esporas de resistencia que pueden permanecer viables en el suelo sin hospederos susceptibles un largo tiempo, lo que agrega complejidad el estudio del patosistema. En Colombia se desconoce la magnitud del problema, no se tienen datos de reportes confirmados de la enfermedad en las principales zonas productoras de crucíferas del país, así como el efecto de los factores mencionados (manejo y condiciones ambientales) en el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación consistió en caracterizar los factores de riesgo asociados con el desarrollo de la hernia de las crucíferas en los sistemas de producción de hortalizas en Colombia.

El presente estudio es el primero en determinar presencia de la enfermedad en las principales zonas de producción de crucíferas, así como identificar los factores ambientales (edafoclimáticos) asociados a su desarrollo. Este estudio además determinó por primera vez en Colombia la densidad de inóculo de *P. brassicae* en lotes de producción de hortalizas y evaluó los efectos de factores asociados al desarrollo de la hernia de las crucíferas sobre la densidad de inóculo. Los resultados aquí obtenidos, permitirán tomar decisiones de siembra y manejo de la enfermedad a los productores de crucíferas de Colombia, así como también servirán como base para el desarrollo de

nuevas investigaciones necesarias para conocer el verdadero estatus de la enfermedad y del patógeno en el país.

# 1. Marco teórico

## 1.1 Plasmodiophora brassicae

### 1.1.1 Taxonomía

*Plasmodiophora brassicae* es un parasito obligado de plantas y habitante natural del suelo, éste es el agente causal de la hernia de las crucíferas, la cual es responsable de pérdidas a nivel mundial entre el 10% y el 15% en cultivos de especies crucíferas (Dixon, 2009). La enfermedad se reportó por primera vez a finales del siglo XIX, pero fue hasta 1878 que Woronin identificó a *P. brassicae* como su agente causal. Este patógeno inicialmente se clasificó dentro del reino Protista, no obstante, después, erróneamente pasó a formar parte de los hongos primitivos (Schwelm et al., 2016), hoy se conoce que pertenece al super grupo Rhizaria dentro de Eukarya, del phylum *Plasmodiophoromycota*, clase *Phytomyxea*. *P. brassicae* hace parte del orden *Plasmodiophorida*, el cual es el más estudiado del super grupo Rhizaria debido a que a este pertenecen otros patógenos de plantas o vectores de virus tales como *Spongospora subterranea* (agente causal de la sarna polvosa en papa), y *Polymyxa graminis* (vector de varios virus de poáceas) (Bulman & Braselton, 2014; Burki & Keeling, 2014; Parfrey et al., 2010).

### 1.1.2 Hospederos

Se cree que *Plasmodiophora brassicae* afecta a todas las especies de la familia *Brassicaceae*, especialmente a las especies del género *Brassica* y las especies de los géneros asociados (Dixon, 2006). Las especies cultivadas parecen ser especialmente susceptibles, estas incluyen todas las variedades de *B. oleracea*: repollo, brócoli, coliflor, coles de Bruselas; de *B. rapa* (sin. *B. campestris*): nabos y la gran variedad de especies dentro de los repollos chinos (*Brassica rapa* var. *pekinensis* and *B. rapa* var. *chinensis*) (Dixon, 2009). Se han desarrollado estudios en el centro de origen de las crucíferas (la cuenca del mediterráneo en Europa) buscando *P. brassicae* en crucíferas primitivas sin

éxito como lo afirma Gustafsson (1981) lo que ha llevado a pensar que *P. brassicae* afecta únicamente a los cultivos y a las especies asociadas a estos (arvenses) (citado en Dixon, 2006). En algunos miembros de las familias *Poaceae*, *Rosaceae* y *Papaveraceae* se registran las primeras fases de la enfermedad (infección primaria en pelos) (Dixon, 2009; Dixon, 2006).

### 1.1.3 Distribución e importancia económica

La hernia de las crucíferas es una enfermedad ampliamente distribuida a nivel mundial. La enfermedad se encuentra presente en 60 países (Figura 1), y desde inicios del siglo XX se considera una limitante para la producción de crucíferas en todos los continentes, siendo la enfermedad que causa mayores pérdidas, que en promedio globalmente ascienden hasta 15% (Dixon, 2009).

**Figura 1.** Países donde está confirmada la presencia de *Plasmodiophora brassicae* (Dixon, 2009).



Uno de los casos más estudiados en América es el de la canola (*Brassica napus* L.) en Canadá. La enfermedad se reportó por primera vez en el cultivo en 1997 en la provincia de Quebec (Morasse et al., 1997), aunque desde finales del siglo XIX y principios del siglo XX la enfermedad ya se había establecido en las zonas de producción de hortalizas



crucíferas de las Provincias Marítimas (Nuevo Brunswick, Nueva Escocia, Isla del Príncipe Eduardo), Quebec, Ontario y Columbia Británica (Strelkov & Hwang, 2014). En 2003 se realizó el primer reporte de la enfermedad en canola en las praderas Canadienses compuesta por las provincias de Alberta, Saskatchewan y Manitoba (Tewari et al., 2005). La enfermedad se presenta en un rango de severidad de baja a moderada en la mayoría de los lotes de la región, pero en hasta 15% de los lotes, la enfermedad se exhibe una severidad alta, llegando a causar pérdidas de hasta el 100% de la producción (Strelkov & Hwang, 2014).

China aparece como uno de los principales productores de cultivos crucíferas en el mundo con más de 10 millones de hectáreas sembradas (Chai et al., 2014). Los primeros reportes de la presencia de la enfermedad datan de la década de 1910. Actualmente se estima que la enfermedad afecta entre tres y cuatro millones de hectáreas anualmente (Chai et al., 2014).

En Australia la industria asociada a la siembra de brócoli, coliflor, repollo y coles de Bruselas representa 207 millones de dólares australianos al año (Donald & Porter, 2014). La hernia de las crucíferas se detectó en la década de 1890. Actualmente la enfermedad se considera endémica del estado de Victoria, en el cual predomina en suelos arcillosos y arenosos, con pH neutro a ácido (Donald & Porter, 2014). En el estado de Victoria, la enfermedad se reporta en cultivos de repollo, coliflor, col china, brócoli, coles de Bruselas, nabo y rábano (Donald et al., 2006).

Los primeros reportes de la enfermedad en Europa datan del siglo XVII y para 2009 se reportaba su presencia en 34 países europeos (Dixon, 2009). En Suecia se han desarrollado investigaciones amplias para definir el estatus de la enfermedad en los lotes de producción de crucíferas; mediante bioensayos y un estudio regional, Wallenhammar (1996) detectó la enfermedad en 78% de los lotes estudiados (148 lotes evaluados). Se conoce que la enfermedad está presente en 17 de los 20 condados de Suecia y causa pérdidas del 50% en lotes con una incidencia alta (90%) y pérdidas menores al 10% con incidencias alrededor del 20% (Wallenhammar, 1998).

#### **1.1.4 Ciclo de vida**

El ciclo de vida de este patógeno se divide en tres etapas: la supervivencia en el suelo, la infección de los pelos radicales y la infección cortical de la raíz. La supervivencia de este

patógeno es atribuible principalmente a las esporas de resistencia (ER) las cuales pueden permanecer viables en suelo hasta por 18 años en ausencia de un hospedero (Wallenhammar, 1996a) y su vida media es de 4.4 años en Canadá y 3.6 en Suecia (Hwang et al., 2015). Las ER están conformadas por un núcleo y una pared celular, compuesta de cinco capas que contienen quitina, lípidos, fosfolípidos y proteínas (Buczacki & Moxham, 1983). La segunda etapa (infección de los pelos radicales) inicia con la germinación de las ER, la cual es inducida probablemente por la presencia de exudados de las raíces de hospederos susceptibles, lo que libera una zoospora biflagelada que se mueve en la fase acuosa del suelo, una película de agua es necesaria para que las zoosporas puedan desplazarse hacia pelos radicales no infectados (Hwang et al., 2012). Luego se enquista rápidamente en la superficie del pelo radical e ingresa a la célula rompiendo la pared celular, al ingresar la zoospora retrae su flagelo y forma una estructura densa con púas dentro de otra estructura tubular, posteriormente, la mayor parte del citoplasma de la zoospora se transfiere al adhesorio, la estructura principal de una zoospora enquistada (Aist & Williams, 1971; Bulman & Braselton, 2014); esta fase es conocida como la infección primaria (Kageyama & Asano, 2009). La zoospora genera el plasmodio primario, mediante divisiones cruciformes, este proceso puede durar de 2 a 4 días (Asano et al., 2000); seguido a esto, ocurre una sucesión de divisiones celulares sincrónicas que originan lóbulos separados por delgadas paredes celulares lo que conforma el zoosporangio (Bulman & Braselton, 2014; Kageyama & Asano, 2009). En el zoosporangio se producen de 4 a 16 zoosporas secundarias, las cuales no se pueden diferenciar visualmente de las primarias una vez que son liberadas al medio (Kageyama & Asano, 2009).

La tercera fase del ciclo del patógeno o infección secundaria, inicia con el ingreso de las zoosporas secundarias a las células de la corteza (infección secundaria) donde forman el plasmodio secundario. Esta infección promueve la síntesis de citoquininas que sobre estimulan la división celular y posteriormente se da un aumento en la síntesis del ácido indolacético causado por el patógeno, el cual se acumula en concentraciones entre 50 y 100 veces más altas a las regularmente encontradas en plantas sanas (Schuller & Ludwig-Müller, 2006). La acumulación de auxinas en la raíz causa hiperplasia e hipertrofia celular, lo que da lugar a la deformación de las raíces y la formación de agallas.

Las ER aumentan su número dentro de las raíces, generando que la epidermis de las

raíces se adelgace y por degradación bacteriana y fungica se rompa, lo que las libera al suelo (Bulman & Braselton, 2014). Se ha estimado que un gramo de tejido de raíz infectado con el patógeno contiene por lo menos  $1 \times 10^8$  ER, y una planta enferma puede producir hasta 20 g de agallas, asumiendo que en este ejemplo la planta haya sido infectada por  $1 \times 10^4$  ER, implicaría un aumento de 100.000 veces en una sola generación (Diederichsen et al., 2009).

## 1.2 Síntomas de la enfermedad

La hernia de las crucíferas afecta el sistema radical de los hospederos susceptibles. La infección primaria no genera síntomas visibles (macro síntomas) pero si está relacionada con la promoción inicial del crecimiento de las raíces y la producción de auxinas antes de que se inicie el desarrollo de los plasmodios secundarios (Devos et al., 2005). La hiperplasia e hipertrofia ocurren porque las raíces se convierten en el principal sumidero metabólico a causa del desbalance hormonal generado por el patógeno (Hwang et al., 2012), estas son las causas de la formación de agallas y deformaciones en la raíz. La pared celular por su rigidez requiere un cambio estructural para que se dé la elongación celular, lo que ocurre por la separación de las fibras de celulosa resultado de la presión por turgencia (Cosgrove, 1997). La estabilidad del entramado de las fibras de celulosa esta mediada por los xiloglucanos, y las modificaciones en estos afectan la estabilidad en la pared, lo que permite la elongación (Fry, 1995). Devos et al. (2005) evaluaron la concentración de hormonas (auxinas y citoquininas) y de xiloglucan endo-transglucosilasa/hidrolasa (XTH) (la enzima que modifica los xiloglucanos que unen las fibras de celulosa) durante la infección de *P. brassicae* en col china (*Brassica rapa* spp. *pekinensis*, var. Wong Bok); los autores concluyeron que se aumenta la concentración de auxinas (ácido indol acético AIA) y de XTH en la infección primaria, lo que genera que las raíces se vuelvan el principal sumidero metabólico y la relajación de las paredes (expansión celular).

Los síntomas secundarios son visibles en el momento más caluroso del día, y se expresan como marchitamiento que usualmente en las noches desaparece (Agris, 2005), esto se debe a que la toma de agua y nutrientes se ve afectada por la desorganización de los tejidos alrededor de los haces vasculares; las células de estos tejidos se llenan de plasmodios secundarios y eventualmente de esporas de resistencia, lo que genera una

constricción de los haces (Devos et al., 2005; Dixon, 2009) A medida que la enfermedad progresa, las hojas toman una coloración rojiza, se vuelven cloróticas y en estados avanzados necróticas y al final caen, si la severidad es alta las plantas mueren antes de terminar su ciclo (Dixon, 2009).

### 1.3 Especialización fisiológica

La virulencia es la propiedad más importante de los patógenos en su interacción con el hospedero (patosistema) (Sacristán & García-Arenal, 2008). Van der Plank (1968) definió agresividad como el efecto cuantitativo negativo de un patógeno en su hospedero, la cual se acerca a la definición moderna de virulencia de la Sociedad Americana de Fitopatología (APS por sus siglas en inglés), que la define como el grado de daño causado al hospedero (cuantitativo) (D'Arcy, 2001) asumida como relación negativa con el desempeño de la planta.

La virulencia no representa ninguna ventaja clara para los parásitos, los cuales dependen de sus hospederos para la supervivencia y su *fitness*, por lo cual no resulta obvio el por qué los parásitos infringen daño en sus hospederos. Una hipótesis comúnmente aceptada es que la virulencia es una consecuencia ineludible de la multiplicación de un parásito con el hospedero infectado. De ser así, la virulencia resultará en una compensación entre la multiplicación en el hospedero y la transmisión por el hospedero, lo que se denomina la teoría de la compensación (Sacristán & García-Arenal, 2008).

Bos & Parlevliet (1995) revisaron los intentos de la APS y organizaciones similares en otros países para formar un consenso en el uso de términos incluidos la virulencia y la patogenicidad. Defendieron la adopción internacional de un acuerdo forjado por el Commissie voor de Terminologie of the Netherlands Society of Plant Pathology, respecto a la definición de estos y de términos relacionados. El acuerdo arregló jerárquicamente los términos patogenicidad, agresividad y virulencia, lo que dio lugar al modelo:

Patogenicidad = Agresividad + Virulencia

En este arreglo la patogenicidad es la capacidad de un organismo de infectar un hospedero y causar enfermedad, la agresividad es la habilidad del patógeno de invadir establecerse dentro de un hospedero, y la virulencia es la severidad de la enfermedad en hospederos

infectados (Thomas & Elkinton, 2004).

Thomas & Elkinton (2004) sugieren dos cambios al postulado de Bos & Parlevliet (1995), proponiendo que no se use el término “agresividad”, en cambio proponen el uso del término “infectividad”, para lo cual argumentan que el primero tiene una definición más amplia, mientras infectividad tiene una definición más exacta y se ajusta casi a la perfección a la definición propuesta para agresividad. Como segundo cambio, proponen que la relación entre los dos factores sea multiplicativa y no aditiva, debido a que un organismo que no es virulento no es patogénico, independientemente de su infectividad. Similarmente, si un patógeno no es infectivo no causara enfermedad, y por lo tanto no será patogénico, sin importar cuan virulento sea. Después de dichas modificaciones propuestas, el modelo de los autores queda definido como:

Patogenicidad= Infectividad × Virulencia

Se conoce desde hace tiempo que el patógeno *P. brassicae* presenta una especialización fisiológica con respecto a su hospedero (Hwang et al., 2012). Esta variación se ha estudiado a través del uso de hospederos diferenciales para clasificar las poblaciones del patógeno, evaluando las diferentes respuestas en términos de virulencia de una población determinada del patógeno. El primer set diferencial que se usó ampliamente a nivel mundial para analizar la especialización fisiológica de las poblaciones de *P. brassicae* fue el diseñado por Williams (1966); el set consiste en dos nabos suecos (*B. napus* L. var. *napobrassica*) y dos repollos (*B. oleracea* L. var. *capitata*), éste separa las poblaciones en 16 patotipos y su uso es sencillo, además tiene la ventaja de utilizar poco espacio en los montajes en invernadero (Strelkov & Hwang, 2014).

Desde 1980, la serie denominada European Clubroot Differential (ECD) desarrollada por Buczacki et al. (1975), ha sido el set de hospederos diferenciales más utilizado e internacionalmente se aceptaba como un método estándar para la clasificación de poblaciones de *P. brassicae* (Donald et al., 2006). Existe ambigüedad en el uso de términos como “aislamiento” y “raza” cuando se trabaja con *P. brassicae*. Buczacki et al. (1975) definen algunos términos para ser tenidos en cuenta en los estudios de especialización fisiológica. Una *colección* de *P. brassicae*, se puede definir como ER colectadas a partir de suelo o raíces (agallas) provenientes de cultivos y suelos naturalmente infestados; una vez se haya inoculado en un set de hospederos diferenciales

y las diferentes reacciones son consignadas la colección de *P. brassicae* pasa a ser una *población diferencialmente interactiva* o simplemente, una *población*; un patotipo o raza en *P. brassicae* define la especialización fisiológica y es el resultado del uso del set diferencial.

El ECD está compuesto por 15 diferenciales de tres especies de crucíferas: *Brassica campestris*: ssp. *rapifera* línea aaBBCC, ssp. *rapifera* línea AAbbCC, *rapifera* línea AABBcc, *rapifera* línea AABBCc y ssp. *pekinensis* cv. Granaat; *Brassica napus*: var. *napus* línea Dc101, var. *napus* línea Dc119, var. *napus* línea Dc128, var. *napus* línea Dc129 y var. *napus* línea Dc130, y de la especie *Brassica oleracea*: var. *capitata* cv. Badger Shipper, var. *capitata* cv. Bindachsener, var. *capitata* cv. Jersey Queen y var. *acephala* subvar. *Laciniata* cv. Verheul. Para determinar el patotipo, se inoculan las colecciones en todos los diferenciales, y mediante un sistema de serie binaria, y según la respuesta de cada diferencial (susceptible o resistente), se le asignan puntajes a cada grupo de especies, lo que genera un código de tres números, el cual define el patotipo (Buczacki et al., 1975). Toxopeus et al. (1986) definieron como reacción susceptible de los diferenciales a los valores mayores de 80% del índice de severidad (ID) obtenido y a las reacciones con valores menores a 20% de ID como resistentes; a las reacciones con estos valores las denominaron *reacciones del hospedero claras* y *reacciones del hospedero indeterminadas*, a aquellas con valores de ID entre 20% y 80%. Sin embargo, se han presentado dificultades en la caracterización de la especialización fisiológica de poblaciones de *P. brassicae* debido a que es común obtener reacciones intermedias o indeterminadas, que pueden variar desde moderadamente susceptible a moderadamente resistente. Strelkov et al. (2007) analizaron poblaciones de *P. brassicae* de Canadá obteniendo reacciones intermedias que no podían clasificarse como susceptibles o resistentes, al analizar sus resultados, encontraron un rango continuo de ID expresado por los diferenciales entre 0% y 45%, así como también en el rango de 65% a 100% de ID y muy pocos diferenciales mostraron ID entre 45% y 65%, por lo cual definieron un valor de 50% de ID como el límite entre respuestas susceptibles y resistentes para las poblaciones del patógeno de Canadá.

Somé et al. (1996) después de obtener resultados inconsistentes con varios sets de diferenciales contra algunas poblaciones de *P. brassicae* en Francia, deciden diseñar un diferencial con resultados simplificados y que se adapten a las poblaciones del país. El set

contiene los diferenciales usados por Williams (1966), las cinco líneas de *Brassica napus* del ECD (Buczacki et al., 1975) y dos nuevos diferenciales para el momento identificados en canola. Se construyó el set con las respuestas diferenciales en tres hospederos *B. napus*: Nevin, Wilhelmsburger y Brutor.

A pesar de que los tres sets diferenciales aquí mencionados se han utilizado amplia y recientemente para caracterizar las poblaciones de *P. brassicae*, se han identificado limitaciones para su uso; en el caso del set de Williams (1966), no se incluyen diferenciales de *B. napus*, por lo cual su uso en canola resulta inconveniente (Strelkov & Hwang, 2014); la capacidad para diferenciar patotipos del diferencial de Somé et al. (1996) también se considera baja, a pesar de que las reacciones suelen ser claras; en el caso del ECD (Buczacki et al., 1975), se pueden lograr comparaciones entre genotipos por el alto número de diferenciales (15), pero se presentan dificultades en el set de diferenciales de *B. rapa* para separar poblaciones del patógeno en Canadá (Strelkov & Hwang, 2014) además del intrincado sistema de codificación, el cual resulta difícil de usar para los productores.

En este sentido la investigación en Canadá ha avanzado en lograr un set diferencial diseñado para sus poblaciones. La aparición de un patotipo capaz de generar altos niveles de la enfermedad en cultivares resistentes (CR) de canola, y las limitaciones ya mencionadas de los sets diferenciales disponibles, llevó a los investigadores a generar el Canadian Clubroot Differential (CCD) (Strelkov et al., 2018). El CCD incluye: los genotipos de los diferenciales de Some et al. (1996) y Williams (1966), además de incluir genotipos del ECD (Buczacki et al., 1975): *B. rapa* ssp. *rapifera* línea AAAbbCC (ECD 02), la col china (*B. rapa* var. *pekinensis*) 'Granaat' (ECD 05), las canolas para forraje (*B. napus*) 'Nevin' (ECD 06) y 'Giant Rape' (ECD 08) y la canola resistente New Zealand (ECD 09), el nabo sueco (*B. napus* var. *napobrassica*) 'Wilhelmsburger' (ECD 10), y los repollos (*B. oleracea* var. *capitata*) 'Badger Shipper' (ECD 11) y 'Jersey Queen' (ECD 13); así como los cultivares de *B. napus* 'Brutor', 'Mendel', 'Westar' y '45H29' completando 13 genotipos. Se probó el CCD en poblaciones de *P. brassicae* provenientes agallas de CR de 106 lotes de Alberta, los investigadores lograron distinguir con el uso de este set muchos más patrones de virulencia dentro de las poblaciones evaluadas que con los diferenciales de Some et al. (1996) y Williams (1966), el CCD logró detectar 17 patotipos únicos en contraste con los únicos dos y cinco encontrados en los diferenciales Some et al. (1996) y Williams (1966) respectivamente.

Se han realizado estudios de virulencia de las poblaciones de zonas de Canadá, República Checa, Polonia y Japón (Kuginuki et al., 1999; Strelkov et al., 2006; Řičařová et al. 2016). Para estas investigaciones, se utilizó el set ECD para separar las poblaciones en patotipos, además para reportar cambios en las poblaciones previamente estudiadas. Por su parte Hatakayema et al. (2006) tras la evaluación de 15 colecciones de *P. brassicae*, encontraron una ruptura de la resistencia en diferentes cultivares.

Respecto a las poblaciones capaces de romper la resistencia de los cultivares de canola, en 2018 se desarrolló un estudio de genotipado de poblaciones de *P. brassicae* en Canadá, se detectaron dos poblaciones distintas y altamente divergentes dentro de Canadá: la población establecida que es avirulenta en los cultivares resistentes de canola y la población virulenta recientemente detectada en estos hospederos. Los autores sugieren con este hallazgo, que la población virulenta podría haber sido introducida recientemente a la provincia de Alberta, o que estuvo presente en una baja frecuencia y no se detectó hasta que se incrementó por la presión de selección dada por la siembra intensiva de cultivares resistentes de canola (Holtz et al., 2018), como también lo reportan (Diederichsen et al., 2014).

## 1.4 Factores asociados al desarrollo de la enfermedad

La intensidad y el desarrollo de una enfermedad está modulado por los diferentes elementos del triángulo de la enfermedad: hospedero, ambiente y patógeno (Agrios, 2005). Las variaciones en cada uno de los tres elementos necesarios para que haya enfermedad conllevan a diferentes escenarios, por ejemplo: una menor o mayor intensidad de la enfermedad, un menor o mayor número de individuos afectados por la enfermedad, menor o mayor capacidad del patógeno para moverse a nuevos sitios de infección, diferencias en la duración de la viabilidad del inóculo, ruptura de la resistencia del hospedero, etc. Se hace necesario entonces revisar los factores asociados al desarrollo de la hernia de las crucíferas en términos del triángulo de la enfermedad.

El primer elemento que se debe revisar en detalle es el patógeno, el cual presenta características biológicas especiales que dificultan su manejo. Las ER se convierten en el único medio de propagación para generar nuevas infecciones, además, existe una relación entre la concentración de inóculo de *P. brassicae* en el suelo y la severidad de la



enfermedad. En este sentido Murakami et al., 2000 encontraron índices de severidad del 10% y del 0% en un andisol háplico y en un andisol con bajos contenidos de ácidos húmicos respectivamente a una concentración de  $1 \times 10^2$  ER·g de suelo<sup>-1</sup> e índices de severidad para los mismos suelos entre 60% y 99 % respectivamente a una concentración de  $1 \times 10^6$  ER·g de suelo<sup>-1</sup>. En esta misma línea, Hwang et al. (2011) inocularon plantas de canola bajo invernadero con suspensiones de ER de 0,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  ER·ml<sup>-1</sup>, al determinar el índice de severidad de la enfermedad (ISE) en de los diferentes tratamientos (0%, 42.9%, 84.7%, 97.6% y 100% respectivamente), encontraron una correlación positiva entre la densidad de inoculo y la severidad de la enfermedad ( $R^2=0.99$ ). Además de la mayor severidad asociada, el aumento en la densidad de inoculo incrementó las probabilidades de nuevas infecciones, lo que generó la aparición más temprana y el desarrollo más rápido de síntomas secundarios.

Como segundo elemento involucrado en el desarrollo de la enfermedad aparece el hospedero. En los sistemas de producción que incluyen crucíferas, la resistencia genética es la herramienta más eficaz para el manejo de hernia de las crucíferas (Diederichsen et al., 2009; Peng et al., 2014). La efectividad que representa el uso de cultivares resistentes en el manejo de la enfermedad ha causado un aumento en la siembra de cultivares resistentes. Uno de los casos más ampliamente estudiados se encuentra en las zonas de producción de canola en Canadá, donde se sabía que existía un gran riesgo de que la resistencia de canola a la hernia se erosionara rápidamente, lo cual podía ser causado por la presión de selección que ejercen los mismos cultivares sobre las poblaciones del patógeno (Diederichsen et al., 2014) y por la siembra intensiva en el tiempo de estos cultivares resistentes (LeBoldus et al., 2012; Holtz et al., 2018). En 2013 se desarrolló en Alberta, Canadá un estudio en lotes de producción de canola para detectar la presencia de hernia de las crucíferas, la severidad de la enfermedad en cultivares resistentes de canola normalmente varía entre 0% y 6% de índice de enfermedad (ID) aproximadamente, en el estudio se encontraron en seis lotes sembrados con cultivares resistentes niveles altos de severidad, presentando ID entre 9.8% y 20.6%. Strelkov et al. (2016) evaluaron los ID que causaron cuatro poblaciones presentes en los suelos de estos lotes en un set de cultivares resistentes, encontrando que tres de las cuatro poblaciones causaron ID altos en todos los cultivares resistentes evaluados, en un rango de 76.9% a 100%, estos resultados muestran un cambio en la estructura de poblaciones de *P. brassicae* en Canadá, lo que confirmaron Holtz et al. (2018). Teniendo en cuenta el fuerte impacto y la

presión de selección que ocurre en las poblaciones del patógeno por efecto de la siembra recurrente de materiales resistentes, y además que esta es la principal y más efectiva herramienta para el control de la hernia su manejo debe ser cuidadoso y debe tener en cuenta los factores que aumenten el riesgo de ruptura de la resistencia, con el fin de garantizar su éxito y durabilidad en el tiempo.

El nivel de susceptibilidad o resistencia del hospedero es uno de los factores más determinantes en lo que al hospedero respecta. Se ha encontrado resistencia genética a *P. brassicae* en todas las especies mayores de *Brassica* excepto para *B. juncea* y *B. carinata* (Diederichsen et al., 2009). El periodo de infección secundaria es el periodo donde la susceptibilidad o la resistencia se manifiestan en todas las especies estudiadas hasta ahora, esto se ve reflejado en la disminución cuantitativa y en el retraso del desarrollo de las etapas del ciclo de vida del patógeno en aquellas interacciones planta-patógeno que se consideran incompatibles (Diederichsen et al., 2009). Las respuestas en términos de incidencia y severidad de cultivares resistentes y susceptibles de brócoli (*B. oleracea* var. *italica*), coles de Bruselas (*B. oleracea* var. *gemmifera*), col china (*B. rapa* var. *communis*) y col coreana (*B. rapa* spp. *pekinensis*) sembradas en campos naturalmente infestados con los patotipos 3, 5 y 6 (diferencial de Williams (1966)) fueron determinadas por Sharma et al., 2013. Los investigadores encontraron que todos los cultivares susceptibles presentaron altos niveles de incidencia y severidad en todos los campos estudiados; al evaluar los rendimientos, encontraron que bajo una alta presión de inóculo ( $3 \times 10^6$  ER·g de suelo<sup>-1</sup>) los materiales resistentes tuvieron un rendimiento considerablemente más alto en comparación con los materiales susceptibles, el comportamiento fue similar cuando se sometieron a una baja presión de inóculo ( $1 \times 10^4$  ER·g de suelo<sup>-1</sup>).

Uno de los factores asociados al hospedero que se han estudiado es la influencia de la edad de las plantas sobre los tiempos de desarrollo de la enfermedad cuando se exponen a diferentes densidades de inóculo. Se determinó que la severidad de la enfermedad disminuye con el incremento de la edad de las plantas al momento de la primera exposición al patógeno. Estudios previos han determinado que los mayores valores de ID son alcanzados cuando se efectúa siembra directa en suelo infestado o cuando se lleva a cabo el trasplante de plántulas de una semana de germinadas, mientras que a medida que se aumenta la edad de trasplante a suelo infestado (dos, tres y cuatro semanas después de germinación) la severidad de la enfermedad tiende a disminuir (Hwang et al., 2011). Este

comportamiento ha sido atribuido en primer lugar al retraso del inicio de la infección de *P. brassicae* con respecto al ciclo de vida del cultivo, lo que disminuye el periodo entre la infección y la madurez de la planta (cosecha) y a la disminución de la susceptibilidad de las raíces debido a un mayor engrosamiento de las paredes celulares en plantas con más edad.

Las características asociadas al suelo influyen en el nivel de infección y la extensión de la invasión del patógeno (Dixon, 2006). Se han estudiado ampliamente las características con mayor impacto sobre el patógeno y la enfermedad. Con respecto al pH, se ha establecido que el óptimo para el establecimiento de *P. brassicae* y el desarrollo de la enfermedad se encuentra entre 5 y 6.5 (Gossen et al., 2013; Narisawa et al., 2005; Niwa et al., 2008; Niwa et al., 2007; Rashid et al., 2010; Webster & Dixon, 1991). Webster & Dixon (1991b) encontraron que condiciones alcalinas redujeron el número de infecciones (infección primaria) en plántulas de col china, reducción que fue más notoria a bajas concentraciones de inóculo ( $5 \times 10^3$  ER·g de sustrato<sup>-1</sup>), además el aumento del pH también demoró la maduración de los plasmodios durante la infección primaria, este efecto se vio tras la exposición a las condiciones alcalinas por tres días después de la infección. Otro efecto del aumento del pH es la disminución de la severidad vía la reducción de la germinación de las ER. Rashid et al. (2013) encontraron un aumento en la germinación de las ER cuando se sometieron a condiciones de pH entre 5.0 y 7.0. La máxima germinación se dio a pH de 6.5, al aumentar el pH por encima de 7.0, la germinación de ER disminuyó gradualmente.

De las características propias del suelo, la humedad resulta importante para el desarrollo de la hernia de las crucíferas. La humedad ideal para el desarrollo de la hernia de las crucíferas está entre 60% y 70% (Hwang et al., 2014; Iwama et al., 1994) y por encima de 50% la severidad de la enfermedad empieza a escalar (Dixon, 1981). El efecto de la humedad sobre la hernia de las crucíferas se relaciona directamente con el contenido de materia orgánica del suelo, en un suelo mineral se logró la infección primaria con una humedad mínima del 9%, mientras que se requirió una humedad superior al 60% en suelos orgánicos (Hamilton & Crête, 1978).

El efecto de la temperatura sobre la hernia de las crucíferas y sobre el desarrollo del patógeno se viene estudiando por casi 100 años y, aun así, no se han develado por

completo los efectos de este factor sobre el desarrollo de la enfermedad. Los estudios se han centrado en el efecto de la temperatura promedio sobre los síntomas (severidad) al momento de la cosecha, y sus resultados han sido conflictivos y dependen de muchos factores (Dixon, 2009; Gossen et al., 2012). McDonald & Westerveld (2008) encontraron una correlación positiva ( $R=0.68$  y  $R=0.73$  en dos variedades de col china) entre las temperaturas del aire y la incidencia y severidad de la enfermedad, a mayor temperatura ambiental, mayor incidencia y severidad de la enfermedad, las más fuertes correlaciones ( $R=0.82$  y  $R=0.84$ ) se dieron en los últimos 10 días antes de la cosecha. En condiciones controladas se determinó el efecto de la temperatura sobre la infección primaria y el desarrollo de síntomas (Infección secundaria) y se determinó que por debajo de  $17\text{ }^{\circ}\text{C}$  el desarrollo de la hernia fue mínimo, así como por encima de  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el desarrollo de la enfermedad fue más lento que en el rango de  $23\text{-}26\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Gossen et al., 2012). En resumen, se ha encontrado que el desarrollo óptimo de la enfermedad ocurre entre los  $20$  y  $25^{\circ}\text{C}$  con un pH del suelo entre  $5$  y  $5.6$  y una densidad de inóculo de  $1 \times 10^6$  ER por planta (Gossen et al., 2012; Gossen et al., 2013; Sharma et al., 2011).

El contenido de algunos nutrientes en el suelo afecta directamente el desarrollo de la hernia de las crucíferas, siendo calcio y boro los elementos que se ha encontrado, tienen mayor efecto sobre el ciclo de vida de *P. brassicae* (Dixon, 2009). Históricamente se han aplicado sales de calcio para a los campos infestados con *P. brassicae* con el fin de reducir los efectos de la hernia (Webster y Dixon, 1991b). Dicho efecto, se ha relacionado principalmente al aumento del pH que estas causan. Aplicaciones de carbonato de calcio ( $5$  o  $7\text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) y de cenizas ( $7,5\text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) aumentaron la altura y el rendimiento de canola sembrada en suelos altamente infestados, en términos de la enfermedad estas dosis redujeron la severidad de la enfermedad en tres sitios diferentes; la ceniza disminuyó la severidad en dos años diferentes de uso (Hwang et al., 2011). Los resultados obtenidos con las aplicaciones de cal han presentado inconsistencias y dificultades para su implementación, especialmente porque resulta en muchos casos impráctico y costoso generar un aumento del pH que tenga efecto sobre el desarrollo de la enfermedad (Hwang et al., 2014). Esto se soporta por un estudio realizado en canola, en el cual se determinó que la aplicación de cal (carbonato de calcio) puede reducir el impacto de la hernia, pero económicamente no es viable, con una aplicación al surco se lograron reducir costos, pero sus efectos en rendimiento no se vieron compensados (Hwang et al., 2011). Junto con estos problemas económicos, se logró demostrar que aumentar el pH vía enclamiento no

disminuye la severidad cuando las condiciones de humedad y temperatura son conductivas para la infección (Gossen et al., 2013). En el caso del boro se conoce que inhibe la maduración del plasmodio en esporangio durante la infección primaria (Webster & Dixon, 1991a), además de mejorar el crecimiento de las crucíferas, las cuales tienen altas demandas en este elemento (Hwang et al., 2014). Al aplicarse una dosis de  $4 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  en un lote naturalmente infestado hubo una reducción significativa de la infección primaria y de la severidad en plantas de canola, estas reducciones están fuertemente y positivamente correlacionadas con los incrementos de boro en el sustrato, aunque después de  $8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  se presentó fitotoxicidad (Deora et al., 2011).

## 1.5 Manejo de la enfermedad

La hernia de las crucíferas es una enfermedad difícil de manejar por varias características biológicas del agente causal dentro de las que se resaltan la larga sobrevivencia de las ER (la cual es atribuible principalmente a la naturaleza de su pared celular) y la gran capacidad de producir nuevo inoculo (Hwang et al., 2014). Por estas características, la mejor estrategia para el manejo de la enfermedad es la exclusión de los lotes de cultivo, con este objetivo se han implementado la sanitización como la principal estrategia de exclusión. Se ha demostrado que la maquinaria es uno de los principales medios de dispersión y de ingreso de nuevo inoculo a los lotes de producción. Cao et al. (2009) encontraron que hay mayor frecuencia de infección (plantas con síntomas) hacia la entrada de algunos lotes de producción de canola en la provincia de Alberta. A esta conclusión se llegó tras evaluar la frecuencia de plantas enfermas en sitios cada vez más alejados de la entrada, encontrándose una disminución de hasta ocho veces en comparación con los sitios cercanos a la entrada, confirmando que *P. brassicae* es introducido a los lotes en el suelo infestado que está adherido a ruedas e implementos usados para la labranza. Por tal razón, la limpieza de los implementos y los vehículos que ingresan a los lotes para la preparación de suelo aparece como la estrategia a seguir para evitar movimiento de inoculo (Howard et al., 2010). Dicha limpieza se debe llevar a cabo tres fases a decir: i) la limpieza gruesa, que debe ser con raspado o cepillado del material vegetal y las porciones de suelo adheridas, ii) la limpieza fina que se realiza con lavado a presión o con aire comprimido para eliminar cualquier residuo de suelo y iii) la desinfección con un biocida apropiado (Hwang et al., 2014).

La reducción del inóculo en el suelo es una de las estrategias más eficaces a la hora de disminuir la severidad de la enfermedad. La rotación de los cultivos puede lograr tal disminución como lo demostraron Peng et al. (2015), después de dejar libre de crucíferas susceptibles un lote experimental de canola por 2 años, encontraron una reducción del 90% del contenido de ER en el suelo respecto a lotes sin rotación, o con rotación de 1 año libre de crucíferas. Los autores encontraron, además, un incremento en el rendimiento de cultivares resistentes y con resistencia media; sin embargo, pueden ser necesarias rotaciones largas (un ciclo de cultivo de canola cada ocho años) para reducir las altas concentraciones de inóculo a niveles inferiores a los mínimos para que se presente la enfermedad en niveles económicamente importantes (Wallenhammar, 1996a). Aunque existen reportes en los cuales, la siembra tres ciclos de una especie no hospedera (trigo, avena o cebada) reduce el ID de la enfermedad de 91% (cuatro ciclos consecutivos de canola susceptible) a 68% cuando se siembra canola susceptible sin rotación y a 38% si la canola sembrada es resistente. Por tal razón, la inducción de la germinación de las ER en ausencia de plantas hospedantes se ha propuesto como una posible herramienta en el manejo de la hernia (Friberg et al., 2005).

Se encontró una reducción en la densidad de inóculo en suelos artificialmente infestados ( $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^6$  ER por gramo de suelo) del 62% cuando se sembró como cultivo trampa avena (*Avena sativa*), del 41% con espinaca (*Spinacia oleracea*) cultivar 'Atlas', del 29% con el cultivar 'Baltic', del 36% con el cultivar FR-1 de rábanos japoneses (*Raphanus sativus*) y del 45% cuando se sembró el cultivar CR-1 (Murakami et al., 2001). Por el contrario, algunos estudios realizados en crucíferas de consumo en fresco no se encontró efecto alguno del uso de cultivos trampa sobre la enfermedad (Friberg, 2005; Friberg et al., 2005). En principio, la siembra de cultivos resistentes (CR) estimularía la germinación de esporas disminuyendo las densidades de inóculo donde se utilicen (Hwang et al., 2014), no obstante, se determinó mediante el monitoreo de la densidad de inóculo por cuatro años en lotes sembrados con cultivares resistentes de canola, que la densidad de inóculo aumentó, por lo que no se recomienda usar los CR con el fin de disminuir la densidad de inóculo del patógeno en suelo (Ernst et al., 2019).

Cuando no es posible implementar rotaciones largas y se presentan suelos ácidos donde la aplicación de cal para aumentar el pH no es viable económicamente, el uso de funguicidas sintéticos se presenta como una opción atractiva para el manejo de *P.*

*brassicae* (Peng et al., 2014). La aplicación de Ciazofamida, Fluazinam, y Fnamidona + Mancozeb redujeron la severidad de la hernia en repollo chino cuando se aplicaron en *drench* al suelo después del trasplante (Townley & Fox, 2003). Cuando se aplica Ciazofamida en *drench* al suelo al trasplante de col china (*B. rapa* L. subsp. *Chinensis*) cultivada en un suelo con alto contenido de materia orgánica (>70%, pH 6.7) la incidencia y severidad se vieron reducidas cuando la presión de inóculo era alta (Gossen et al., 2012). Se desconoce el modo de acción de la mayoría de los funguicidas usados para el control de *P. brassicae*, sin embargo, la flusulfamida se ha reportado como inhibidor de la germinación de ER (Tanaka et al., 1999) y a la ciazofamida como inhibidora de la germinación de ER, la infección de pelos radicales y del desarrollo de síntomas secundarios (Mitani et al., 2003). Las tasas de aplicación de funguicidas pueden llegar a ser efectivas para el control de la enfermedad, aunque se presentan inconsistencias en los resultados publicados, además entran en juego otros factores como la alta toxicidad de algunos de estos y comercialmente resulta costoso respecto a los beneficios de control que se obtienen (Hwang et al., 2014), por tal razón, se propone su uso focalizado en parches altamente infestados (Strelkov, 2018. Comunicación personal).

El control biológico de la hernia de las crucíferas resulta ser una estrategia prometedora que puede complementar, dentro de un sistema de manejo integral, las estrategias antes descritas para el control de la enfermedad (Peng et al., 2014). Se probaron diferentes agentes de control biológico para el control de la enfermedad. Serenade (*Bacillus subtilis* cepa QST 713, Bayer CropScience, Alemania) y Prestop (*Gliocladium catenulatum* cepa J1446, Verdera, Finlandia) redujeron la severidad de la enfermedad entre el 85% y 100% cuando se aplicaron después del trasplante especialmente bajo una baja presión de inóculo (Peng et al., 2011). Además del efecto directo sobre *P. brassicae*, estos microorganismos usualmente colonizan la rizosfera de canola e inducen resistencia a través de la regulación aguas arriba de los que están involucrados en las rutas metabólicas del fenilpropanoide (BnOPCL, BnCCR), del ácido jasmónico (BnOPR2) y del etileno (BnACO) (Lahlali et al., 2012; Peng et al., 2011).

La resistencia genética se presenta como la herramienta más efectiva y usada recientemente para el control de la hernia de las crucíferas (Diederichsen et al., 2009; Diederichsen et al., 2014; Hwang et al., 2014). Los esfuerzos por obtener cultivares resistentes se han enfocado por países, en Japón y Corea se han concentrado en la obtención de cultivares de col china

(*B. rapa* spp. *pekinensis*), en Alemania, Suecia y Canadá en la canola (*B. napus*) y en Holanda y Francia los programas de mejoramiento son fuertes en obtener cultivares de hortalizas crucíferas (*B. oleracea*) (Diederichsen et al., 2009).

En *B. rapa* se identificaron fuentes de resistencia de los forrajes europeos (*B. rapa* ssp. *rapifera*) (Buczacki et al., 1975). Se sabe que la resistencia en *B. rapa* está controlada por tres genes de resistencia independientes, los cuales confieren resistencia a patotipos específicos de *P. brassicae*. Para el caso de *B. oleracea*, se ha concluido que la herencia de la resistencia está controlada por dos alelos dominantes con predominio de efectos genéticos aditivos con dominancia incompleta. En *B. napus*, la resistencia contra *P. brassicae* es controlada por una combinación de genes mayores y por QTL's (Piao et al., 2009).

Al tratarse de la herramienta más efectiva para el control de *P. brassicae*, el uso de cultivares resistentes ha sido intensivo por lo cual se ha empezado a reportar rompimiento de la resistencia en las tres especies más cultivadas de crucíferas, *B. rapa*, *B. napus* y *B. oleracea*. Por efecto de la baja durabilidad de la resistencia, la cual usualmente es monogénica y patotipo-específica, el uso de los cultivares resistentes se ha visto limitado (Diederichsen et al., 2009). Por tal razón, el uso efectivo de los cultivares resistentes para manejar la hernia de las crucíferas requiere la integración de otras estrategias de control con el fin de prolongar su vida útil (Diederichsen et al., 2009; Donald & Porter, 2014; Strelkov & Hwang, 2014).

## 1.6 Distribución geoespacial de patógenos del suelo

Comprender las características espaciales de una población de patógenos o población de plantas enfermas es esencial para desarrollar programas de manejo de enfermedades (Madden et al., 2007). En epidemiología vegetal cuando el uso del término *distribución* genera conflictos al momento de analizar estadísticamente los datos, por lo cual se utiliza el término *patrón*, que se puede describir como la organización espacial del patógeno o de las plantas enfermas (Young et al., 2008). El patrón de la enfermedad puede revelar mucho sobre la forma en que se propaga, lo que permite además diseñar e implementar estrategias de control efectivas.

Normalmente se dificulta establecer los factores que determinan los patrones espaciales de los fitopatógenos o de las enfermedades de las plantas, no obstante, los más destacados



son: restricciones físicas de la dispersión del patógeno, la variabilidad genética de las poblaciones del hospedero, variaciones en las condiciones ambientales (antrópicas y no antrópicas) o la combinación de varios factores (Barnes et al., 2005).

### 1.6.1 Dispersión de *Plasmodiophora brassicae*

Los esfuerzos por conocer cómo y en que direcciones se mueve las fuentes de inóculo de *P. brassicae* son constantes. Por tratarse de un habitante del suelo, las actividades relacionadas con el movimiento de suelo pueden dispersar el inóculo de este patógeno (Strelkov & Hwang, 2014). Uno de los ejemplos de mayor estudio en el movimiento y en los mecanismos de dispersión de *P. brassicae* es el caso de la provincia de Alberta, Canadá. En 2003 se descubren los primeros 12 lotes con presencia del patógeno en esta provincia, a pesar de que ya había reportes para otras crucíferas (vegetales) en otras provincias (Tewari et al., 2005). Cao et al. (2009) desarrollan un estudio con el fin de sumar esfuerzos para entender las diferencias en términos de virulencia de las poblaciones (insumos para el desarrollo de cultivares resistentes) y como es la diseminación del patógeno a través de las áreas estudiadas de la provincia de Alberta. Los investigadores encontraron 405 nuevos lotes infestados con *P. brassicae* principalmente en la zona central de Alberta, pero también hacia el sur de la provincia. Los estudios desarrollados dentro de cada lote permitieron confirmar que el principal mecanismo de dispersión es la maquinaria agrícola, los residuos de cosecha y suelo infestado que están adheridos a esta. Y en cuanto a la virulencia, encontraron que las poblaciones del área central de Alberta son las de mayor virulencia, cuando se evaluaron por medio de los diferenciales de Williams (Williams, 1966), Somé (Somé et al., 1996) y el ECD (Buczacki et al., 1975), lo que explica la rápida dispersión en esta zona de la provincia. Otro mecanismo de movimiento del inóculo de *P. brassicae* reportado es a través de del suelo contaminado presente en la superficie de semillas y tubérculos cosechados de suelos infestados, no obstante, las cantidades allí detectadas son menores en comparación con las observadas en la maquinaria agrícola (Rennie et al., 2011).

Otro de los casos con más estudios a través del tiempo y en grandes extensiones, son las zonas de producción de crucíferas en Suecia. Hacia la década de los 40' se incluyó extensiva y frecuentemente en los sistemas de producción de Suecia la canola (*Brassica napus* L.). La siembra y producción de canola se llevó una alta intensidad, esto sumado a la presencia del patógeno generó una disminución en rendimientos en múltiples zonas de producción hacia principios de los 80's (Wallenhammar, 1996a).

Con el fin de hacerle seguimiento a los brotes de hernia reportados en diferentes zonas de Suecia entre 1984 y 1985, se tomaron 190 muestras en campos de producción de canola una vez al año entre 1986 y 1994 con el fin de realizar bioensayos para detectar *P. brassicae* y encontrar posibles correlaciones entre la prevalencia de la enfermedad y la rotación de cultivos, el pH, el tipo de suelo y la ocurrencia de malezas susceptibles. Wallenhammar (1996) encontró un que un 78% de las muestras tomadas estaban infestadas con *P. brassicae*. Además, la autora determinó que en lotes 100 % infestados con *P. brassicae*, el nivel de infestación disminuyó hasta un nivel indetectable después de 17,3 años. En cuanto a la textura, se encontraron niveles de infestación más altos en suelos arcillosos que en suelos limosos (60% contra 50%). Al evaluar el susceptible universal del ECD (Buczacki et al., 1975) en las diferentes muestras, se encontraron respuestas diferenciales, lo que indicó variación en las poblaciones del patógeno (diferentes patotipos), por lo cual la autora sugiere que para este tipo de estudios se utilicen diferentes plantas trampa.

Se desarrolló un método cuantitativo basado en qPCR (curva estándar con base en plasmidos) para detectar el patógeno directamente en suelos naturalmente infestados (se hicieron bioensayos para correlacionar la cantidad de ADN del patógeno encontrado con los síntomas de la enfermedad) y usar estas determinaciones para predecir espacialmente el riesgo de desarrollo de la enfermedad (según el cultivar sembrado) dentro de lotes comerciales de producción de crucíferas en Suecia (Wallenhammar et al., 2012). Con resultados de bioensayos anteriores (Wallenhammar et al., 2000) lograron asociar cantidades de ADN de *P. brassicae* a las pérdidas en rendimiento de canola de primavera donde menos de 5 fg de ADN de plásmido·g de suelo<sup>-1</sup> da lugar a pérdidas menores al 10% en cultivos susceptibles; entre 5 y 200 fg de ADN plasmídico·g de suelo<sup>-1</sup> (correspondiente a 3000 y 130000 esporas · g de suelo<sup>-1</sup>, respectivamente), existe un riesgo de pérdida en rendimiento mayor al 10% en cultivos susceptibles, pero variedades resistentes pueden ser cultivadas sin riesgo alguno, mientras que niveles mayores a 200 fg de ADN del plásmido · g de suelo<sup>-1</sup>, el uso de cultivares resistentes no es recomendable debido al riesgo generado por la presión de inóculo. Respecto al patrón de distribución del patógeno dentro de los lotes, Wallenhammar et al., (2012) encontraron una distribución en parches, independientemente de la metodología de muestreo empleada (se evaluó un muestreo en grilla rígida 50 m y uno completamente aleatorizado con pocas muestras por lote). Esta distribución irregular enfatiza el hecho de que uno de los principales desafíos involucrados en detección en un campo particular de *P. brassicae* es la elección de la técnica de muestreo (Cao et al., 2007).

## **2. Factores de suelo, clima y manejo agronómico relacionados con la prevalencia de la hernia de las crucíferas en sistemas hortícolas de Colombia**

### **2.1 Introducción**

La hernia de las crucíferas es una enfermedad causada por *Plasmodiophora brassicae* Woronin, un protozoo habitante de suelo. Este patógeno afecta significativamente la producción de crucíferas en Colombia, las cuales para el año 2016 representaron un 1.7% del área total sembrada con hortalizas (Agronet, 2016). Los síntomas típicos de la enfermedad se encuentran asociados con la formación de agallas en las raíces de las plantas, lo que impide la absorción de nutrientes y agua, causando retraso en el crecimiento, marchitez foliar, clorosis, e incluso la muerte de la planta cuando los síntomas son severos (Dixon, 2009b). El ciclo de esta enfermedad se encuentra dividido en tres etapas principales. Durante la infección primaria, las esporas de resistencia del patógeno perciben la presencia de una planta hospedera, lo que induce su germinación dando lugar a la liberación de una zoospora primaria que viaja hasta los pelos radicales. Una vez en los pelos radicales, ocurre la penetración del patógeno que posteriormente produce un zoosporangio primario el cual libera nuevas zoosporas que inician la segunda fase del ciclo. La fase secundaria ocurre con la infección cortical durante la cual se observa la aparición de síntomas. Finalmente, se da la formación de esporas de resistencia dentro de las agallas, las cuales son liberadas al suelo tras la degradación bacteriana; dichas esporas constituyen el inóculo primario en infecciones futuras (Burki et al., 2010). Debe destacarse, que estas esporas, además, pueden permanecer viables en suelo hasta por 18 años en ausencia de un hospedero (Wallenhammar, 1996a) y su vida media es de 4.4 años (Hwang et al., 2015). Debido a la longevidad de las esporas

de resistencia en el suelo y a su difícil manejo, esta enfermedad se ha convertido en una de las mayores limitantes para el cultivo de especies crucíferas a nivel mundial incluida Colombia (Dixon, 2009b; Jaramillo & Díaz, 2006).

Comprender las características espaciales de una población de patógenos o población de plantas enfermas es esencial para desarrollar programas de manejo de enfermedades (Madden et al., 2007). En Colombia las investigaciones sobre la hernia de las crucíferas son limitadas y se han enfocado principalmente en el estudio de estrategias de manejo de la enfermedad (Botero et al., 2015; Botero, 2016 Velandia et al., 1998). Se desconocen la prevalencia de la enfermedad a nivel nacional y los principales factores asociados al suelo, al clima y al sistema de producción que afectan su desarrollo en las principales especies crucíferas cultivadas en Colombia que incluyen repollo, brócoli y coliflor.

La intensidad de una enfermedad está modulada por los diferentes elementos del triángulo de la enfermedad (hospedero, ambiente y patógeno) (Agrios, 2005). Con base en el planteamiento anterior, cuando se estudia la hernia de las crucíferas, el primer elemento que se debe revisar en detalle es el patógeno, el cual presenta características biológicas especiales que dificultan su manejo. En segundo lugar, con referencia al ambiente las principales características que modifican el desarrollo y la aparición de la enfermedad son aquellas asociadas al suelo, destacándose el pH, los contenidos de boro y calcio, y la saturación de agua en el suelo. Con respecto al pH, se ha establecido que el óptimo para el establecimiento de *P. brassicae* y el desarrollo de la enfermedad se encuentra entre 5 y 6.5 (Gossen et al., 2013; Narisawa et al., 2005; Niwa et al., 2008; Niwa et al., 2007; Rashid et al., 2010; Webster & Dixon, 1991). Con relación a los contenidos de calcio y boro, se ha concluido que el incremento de las concentraciones de calcio en suelo disminuye las tasas de infección primaria además de inhibir la dehiscencia de los plasmodios (Webster & Dixon, 1991a). Por otro lado, se ha reportado que el boro, aplicado en dosis entre 20 y 30 ppm reduce la tasa de maduración de plasmodios primarios además de disminuir la expresión de los síntomas (Webster & Dixon, 1991a). Se ha establecido que un contenido de agua entre 60 y 70% favorece el desarrollo de la enfermedad cuando la temperatura es óptima (Hwang et al., 2014; Iwama et al., 1994). Finalmente, con respecto a la temperatura, el desarrollo óptimo de la enfermedad ocurre entre los 20 y 25 °C con un pH del suelo entre 5 y 5.6 y una

densidad de inóculo de  $1 \times 10^6$  esporas de resistencia por planta (Gossen et al., 2012; Gossen et al., 2013; Sharma et al., 2011).

Por último, el hospedero también genera diferencias en la aparición de la enfermedad y en su intensidad. Hwang et al. (2011) encontraron que cultivares resistentes presentan de dos a tres veces menor incidencia en la infección de pelos radicales en comparación con materiales susceptibles. Contrariamente, Ernst et al. (2019) hallaron aumentos en las concentraciones de inóculo en suelos cultivados con ciclos consecutivos de cultivares resistentes. El uso intensivo de cultivares resistentes puede generar presión de selección sobre el patógeno y causar la selección de patotipos capaces de romper la resistencia (Diederichsen et al., 2014; Hwang et al., 2011).

Teniendo en cuenta el desconocimiento de la prevalencia de la enfermedad y la relación entre su expresión y los factores asociados al suelo, al clima y al manejo del sistema de producción (Bhering et al., 2017; Dixon, 2009; Gossen et al., 2012), se hace crucial investigar la relación entre estos factores y la prevalencia de la enfermedad en las diferentes zonas productoras de especies crucíferas en Colombia.

Esta investigación tiene dos objetivos. El primero es determinar la prevalencia de la enfermedad en las principales zonas productoras de especies crucíferas en Colombia; mientras el segundo es evaluar la correlación entre las características del suelo, del clima y del manejo agronómico sobre la presencia de la enfermedad.

## **2.2 Materiales y Métodos**

Para determinar la prevalencia de la enfermedad en las principales zonas de producción de crucíferas en Colombia, se visitaron en total 125 sitios de muestreo distribuidos en los departamentos de Cundinamarca (33), Antioquia (29), Nariño (28), Caldas (3), Boyacá (10) Norte de Santander (9), Valle del Cauca (10) y Cauca (3). El número de muestras colectadas en cada departamento se estableció de forma proporcional al área sembrada en repollo, brócoli y coliflor para el año 2016 (Agronet, 2016). En cada uno de los sitios de muestreo se colectó una muestra de suelo para análisis fisicoquímicos y en aquellos donde fue posible, se aplicó una encuesta al agricultor donde se indagó sobre el manejo agronómico del sistema de producción. Además, se obtuvo la información climática

reportada en las estaciones más cercanas a los sitios de muestreo, teniendo en cuenta los promedios históricos normalizados comprendidos entre 1981-2010 (IDEAM, 2014). Las variables que se registraron fueron: temperatura promedio, temperatura máxima, temperatura mínima, humedad relativa y precipitación.

### **2.2.1 Determinación de la presencia de la enfermedad**

La presencia de la enfermedad en los sitios de muestreo visitados se determinó de dos formas: la primera, por observación directa en lotes sembrados con crucíferas susceptibles al momento de la visita y la segunda contempló una indagación sobre el historial del lote respecto a la presencia ausencia de la enfermedad. Para la observación directa, se realizó un muestreo en “W”, donde se extrajeron e inspeccionaron las raíces de las plantas en busca de síntomas. La enfermedad se reportó como presente en caso tal que: se observaran los síntomas de la enfermedad durante el muestreo o, el agricultor reportara haber observado la enfermedad en ciclos de cultivo anteriores. Donde se encontraron cultivos de crucíferas establecidos, se buscaron síntomas de la enfermedad y se determinó la severidad según la escala de seis niveles propuesta por Wang et al. (2011): 0, plantas sin síntomas; 1, agallas en raíces fibrosas; 3, pequeñas agallas en las raíces laterales; 5, agallas en las raíces laterales o pequeñas agallas en la raíz principal; 7, muchas agallas grandes en las raíces laterales o agallas en la raíz principal; 9, varias agallas en la raíz principal y la planta casi muerta.

### **2.2.2 Muestras de suelo**

En cada uno de los sitios de muestreo se colectó una muestra compuesta de suelo (500 g) de los primeros 20 cm de profundidad siguiendo un patrón en “W” por el lote. Las muestras se componían de cinco submuestras, las cuales se colectaron en cinco puntos distribuidos a lo largo y ancho del lote. En la colección de las submuestras se buscó cubrir la totalidad del área sembrada, también se tomó al menos una submuestra de los puntos donde los agricultores reportaron la mayor severidad de la enfermedad. En el punto central de la W se tomó un cilindro para la estimación de la densidad real y aparente del suelo. Las muestras se llevaron al laboratorio de suelos y aguas de Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, donde se realizó el análisis fisicoquímico completo.

### **2.2.3 Colección de información de manejo agronómico**

Para conocer acerca del manejo agronómico, en aquellos lotes donde fue posible, se aplicó una encuesta a los agricultores donde se indagó sobre el tiempo durante el cual el agricultor había manejado el lote, el área sembrada, el esquema de rotación de cultivos, el material de crucíferas más sembrado, la estrategia de propagación empleada, la maquinaria empleada para la preparación del lote, el esquema de mecanización, la proveniencia de la maquinaria utilizada, el uso de materiales enalantes, la frecuencia y momento de aplicación de los mismos, el uso de materia orgánica, el tipo de materia orgánica aplicada, la frecuencia de aplicación de materia orgánica y el manejo de los residuos de cosecha.

### **2.2.4 Análisis estadístico**

Se efectuó un análisis de correlación de biserial puntual. Este tipo de análisis se usa para correlacionar variables continuas (variables climáticas, propiedades de los suelos) y variables dicotómicas (prácticas de manejo y prevalencia de la enfermedad) para todas las zonas (Kornbrot, 2014). Para tal efecto se utilizó el procedimiento CORR del software estadístico SAS 9.4 (SAS© Institute Inc.)

## **2.3 Resultados**

### **2.3.1 Sistema de producción de crucíferas en Colombia**

#### **2.3.1.1 Cundinamarca**

Para 2016, Cundinamarca contaba con la mayor área de producción de crucíferas de Colombia (Agronet, 2016). De los sitios visitados que coincidieron con lotes de producción agrícola, el 63.3% incluyen crucíferas como parte de su esquema de rotación. Comúnmente, el esquema de rotación de los lotes donde se siembran crucíferas incluye zanahoria, lechuga y papa. De los lotes de producción que incluyen crucíferas, el 47.4% de sus explotadores arrienda los terrenos y tan sólo el 5.3% es propietario. La producción de crucíferas en Cundinamarca se concentra en áreas pequeñas a medianas, donde el 94% de los lotes tiene un área entre 0.5 y 5 ha, el restante 6% cuenta con áreas superiores a 5 ha. Los lotes de producción se ubican entre los 2500 y 2600 msnm (88%) y entre los 2600 y 2700 msnm (12%).

En términos de la tecnificación de la producción, el 100% de los productores de

Cundinamarca que incluyen crucíferas en sus esquemas de rotación utilizan como sistema de propagación plántulas adquiridas en viveros especializados, además, todos realizan la preparación del lote de manera mecanizada. El uso de híbridos se da en la mayoría de los lotes de producción en Cundinamarca. En el 76.2% de los lotes que incluyen crucíferas se siembra repollo y de estos, el 56% de los productores siembran el híbrido 'Globe Master' y 37% el híbrido 'Delus'; en el 19% de los lotes se siembra brócoli, en estos, en el 25% se siembra el híbrido 'Legacy', en los restantes lotes desconocen el material sembrado; y por último, en el 4.8% restante se siembra el híbrido 'Skywalker' de coliflor.

Con respecto a el manejo de la fertilidad del suelo, el 93% de los productores realiza dos fertilizaciones, la primera se realiza en el momento de la siembra y la segunda antes del inicio de la formación de la cabeza en repollo o de la inflorescencia en brócoli y coliflor; el 7% restante aplica toda la fertilización al momento de la siembra. Al evaluar el uso de enmiendas (cal), se encontró que el 55% no aplica cal en ningún momento del cultivo. Del restante 44% que encala, el 80% aplica las enmiendas justo antes de la siembra. El tipo de cal aplicado en todos los lotes visitados en Cundinamarca es cal dolomita.

Con respecto al manejo de los residuos de cosecha, el cual se considera uno de los mayores factores de riesgo relacionados con la enfermedad, se encontró que todos productores reincorporan los residuos de cosecha con la preparación del suelo para la siguiente siembra.

### **2.3.1.2 Antioquia**

En Antioquia, el 63% de los lotes agrícolas visitados incluyen crucíferas. El esquema de rotación en este departamento incluye con mayor frecuencia pastos, papa, barbecho (lotes en descanso) y zanahoria. El 40% de los lotes visitados pertenece al agricultor, el 30% son arrendados para fines de producción y el restante 25% es manejado por un administrador. Los lotes de producción que incluyen crucíferas tienen un área mediana, donde el 47% está entre 1 a 5 ha, el 48% tiene áreas menores a 1 ha y el restante 5% presenta áreas mayores a 5 ha. La siembra de crucíferas en Antioquia se da en alturas entre 2000 y 2400 msnm, es de destacarse que el 59% de los lotes se ubican entre 2100 y 2200.



En cuanto al material de partida, los productores antioqueños en su mayoría (94%) adquieren plántulas en viveros especializados, los restantes implementan semilleros en suelo. Por dificultades generadas por el relieve, la mecanización resulta difícil y sólo el 30% de los productores emplea maquinaria agrícola para la preparación de sus terrenos.

Con respecto a la fertilización, el 53% de los productores aplica toda la fertilización a la siembra mientras el 35% aplica dos fertilizaciones, la primera al momento de la siembra y la segunda antes del inicio de la formación de la cabeza en repollo o de la inflorescencia en brócoli y coliflor. En el 81.5% de los lotes se aplica cal como enmienda, la mayoría la aplica ocasionalmente (38%) y justo antes de la siembra (30%). En el 70% de los lotes se aplica cal dolomita mientras que en el restante 30% se aplica cal agrícola.

Al igual que en Cundinamarca todos productores reincorporan los residuos de cosecha con la preparación del suelo para la siguiente siembra.

### **2.3.1.3 Nariño**

De los lotes agrícolas visitados en Nariño, el 48% incluye crucíferas en la rotación, la cual incluye papa y arveja. Los lotes donde se producen crucíferas en Nariño en su mayoría son explotados por el propietario (62.5%), los restantes son explotados en un sistema de aparcería (12.5%) y por un administrador (25%). En cuanto al área se encontró que la mayoría de los lotes son de menos de 0.5 ha (58.3%) y el 41.7% de los lotes tiene un área entre 1 y 5 ha. La siembra de crucíferas en el departamento se ubica entre 2800 y 3100 msnm (80%) el restante entre 2500 y 2700 msnm.

La mayoría de los productores establecen su propio semillero en suelo (55.6%), los restantes productores (44.4%) compran las plántulas en viveros especializados. La mecanización para la preparación del suelo se dificulta por el relieve escarpado y las pendientes con alto grado de inclinación, aun así, el 40% de los lotes agrícolas visitados mecaniza.

En cuanto al uso de enmiendas, se determinó que el 66.6% de los productores de

hortalizas que incluyen crucíferas en sus esquemas de rotación aplican cal, y el total de ellos lo hacen justo antes de la siembra. Respecto a la fertilización, en Nariño en la mayor proporción de los lotes no se usa ningún tipo de fertilización (46%), en los restantes se aplica en la siembra (21.4%) o en una aplicación fraccionada en la siembra y justo antes de la formación de la cabeza en repollo o de la inflorescencia en brócoli y coliflor (32.6%).

Una pequeña proporción de los productores encuestados en Nariño recoge los residuos de cosecha (6.25%), la gran mayoría los deja en el campo y los reincorpora al suelo al momento de la preparación del suelo para la siembra de la siguiente especie de su esquema de rotación.

#### **2.3.1.4 Norte de Santander**

En Norte de Santander sólo se visitaron y se aplicaron las encuestas a lotes donde estaban sembradas crucíferas. Las rotaciones en los lotes agrícolas de este departamento incluyen hortalizas semestrales como lechuga, apio y remolacha. El 44.4% de los lotes son explotados por su propietario, en el 33.3% se presenta el sistema de aparcería y en el 22.2% por un arrendatario del predio. El área de los lotes varía entre menos de 0.5 ha (55.6%) y entre 1 y 5 ha (44.4%). El departamento presenta el mayor rango de altitud a la que se siembra crucíferas, concentrándose el 44.4% de los lotes entre 2000 y 2100 msnm, el restante 55.6% entre 2700 y 2800 msnm.

En Norte de Santander el 88% de lotes mecaniza. En términos del origen del material de propagación (plántulas), el 55% lo adquiere en viveros especializados y el 45% las obtiene de su propio semillero en suelo desarrollado dentro del predio.

De los productores que fertilizan, el 33.3% lo hacen solamente a la siembra, y el 66.7% lo hacen en de manera fraccionada. De igual manera se logró determinar que el 55% de los lotes que incluye crucíferas aplica cal, de estos, en el 100% la cal se aplica justo antes de la siembra.

En el departamento ningún productor recoge los residuos y por tanto los incorporan al suelo al momento de la preparación.

### **2.3.1.5 Valle del Cauca**

Al igual que en Norte de Santander, sólo se visitaron lotes que incluían crucíferas en su esquema de rotación. En el esquema a de rotación se incluyen con mayor frecuencia frijol, cebolla y habichuela. El 50% de los que explotan el predio son arrendatarios, el 40% propietarios y el 10 % administradores. En cuanto al área, En el Valle del Cauca se encontró la mayor proporción de lotes visitados con mayor área, 10% tenían un área entre 5 y 10 ha, 40% entre 1 y 5 ha y el restante 50%, tenían un área menor a 0.5 ha. En este departamento se encontraron las menores altitudes de siembra, variando de 1600 a 2100 msnm, concentrándose el 40% entre 1700 y 1800 msnm.

El 60 % de los productores mecaniza la preparación de los lotes, y a diferencia de los demás departamentos; en cuanto al origen de las plántulas utilizadas para el trasplante, la mayor proporción de los productores la obtiene de un semillero en suelo establecido dentro del mismo predio (90%), el restante (10%) posee una plantuladora en su lote, ninguno compra plántulas en viveros especializados.

Respecto a el manejo de la fertilidad del suelo, el 80% de los productores aplican el 100% de la fertilización al momento de la siembra, los restantes productores la aplican mensualmente. Al evaluar el uso de enmiendas (cal), se encontró que el 70% no aplica cal en ningún momento del cultivo, y el 30% restante que si la aplica lo hace justo antes de la siembra. En este departamento se aplican cal dolomita (66%) y cal agrícola (34%).

La mitad de los productores del departamento recoge los residuos de cosecha, mientras que la otra mitad los reincorpora con la preparación del suelo para la siguiente siembra.

### **2.3.1.6 Boyacá**

En el departamento de Boyacá se visitaron únicamente lotes que incluían crucíferas en sus esquemas de rotación. Regularmente la rotación incluye lechuga, cebolla de bulbo y un periodo de barbecho. En Boyacá, predominan los propietarios como explotadores de los predios (55%), seguidos de arrendatarios (33%) y por último los

aparceros (11%). El 89% de los lotes de producción que incluyen crucíferas en el departamento son de menos de una hectárea, el restante 11% tienen un área entre una y cinco hectáreas. La producción de crucíferas se concentra entre los 2400 y los 2600 msnm, donde el 77.7% de las crucíferas se siembra entre 2500 y 2600 msnm.

Respecto a la tecnificación de la producción, en Boyacá todos los lotes usan maquinaria para la preparación del suelo; en cuanto al origen del material de propagación, en el departamento se presentan tres tipos: el 66.7% compra las plántulas en viveros especializados, el 22.2% las obtiene de semilleros propios en suelo dentro del mismo predio y el 11.1% posee su propia plantuladora usando bandejas y sustrato para la propagación.

Se indagó sobre el manejo de la fertilidad del suelo encontrándose que el 100% de los productores encuestados divide la fertilización en dos momentos, la primera a la siembra y la segunda antes de que inicie la etapa de llenado del órgano de interés (cabeza para repollo e inflorescencia para brócoli y coliflor); ninguno de los agricultores visitados aplica cal al suelo.

Ninguno de los productores visitados recoge los residuos de cosecha, por consiguiente, estos son incorporados al suelo para la siguiente siembra.

### **2.3.1.7 Caldas**

En caldas todos los lotes visitados incluían crucíferas en sus esquemas de rotación los cuales normalmente incluyen también cebolla y cilantro. En Caldas, dos de tres explotadores de los predios visitados son arrendatarios de estos, y el restante es propietario. Dos de los lotes tienen un área inferior a 1 ha, y el restante tiene entre 1 y 5 ha de área. En Caldas se encontraron lotes en dos rangos de altura distantes, el 66.6% de los lotes de producción de crucíferas se ubica entre los 1900 y los 2000 msnm, mientras el 33.4% restante entre los 2300 y 2400 msnm.

En el departamento predomina con un 66% la preparación del suelo manual, tan sólo un tercio de los lotes visitados usa maquinaria para esta labor. Por disponibilidad del material de propagación, todos los productores de crucíferas producen sus propias plántulas en semilleros en suelo dentro del predio.

La frecuencia de fertilización es diversa, esta puede efectuarse toda a la siembra o se divide en la siembra y en una segunda fertilización o se realizan aplicaciones mensuales. Se determinó que un tercio de los productores visitados aplica cal y los restantes no aplica ningún tipo de enmienda. De los productores que usan enmiendas, el 100% lo hace justo antes de la siembra, la mitad usa cal agrícola y la otra mitad cal, cal dolomita.

Todos los productores visitados dejan los residuos de cosecha en el lote y los incorporan con la preparación del suelo para la siguiente siembra.

### **2.3.1.8 Cauca**

Del mismo modo que en Caldas, en el Cauca solo se visitaron lotes con siembra de crucíferas. Además de las crucíferas, el esquema de rotación también incluye regularmente lechuga y acelga. Este departamento es el único visitado donde todos los explotadores de los predios visitados son propietarios. Se determinó que todos los lotes de producción que incluyen crucíferas en el Cauca son de menos de 1 ha. Del mismo modo que en Caldas, la producción de crucíferas en el Cauca se concentra en dos rangos de altitud distantes entre sí, el 66.6% de los lotes se ubican entre los 1900 y los 2000 msnm, mientras el 33.4% restante entre los 2300 y 2400 msnm.

Otra particularidad del sistema de producción de crucíferas del departamento es que la totalidad de los productores preparan el suelo manualmente, además todos los productores obtienen las plántulas para la propagación de semilleros en suelo establecidos dentro del mismo predio de producción, factores que hacen del Cauca el departamento con menor nivel de tecnificación de la producción, dentro de los departamentos estudiados.

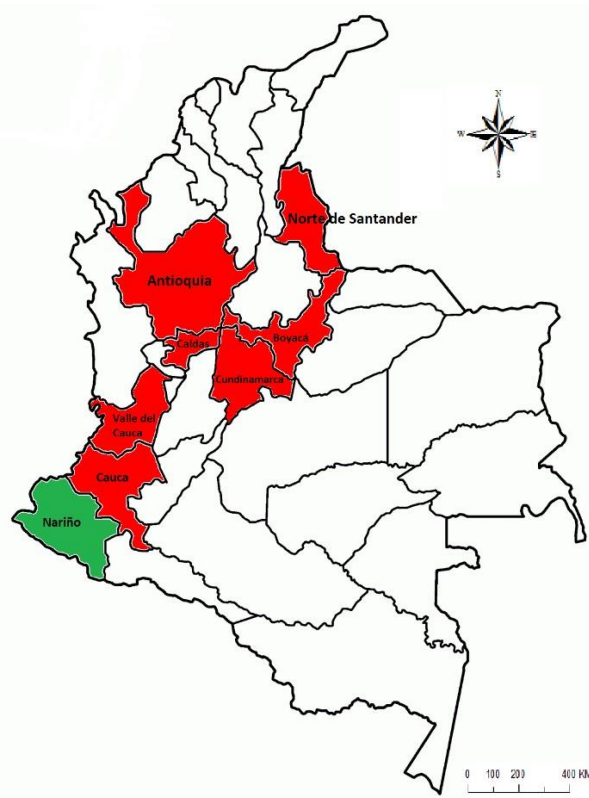
Los residuos de cosecha no se recogen y se incorporan con la preparación del suelo de la siguiente siembra.

## **2.3.2 Presencia de la enfermedad en las principales zonas productoras de crucíferas**

Se determinó la presencia de la hernia de las crucíferas en los principales

departamentos productores de plantas pertenecientes a la familia *Brassicaceae* en Colombia (Figura 2). Se reportaron como positivos aquellos sitios de muestreo donde se encontraron síntomas de la enfermedad por observación directa y aquellos donde los agricultores reportaron la presencia de esta en ciclos anteriores de cultivo. Se encontró la presencia de la hernia de las crucíferas en el 53.6% de los sitios de muestreo visitados, de estos el 48.8% corresponde a sitios donde la enfermedad se observó directamente por parte de los investigadores, mientras que el restante 4.8% corresponde a lotes que se asumieron como positivos con base en el reporte de los agricultores. A nivel nacional, se encontró la enfermedad en todos los departamentos visitados a excepción de Nariño (Figura 2).

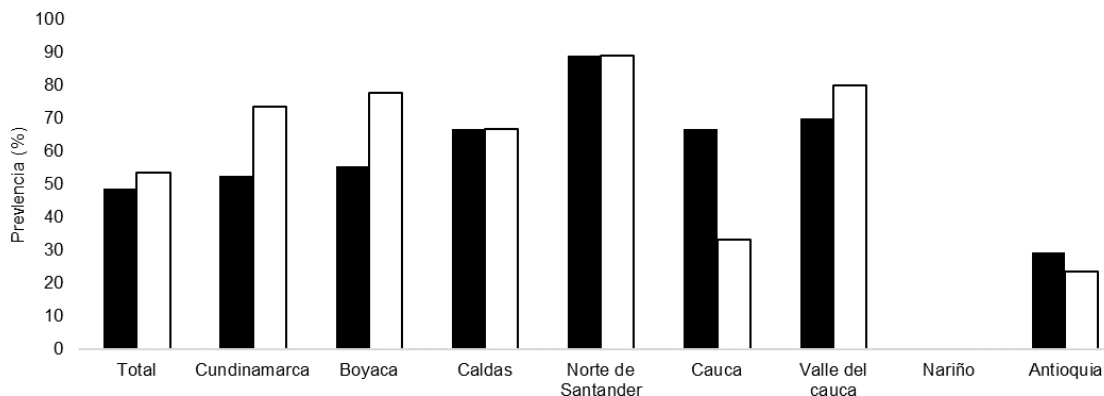
**Figura 2. Prevalencia de la hernia de las crucíferas en las principales zonas de producción de crucíferas de Colombia.** En verde los departamentos visitados donde no se observaron ni reportaron síntomas de la enfermedad; en rojo los departamentos donde se observaron y/o se reportaron síntomas de la enfermedad



Debe destacarse que en todos los lotes visitados donde se observó la enfermedad, hubo plantas con el mayor nivel de severidad posible en la escala de Wang et al. (2011). En los departamentos de Nariño, Boyacá y Cauca, la mayoría de los agricultores desconoce la enfermedad (datos no mostrados). Dicho desconocimiento es de especial importancia en los municipios de Sogamoso (Boyacá) y Popayán (Cauca), donde, aunque la enfermedad se encontró con la severidad más alta, los agricultores atribuyen las pérdidas y síntomas secundarios de la misma a factores tales como déficit hídrico y deficiencias nutricionales. De los datos obtenidos, es de resaltar la posibilidad de que, a la fecha, Nariño se encuentre libre del patógeno (Figura 3).

El departamento de Antioquia no se observaron síntomas de la enfermedad en repollo blanco. Finalmente, según las encuestas aplicadas, la enfermedad empezó a observarse en Cundinamarca hace aproximadamente 15 años, en Boyacá hace cinco años y en Norte de Santander hace tres años, en los demás departamentos no se logró determinar el momento de la aparición de la enfermedad.

**Figura 3. Prevalencia de la enfermedad en los principales departamentos productores de crucíferas de Colombia.** Se presenta el porcentaje de sitios de muestreo visitados en cada *Brassicaceae* (barras negras) y de sitios de muestreo donde el agricultor reportó haber observado la enfermedad en ciclos de cultivo anteriores de especies pertenecientes a la familia *Brassicaceae* (barras blancas). Dicho porcentaje se estimó con base a la totalidad de sitios de muestreo visitados en cada departamentodepartamento donde la enfermedad se observó en plantas pertenecientes a la familia.



### **2.3.3 Correlación de variables de suelo y variables medioambientales con la prevalencia de la enfermedad**

Se determinó la correlación entre la presencia de la hernia de las crucíferas en los diferentes sitios muestreados con las variables suelo y ambientales evaluadas para establecer si existe alguna relación de estas con la presencia de la enfermedad (Tabla 1).

El análisis biserial puntual compara cada valor posible de la variable continua con las dos posibilidades de la variable dicotómica (Kornbrot, 2014). Este análisis permite definir si existe o no correlación entre los dos tipos de variables, para determinar dependencia entre estas.

De las variables evaluadas, el contenido de calcio, sodio, fósforo, boro, cobre y limos en suelo, además del pH y la capacidad de intercambio catiónico efectiva (CICE), presentaron una correlación positiva con la presencia de la enfermedad (Tabla 1). Esto, indica que a medida que se incrementan los niveles de estas variables, la probabilidad de encontrar la enfermedad en un sitio determinado aumenta. Por su parte, el contenido de aluminio en el suelo y el promedio de días con lluvia al año mostraron una correlación negativa con la presencia de la enfermedad (Tabla 1), lo que indica que la probabilidad de encontrar la enfermedad en un sitio determinado se reduce a medida que incrementan el contenido de aluminio en el suelo y el número de días con lluvia al año.

### **2.3.4 Correlación de variables de manejo agronómico con la presencia de la enfermedad**

Se determinó la correlación de la presencia de la enfermedad con las variables de manejo agronómico (Tabla 2). De estas, la aplicación de materiales encalantes, la inclusión de crucíferas en el sistema de rotación y la resistencia a la enfermedad del material sembrado estuvieron correlacionadas con la presencia de la enfermedad en los lotes visitados. Se encontró que la probabilidad de encontrar la enfermedad en un lote es mayor cuando se incluyen crucíferas en el sistema de rotación, mientras que a medida que se incrementa la aplicación de materiales encalantes y se usan materiales resistentes a la enfermedad, la probabilidad de encontrar la enfermedad se reduce (Tabla 2).



### **2.3.5 Descripción de las variables correlacionadas**

Para el caso de las variables de manejo agronómico, se encontró correlación negativa entre la presencia de la enfermedad y la inclusión de crucíferas en el esquema de rotación y con el nivel de resistencia del material sembrado. En el 86.5% de los lotes que incluyen crucíferas en el esquema de rotación, se siembra repollo, en los lotes restantes brócoli (7.5%) y coliflor (6%).

En Antioquia el 100% de los agricultores que siembra repollo blanco emplea el híbrido 'Tekila', el cual se reporta como resistente a hernia de las crucíferas, en el resto de las zonas visitadas se siembran híbridos y cultivares susceptibles.

Las variables relacionadas con el suelo y el ambiente que correlacionaron con la presencia de la enfermedad fueron el pH y la CICE, los contenidos en suelo de aluminio, fósforo, calcio, boro y cobre, así como el número de días promedio con lluvia al año. El pH de los suelos evaluados varía entre 4.45 y 7.75 con un promedio de 5.9, encontrándose promedios de 5.72 en los lotes de Cundinamarca, 6.79 en Boyacá, 5.45 en Caldas, 6.25 en Norte de Santander, 6.5 en Cauca, 6.25 en Valle del Cauca, 5.58 en Nariño y 5.8 en Antioquia.

**Tabla 1. Correlación biserial puntual de la presencia de la enfermedad con variables de suelo y medioambientales en los principales departamentos productores de crucíferas de Colombia.** Se resaltan con (\*) aquellas variables correlacionadas con la prevalencia de la enfermedad ( $p < 0.05$ )

Variable	Correlación biserial puntual/prevalencia de la enfermedad	Valor de significancia ( <i>p-value</i> )
<b>Atributos del suelo</b>		
pH	0.272	0.0037*
CICE <sup>a</sup>	0.259	0.0058*
<b>Contenido de elementos en el suelo</b>		
Carbono orgánico <sup>b</sup>	-0.056	0.556
Nitrógeno <sup>b</sup>	-0.057	0.550
Calcio <sup>b</sup>	0.268	0.004*
Potasio <sup>b</sup>	0.084	0.375
Magnesio <sup>b</sup>	0.168	0.074
Sodio <sup>b</sup>	0.40	0.139
Aluminio <sup>b</sup>	-0.259	0.030*
Fósforo <sup>b</sup>	0.413	<0.0001**
Cobre <sup>b</sup>	0.268	0.0042*
Hierro <sup>b</sup>	-0.141	0.137
Manganeso <sup>b</sup>	0.129	0.176
Zinc <sup>b</sup>	0.112	0.241
Boro <sup>b</sup>	0.289	0.002*
<b>Distribución granulométrica del suelo</b>		
Arcillas <sup>c</sup>	0.074	0.428
Limos <sup>c</sup>	0.208	0.028*
Arenas <sup>c</sup>	0.078	0.409
<b>Variables medioambientales</b>		
Altura <sup>d</sup>	-0.165	0.092
Precipitación <sup>e</sup>	-0.188	0.060
Días al año con lluvia <sup>e</sup>	-0.297	0.002*
Temperatura media <sup>e</sup>	0.070	0.620
T máxima <sup>e</sup>	0.133	0.370
T mínima <sup>e</sup>	0.102	0.491

<sup>a</sup> Capacidad de intercambio catiónico efectiva.

<sup>b</sup> Determinación del contenido de los elementos en el suelo.

<sup>c</sup> Determinación porcentual de las fracciones de la fase sólida del suelo.

<sup>d</sup> Altura sobre el nivel del mar del sitio de muestreo

<sup>e</sup> Promedios anuales históricos normalizados comprendidos entre 1981-2010.

**Tabla 2. Correlación biserial puntual de la presencia de la enfermedad con las variables de manejo agronómico. en los principales departamentos productores de crucíferas de Colombia.** Se resaltan con un (\*) aquellas variables correlacionadas con la prevalencia de la enfermedad ( $p < 0,05$ ).

Variable	Correlación biserial puntual/prevalencia de la enfermedad	Valor de significancia ( <i>p-value</i> )
Plantulación <sup>a</sup>	-0.069	0.535
Inclusión de crucíferas <sup>b</sup>	0.763	<0.0001*
Tipo de material <sup>c</sup>	-0.489	0.0006*
Relación de propiedad de la maquinaria <sup>d</sup>	-0.007	0.49
Aplicación de cal <sup>e</sup>	-0.211	0.03
Aplicación de materia orgánica <sup>e</sup>	0.042	0.701
Uso de materia orgánica fresca	-0.031	0.823
Incorporación de residuos de cosecha	0.110	0.311

<sup>a</sup> Uso de plántulas provenientes de viveros especializados

<sup>b</sup> Inclusión de crucíferas en el esquema de rotación

<sup>c</sup> Materiales resistentes y susceptibles

<sup>d</sup> Determinación de la proveniencia de la maquinaria, propia o alquilada.

<sup>e</sup> Se determinó si se aplicaba o no cal y materia orgánica

La CICE, por su parte, exhibió una alta variabilidad, oscilando entre 1.03 y 85 meq·100g<sup>-1</sup> siendo los departamentos de Cundinamarca (33 meq·100g<sup>-1</sup>) y Boyacá (30 meq·100g<sup>-1</sup>) los que presentaron los promedios más altos. Respecto a los contenidos en suelo de calcio, aluminio, fósforo, cobre y boro se encontraron valores promedio de 17.22, 0.76, 51.18, 2.23 y 0.59 ppm respectivamente.

Por último, de las variables ambientales evaluadas sólo el número promedio de días con lluvia al año se relacionó con la presencia de la enfermedad. El promedio nacional fue de 179 días con lluvia al año. En Cundinamarca hay en promedio 149 días con lluvia al año, en Boyacá 135, en Caldas 180, en Norte de Santander 171, en Cauca 213, Valle del Cauca 161, en Nariño 195 y en Antioquia 217.

## 2.4 Discusión

En el presente estudio se determinó la prevalencia de la hernia de las crucíferas en las principales zonas de producción de crucíferas de Colombia. Además, se determinó la correlación entre la prevalencia de la enfermedad y variables de suelo, clima y de manejo del sistema de producción. La enfermedad se observó y/o reportó en todos los departamentos visitados exceptuando Nariño, no obstante, se requiere confirmación por pruebas moleculares para la detección del patógeno en suelo (PCR de punto final y/o cuantificación de inóculo por qPCR) (Cao et al., 2007; Rennie et al., 2011). Tal confirmación se requiere puesto que, aunque no se observó ni se reportó la enfermedad en campo, aún existe la posibilidad de que el inóculo se encuentre en suelo en densidades inferiores a las requeridas para el desarrollo de síntomas. Hwang et al. (2011) reportan que se requiere un mínimo de  $1 \times 10^3$  esporas de resistencia·gramo de suelo<sup>-1</sup> para producir síntomas consistentes en condiciones que sean altamente propicias para la infección.

La presente investigación reporta por primera vez la enfermedad en Norte de Santander, Cauca, Valle del Cauca y Boyacá ampliando el reporte hecho por Jaramillo & Díaz, (2006) y Torres (1972); estos autores confirmaron la presencia de la hernia de las crucíferas en los departamentos de Cundinamarca, Antioquia y Caldas.

En Antioquia no se encontraron síntomas de la enfermedad en repollo blanco, esto se debe a que, en la totalidad de los lotes visitados en el departamento, se cultiva el repollo híbrido 'Tekila', el cual ha sido reportado como resistente a la enfermedad (Diederichsen et al., 2009; Peng et al., 2014). En este departamento, los lotes donde se encontró y/o reportó la enfermedad se siembran con repollo morado, brócoli y coliflor, para los cuales no se encontraron materiales cultivados de alta aceptación comercial con resistencia a la enfermedad.

Las condiciones edáficas que se correlacionaron con la presencia de la enfermedad fueron el pH, la CICE y los contenidos en el suelo de aluminio, fósforo, calcio, boro y cobre.

El pH y la concentración de calcio son características determinantes en el desarrollo de la hernia de las crucíferas (Webster y Dixon 1991). Con respecto al pH se ha encontrado una correlación positiva débil entre este y la incidencia de la enfermedad (Gossen et al., 2013; Strelkov et al., 2007; Wallenhammar, 1996), lo que indicaría a primera vista los resultados de esta investigación son discordantes con reportes previos. No obstante, el pH óptimo para que se desarrolle la enfermedad se encuentra entre 5,0 y 6,5 (Gossen et al., 2013; Narisawa et al., 2005; Niwa et al., 2008; Niwa et al., 2007; Rashid et al., 2013; Ruaro *et al.*, 2010; Webster & Dixon, 1991), mientras que el rango del pH de los suelos evaluados en este estudio varía entre 4.45 y 7.75. Así pues, el límite inferior de pH de los suelos evaluados se encuentra por fuera del óptimo para el desarrollo de la enfermedad, por consiguiente, el aumento en el pH equivaldría a acercarse al óptimo, lo que explica el tipo de correlación encontrada.

Con respecto a los contenidos de calcio y al boro, se encontró que a mayores contenidos de estos elementos en el suelo se aumenta la probabilidad de encontrar la enfermedad en las zonas visitadas. Estos resultados se oponen con los reportes de literatura, donde el incremento en las concentraciones de calcio causa una reducción en el número de infecciones y la expresión de síntomas de la enfermedad (Webster & Dixon, 1991c), mientras que altas concentraciones de boro reducen la tasa de maduración de los plasmodios lo que afecta negativamente los niveles de la enfermedad (Webster & Dixon, 1991a). Debe recalarse que el efecto de estos nutrientes se correlaciona negativamente con la presión de inóculo, es decir, a mayor presión de inóculo la reducción de la enfermedad en altas concentraciones de calcio y boro en el medio es menor (Gossen et al., 2014; Webster & Dixon, 1991). En la mayoría de los lotes visitados donde se encontró la enfermedad los niveles de severidad eran los más altos, lo que se ha relacionado con altas densidades de inóculo del patógeno (Murakam et al., 2002). Por tal razón es de presumirse una alta presión de inóculo que puede enmascarar el efecto de estos elementos sobre la hernia, causando una falsa correlación de dichas variables con la presencia de la enfermedad, por esto se debe profundizar en el análisis incluyendo variables tales como la densidad de inóculo.

Bhering et al. (2017) reportan que valores bajos de pH y altos contenidos de aluminio en el suelo favorecen el desarrollo de la hernia de las crucíferas (avance de síntomas).

Para el caso de nuestro estudio, los contenidos de aluminio en el suelo se correlacionaron negativamente con la prevalencia de la enfermedad. Dicho comportamiento, aunque contrario a lo que reporta la literatura, puede deberse al efecto negativo que tiene el aluminio en el desarrollo radical del hospedero, al disminuir la ramificación de raíces (Meurer, 2007), lo que puede reducir la probabilidad de infección y con esta la probabilidad de encontrar la enfermedad en un lote determinado. No obstante, dicha afirmación es una hipótesis que requiere ser investigada a profundidad. En términos del sistema productivo, se encontró la más alta correlación de los factores aquí evaluados entre la inclusión de crucíferas en el esquema de rotación y la presencia de la enfermedad. Esto concuerda con lo reportado por Dixon (2009) y Gossen et al., (2014), quienes afirman que la incidencia y la severidad de la hernia de las crucíferas aumentan a medida que se intensifican los cultivos de crucíferas.

Finalmente, de las variables climáticas solamente el promedio de días al año con lluvia tiene un efecto significativo sobre la prevalencia de la enfermedad, mostrando una correlación negativa. Como reportan Bhering et al. (2017), existe menor riesgo de que se presente la hernia de las crucíferas en áreas con poca lluvia y suelos bien drenados. Sin embargo, los mismos autores aclaran, que fluctuaciones en la cantidad de lluvia (periodos con lluvia sobre el promedio seguidos de periodos de sequía) pueden generar epidemias de la enfermedad, lo que no podemos verificar para las zonas evaluadas con los resultados obtenidos en este estudio, debido a la imposibilidad de acceder a datos climáticos curados correspondientes a un periodo más cercano al momento de la evaluación de la enfermedad.

### **3. Factores de suelo, clima y manejo agronómico relacionados con la densidad de inóculo de *P. brassicae* en sistemas hortícolas de Colombia**

#### **3.1 Introducción**

La hernia de las crucíferas es una enfermedad importante presente en las principales zonas de producción de crucíferas de Colombia. Se reportan pérdidas entre el 42.5% y el 74.5% en cultivos de repollo, brócoli y coliflor con densidades de inóculo de  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^6$  ER por gramo de suelo (Gómez et al. datos sin publicar). Dixon (2009) reportó un promedio de pérdidas a nivel mundial entre el 10% y el 15%.

La severidad de la enfermedad está relacionada directamente con la concentración de inóculo del patógeno. Murakami et al. (2000) así lo determinaron, tras encontrar índices de severidad del 10% y del 62% en un andisol háplico y en un andisol con bajos contenidos de ácidos húmicos respectivamente a una concentración de  $10^2$  ER·g de suelo e índices de severidad para los mismos suelos del 60% y 99% respectivamente con una concentración de  $1 \times 10^6$  ER·g de suelo.

Las plantas infectadas por *P. brassicae* producen agallas en las raíces afectando el paso de agua y nutrientes hacia la parte aérea, lo que resulta en plantas con poco crecimiento y marchitas. Cuando las raíces infectadas se descomponen, una gran cantidad de esporas de resistencia se libera al suelo, donde pueden sobrevivir durante muchos años (Wallenhammer 1996).

Existen factores que afectan la producción, viabilidad y vida media de las ER en el suelo. La densidad de inóculo de un suelo infestado con el patógeno depende de factores como la capacidad de producir y liberar ER al suelo. Una planta infectada muerta puede liberar al suelo entre  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^9$  ER. La severidad de la enfermedad influye en la producción y liberación de ER. Esta producción y liberación de ER llega a su máximo en niveles bajos de severidad, y permanece constante cuando la severidad es mayor (Dixon 2009a), lo que implica un gran número de ER liberadas al suelo incluso en severidades bajas.

El ambiente juega un papel importante en la acumulación de ER, principalmente en la viabilidad y su duración en el suelo. Una de las características del suelo con más efecto sobre la hernia de las crucíferas y sobre el patógeno que la causa es el pH. Aparentemente el pH ácido aumenta la tasa de producción de zoosporas primarias, pero no tiene efecto sobre la germinación de las ER (Bochow 1961 citado por Dixon 2009a). La longevidad de las esporas es influenciada por la temperatura, el contenido de humedad y la posición en el perfil del suelo (Dixon 2009a). Otro elemento que afecta la densidad de esporas está relacionado con la aplicación de cal, Murakami et al. 2002 encontraron una disminución en el contenido de ER en el suelo en los rangos de 17-31% cuando se aplicó cianamida de calcio, 12-29% cuando se aplicó cal dolomita y una reducción entre 10% y 39% cuando se usó carbonato de calcio (cal viva).

Detectar y cuantificar el patógeno o la enfermedad que éste causa son componentes fundamentales en el manejo de enfermedades (Strandberg, 1986; Faggian & Strelkov, 2009). Debido a las dificultades del manejo de la hernia de las crucíferas, se han desarrollado métodos para detectar y cuantificar el inóculo de *P. brassicae* con el fin de evitar la siembra de crucíferas en lotes con altos niveles de infestación, siendo esta la estrategia más efectiva de control. Determinar la carga de ER en el suelo contribuye a una óptima selección de las estrategias de manejo de la enfermedad (Stewart 2007), como también es ampliamente utilizada para generar patrones de distribución del inóculo (Standberg, 1986).

A la fecha, diversos autores han desarrollado métodos basados en PCR en tiempo real (qPCR) para la cuantificación de *P. brassicae*, ofreciendo diversas variaciones que van desde la selección de cebadores diferentes hasta la modificación de la reacción de amplificación, entre otras (Cao, Tewari, & Strelkov, 2007; Deora et al., 2015; Hwang et al.,



2011; Li et al., 2013; Rennie et al., 2011; Wallenhammar et al., 2012). Sin importar la variación en la técnica de qPCR, el éxito y la confiabilidad de los métodos de cuantificación basados en PCR dependen de la calidad del muestreo, esto debido a la frecuente distribución en parches del patógeno en los lotes (Cao et al., 2007), lo que genera una alta probabilidad de tener una baja representatividad el estado actual de la densidad de inóculo en los lotes.

El presente estudio es el primero en determinar la densidad de inóculo de *P. brassicae* en lotes de producción de hortalizas de Colombia y en evaluar los efectos de factores asociados al desarrollo de la hernia de las crucíferas sobre la densidad de inóculo. Por consiguiente, la investigación tuvo por objetivos: i) validar la técnica de qPCR para la cuantificación de inóculo de las poblaciones colombianas de *P. brassicae* presentes en las principales zonas de producción de crucíferas del país; ii) determinar la densidad de inóculo en lotes de las principales zonas de producción de crucíferas de Colombia, y iii) determinar la relación entre la densidad de inóculo y algunos factores de producción y ambientales.

## **3.2 Materiales y métodos**

Para determinar la densidad de inóculo se visitaron en total 125 sitios de muestreo distribuidos en los departamentos de Cundinamarca (34), Antioquia (28), Nariño (29), Caldas (3), Boyacá (10) Norte de Santander (9), Valle del Cauca (9) y Cauca (3). El número de muestras colectadas en cada departamento se estableció con base en el área sembrada en repollo, brócoli y coliflor para el año 2016 (Agronet, 2016).

### **3.2.1 Muestras de suelo**

En cada uno de los sitios de muestreo se colectó una muestra representativa compuesta (cinco submuestras) de 700 g de los primeros 20 cm de profundidad siguiendo un patrón de "W". En el punto central de la W se tomó un cilindro para la estimación de la densidad real y aparente del suelo. Las muestras se llevaron al Laboratorio de Biotecnología Vegetal Antonio Angarita Zerda de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, donde se secaron a temperatura ambiente, pulverizaron, y 200 g se congelaron a -20 °C hasta su uso en la cuantificación vía qPCR, los restantes 500 g se

llevaron al Laboratorio de Aguas y Suelo de la misma Facultad para el análisis fisicoquímico completo.

### **3.2.2 Colección de información de manejo agronómico**

Para conocer acerca del manejo agronómico, en aquellos lotes donde fue posible, se aplicó una encuesta a los agricultores donde se indagó sobre el tiempo durante el cual el agricultor había manejado el lote, el área sembrada, el esquema de rotación de cultivos, el material de crucíferas más sembrado, la estrategia de propagación, la maquinaria empleada para la preparación del lote, el esquema de mecanización, la proveniencia de la maquinaria utilizada, el uso de materiales encalantes, la frecuencia y momento de aplicación de los mismos, el uso de materia orgánica, el tipo de materia orgánica aplicada, la frecuencia de aplicación de materia orgánica y el manejo de los residuos de cosecha.

### **3.2.3 Información climática**

La información climática se obtuvo de la estación meteorológica más cercana al sitio de muestreo, el conjunto de datos obtenido consistió en los datos históricos normalizados de 1982 a 2010 (IDEAM, 2014). El análisis incluyó la temperatura promedio, la temperatura máxima, la temperatura mínima, la humedad relativa, la precipitación mensual y el número de días de lluvia por año.

### **3.2.4 Extracción y dilución de ADN**

El ADN total del suelo se extrajo a partir de 250 mg de la fracción más fina del suelo usando el kit DNeasy PowerSoil™ (Quiagen). Se siguieron las recomendaciones del fabricante exceptuando el volumen de elución el cual se modificó debido a resultados de ensayos previos (datos no mostrados) en los cuales se encontraron concentraciones muy bajas en algunas muestras, por lo que el volumen de elución se modificó de 100 µl a 50 µl.

Una vez obtenidas las extracciones, se cuantificó el ADN y se determinó su calidad con un NanoDrop ONE (TermoFisher Scientific EEUU). El ADN se diluyó a 1 ng·µl<sup>-1</sup> y 2 ng·µl<sup>-1</sup> para PCR de punto final. Para qPCR se efectuaron diluciones 1:10 y 1:50 cuando la concentración del ADN obtenido era mayor a 10 ng·µl<sup>-1</sup>, en caso contrario el ADN se procesó sin diluir. Las diluciones se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

### 3.2.5 Estandarización de las condiciones de PCR

Con el fin de descartar la presencia de inhibidores en las muestras de ADN y verificar la presencia del patógeno, se desarrollaron PCR de punto final con las extracciones de todas las muestras usando los cebadores específicos para *P. brassicae* TC2: TC2F 5'-3' (AAACAACGAGTCAGCTTGAATGCTAGTGTG) y TC2R 5'-3' (CTTTAGTTGTGTTTCGGCTAGGATGGTTCCG) que amplifican un fragmento de la regiones 18S e ITS1 y producen un fragmento de 519 pares de bases (pb) (Cao et al., 2007) y con los cebadores universales ITS: ITS1 (5'-3' TCCGTAGGTGAACCTGCGG) (Gardes & Bruns 1993) e ITS4 (5'-3' TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990) con una longitud entre 550 y 780 bp, con ADN diluido a  $1 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  y a  $2 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ .

Los volúmenes de los reactivos para las reacciones de PCR de punto final para los cebadores TC2 e ITS usados se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Concentración y volúmenes en la reacción final de los reactivos para PCR de punto final con el set de primers TC2/ITS

Reactivo	Volumen
sd Agua Milliq	12.3 $\mu\text{l}$
PCR Buffer (10X)	2.5 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1.0 $\mu\text{l}$
dNTPs (2.5 mM)	2.0 $\mu\text{l}$
TC2F/ITS1 (1.0 $\mu\text{M}$ )	1.0 $\mu\text{l}$
TC2R/ITS4 (1.0 $\mu\text{M}$ )	1.0 $\mu\text{l}$
Taq Polymerasa	0.2 $\mu\text{l}$
ADNg*	5.0 $\mu\text{l}$
<b>TOTAL</b>	<b>25 <math>\mu\text{l}</math></b>

\*Concentración del ADN varía según ensayo

Las temperaturas de la reacción de PCR fueron las siguientes: activación a 94 °C por 2 min, 40 ciclos de: 94 °C por 30 s, 1 min a 65 °C, y 1 min de extensión a 72 °C. Para finalizar un ciclo de 72 °C por 10 min.

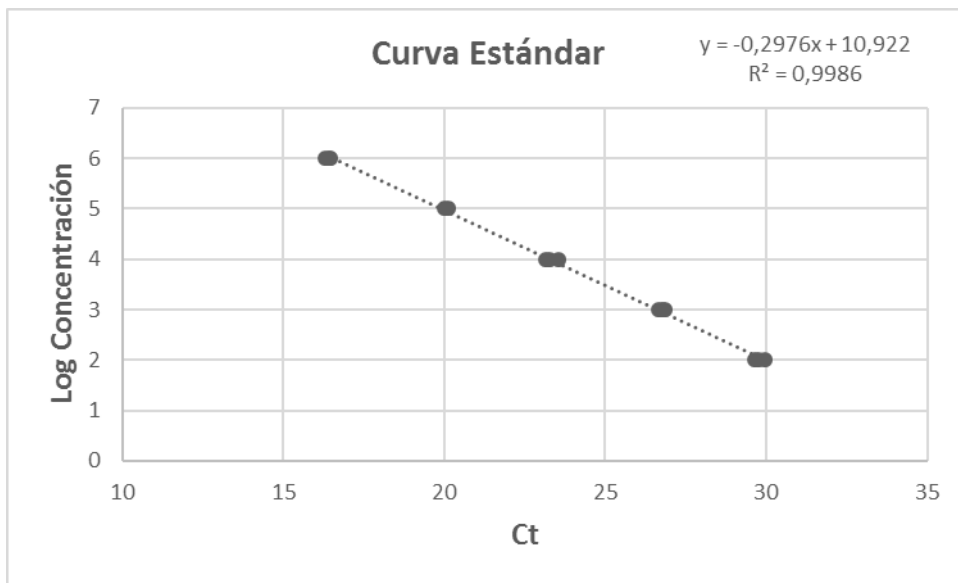
Se efectuó electroforesis de los segmentos amplificados en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio:

### 3.2.6 Curva estándar

Para la construcción de la curva estándar se empleó ADN extraído a partir de una suspensión de esporas de resistencia con concentración de  $1.7 \times 10^9$  ER por mililitro. Las esporas se obtuvieron a partir de agallas de plantas de repollo híbrido 'Globe Master'. El ADN obtenido se diluyó de forma seriada en base diez usando la extracción original y agua Mq estéril obteniendo la cantidad de ADN que se obtendría a partir de extracciones realizadas en suspensiones de ER con las concentraciones  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^2$  ER·g de suelo.

Para la qPCR se utilizaron los cebadores propuestos por Rennie et al. (2011) y modificados por Deora et al. (2015) DC1F 5'-3 CCTAGCGCTGCATCCCATAT Y DC1mR 5'-3 CGGCTAGGATGGTTCGAAA que amplifica un fragmento de 92 pb. La curva se corrió en cada placa de cuantificación para disminuir los errores y definir los límites de detección de la curva en cada placa (Figura 4).

**Figura 4.** Curva estándar para la cuantificación de *P. brassicae* en lotes de Colombia. Se muestra la ecuación de la curva y el  $R^2$ .



### 3.2.7 Cuantificación de inóculo de *P. brassicae* en muestras de suelo

La cuantificación de inóculo se desarrolló en un LightCycler 480 (Roche). Como agente intercalante y emisor de fluorescencia se utilizó SYBR® Green (LightCycler® 480 SYBR® Green I Master, Roche). Las concentraciones y los volúmenes de la reacción se presentan en la Tabla 4.

El ADN extraído se procesó para la cuantificación empleando una dilución 1:10. Aquellas muestras que presentaron inconsistencias dentro de las repeticiones técnicas tales como: curvas *melting* con picos en temperaturas diferentes a las esperadas o más de un pico por muestra, valores de desviación estándar del ciclo de cuantificación (Ct) mayores a 0.3 o incongruencias con lo reportado en las encuestas y lo visto en campo, se repitieron empleando una dilución del ADN 1:50, o aquellas muestras donde el ADN presentaba concentraciones inferiores a 10 ng/μl la amplificación se llevó a cabo con el ADN sin diluir. Las temperaturas y los tiempos utilizados fueron: denaturación inicial a 94.0 °C por 2 min, 40 ciclos de 94.0 °C por 30 seg. para denaturación, 1 min de *annealing* a 65.0 °C, extensión a 72.0 °C por 1 min y un ciclo de 72.0 °C por 10 min. Al terminar los ciclos de la qPCR, se implementó un análisis *High Resolution Melting* (HRM por sus siglas en inglés), el cual permite visualizar los picos *melting* (temperatura a la cual el equipo detecta la fluorescencia emitida por el SYBR Green). En cada placa además de la curva estándar, se incluyó un control negativo (el ADN se reemplazó con agua). Las muestras se cuantificaron por triplicado.

**Tabla 4. Concentración y volúmenes de la reacción de qPCR con los cebadores DC1m**

<b>Reactivo (concentración inicial)</b>	<b>Volumen</b>
SYBR Green Master Mix 2X Buffer	5 μl
Primer's F/R (3.2 mM)	2.5 μl
ADN	2.5 μl
<b>Total</b>	<b>10 μl</b>

### 3.2.8 Análisis estadístico

Para la determinación de la densidad de inóculo se puso como límite entre las réplicas de cada muestra un valor de 0.3 de desviación estándar, aquellas muestras que superaron este límite se repitieron con una menor concentración de ADN (1:50).

Previo realización de los análisis para relacionar los diferentes factores de riesgo asociados con la densidad de inóculo del patógeno, se realizaron análisis de distribución de los datos para establecer su normalidad y así definir el tipo de análisis más apropiado. Puesto que la densidad de inóculo no presentó una distribución normal, los análisis se realizaron por medio de modelos generales linealizados, ya que estos soportan datos de diferente naturaleza con diversas distribuciones. Para estos análisis se eliminaron los datos de los sitios de muestreo donde el valor de la densidad de inóculo era mayor a  $2 \times 10^4$  ER·g de suelo<sup>-1</sup> (los sitios eliminados del análisis fueron: NSCH02, NSMU01, CFA31, NSMU02, NSMU05, NSCH03, AMA28). Los datos eliminados representaban valores extremos que afectaban la estimación de modelos, generando respuestas espurias.

Si las variables evaluadas con los modelos linealizados mostraban efecto sobre la densidad de inóculo, se realizó un análisis de correlación de *Spearman* que es válido para variables que no siguen una distribución normal, con los valores de densidad de inóculo para cada departamento. Todos los análisis se llevaron a cabo usando el software R studio

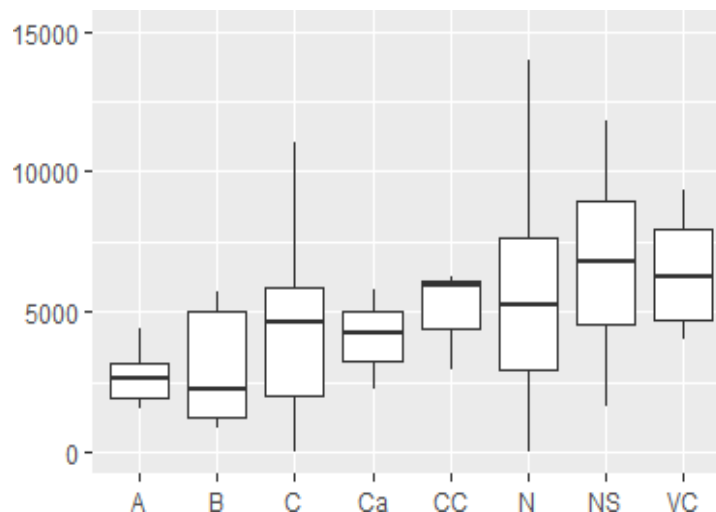
## 3.3 Resultados

### 3.3.1 Densidad de inóculo en las principales zonas de producción de crucíferas

Se determinó la densidad de inóculo promedio de los lotes de los ocho departamentos con mayor producción de crucíferas en Colombia. La densidad de inóculo fue de  $4.14 \times 10^3$  ER·g de suelo<sup>-1</sup> en Antioquia,  $3.48 \times 10^3$  ER·g de suelo<sup>-1</sup> en Boyacá,  $5.05 \times 10^3$  ER·g de suelo<sup>-1</sup> en el Cauca,  $4.09 \times 10^3$  ER·g de suelo<sup>-1</sup> en Caldas,  $8.93 \times 10^3$  ER·g de suelo<sup>-1</sup> en Cundinamarca,  $8.19 \times 10^3$  ER·g de suelo<sup>-1</sup> en el Valle del Cauca, y  $1.64 \times 10^5$  ER·g de suelo<sup>-1</sup> en Norte de Santander, donde se encontró la densidad más alta, ésta se diferenció estadísticamente de los demás departamentos (Figura 5). A

pesar de que durante el muestreo no se observaron plantas enfermas, ni hubo reporte de la presencia de la enfermedad en el departamento de Nariño, la alta sensibilidad de la técnica qPCR permitió la identificación de la presencia de inóculo del patógeno en la zona, con una densidad de inóculo promedio de  $7.06 \times 10^3$  ER·g de suelo<sup>-1</sup>.

**Figura 5. Boxplot para la densidad de inóculo en términos de esporas de resistencia por gramo de suelo (ER).** Antioquia (A), Boyacá (B), Cundinamarca (C), Caldas (Ca), Cauca (CC), Nariño (N), Norte de Santander (NS), Valle del Cauca (VC). La barras representan los valores máximos y mínimos de densidad de inóculo en cada departamento, el valor promedio esta representado por la línea transversal, los límites de las cajas representan los cuartiles con mayor concentración de datos.



### 3.3.2 Relación entre las características ambientales y del suelo con la densidad de inóculo

Se determinó la relación entre densidad de inóculo y las características ambientales y del suelo. Se encontró efecto sobre la densidad de inóculo de los contenidos en suelo de calcio, magnesio, sodio, boro y zinc, la capacidad de intercambio catiónica efectiva (CICE), la precipitación media anual, los días con lluvia al año, la temperatura promedio y la temperatura máxima. Dicho efecto, se evaluó por medio de la construcción de modelos generales linealizados de la familia gamma con enlace a la distribución *identity*, los cuales son ideales para variables respuesta y explicativas de tipo continuo cuya distribución no

se ajusta a un modelo normal.

Se encontró correlación negativa en todas las variables de suelo que tienen efecto sobre densidad de inóculo (Tabla 5), es decir, a medida que aumentan los contenidos en suelo de calcio, magnesio, sodio, zinc y boro y aumenta la CICE las densidades de inóculo del patógeno tienden a disminuirse (Tabla 5). Por el contrario, las variables climáticas presentaron correlación positiva con la densidad de inóculo de *P. brassicae*. Siendo así, cuando se incrementa la temperatura media, la precipitación media, los días con lluvia al año y la temperatura máxima, existe mayor probabilidad de encontrar lotes con mayor densidad de inóculo (Tabla 5).

### **3.3.3 Relación entre factores del manejo del sistema productivo y la densidad de inóculo**

Dentro de los factores relacionados con el manejo agronómico del sistema de producción, únicamente el tipo de plantulación tuvo efecto sobre la densidad de inóculo. Dicho efecto se evaluó por medio de un modelo general linealizado de la familia *gamma*, puesto que esta es una variable categórica multinomial. El modelo obtenido permitió concluir que la plantulación tiene un efecto significativo sobre la densidad de inóculo ( $p=0.0253$ ), explicando que la probabilidad de tener mayores densidades de inóculo aumenta cuando el agricultor realiza semilleros en suelo, mientras que las menores densidades de inóculo de *P. brassicae* son observadas cuando el agricultor compra plántulas en vivero.

## **3.4 Discusión**

Este es el primer estudio en cuantificar la densidad de inóculo de *P. brassicae* en lotes de los principales departamentos productores de crucíferas de Colombia (Cundinamarca, Antioquia, Nariño, Boyacá, Norte de Santander, Valle del Cauca, Cauca y Caldas), además de establecer la correlación entre la densidad de inóculo y las características ambientales y del suelo, así como con las estrategias de manejo del sistema productivo.



**Tabla 5.** Correlación de Spearman entre la densidad de inóculo de *P. brassicae* y variables de suelo y medioambientales en los principales departamentos productores de crucíferas de Colombia.

Variable	Correlación Spearman/densidad de inóculo	Valor de significancia (p-value)
<b>Atributos del suelo</b>		
CICE <sup>a</sup>	-0.2522429	0.00564
<b>Contenido de elementos en el suelo</b>		
Calcio <sup>b</sup>	-0.22491	0.01434
Magnesio <sup>b</sup>	-0.3163	0.00045
Sodio <sup>b</sup>	-0.3092	0.00062
Zinc <sup>b</sup>	-0.2579	0.00462
Boro <sup>b</sup>	-0.2346	0.01041
<b>Variables climáticas</b>		
Precipitación <sup>c</sup>	0.3377	0.00017
Días al año con lluvia <sup>c</sup>	0.2035	0.02637
Temperatura media <sup>c</sup>	0.2974	0.03721
T máxima <sup>c</sup>	0.2886	0.0326

<sup>a</sup> Capacidad de intercambio catiónico efectiva

<sup>b</sup> Determinación del contenido de los elementos en el suelo

<sup>c</sup> Promedios anuales históricos normalizados comprendidos entre 1981-2010

Con la detección y cuantificación de *P. brassicae* (Figura 1), se confirman los reportes de la presencia de la enfermedad hechos para Cundinamarca, Antioquia, Boyacá, Norte de Santander, Valle del Cauca, Cauca y Caldas (Jaramillo & Díaz, 2006; Torres 1969). En investigaciones previas no se observó ni reportó la enfermedad en el departamento de Nariño, sin embargo, la sensibilidad de la técnica aquí utilizada para detectar y cuantificar inóculo del patógeno (qPCR), logró confirmar la presencia de *P. brassicae* en los lotes evaluados de Nariño, con una densidad de  $7.06 \times 10^3$  ER·g de suelo<sup>-1</sup>. Bajo condiciones de alta favorabilidad para el desarrollo de la enfermedad, Hwang et al. (2011) reportaron que se requiere una densidad de inóculo mínima de  $1 \times 10^3$  ER·g de suelo<sup>-1</sup> en condiciones de invernadero para la aparición consistente de síntomas, para el caso de condiciones de campos naturalmente infestados, se requieren  $1 \times 10^5$  ER·g de suelo<sup>-1</sup>, lo cual indica que en las zonas estudiadas de Nariño, en promedio, se pueden presentar síntomas ocasionalmente pero sólo en aquellos lotes donde la densidad de inóculo se acerca a  $1 \times 10^5$  ER·g de suelo x se generan síntomas claros consistentemente, se requieren estudios más detallados en Nariño para determinar qué factores están influyendo negativamente en algunas zonas, en la aparición de síntomas de hernia de las crucíferas.

El departamento con las concentraciones más elevadas de ER·g de suelo<sup>-1</sup> fue Norte de Santander (1.64 x10<sup>5</sup> ER·g de suelo<sup>-1</sup>), resultado que resulta interesante por tratarse de una zona de frontera; se deben realizar estudios más detallados y con mayor amplitud en los muestreos en esta zona. Las diferencias observadas entre la densidad de inóculo encontrada en los lotes de este departamento con los demás posiblemente se deban a esquemas de rotación con alta frecuencia de crucíferas como lo reportan Dixon (2009) y Gossen et al. (2014).

Respecto a la densidad de inóculo, existen dos factores que están relacionados directamente: i) la longevidad de las ER, las cuales pueden sobrevivir hasta por 18 años (3.6 años en promedio) en ausencia de un hospedero susceptible (Wallenhammar, 1996b) y ii) las grandes cantidades de ER liberadas al medio por plantas enfermas, un cultivo susceptible de canola contribuye con 1.49x10<sup>8</sup> ER·g de suelo<sup>-1</sup> en ensayos de mini parcelas, y hasta 1x10<sup>10</sup> ER por gramo de agalla bajo condiciones de campo (Hwang et al., 2013).

Existen factores ambientales que pueden modificar tanto la producción de nuevo inóculo como su longevidad (Dixon, 2009; Rashid et al., 2013). Este estudio encontró una correlación negativa entre la densidad de inóculo y los contenidos en suelo de calcio, magnesio, sodio, boro y zinc, y la capacidad de intercambio catiónica efectiva (CICE).

El calcio se considera un factor que genera suelo supresivo para *P. brassicae*, por lo tanto, afecta negativamente la germinación de ER, pero no actúa de forma aislada, deben tenerse en cuenta los factores asociados a la microbiota del suelo (Stewart 2007). Shinoda et al. (2005) encontraron que la cantidad de ER presentes en el suelo se vio afectada negativamente al agregar escoria altamente calcárea. En este estudio, la disminución de la densidad de las esporas en reposo se asoció con el cultivo de Qing gin cai (*Brassicae chinensis* L) en condiciones de pH alto del suelo. A partir de estos resultados, los autores concluyen que el mecanismo de supresión se debe a un fenómeno que ocurre después de que la zoospora primaria infecta el pelo de la raíz. Tales resultados concuerdan con lo encontrado en este estudio, a medida que aumentan las concentraciones en suelo de calcio, se disminuye la cantidad de inóculo presente en el suelo. Sin embargo, respecto al efecto directo del calcio sobre las esporas de resistencia existen reportes contradictorios. Myers & Campbell (1985) mostraron una baja toxicidad de los iones de calcio e hidrogeno sobre las ER. Para concluir esto los autores incubaron por una semana ER en una solución

1M de cloruro de calcio, después de lo cual concluyeron que la reducción en la capacidad de infección de los pelos radicales por parte de las ER es mínima.

Existe un efecto indirecto del calcio sobre la densidad de inóculo, que va en concordancia con lo aquí hallado. Aumentos en la concentración en suelo del ion calcio pueden suprimir la germinación de esporas de resistencia a niveles bajos de inóculo (Murakami et al., 2002). También se reporta que el calcio genera inhibición de la dehiscencia del esporangio primario a niveles altos de densidad de inóculo (Webster & Dixon, 1991c); el calcio también está involucrado en la interacción con el potasio y el magnesio, cualquier exceso en alguno de estos nutrientes puede afectar la toma por parte de la planta de otro.

Al igual que el calcio, el magnesio y el sodio tienen un efecto indirecto en la densidad de inóculo; altas concentraciones de magnesio en el medio de crecimiento inhiben la liberación de zoosporas y la formación de agallas. En este caso, la respuesta de la enfermedad al magnesio también depende del pH, a mayor pH mayor es el efecto de reducción de la enfermedad con aplicaciones de magnesio (Myers & Campbell 1985). El sodio se reporta como controlador de la hernia de las crucíferas, reduciendo el número de pelos infectados, el mayor efecto se encontró con el hidróxido de sodio y al igual que las otras bases, su efecto es dependiente del pH, a mayor pH mayor reducción de las infecciones (Samuel & Garrett, 1945).

Respecto a las variables climáticas estudiadas, se encontró correlación positiva entre la densidad de inóculo y la temperatura media y máxima, la precipitación media anual y el número de días con lluvia al año, lo que implica que aumentos en los valores de estas variables, aumentan la probabilidad de encontrar lotes con mayores densidades de inóculo.

En términos generales, altos contenidos de agua en el suelo favorecen el desarrollo de la enfermedad (Stewart, 2007). Ledingham (1934) concluyó que las ER permanecen viables a pesar de ser humedecidas y secadas repetidamente; en este sentido, el efecto positivo encontrado en este estudio no está relacionado con un efecto directo de la humedad sobre la densidad de inóculo, sino con un efecto indirecto. La sobresaturación de humedad del suelo conlleva a que los poros del suelo estén llenos de agua, esto aumenta la probabilidad de que las ER germinen y puedan moverse en la fase acuosa del suelo con mayor facilidad

para llegar a los pelos radicales y generar infección, que en últimas lleva a la formación de agallas y a la liberación de más inóculo al suelo en hospederos susceptibles (Monteith, 1924). Otro factor relacionado con el ambiente que modifica la densidad de inóculo en los suelos es la precipitación. Si el suelo está saturado de agua, se generarán encharcamientos y posibles inundaciones que en terrenos con pendiente pueden mover las ER a distancias considerables, aumentando el número de estas en zonas alejadas a los lotes infestados (Dixon 2009a).

Se sabe que la temperatura desempeña un papel en el desarrollo de la hernia de las crucíferas (Colhoun, 1953; Monteith, 1924). La temperatura óptima para el desarrollo de la enfermedad oscila entre 20 °C y 24 °C (Colhoun, 1953). Los resultados respecto a los rangos de temperatura no son consistentes, sin embargo, se han logrado rangos consenso para cada etapa del ciclo de vida de *P. brassicae* (infección primaria, infección secundaria, colonización y desarrollo de síntomas): el desarrollo es muy lento a temperaturas por debajo de 17 °C, el desarrollo llega a su máximo entre 23-26 °C y luego disminuye a medida que la temperatura aumenta a 30 °C (Sharma et al., 2011; Sharma et al., 2011). La relación directa encontrada en este estudio entre la densidad de inóculo y la temperatura media y máxima de los lotes concuerda con lo reportado en literatura, en promedio, la temperatura media en los lotes estudiados fue de 15 °C, y la temperatura máxima promedio fue de 20.5 °C; lo que indica que aumentos en las dos temperaturas generarían temperaturas que están dentro de los rangos óptimos para el desarrollo, lo que aumenta la probabilidad que la densidad de inóculo se incremente.

La densidad de inóculo de *P. brassicae* es uno de los factores que más influye en el desarrollo de la hernia de las crucíferas, por consiguiente, la toma de decisiones con respecto a su manejo debe estar siempre en busca de mejores estrategias para reducir la densidad de inóculo además de prevenir su aumento. Teniendo en cuenta lo anterior, los resultados acá obtenidos, son importantes puesto que permitirán una toma de decisiones mucho más acertada en la medida que se tendrán en cuenta aquellos factores ambientales y los relacionados con el manejo que se dan en las regiones productoras de crucíferas de Colombia que están determinando cambios en la densidad de inóculo y por ende en el desarrollo y severidad de la enfermedad.

## **4. Patrones espaciales de *plasmodiophora brassicae* en Colombia**

### **4.1 Introducción**

Como la principal limitante para la producción de crucíferas donde está presente, la hernia de las crucíferas es una enfermedad de suelo presente en las principales zonas de producción de cultivos de esta familia de Colombia.

Su agente causal, *P. brassicae*, es un parasito obligado que produce grandes cantidades de ER que son liberadas al suelo y pueden permanecer viables en promedio 3.6 años y hasta 18 años en ausencia de un hospedero susceptible (Wallenhamar 1998). Las ER se convierten en el único medio de dispersión y de nuevas infecciones de la enfermedad (Murakami et al. 2000).

Comprender las características espaciales de una población de patógenos o población de plantas enfermas es esencial para desarrollar programas de manejo de enfermedades (Madden et al., 2007).

Respecto al patrón de distribución del patógeno dentro de los lotes, Wallenhamar et al. (2012) encontraron una distribución en parches, independientemente de la metodología de muestreo empleada (un muestreo de grilla rígida de 50 m y un muestreo completamente aleatorizado con pocas muestras por lote). Esta distribución irregular enfatiza el hecho de que uno de los principales desafíos involucrados en detección en un lote particular de *P. brassicae* es la elección de la técnica de muestreo (Cao et al., 2007).

Se han desarrollado estudios sobre patrones espaciales y monitoreo de las poblaciones del patógeno en Australia, China, Canadá y Suecia (Anders et al., 2016; Cao et al., 2009; Chai et al., 2014; Donald et al., 2006; Faggian & Parsons, 2002; Gossen et al., 2015;

Wallenhammar, 1996). El caso de la región de Alberta, Canadá es uno de los más estudiados. La zona se consideraba libre del patógeno hasta 2003, a pesar de que en la enfermedad se había reportado en otras regiones del país y principalmente en cultivos de hortalizas crucíferas (Strelkov & Hwang 2014). En 2003 se desarrolló un estudio en aproximadamente 70 lotes de canola de Alberta, el cual reveló la presencia no confirmada antes del patógeno (Tewari et al., 2005). El reporte prendió las alarmas en la región y permitió generar políticas públicas para el control de la enfermedad y su dispersión (Cao et al., 2009).

El presente estudio es el primero en determinar los patrones espaciales del inóculo de *P. brassicae* y en generar una estimación de la probabilidad de encontrar la enfermedad en ciertas áreas de las regiones de mayor producción de crucíferas de Colombia (Nariño, Cundinamarca y Antioquía).

## **4.2 Materiales y métodos**

Para establecer los patrones espaciales de *P. brassicae*, se determinó la densidad de inóculo en 91 sitios de muestreo de los departamentos con mayor área de producción de crucíferas: Cundinamarca (34), Antioquia (28) y Nariño (29). El número de muestras colectada corresponde al mínimo requerido para garantizar la continuidad espacial necesaria para los análisis geoestadísticos. Las muestras se colectaron una grilla rígida con puntos equidistantes entre sí.

### **4.2.1 Cuantificación de inóculo**

La metodología de cuantificación que incluye: la metodología de muestreo, la toma y almacenamiento de muestras, la extracción de ADN, la construcción de la curva estándar y los métodos y materiales necesarios para la cuantificación *per se*, se describe en el numeral 4.2 del capítulo 4 anteriormente presentado.

## 4.2.2 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de distribución de los datos para establecer su normalidad y poder definir el tipo de análisis más apropiado. Puesto que la densidad de inóculo no presentó una distribución normal, los análisis se realizaron por medio de modelos generales linealizados, ya que estos soportan datos de diferente naturaleza con diversas distribuciones. Para estos análisis se eliminaron los sitios de muestreo donde el valor de la densidad de inóculo era mayor a  $2 \times 10^4$  ER·g de suelo<sup>-1</sup> (los sitios eliminados del análisis fueron: NSCH02, NSMU01, CFA31, NSMU02, NSMU05, NSCH03, AMA28). Los datos eliminados representaban valores extremos que afectaban la estimación de modelos, generando respuestas espurias.

Los análisis geoestadísticos se realizaron por medio de la estimación de variogramas para la determinación de autocorrelación espacial. Cuando se encontró correlación espacial de la densidad de inóculo del patógeno en cada uno de los puntos de procedió a efectuar análisis de modelamiento por medio de *krigging* y con estos modelos se realizaron mapas de calor. Estos análisis se efectuaron usando el software ArcGis 10.4®.

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Patrones espaciales de la densidad de inóculo en los departamentos de Cundinamarca, Antioquia y Nariño

Los análisis espaciales de los tres departamentos revelaron la correlación espacial para la densidad de inóculo del patógeno. En Cundinamarca se observó que el patógeno se dispersa siguiendo un ángulo de 45°, mientras que en Antioquia y Nariño la dispersión del patógeno es anisotrópica (igual dispersión en todos los sentidos). En cuanto se realizó en modelamiento para los datos de densidad de inóculo, se pudieron generar mapas de calor que permiten la estimación de la densidad de inóculo, no obstante, la intensidad de muestreo fue insuficiente para generar valores altamente confiables, por tal razón no es válido predecir la densidad de inóculo por fuera de los sitios muestreados y los mapas aquí generados son ilustrativos (Figura 6, Figura 7 y Figura 8).

## 4.4 Discusión

Este es el primer estudio en generar patrones espaciales del inóculo de *P. brassicae* en los principales departamentos productores de crucíferas de Colombia: Cundinamarca, Antioquia, Nariño.

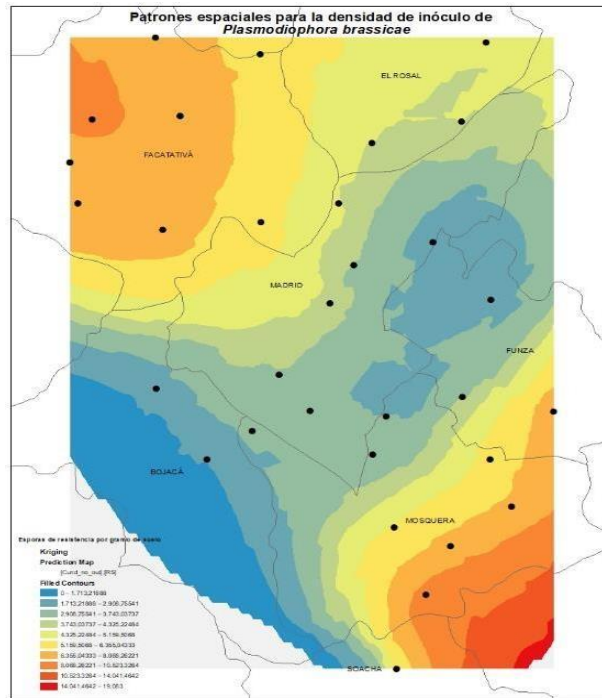
Debido a las dificultades del manejo de la hernia de las crucíferas cuando ya está presente en el lote de producción, la exclusión aparece como una alternativa efectiva de manejo, al evitar la siembra de crucíferas en lotes con altos niveles de infestación (Stewart 2007). Por eso, los resultados aquí obtenidos resultan útiles para predecir dentro de las zonas muestreadas, las áreas infestadas o con presencia del patógeno y así evitarlas o diseñar estrategias dentro del manejo del sistema productivo que eviten la dispersión o el aumento del inóculo en los lotes.

En las Praderas Canadienses se ha desarrollado uno de los estudios de monitoreo más complejos, extensos y de mayor duración con el fin de identificar nuevos lotes con la presencia de *P. brassicae*. Se logró obtener abundante evidencia que soporta el hecho de que el aumento en la prevalencia de la enfermedad en esta región se debe a la dispersión del patógeno (Strelkov & Hwang 2014).

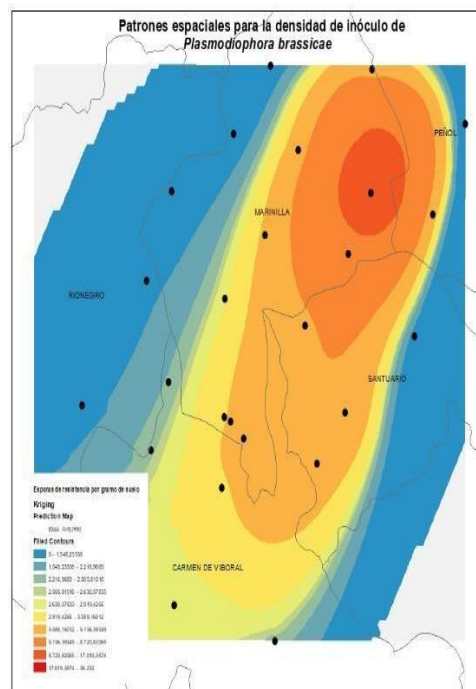
Por tratarse de un patógeno de suelo, *P. brassicae* se puede dispersar por todas aquellas actividades que estén relacionadas con el movimiento de suelo (Strelkov & Hwang 2014). Una de las variables evaluadas en este estudio fue la propiedad de la maquinaria utilizada para hacer las labores de preparación del suelo. En este aspecto se encontró que, en Antioquia, Nariño, y Cundinamarca, más del 60% de los productores que preparan el suelo de forma mecanizada, para tal fin los agricultores arriendan la maquinaria, lo que aumenta el riesgo de dispersión del patógeno de lotes infestados a lotes sin la presencia del patógeno.



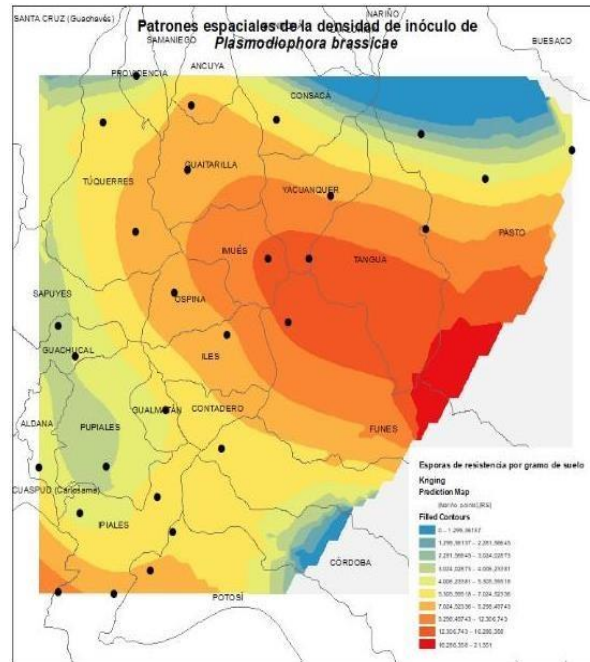
**Figura 6.** Mapa de calor que presenta la densidad de inóculo de *P. brassicae* en términos de esporas de resistencia por gramo de suelo en el departamento de Cundinamarca.



**Figura 7.** Mapa de calor que presenta la densidad de inóculo de *P. brassicae* en términos de esporas de resistencia por gramo de suelo en el departamento de Antioquia.



**Figura 8.** Mapa de calor que presenta la densidad de inóculo de *P. brassicae* en términos de esporas de resistencia por gramo de suelo en el departamento de Nariño.



Se reporta que el viento puede mover las esporas a larga distancia, en contraste con las distancias que pueden generar el movimiento de agua de escorrentía superficial (Gossen et al., 2014). Esto se relaciona con el hecho de que en los primeros 5 cm del perfil del suelo se pueden encontrar el 97% de las ER presentes en el suelo, lo que aumenta la posibilidad de que en el viento se transporten partículas del suelo con ER adheridas (Kim et al., 2000). Este estudio no tuvo en cuenta una variable relacionada directamente con este medio de dispersión, pero en las visitas a los sitios de muestreo, se evidenciaron prácticas que contribuyen a la dispersión por viento, en algunos casos la preparación del suelo en seco genera nubes de polvo que pueden contener ER (Fig. 9B) y en otros casos, la preparación del suelo para nuevas siembras implica dejar el primer horizonte del perfil del suelo desnudo expuesto a la erosión por el viento (Fig. 9A) como lo reportan Rennie et al. (2015).

En Colombia se está favoreciendo la dispersión del inóculo de *P. brassicae* debido a prácticas de manejo como dejar a total exposición el horizonte A y el hecho de que la mayoría de los productores preparan el suelo con maquinaria alquilada y posiblemente contaminada con inóculo del patógeno.

Para este tipo de estudios son necesarios muestreos más intensivos, que garanticen mayor continuidad espacial, con el fin de que los mapas sean predictivos y puedan ser tenidos en cuenta para la toma de decisiones de siembra en zonas donde la probabilidad de encontrar altas densidades de inóculo sea muy baja.

**Figura 9.** Prácticas de manejo del sistema productivo de crucíferas en Colombia que aumentan el riesgo de dispersión de ER por el viento. A) Lote de producción de hortalizas en Antioquia recién preparado con el horizonte A (primeros centímetros del perfil) sin cobertura vegetal; B) Nube de polvo generada por la incorporación de residuos de cosecha en un lote de coliflor en Cundinamarca





## 5. Conclusiones generales y recomendaciones

La hernia de las crucíferas está presente en los principales departamentos productores de especies crucíferas de Colombia a excepción de Nariño, sin embargo, la alta sensibilidad de la técnica qPCR permitió la confirmación de la presencia de inóculo del patógeno en la zona, con una densidad de inóculo promedio de  $7.06 \times 10^3$  ER·g de suelo<sup>-1</sup>. Además, este estudio representa el primer reporte de presencia de la enfermedad para Norte de Santander, Valle del Cauca, Cauca y Boyacá. Con base en la presente metodología, Nariño se proyecta como una zona prominente para la producción de crucíferas en Colombia, ya que a pesar de que el inóculo de *P. brassicae* está presente, existen condiciones ambientales, de manejo o aquellas asociadas al suelo que están afectando negativamente el desarrollo de la enfermedad y con esto aparición de síntomas de hernia de las crucíferas, por consiguiente, se requiere estudiar este proceso a mayor profundidad.

La presencia de la enfermedad esta correlacionada positivamente en las principales zonas de producción de crucíferas de Colombia con el aumento en los contenidos de calcio, boro, fósforo y cobre en el suelo, efecto posiblemente relacionado con las mejores condiciones para el hospedero y no para el patógeno. Aquellos factores relacionados con el hospedero (inclusión de crucíferas y su nivel de resistencia) son los más relacionados con la presencia de la enfermedad en las diferentes zonas estudiadas.

El departamento con mayor densidad de inóculo promedio fue Norte de Santander, con  $1.64 \times 10^5$  ER·g de suelo<sup>-1</sup>, el resto de los departamentos exhiben valores similares de densidad de inóculo entre sí (sin diferencias significativas).

Al aumentar los valores de todas las variables de suelo, se aumenta la probabilidad de encontrar lotes con menores valores de densidad de inóculo, es decir, a medida que

aumentan los contenidos en suelo de calcio, magnesio, sodio, zinc y boro y aumenta la CICE las densidades de inóculo del patógeno tienden a disminuirse.

El único factor de manejo del sistema productivo que incluye crucíferas que se correlaciona con la densidad de inóculo, fue el tipo de propagación utilizado, donde la probabilidad de tener mayores densidades de inóculo se aumenta cuando el agricultor realiza semilleros en suelo, mientras que las menores densidades de inóculo de *P. brassicae* son observadas cuando el agricultor compra plántulas en vivero.

Este es el primer estudio de este tipo realizado en Colombia, en el cual se lograron determinar los factores ambientales y de manejo que tienen mayor peso en el desarrollo de la hernia de las crucíferas y en las variaciones de la densidad de inóculo del patógeno presente en el suelo, además se convierte en una herramienta de partida para el diseño e implementación de esquemas de manejo integrado de la enfermedad, que incluyan zonas aptas para el cultivo de crucíferas en el país.

De igual manera es el primer estudio de este tipo desarrollado en una zona tropical, donde a diferencia de las zonas templadas con estaciones, las condiciones climáticas permiten que existan hospederos susceptibles todo el año, lo que suma elementos diferentes a las dinámicas poblacionales del patógeno, respecto a lo reportado en estudios realizado en zonas con estaciones.

## 5.2 Recomendaciones

Sabiendo la distribución de la enfermedad y los factores que afectan su desarrollo y la densidad de inóculo del patógeno, se hace necesario entrar en detalle sobre la estructura poblacional de *P. brassicae*. Para tal fin, se deben determinar los patotipos presentes en las zonas de producción, haciendo especial énfasis en las zonas de frontera como posible punto de entrada de la enfermedad al país.

Además de determinar los patotipos, desarrollar estudios filogenéticos incluyendo poblaciones caracterizadas de países de la región y de otras regiones con estudios más profundos (Canadá, Europa y Asia), permitirá tener claridades de donde pudieron provenir las poblaciones de *P. brassicae* presentes en el país además de convertirse en un insumo

fundamental para el desarrollo de un programa de mejoramiento enfocado en hortalizas crucíferas y en las poblaciones del patógeno específicas del país.

La validación de los resultados aquí obtenidos, en términos de toma de decisiones es necesaria para darle efectos prácticos a los mismos, el enfoque de análisis de riesgos puede resultar en un método más amable en cuanto a la utilidad y facilidad de uso para los productores de crucíferas del país.





## Bibliografía

- Agrios, G. (2005). *Plant pathology* (Fifth edition). USA: Elsevier Academic Press.
- Agronet. (2016). Sistema de Estadísticas Agropecuarias. Anuario estadístico del sector agropecuario 2016.  
<http://www.agronet.gov.co/agronetweb1/Estad%C3%ADsticas.aspx>. Consultado 15 de Marzo 2017.
- Aist, J. R., & Williams, P. H. (1971). The cytology and kinetics of cabbage root hair penetration by *Plasmodiophora brassicae*. *Canadian Journal of Botany*, 49(11), 2023-2034. <https://doi.org/10.1139/b71-284>
- Anders, J., Katarzyna, M.-S., Gunnar, B., & Ann-Charlotte, W. (2016). Quantitative PCR shows propagation of *Plasmodiophora brassicae* in Swedish long-term field trials. *European Journal of Plant Pathology*, 145(3), 573-581.  
<https://doi.org/10.1007/s10658-016-0906-x>
- Asano, T., Kageyama, K., & Hyakumachi, M. (2000). Germination of surface-disinfected resting spores of *Plasmodiophora brassicae* and their root hair infection in turnip hairy roots. *Mycoscience*, 41(1), 49-54. <https://doi.org/10.1007/BF02464385>
- Barnes, C. W., Kinkel, L. L., & Groth, J. V. (2005). Spatial and temporal dynamics of *Puccinia andropogonis* on *Comandra umbellata* and *Andropogon gerardii* in a native prairie. *Canadian Journal of Botany*, 83(9), 1159-1173. <https://doi.org/10.1139/b05-087>
- Bhering, A. da S., do Carmo, M. G. F., Matos, T. de S., Lima, E. S. A., & do Amaral Sobrinho, N. M. B. (2017). Soil factors related to the severity of clubroot in Rio de Janeiro, Brazil. *Plant Disease*, 101(8), 1345-1353. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-16-1024-SR>
- Bos, L., & Parlevliet, J. E. (1995). Concepts and terminology on plant/pest relationships: toward consensus in plant pathology and crop protection. *Annual Review of Phytopathology*, 33, 69-102. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.33.090195.000441>

- Botero, A., Gómez, I., Benítez, É., & García, C. (2015). Liming with dolomite reduces the efficacy of the biocontrol fungus *Trichoderma koningiopsis* against cabbage clubroot. *Agronomía Colombiana*, 33(1), 49-57.  
<https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v33n1.46759>
- Botero, A. 2016. Effect of three *Trichoderma* species on clubroot disease in cabbage. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia.
- Buczacki, S. T., & Moxham, S. E. (1983). Structure of the resting spore wall of *Plasmodiophora brassicae* revealed by electron microscopy and chemical digestion. *Transactions of the British Mycological Society*, 81(2), 221-231.  
[https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(83\)80073-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(83)80073-4)
- Buczacki, S. T., Toxopeus, H., Mattusch, P., Johnston, T. D., Dixon, G. R., & Hobolth, L. A. (1975). Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: Proposals for attempted rationalization through an international approach. *Transactions of the British Mycological Society*, 65(2), 295-303. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(75\)80013-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(75)80013-1)
- Bulman, S., & Braselton, J. P. (2014). 4 *Rhizaria*: Phytomyxea. En D. J. McLaughlin & J. W. Spatafora (Eds.), *Systematics and Evolution* (pp. 99-112). Springer Berlin Heidelberg.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-55318-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55318-9_4)
- Burki, F., & Keeling, P. J. (2014). *Rhizaria*. *Current Biology*, 24(3), R103-R107.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.025>
- Burki, F., Kudryavtsev, A., Matz, M. V., Aglyamova, G. V., Bulman, S., Fiers, M., ... Pawlowski, J. (2010). Evolution of *Rhizaria*: new insights from phylogenomic analysis of uncultivated protists. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 377.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-377>
- Cao, T., Manolii, V. P., Strelkov, S. E., Hwang, S.-F., & Howard, R. J. (2009). Virulence and spread of *Plasmodiophora brassicae* [clubroot] in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 31(3), 321-329.  
<https://doi.org/10.1080/07060660909507606>
- Cao, T., Tewari, J., & Strelkov, S. E. (2007). Molecular detection of *Plasmodiophora brassicae*, causal agent of clubroot of crucifers, in plant and soil. *Plant Disease*, 91(1), 80-87. <https://doi.org/10.1094/PD-91-0080>
- Chai, A. L., Xie, X. W., Shi, Y. X., & Li, B. J. (2014). Research status of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on cruciferous crops in China. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36(sup1), 142-153. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.868829>

- Colhoun, J. (1953). A Study of the epidemiology of clubroot disease of *Brassicae*. *Annals of Applied Biology*, 40(2), 262-283. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1953.tb01081.x>
- Cosgrove, D. J. (1997). Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *The Plant Cell*, 9(7), 1031-1041.
- D'Arcy. (2001). Illustrated glossary of plant pathology. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2001-0219-01>
- Deora, A., Gossen, B. D., Walley, F., & McDonald, M. R. (2011). Boron reduces development of clubroot in canola. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33(4), 475-484. <https://doi.org/10.1080/07060661.2011.620630>
- Deora, Abhinandan, Gossen, B. D., Amirsadeghi, S., & McDonald, M. R. (2015). A ultiplex qPCR Assay for Detection and Quantification of *Plasmodiophora brassicae* in Soil. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0608-RE>
- Devos, S., Vissenberg, K., Verbelen, J.-P., & Prinsen, E. (2005). Infection of chinese cabbage by *Plasmodiophora brassicae* leads to a stimulation of plant growth: Impacts on cell wall metabolism and hormone balance. *New Phytologist*, 166(1), 241-250.
- Diederichsen, E., Frauen, M., Linders, E. G. A., Hatakeyama, K., & Hirai, M. (2009). Status and perspectives of clubroot resistance breeding in crucifer Crops. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(3), 265-281. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9100-0>
- Diederichsen, E., Frauen, M., & Ludwig-Müller, J. (2014). Clubroot disease management challenges from a German perspective. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36(sup1), 85-98. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.861871>
- Dixon, G. R. (1981). *Vegetable Crop Diseases*. Palgrave Macmillan UK. Recuperado de [//www.springer.com/la/book/9781349037049](http://www.springer.com/la/book/9781349037049)
- Dixon, G. R. (2009). The occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28, 194-202.
- Dixon, Geoffrey R. (2009a). *Plasmodiophora brassicae* in its environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(3), 212-228. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9098-3>
- Dixon, Geoffrey R. (2009b). The occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(3), 194- 202. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9090-y>

- Dixon, G.R. (2006). The biology of *Plasmodiophora brassicae* wor. - a review of recent advances. *Acta Horticulturae*, (706), 271-282.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.706.32>
- Donald, E. c., Cross, S. j., Lawrence, J. m., & Porter, I. j. (2006). Pathotypes of *Plasmodiophora brassicae*, the cause of clubroot, in Australia. *Annals of Applied Biology*, 148(3), 239-244. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2006.00062.x>
- Donald C. 2006. Clubroot of cruciferous crops. En: Agriculture Notes, Fact Sheet. Publicación en línea. State of Victoria, Department of Primary Industries.  
[https://ausveg.com.au/app/data/technical-insights/docs/AG0531\\_Clubroot\\_of\\_Cruciferous\\_Crops.pdf](https://ausveg.com.au/app/data/technical-insights/docs/AG0531_Clubroot_of_Cruciferous_Crops.pdf)
- Donald, E. C., & Porter, I. J. (2014). Clubroot in Australia: the history and impact of *Plasmodiophora brassicae* in *Brassica* crops and research efforts directed towards its control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36(sup1), 66-84.  
<https://doi.org/10.1080/07060661.2013.873482>
- Ernst T., Kher S., Stanton D., Rennie D., Hwang S. & Strelkov S. 2018. The influence of clubroot resistant canola on resting spores levels in the soil. International Clubroot Workshop. Edmonton, Alberta. Canada.
- Ernst, T. W., Kher, S., Stanton, D., Rennie, D. C., Hwang, S. F., & Strelkov, S. E. (2019). *Plasmodiophora brassicae* resting spore dynamics in clubroot resistant canola (*Brassica napus*) cropping systems. *Plant Pathology*, 68(2), 399-408.  
<https://doi.org/10.1111/ppa.12949>
- Faggian, R., & Parsons, S. (2002). A rapid diagnostic test for clubroot. Sydney: Horticulture Australia.
- Faggian, Robert, & Strelkov, S. E. (2009). Detection and measurement of *Plasmodiophora brassicae*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(3), 282-288.  
<https://doi.org/10.1007/s00344-009-9092-9>
- Friberg, H. (2005, noviembre). Persistence of *Plasmodiophora brassicae* [Doctoral thesis]. Recuperado 26 de octubre de 2015, de <http://pub.epsilon.slu.se/990/>
- Friberg, H., Lagerlöf, J., & Rämert, B. (2005). Germination of *Plasmodiophora brassicae* resting spores stimulated by a non-host plant. *European Journal of Plant Pathology*, 113(3), 275-281. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-2797-0>
- Fry, S. C. (1995). Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46(1), 497-520.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.46.060195.002433>

- Gossen, B., Adhikari, K., & McDonald, M. R. (2012). Effect of seeding date on development of clubroot in short-season *Brassica* crops. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34(4), 516-523.
- Gossen, B. D., Adhikari, K. K. C., & McDonald, M. R. (2012). Effects of temperature on infection and subsequent development of clubroot under controlled conditions. *Plant Pathology*, 61(3), 593-599. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02536.x>
- Gossen, B. D., Strelkov, S. E., Manolii, V. P., Rennie, D. C., Cao, T., Hwang, S. F., McDonald, M. R. (2015). Spread of *Plasmodiophora brassicae* on canola in Canada, 2003–2014: Old pathogen, new home. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 37(4), 403-413. <https://doi.org/10.1080/07060661.2015.1105871>
- Gossen, Bruce D., Deora, A., Peng, G., Hwang, S.-F., & McDonald, M. R. (2014). Effect of environmental parameters on clubroot development and the risk of pathogen spread. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36(sup1), 37-48. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.859635>
- Gossen, Bruce D., Kasinathan, H., Cao, T., Manolii, V. P., Strelkov, S. E., Hwang, S.-F., & McDonald, M. R. (2013). Interaction of pH and temperature affect infection and symptom development of *Plasmodiophora brassicae* in canola. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(3), 294-303. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.804882>
- Gustafsson, M. (1981). Biosystematic studies in the Brassica oleracea group. En *Stensiltrykk - Norges Landbrukshoegskole. Institutt for Groennsakdyrking (Norway)*. Agricultural Univ. of Norway. Dept. of Vegetable Crops. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=NO8300357>
- Hamilton, H. A., & Crête, R. (1978). Influence of soil moisture, soil pH, and liming sources on the incidence of clubroot, the germination and growth of cabbage produced in mineral and organic soils under controlled conditions. *Canadian Journal of Plant Science*, 58(1), 45-53. <https://doi.org/10.4141/cjps78-010>
- Hatakayema, K., Fujimura, M., Ishida, M., Suzuki, T., & Sato, T. (2006). Classification of pathogenicity of *Plasmodiophora brassicae* field isolates in Japan based on resistance of F1 cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) to clubroot. *Acta Horticulturae*, (706), 323-328. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.706.38>
- Holtz, M. D., Hwang, S.-F., & Strelkov, S. E. (2018). Genotyping of *Plasmodiophora brassicae* reveals the presence of distinct populations. *BMC Genomics*, 19. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4658-1>
- Howard, R. J., Strelkov, S. E., & Harding, M. W. (2010). Clubroot of cruciferous crops –

- new perspectives on an old disease. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 32(1), 43-57. <https://doi.org/10.1080/07060661003621761>
- Hwang, S. F., Ahmed, H. U., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., Turnbull, G. D., Peng, G., & Howard, R. J. (2011a). Seedling age and inoculum density affect clubroot severity and seed yield in canola. *Canadian Journal of Plant Science*, 91(1), 183-190. <https://doi.org/10.4141/cjps10066>
- Hwang, S. F., Ahmed, H. U., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., Turnbull, G. D., Peng, G., & Howard, R. J. (2011b). Seedling age and inoculum density affect clubroot severity and seed yield in canola. *Canadian Journal of Plant Science*, 91(1), 183-190. <https://doi.org/10.4141/cjps10066>
- Hwang, S. F., Ahmed, H. U., Zhou, Q., Rashid, A., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., ... Turnbull, G. D. (2013). Effect of susceptible and resistant canola plants on *Plasmodiophora brassicae* resting spore populations in the soil. *Plant Pathology*, 62(2), 404-412. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02636.x>
- Hwang, S. F., Ahmed, H. U., Zhou, Q., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., Peng, G., & Turnbull, G. D. (2011). Influence of cultivar resistance and inoculum density on root hair infection of canola (*Brassica napus*) by *Plasmodiophora brassicae*. *Plant Pathology*, 60(5), 820-829. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02457.x>
- Hwang, S. F., Ahmed, H. U., Zhou, Q., Turnbull, G. D., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., & Peng, G. (2015). Effect of host and non-host crops on *Plasmodiophora brassicae* resting spore concentrations and clubroot of canola. *Plant Pathology*, 64(5), 1198-1206. <https://doi.org/10.1111/ppa.12347>
- Hwang, S. F., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., Turnbull, G. D., Ahmed, H. U., & Manolii, V. P. (2011). Soil treatments and amendments for amelioration of clubroot of canola. *Canadian Journal of Plant Science*, 91(6), 999-1010. <https://doi.org/10.4141/cjps2011-028>
- Hwang, S.-F., Howard, R. J., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., & Peng, G. (2014a). Management of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola (*Brassica napus*) in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36(sup1), 49-65. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.863806>
- Hwang, S.-F., Howard, R. J., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., & Peng, G. (2014b). Management of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola (*Brassica napus*) in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36(sup1), 49-65. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.863806>

- Hwang, Sheau-Fang, Strelkov, S. E., Feng, J., Gossen, B. D., & Howard, R. J. (2012). *Plasmodiophora brassicae*: a review of an emerging pathogen of the Canadian canola (*Brassica napus*) crop. *Molecular Plant Pathology*, 13(2), 105-113. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00729.x>
- Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM). (2014). 375 <http://www.ideam.gov.co/web/tiempo-y-clima/clima>. Accessed 6 December 2018.
- Iwama, H., Osozawa, S., Ushiroda, T., & Kubota, T. (1994). Analysis of soil water matric potential requirement for infection of turnip with *Plasmodiophora brassicae* using negative pressure water circulation technique. *Soil Science and Plant Nutrition*, 40(2), 293-299. <https://doi.org/10.1080/00380768.1994.10413303>
- Jaramillo, J., & Díaz, C. (2006). El cultivo de las crucíferas: Brócoli, Coliflor, Repollo, Col china. Rionegro, Antioquia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. Recuperado de <http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/WebBac/Documentos/ELCULTIVOCRUCIFERAS.pdf>
- Kageyama, K., & Asano, T. (2009). Life cycle of *Plasmodiophora brassicae*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(3), 203-211. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9101-z>
- Kim C.H., Cho W.D., Kim H.M. (2000): Distribution of *Plasmodiophora brassicae* causing clubroot disease of Chinese cabbage in soil. *Plant Disease Research* 6: 27–32.
- Kornbrot, D. (2014). Point Biserial Correlation. En *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*. American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat06227>
- Kuginuki, Y., Yoshikawa, H., & Hirai, M. (1999). Variation in virulence of *Plasmodiophora brassicae* in Japan tested with clubroot-resistant cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *European Journal of Plant Pathology*, 105(4), 327-332. <https://doi.org/10.1023/A:1008705413127>
- Lahlali, R., Peng, G., Gossen, B. D., McGregor, L., Yu, F. Q., Hynes, R. K., Boyetchko, S. M. (2012). Evidence that the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis*) suppresses clubroot on canola via antibiosis and induced host resistance. *Phytopathology*, 103(3), 245-254. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-12-0123-R>
- LeBoldus, J. M., Manolii, V. P., Turkington, T. K., & Strelkov, S. E. (2012). Adaptation to *Brassica* host genotypes by a single-spore isolate and population of *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). *Plant Disease*, 96(6), 833-838. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-11-0807>

- Ledingham, G. A. (1934). Zoospore ciliation in the *Plasmodiophorales*. *Nature*, 133(3362), 534. <https://doi.org/10.1038/133534b0>
- Li, J., Li, Y., Shi, Y., Xie, X., A-li, C., & Li, B. (2013). Development of a Real-Time PCR assay for *Plasmodiophora brassicae* and its detection in soil samples. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(10), 1799-1806. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60491-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60491-8)
- Madden, L. V., Hughes, G., & Van Den Bosch, F. (2007). The study of plant disease epidemics. American Phytopathological Society.
- McDonald, M. R., & Westerveld, S. M. (2008). Temperature prior to harvest influences the incidence and severity of clubroot on two Asian Brassica vegetables. *Hortscience*, 43(5), 1509-1513.
- Meurer, E. (2007, enero). Factores que influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Recuperado 18 de febrero de 2019, de <https://www.sbcs.org.br>
- Mitani, S., Sugimoto, K., Hayashi, H., Takii, Y., Ohshima, T., & Matsuo, N. (2003). Effects of cyazofamid against *Plasmodiophora brassicae* Woronin on Chinese cabbage. *Pest Management Science*, 59(3), 287-293. <https://doi.org/10.1002/ps.627>
- Monteith, J. (1924, octubre 6). Relation of soil temperature and soil moisture to infection, by *Plasmodiophora brassicae*. Recuperado 4 de febrero de 2019, de <https://eurekamag.com/research/013/480/013480466.php>
- Morasse I, Pageau D & Lafond J. 1997. Attention à la hernie des crucifères dans le canola. *Grandes Cult.* 7:22–23.
- Murakami, H, Tsushima, S., & Shishido, Y. (2000). Soil suppressiveness to clubroot disease of Chinese cabbage caused by *Plasmodiophora brassicae*. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(11–12), 1637-1642. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00079-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00079-1)
- Murakami, Hiroharu, Tsushima, S., Akimoto, T., & Shishido, Y. (2001). Reduction of spore density of *Plasmodiophora brassicae* in soil by decoy plants. *Journal of General Plant Pathology*, 67(1), 85-88. <https://doi.org/10.1007/PL00012994>
- Murakami, Hiroharu, Tsushima, S., Kuroyanagi, Y., & Shishido, Y. (2002). Reduction of resting spore density of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease severity by liming. *Soil Science and Plant Nutrition*, 48(5), 685-691. <https://doi.org/10.1080/00380768.2002.10409258>
- Myers, D. F. (1985). Lime and the control of clubroot of crucifers: Effects of pH, calcium, magnesium, and their interactions. *Phytopathology*, 75(6), 670.



- <https://doi.org/10.1094/Phyto-75-670>
- Narisawa, K., Shimura, M., Usuki, F., Fukuhara, S., & Hashiba, T. (2005). Effects of pathogen density, soil moisture, and soil pH on biological control of clubroot in Chinese Cabbage by *Heteroconium chaetospora*. *Plant Disease*, 89(3), 285-290. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0285>
- Niwa, R., Nomura, Y., Osaki, M., & Ezawa, T. (2008). Suppression of clubroot disease under neutral pH caused by inhibition of spore germination of *Plasmodiophora brassicae* in the rhizosphere. *Plant Pathology*, 57(3), 445-452. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01817.x>
- Niwa, Rieko, Kumei, T., Nomura, Y., Yoshida, S., Osaki, M., & Ezawa, T. (2007). Increase in soil pH due to Ca-rich organic matter application causes suppression of the clubroot disease of crucifers. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(3), 778-785. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.09.027>
- Parfrey, L. W., Grant, J., Tekle, Y. I., Lasek-Nesselquist, E., Morrison, H. G., Sogin, M. L. Ané, C. (2010). Broadly sampled multigene analyses yield a well-resolved Eukaryotic tree of life. *Systematic Biology*, 59(5), 518-533.
- Peng, G., McGregor, L., Lahlali, R., Gossen, B. D., Hwang, S. F., Adhikari, K. K. McDonald, M. R. (2011). Potential biological control of clubroot on canola and crucifer vegetable crops. *Plant Pathology*, 60(3), 566-574. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02400.x>
- Peng, Gary, Falk, K. C., Gugel, R. K., Franke, C., Yu, F., James, B. McGregor, L. (2014). Sources of resistance to *Plasmodiophora brassicae* (clubroot) pathotypes virulent on canola. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36(1), 89-99. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.863805>
- Peng, Gary, Lahlali, R., Hwang, S.-F., Pageau, D., Hynes, R. K., McDonald, M. R. Strelkov, S. E. (2014). Crop rotation, cultivar resistance, and fungicides/biofungicides for managing clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36(sup1), 99-112. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.860398>
- Peng, Gary, Pageau, D., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., Hwang, S.-F., & Lahlali, R. (2015). A >2-year crop rotation reduces resting spores of *Plasmodiophora brassicae* in soil and the impact of clubroot on canola. *European Journal of Agronomy*, 70, 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.07.007>

- Piao, Z., Ramchiary, N., & Lim, Y. P. (2009). Genetics of clubroot resistance in *Brassica* species. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(3), 252-264.  
<https://doi.org/10.1007/s00344-009-9093-8>
- Rashid, A., Ahmed, H. U., Xiao, Q., Hwang, S. F., & Strelkov, S. E. (2013). Effects of root exudates and pH on *Plasmodiophora brassicae* resting spore germination and infection of canola (*Brassica napus* L.) root hairs. *Crop Protection*, 48, 16-23.  
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.11.025>
- Rennie, D. C., Manolii, V. P., Cao, T., Hwang, S. F., Howard, R. J., & Strelkov, S. E. (2011). Direct evidence of surface infestation of seeds and tubers by *Plasmodiophora brassicae* and quantification of spore loads. *Plant Pathology*, 60(5), 811-819.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02449.x>
- Řičařová, V., Kaczmarek, J., Strelkov, S. E., Kazda, J., Lueders, W., Rysanek, P. Jedryczka, M. (2016). Pathotypes of *Plasmodiophora brassicae* causing damage to oilseed rape in the Czech Republic and Poland. *European Journal of Plant Pathology*, 145(3), 559-572. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0939-1>
- Ruaro, L., Neto, L., Costa, V. da, & Motta, A. C. V. (2010). Efeito do pH do solo em diferentes níveis de concentração de inóculo no controle de *Plasmodiophora brassicae*. *Summa Phytopathologica*, 36(1), 16-20. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052010000100002>
- Sacristán, S., & García-Arenal, F. (2008). The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Molecular Plant Pathology*, 9(3), 369-384.  
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00460.x>
- Samuel, G., & Garrett, S. D. (1945). The infected root-hair count for estimating the activity of *Plasmodiophora brassicae* Woron. in the soil. *Annals of Applied Biology*, 32(2), 96-101. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1945.tb06767.x>
- Schuller, A., & Ludwig-Müller, J. (2006). A family of auxin conjugate hydrolases from *Brassica rapa*: characterization and expression during clubroot disease. *New Phytologist*, 171(1), 145-158. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01727.x>
- Schwelm, A., Dixelius, C., & Ludwig-Müller, J. (2016). New kid on the block – the clubroot pathogen genome moves the plasmodiophorids into the genomic era. *European Journal of Plant Pathology*, 145(3), 531-542. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0839-9>
- Sharma, K., Gossen, B. D., & McDonald, M. R. (2011). Effect of temperature on primary

- infection by *Plasmodiophora brassicae* and initiation of clubroot symptoms. *Plant Pathology*, 60(5), 830-838. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02458.x>
- Sharma, Kalpana, Gossen, B. D., Howard, R. J., Gludovacz, T., & McDonald, M. R. (2013). Reaction of selected *Brassica* vegetable crops to Canadian pathotypes of *Plasmodiophora brassicae*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(3), 371-383. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.812983>
- Sharma, Kalpana, Gossen, B. D., & McDonald, M. R. (2011). Effect of temperature on cortical infection by *Plasmodiophora brassicae* and clubroot severity. *Phytopathology*, 101(12), 1424-1432. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-11-0124>
- Some, a., Manzanares, m. j., Laurens, f., baron, f., Thomas, g., & Thomas, g. (1996). Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates. *Plant Pathology*, 3, 432-439.
- Strelkov, S. E., Manolii, V. P., Cao, T., Xue, S., & Hwang, S. F. (2007). Pathotype classification of *Plasmodiophora brassicae* and its occurrence in *Brassica napus* in Alberta, Canada. *Journal of Phytopathology*, 155(11-12), 706-712. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01303.x>
- Strelkov, S. E., Tewari, J. P., & Smith-Degenhardt, E. (2006). Characterization of *Plasmodiophora brassicae* populations from Alberta, Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28(3), 467-474. <https://doi.org/10.1080/07060660609507321>
- Strelkov, Stephen E., & Hwang, S.-F. (2014). Clubroot in the Canadian canola crop: 10 years into the outbreak. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36(sup1), 27-36. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.863807>
- Strelkov, Stephen E., Hwang, S.-F., Manolii, V. P., Cao, T., & Feindel, D. (2016). Emergence of new virulence phenotypes of *Plasmodiophora brassicae* on canola (*Brassica napus*) in Alberta, Canada. *European Journal of Plant Pathology*, 145(3), 517-529. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0888-8>
- Strelkov, Stephen E., Hwang, S.-F., Manolii, V. P., Cao, T., Fredua-Agyeman, R., Harding, M. W., ... Feindel, D. (2018). Virulence and pathotype classification of *Plasmodiophora brassicae* populations collected from clubroot resistant canola (*Brassica napus*) in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40(2), 284-298. <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1459851>

- Strelkov, S. E. (2018). La hernia de las crucíferas y su impacto en la producción de crucíferas en Canada. Taller: Hernia DE LAS crucíferas en Colombia, una enfermedad del suelo olvidada. Bogotá, Colombia.
- Tanaka, S., Kochi, S., Kunita, H., Ito, S., & Kameya-Iwaki, M. (1999). Biological mode of action of the fungicide, flusulfamide, against *Plasmodiophora brassicae* (clubroot) - Springer. *European Journal of Plant Pathology*, 105(6), 577-584.
- Tewari, J. P., Strelkov, S. E., Orchard, D., Hartman, M., Lange, R. M., & Turkington, T. K. (2005). Identification of clubroot of crucifers on canola (*Brassica napus*) in Alberta. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27(1), 143-144.  
<https://doi.org/10.1080/07060660509507206>
- Thomas, S. R., & Elkinton, J. S. (2004). Pathogenicity and virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(3), 146-151. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.01.006>
- Torres, E. (1972). Reacción de algunas crucíferas al ataque de *Plasmodiophora brassicae* woronin en Manizales, Colombia. *Acta Agronómica*, 22(3-4), 185-207.
- Townley, D., & Fox, R. T. V. (2003). Control of clubroot disease using cyazofamid and fluazinam fungicides - Abstracts of offered papers. Presentado en 8th International Congress for Plant Pathology, Christchurch, New Zealand. Recuperado de <http://centaur.reading.ac.uk/10889/>
- Toxopeus, H., Dixon, G. R., & Mattusch, P. (1986). Physiological specialization in *Plasmodiophora brassicae*: an analysis by international experimentation. *Transactions of the British Mycological Society*, 87(2), 279-287. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(86\)80031-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(86)80031-6)
- Van der Plank, J. E. (1968). *Disease resistance in plants*. New York: Academic Press.
- Velandia, J., Galindo, R., & Ávila de Moreno, C. (1998). Evaluación de la gallinaza en el control de *Plasmodiophora brassicae* en repollo. *Agronomía Colombiana*, 15(1), 1- 6.
- Wallenhammar, A.-C. (1996a). Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. *Plant Pathology*, 45(4), 710-719. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1996.d01-173.x>
- Wallenhammar, A.-C. (1996b). Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. *Plant Pathology*, 45(4), 710-719. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1996.d01-173.x>
- Wallenhammar, A.-C., Almquist, C., Söderström, M., & Jonsson, A. (2012). In-field

- distribution of *Plasmodiophora brassicae* measured using quantitative real-time PCR. *Plant Pathology*, 61(1), 16-28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02477.x>
- Wallenhammar, A.-C., Johnsson, L., & Gerhardson, B. (2000). Agronomic performance of partly clubroot-resistant spring oilseed turnip rape lines. *Journal of Phytopathology*, 148(7-8), 495-499. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2000.00536.x>
- Wallenhammar, Ann-Charlotte. (1998). Observations on yield loss from *Plasmodiophora brassicae* infections in spring oilseed rape. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 105(1), 1-7.
- Wang J, Huang Y, Li XL, Li HZ. 2011a. Research progress in clubroot of crucifers. *Plant Prot.* 37:153–158.
- Wang, J., Huang, Y., Peng, Y., Zhao, L., Xiong, H., & Qin, Y. (2011). Suppression of clubroot on Chinese cabbage and oilseed rape by *Trichoderma* spp. in China. *Advances in Biomedical Engineering*, 1-2, 56-58.
- Webster, M. A., & Dixon, G. R. (1991a). Boron, pH and inoculum concentration influencing colonization by *Plasmodiophora brassicae*. *Mycological Research*, 95(1), 74-79. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81363-4](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81363-4)
- Webster, M. A., & Dixon, G. R. (1991b). Calcium, pH and inoculum concentration influencing colonization by *Plasmodiophora brassicae*. *Mycological Research*, 95(1), 64-73. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81362-2](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81362-2)
- Webster, M. A., & Dixon, G. R. (1991c). Calcium, pH and inoculum concentration influencing colonization by *Plasmodiophora brassicae*. *Mycological Research*, 95(1), 64-73. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81362-2](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81362-2)
- Williams, P. H. (1966). A system for the determination of races of *Plasmodiophora brassicae* that infect Cabbage and Rutabaga. *Phytopathology*, 56, 624–626.
- Young, I. M., Crawford, J. W., Nunan, N., Otten, W., & Spiers, A. (2008). Chapter 4 Microbial Distribution in soils: Physics and scaling. En Donald L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol. Volume 100, pp. 81-121). Academic Press.
- Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211308006044>