

ETIOLOGÍA DE LA SARNA POLVORIENTA DE LA PAPA EN VENEZUELA

Francisco Bittara, Dorian Rodríguez, Alexander Hernández, Vivian Bravo e Iván Galindo

RESUMEN

La presencia de la sarna polvorienta o roña de la papa en Venezuela ha sido señalada, pero la identificación exacta del organismo patógeno no ha sido confirmada aún. Se colectaron plantas enteras de los cvs. 'Andinita' y 'Única', de los estados Mérida y Táchira, respectivamente, las que fueron divididas en raíces, estolones, tubérculos sintomáticos, tubérculos asintomáticos y agallas radicales. Se realizaron secciones transversales de los órganos para su descripción, y con la ayuda de una hojilla de afeitar se rasparon y describieron los esporosoros presentes en las lesiones. Se realizaron bioensayos *in vitro* con los esporosoros raspados y con suelo infestado, colectado de los estados Táchira, Mérida, Trujillo y Lara, sobre plantas de los cv. 'Granola' y 'Kennebec'. Se realizaron pruebas de PCR con los iniciadores específicos *Sps1* y *Sps2* a las muestras de

campo y a las raíces de plantas provenientes del bioensayo, incluyendo como positivos, esporosoros de *Spongospora subterranea* obtenidos de EEUU, Japón, RU y Dinamarca. Los resultados mostraron características del organismo patógeno correspondientes con las señaladas previamente para *S. subterranea*. El organismo fue observado en raíces y tubérculos sintomáticos y asintomáticos. El bioensayo mostró su presencia en ambos cultivares inoculados con esporosoros o con suelo; sin embargo, 'Granola' presentó menor nivel de infección, especialmente con suelo proveniente del estado Táchira. Las pruebas de PCR generaron una banda de ~390pb en todas las muestras sintomáticas y no sintomáticas, coincidentes con las muestras positivas, confirmando la identidad del organismo patógeno.

Introducción

La sarna polvorienta o roña de la papa es causada por *Spongospora subterranea* (Wallroth) Lagerheim f. sp. *subterranea* Tomlinson (Harrison *et al.*, 1997). Esta enfermedad tiene la capacidad de reducir directamente la calidad de los tubérculos producidos al generar lesiones superficiales que varían desde pústulas y cánceres hasta la deformación total del tubérculo, lo que dificulta su comercialización, tanto como tubérculo-semilla, como para consumo fresco e industrialización (Merz, 2000). Igualmente, *S. subterranea* puede reducir la productividad del cultivo (Falloon *et al.*, 1996, Falloon *et al.*, 2004, Lister *et*

al., 2004) al afectar la función radical de la planta y al servir de vector del virus *mop top* de la papa (PMTV) (Jones y Harrison, 1969).

S. subterranea es un protozoario biotrofo, miembro de la familia Plasmodiophoridae (Cercozoa) (Cavalier-Smith y Chao, 2003). Es un parásito obligado de desarrollo intracelular, que requiere del hospedante para completar su ciclo de vida (Braselton, 2001). Este parásito tiene la capacidad de infectar las raíces y los tubérculos en formación (estolones) de la planta, así como también la de producir agallas radicales. La supervivencia del organismo patógeno es favorecida por la producción de esporas de resistencia en agregados (espo-

rosoros), las cuales son generadas a partir del tubérculo o de las agallas radicales (Merz, 1997).

La identificación de *S. subterranea* puede ser llevada a cabo a través de diversas metodologías, según sea las características del material u órgano de la planta evaluado y el estado de desarrollo de la enfermedad al momento del análisis. Entre las estrategias existentes, se encuentra la observación directa de la sintomatología y/o signos de la presencia del organismo patógeno y los bioensayos, los cuales permiten determinar, entre otros aspectos, su presencia en el suelo y el potencial de infección del inóculo. Por otra parte, el desarrollo de anticuerpos ha

permitido la detección del microorganismo a partir de muestras de suelo y peridermis del tubérculo a través de la prueba de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; Harrison *et al.*, 1993; Walsh *et al.*, 1996). De igual manera, han sido diseñados diversos grupos de iniciadores moleculares para la detección específica del organismo patógeno a partir de la amplificación de los espaciadores internos transcritos (ITS), mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Bulman y Marshall, 1998; Bell *et al.*, 1999; Qu *et al.*, 2000; van de Graaf *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2004; Nitzan *et al.*, 2009). Estas técnicas, con sus limitaciones y bondades (Bell *et al.*, 1999;

PALABRAS CLAVE / 'Andinita' / Esporosoros / 'Granola' / *Spongospora subterranea* / Roña /

Recibido: 06/05/2011. Modificado: 10/03/2012. Aceptado: 12/03/2012.

Francisco Gabriel Bittara. Ingeniero Agrónomo y M.Sc., Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), Venezuela. Estudiante de Doctorado, North Dakota State University, EEUU. e-mail: bittarafo@hotmail.com

Dorian A. Rodríguez G. Ingeniero Agrónomo, Universidad del

Zulia (LUZ), Venezuela. M.Sc. y Ph.D en Fitopatología, North Dakota State University, EEUU. Profesor, UCLA, Venezuela. Dirección: Postgrado de Fitopatología. UCLA, Apartado 400 Barquisimeto, Estado Lara, Venezuela. e-mail: rdorian@ucla.edu.ve

Alexander Hernández. Ingeniero Agrónomo, Universidad de Oriente, Venezuela. Doctor en Ciencias Agrícolas, Universidad Central de Venezuela (UCV). Profesor, UCLA, Venezuela. e-mail: ahernandez@ucla.edu.ve

Vivian Bravo. Ingeniera Agrónoma y M.Sc., LUZ, Venezuela. Estudiante de Doctorado, Uni-

versidad Simón Bolívar (USB), Venezuela. e-mail: vivianbra@cantv.net

Iván Galindo. Licenciado en Biología, UCV, Venezuela. Doctor en Ciencias Biológicas, USB, Venezuela. Investigador, Instituto de Estudios Avanzados, Venezuela. e-mail: igalindo@idea.gob.ve

ETIOLOGY OF THE POTATO POWDERY SCAB IN VENEZUELA

Francisco Bittara, Dorian Rodríguez, Alexander Hernández, Vivian Bravo and Iván Galindo

SUMMARY

The presence of potato powdery scab in Venezuela has been reported, but the identity of the pathogen has not been confirmed yet. Whole plants of cvs 'Andinita' and 'Única' were collected from the states of Mérida and Táchira, respectively, and were divided into roots, stolons, symptomatic and asymptomatic tubers, and root galls. Transversal sections of the organs were obtained for descriptions, and with the help of a razor blade, sporeballs were scratched from the skin lesions. In vitro bioassays were conducted with the scratched sporeballs and infested soil collected from the states of Táchira, Mérida, Trujillo and Lara, on plants of the 'Granola' and 'Kennebec'

varieties. PCR tests with Sps1 and Sps2 specific primers were run on field samples and bioassay plant roots. Spongospora subterranea sporeballs obtained from the USA, Japan, UK and Denmark were used as positive controls. Results showed pathogen characteristics corresponding to S. subterranea. The pathogen was observed on both symptomatic and asymptomatic tubers. Bioassay showed presence of the pathogen in both cultivars inoculated with either sporeballs or infested soil; however, infection was lower in 'Granola', especially if inoculated with soil from Táchira. A PCR band ~390bp in all samples confirmed the identity of the causal agent as S. subterranea.

ETIOLOGIA DA SARNA PULVERULENTE DA BATATA NA VENEZUELA

Francisco Bittara, Dorian Rodríguez, Alexander Hernández, Vivian Bravo e Iván Galindo

RESUMO

A presença da sarna pulverulenta da batata na Venezuela tem sido apontada, mas a identificação exata do organismo patógeno não tem sido confirmada ainda. Foram coletadas plantas inteiras dos cvs. 'Andinita' e 'Única', dos estados Mérida e Táchira, respectivamente, as que foram divididas em raízes, estolões, tubérculos sintomáticos, tubérculos assintomáticos e entranhas radicais. Realizaram-se seções transversais dos órgãos para sua descrição, e com a ajuda de uma lâmina de barbear se rasparam e descreveram os esporosoros presentes nas lesões. Realizaram-se bio ensaios in vitro com os esporosoros raspados e com solo infestado, coletado dos estados Táchira, Mérida, Trujillo e Lara, sobre plantas dos cv. 'Granola' e 'Kennebec'. Realizaram-se provas de PCR com os iniciadores específicos Sps1 e Sps2 às amostras de campo e às

raízes de plantas provenientes do bio ensaio, incluindo como positivos, esporosoros de Spongospora subterranea obtidos de EEUU, Japão, RU e Dinamarca. Os resultados mostraram características do organismo patógeno correspondentes com as indicadas previamente para S. subterranea. O organismo foi observado em raízes e tubérculos sintomáticos e assintomáticos. O bio ensaio mostrou sua presença em ambos cultivares inoculados com esporosoros ou com solo; no entanto, 'Granola' apresentou menor nível de infecção, especialmente com solo proveniente do estado Táchira. As provas de PCR geraram uma banda de ~390pb em todas as amostras sintomáticas e não sintomáticas, coincidentes com as amostras positivas, confirmando-se a identidade do organismo patógeno.

Forsund, 1971; de Haan y van den Bovenkamp, 2005; Qu *et al.*, 2006), han permitido el estudio de diversos aspectos relacionados a la biología del organismo patógeno.

Reportes previos han señalado la ocurrencia de la sarna polvorienta de la papa en Venezuela (Díaz y Alcalá, 1984; García *et al.*, 2004; Ortega y Rodríguez, 2004; Paz, 1984; Bittara *et al.*, 2009). No obstante, la identidad del agente causal no ha sido comprobada. El objetivo de esta investigación fue determinar el agente causal de la sarna polvorienta de la papa mediante bioensayos y pruebas de PCR.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se emplearon plántulas de papa provenientes de cultivo *in vitro* de los cvs. 'Granola' y 'Kennebec'; de éstas, un grupo fue utilizado para la realización de los bioensayos y otro grupo para la obtención de ADN genómico. Por otra parte, plantas enteras de los cultivares 'Andinita' y 'Única' fueron colectadas en campos comerciales de las localidades de Mucuchies, Municipio Rangel, estado Mérida (MAnd08) y Páramo el Rosal, Municipio Jáuregui, estado Táchira (TUni06), respectivamente. Una vez en el laboratorio, el material fue

lavado vigorosamente con agua corriente, secado y almacenado a 4°C o -20°C, según la prueba a realizar, hasta su uso. Al momento del análisis, las muestras fueron clasificadas en raíces, estolones, tubérculos sintomáticos, tubérculos asintomáticos y agallas radicales; previo a su observación, estas últimas fueron mantenidas por cuatro semanas a 4°C.

Los tubérculos que presentaron lesiones fueron utilizados en la descripción de la sintomatología, para ello, se emplearon diversos estados de desarrollo de la enfermedad. Por otra parte, a cada grupo de muestras, le fueron realizadas secciones para la observación y descripción de la infec-

ción. Las lesiones de tubérculos enfermos fueron separadas del órgano con ayuda de una hojilla de afeitar convencional y observadas directamente al microscopio óptico mediante epiluminiscencia. También, esporosoros parcialmente purificados fueron observados y medidos directamente al microscopio óptico de luz (100×). Las imágenes fotográficas fueron digitalizadas empleando el programa de imágenes GNU (Free Software Foundation, Inc. Boston, EEUU).

Fuentes de inóculo del organismo patógeno

Como fuente de inóculo para los bioensayos se empleó

suelo agrícola naturalmente infestado y esporosoros del organismo patógeno. El suelo provino de las localidades de Apartaderos, Municipio Rangel, estado Mérida; Páramo El Rosal, Municipio Jáuregui, estado Táchira; La Puerta, Municipio Valera, estado Trujillo; y Sanare, Municipio Andrés Bello, estado Lara. Previo a su uso, las muestras de suelo fueron secadas a la sombra por dos semanas, cernidas (850µm) y almacenadas en oscuridad a 4°C.

Los esporosoros empleados fueron obtenidos a partir de lesiones de tubérculos sintomáticos de muestras de MAnd08 y TUni06. Para su obtención, los tubérculos fueron lavados con agua corriente y secados sobre papel absorbente durante la noche. Posteriormente, las lesiones superficiales identificadas fueron raspadas con ayuda de una hojilla de afeitar convencional y homogenizadas por 15min en un agitador magnético con agua destilada. La suspensión obtenida fue tamizada y la fracción comprendida entre 40 y 80µm fue separada, secada a temperatura ambiente y, finalmente, conservada en oscuridad a 4°C (Merz, 1989). Un grupo de muestras de esporosoros gentilmente suministradas por Barbara Christ (Penn State University, EEUU; SSUSA), Takato Nakayama (National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, Japón; SSJpn), Pieter van de Graaf (Scottish Agricultural Science Agency, RU; SSSco) y Steen Nielsen (University of Aarhus, Dinamarca; SSDen) fueron empleadas como controles positivos en la identificación molecular del organismo patógeno.

Bioensayos

Se utilizó el sistema descrito por Merz *et al.* (2004), con ligeras modificaciones. Las plántulas de papa de los cv. 'Granola' y 'Kennebec', provenientes de cultivo *in vitro* con cuatro semanas de edad,

fueron cultivadas en recipientes plásticos negros (70mm de diámetro y 50mm de profundidad) contentivos de 100ml de solución nutritiva (SN) estéril (Merz, 1989). En cada recipiente se colocaron tres plantas, que fueron mantenidas por una semana a 15°C, 75% de humedad relativa y fotoperíodo de 16h, previo a la inoculación. Como inóculo se emplearon esporosoros (TUni06) y suelo naturalmente infestado de los estados Mérida, Táchira, Trujillo y Lara. La fuente de inóculo seleccionada según el caso fue suspendida en SN (20mg de raspaduras de lesiones/litro para las esporas y 10g de suelo/litro), en agitación. Posteriormente, 90ml de esta suspensión fue vertida en un recipiente plástico e incubada en oscuridad por nueve días a 15°C, en ausencia del hospedante. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se transfirieron tres plantas por envase (dos recipientes) e incubadas por 24h (periodo de trampeo) bajo las condiciones señaladas; seguidamente, se lavaron las raíces vigorosamente con agua corriente y se trasladaron a nuevos recipientes plásticos con 100ml de SN estéril fresca, para ser cultivadas por una semana (Merz *et al.*, 2004).

Después del periodo de cultivo, el material vegetal fue retirado, las raíces colectadas lavadas vigorosamente con agua corriente y observadas al microscopio óptico de luz para la determinación cualitativa de la presencia del microorganismo; este mismo material fue posteriormente empleado para la detección molecular del patógeno. Se utilizó un modelo completamente al azar, se examinaron cuatro plantas (repeticiones) por variedad, usando cinco fuentes de inóculo (suelos y esporas). Como control se emplearon plantas cultivadas en SN estéril. Se evaluó la presencia/ausencia del patógeno y los resultados fueron sometidos a la prueba de análisis de varianza de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) empleando el progra-

ma Statistix 8 (Analytical Software, Florida, Estados Unidos). El experimento se realizó una vez.

Detección específica de *Spongospora subterranea* por PCR

Para los análisis moleculares se empleó ADN genómico obtenido a partir de las siguientes fuentes: cada genotipo estudiado (a partir de *vitro*-plantas), muestras de esporosoros de *S. subterranea* (nacionales y foráneas) y muestras del material vegetal procedentes de campo. Las extracciones se realizaron a partir de 0,3g de tejido seco. El ADN se purificó mediante el método descrito por Doyle y Doyle (1990), con ligeras modificaciones. El tejido molido fue resuspendido en una solución tampón de extracción (100mM Tris HCl, pH 8; 1,4M NaCl; 20mM EDTA; 2% CTAB; y 0,2% β-Mercaptoetanol), y la mezcla se incubó por 30min a 65°C. La extracción fue hecha con una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), luego de centrifugar durante 10min a 10000rpm (4°C). La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo y se sometió a un tratamiento con ARNasa. Posteriormente, la fase superior se transfirió a un nuevo tubo, el ADN se precipitó con isopropanol frío (0,7 vol), y a continuación se centrifugó durante 30min a 13000rpm. El ADN se resuspendió en 100µl de buffer T₁₀E₁ (TE), y se almacenó a -20°C, hasta su uso. Con el fin de estimar la calidad y concentración de las muestras de ADN, se analizaron alícuotas de éstas en geles al 0,8% de agarosa y tampón Tris-acetato-EDTA (TAE; 40mM Tris-acetato y 1mM EDTA, pH 8,0). Las muestras de ADN se diluyeron a una concentración de 50-100ng-µl⁻¹ en agua estéril para las reacciones de PCR.

Las condiciones e iniciadores empleados en este estudio corresponden a las especificaciones reportadas por Bell *et*

al. (1999). Las concentraciones finales de los componentes de la mezcla para la reacción de PCR fueron: ADN total 50-100ng (donde fue cuantificado); 1X de buffer de reacción de PCR (Promega, Madison, EEUU); 1,5mM MgCl₂ (Promega); 250µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP y dCTP; Promega); 0,25µM de cada iniciador; 1,25U de Taq polimerasa (Promega); y agua libre de nucleasa para un volumen final de 25µl.

Los iniciadores específicos a *S. subterranea* empleados en este estudio fueron el par Sps1 con una secuencia de 20pb (5'-CCTGGGTGC-GATTGTCTGTT-3') y Sps2 de 20pb de longitud (5'-CACGCCAATGGTTAGAGACG-3') (Operon, Alabama, EEUU), los cuales generan un producto de amplificación de 391pb a partir de los espaciadores internos transcritos (ITS 1 y 2; Bell *et al.*, 1999). Las temperaturas y tiempos de reacción empleados fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 2min, seguido de 35 ciclos de separación (95°C por 20s), alineamiento (64°C por 25s) y extensión (72°C por 50s) con un ciclo final de 72°C por 10min. Los fragmentos de ADN amplificados fueron separados y visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa 2% en buffer TAE, teñidos con bromuro de etidio (EtBr) o SYBR Green (Promega) según el caso, junto a un marcador estándar de 100pb (Promega). Todas las reacciones fueron repetidas al menos dos veces.

Resultados y Discusión

Análisis de material vegetal de campo

A partir del material colectado en campo se pudo observar diferentes síntomas que variaron desde pústulas conspicuas solitarias sobre la superficie del tubérculo (Figura 1a) hasta lesiones levantadas y abiertas de forma circular (Figura 1c); en algunos casos éstas se mostraron formando

conglomerados, lo que dificultó evidenciar individualidades. Los bordes de las lesiones variaron entre lisos y levantados, presentando una masa polvorienta marrón claro en su interior. Algunos tubérculos muestreados se encontraron deformes (Figura 1b), observándose la presencia de una masa polvorienta sobre su superficie. Al examinar detenidamente las lesiones maduras presentes en el material colectado, pudo evidenciarse la presencia de estructuras esféricas simples formando aglomerados (Figura 1d), síntomas que concuerdan con la descripción realizada por Jones (1978).

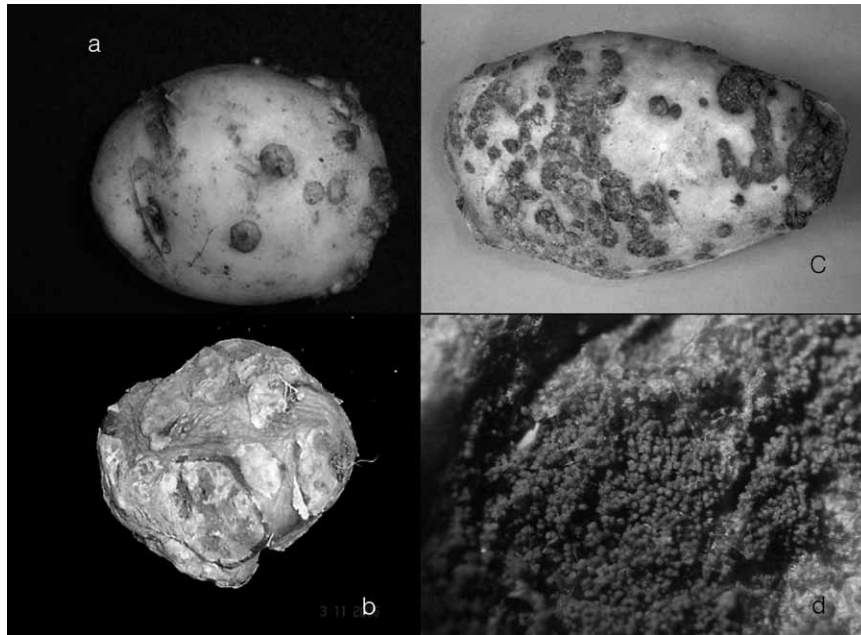


Figura 1. Sintomatología de la sarna polvorienta en tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) cv. Única, colectados en campo. a: pústulas superficiales inmaduras, b: lesiones conspicias maduras, c: tubérculo deformado (cánceres), d: vista interior de una lesión.

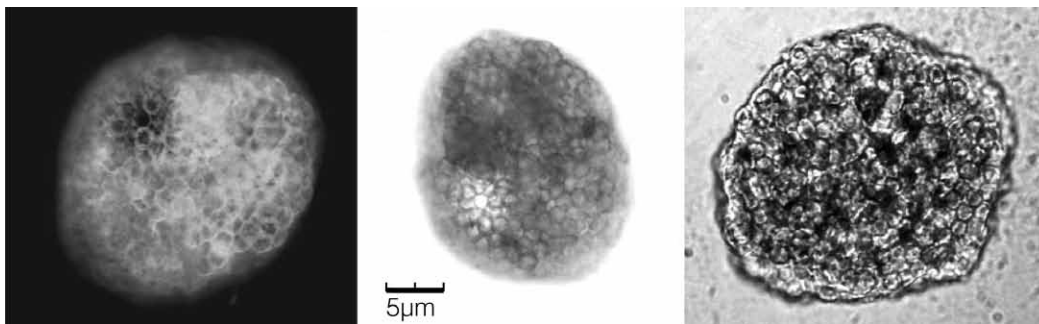


Figura 2. Estructuras (esporosoros) obtenidas a partir de lesiones maduras de tubérculos sintomáticos de papa (*Solanum tuberosum* L.) colectados en campo (400X).

Los esporosoros observados en tubérculos sintomáticos (Figura 2) presentaron un diámetro ecuatorial entre 25 y 110µm, su forma varió entre esférica, ovalada, alargada, circular e irregular. Tales estructuras presentaron pigmentación color castaño claro a oscuro, exhibiendo numerosos canales a manera de túneles y un centro hueco, cada una compuesta por numerosas esporas individuales de forma hexagonal y pared gruesa, arregladas en conglomerados. Las características descritas concuerdan con descripciones previas de Lahert y Kavanagh (1985) y de Hutchison y Kawchuk (1998), cuyos reportes de los

quistosoros, esporosoros o bolas de esporas describen una estructura acanalada, irregular y hueca, con apariencia de esponja, debido a las cavidades de la superficie exterior y a la red de canales internos. Así, la apariencia que genera la enfermedad sobre los tubérculos es producto de la acumulación de masas de esporas formadas en las lesiones junto a remanentes de peridermis de los mismos (Jones 1978, Kirkham, 1986).

Por otra parte, al realizar secciones al tejido de tubérculos asintomáticos, se pudo evidenciar la presencia de estructuras intracelulares semejantes a plasmodios y/o zoosporangios (Figura 3). Debido a que las estructuras observadas en secciones de tubérculos asintomáticos no han sido

porangios (Figura 3). Debido a que las estructuras observadas en secciones de tubérculos asintomáticos no han sido

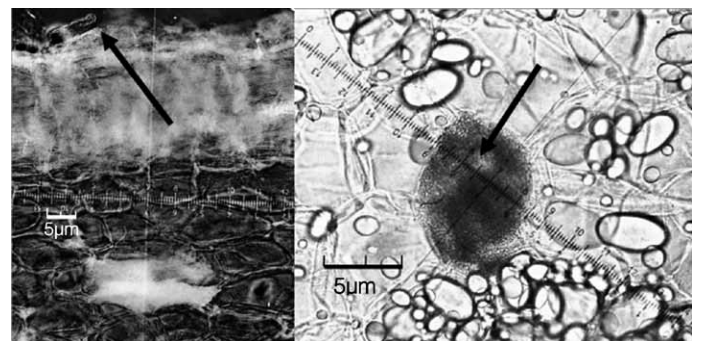


Figura 3. Secciones de tubérculos asintomáticos colectados en campo presentando estructuras intracelulares semejantes a plasmodios/zoosporangios, señalados con flechas. 400x.

descritas previamente, la identidad de estas fue evaluada a través de la detección específica del patógeno por PCR.

Bioensayos

En las raíces de plántulas procedentes del bioensayo se observaron estructuras intracelulares semejantes a zoosporangios (Figura 4), las cuales fueron similares a aquellas encontradas en el material proveniente de campo. La distribución de estas estructuras se centró principalmente en las células de la rizodermis. Según Braselton (2001), los plasmodios esporangiales o primarios de *S. subterreanaea* generalmente

ocurren en las células de la rizodermis, mientras que los plasmodios esporogénicos o secundarios en las células corticales y, por ende, ocurrirá de igual manera la distribución de los zoosporangios. Dicha acotación permite inferir que la distribución de las estructuras observadas sigue un patrón de comportamiento reportado con anterioridad, por lo que probablemente, correspondan al organismo bajo estudio.

Por otra parte, los cuerpos intracelulares observados en las raíces de las plántulas estuvieron presentes tanto en las inoculadas con la suspen-

sión de esporos como en las tratadas con suelo infestado, lo que indicó que los signos observados del tratamiento con suelo correspondieron a aquellos logrados a través de la infección por esporas. Dado que los esporos fueron obtenidos a partir de lesiones de tubérculos procedentes del mismo lote de terreno de donde se tomó una de las muestras de suelo empleadas en este experimento, fue posible señalar que las estructuras presentes en estos órganos probablemente correspondían al agente etiológico de esta enfermedad. Las estructuras mencionadas fueron observadas en las raíces de ambas variedades que fueron inoculadas con suelos de distinta procedencia. No obstante, fue posible diferenciar ($p \leq 0,05$) el efecto tanto de la variedad como de la fuente de inóculo en la infección tisular de las plántulas (Figura 5). De manera general, la infección en las raíces fue de 31,25% para el cultivar 'Granola' y 100% para 'Kennebec' (datos no mostrados). La procedencia del suelo infestado también tuvo un efecto sobre el nivel de infección en las plantas, especialmente con el cv. 'Granola', el cual no se vio afectado por el inóculo presente en el suelo del Táchira (Figura 5). Esta reacción diferencial de 'Granola' fue descrita por Merz *et al.* (2004), quienes observaron un nivel medio de resistencia de 'Granola', pero posiblemente asociado a la existencia de patotipos del organismo patógeno. No obstante, los resultados aquí presentados se basaron en la observación de la presencia/ausencia de infección, por lo que se requiere de un estudio que cuantifique la infección y descarte la con-

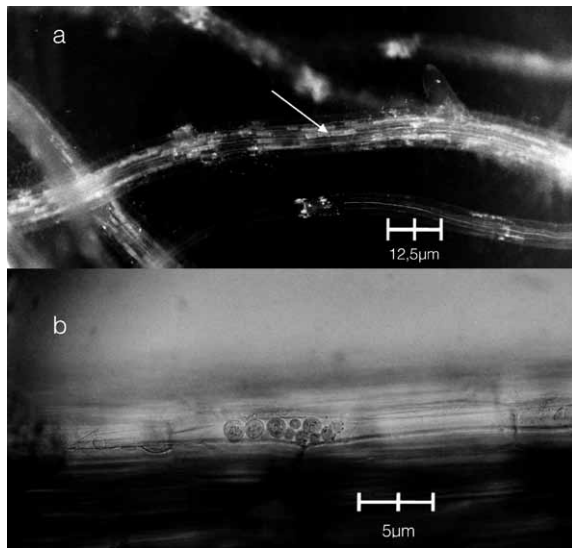


Figura 4. Estructuras intracelulares semejantes a zoosporangios encontradas en raíces de plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L.) cv. 'Kennebec' inoculadas artificialmente. a: aspecto general de la raíz (40×), b: estructuras intracelulares en la rizodermis (400×).

centración inicial del inóculo como fuente de variación.

Falloon *et al.* (2003), por su parte, señalaron que la inmunidad del hospedante parece no existir, por lo que los resultados de esta prueba sugirieron que efectivamente pudo haber infección y la misma no haber sido discriminada a través de la inspección visual. Tal desventaja de este tipo de evaluación fue señalada por Bullman y Marshall (1998), Bell *et al.* (1999) y Qu *et al.* (2006).

Finalmente, no fueron observadas agallas en las raíces de las plantas provenientes del bioensayo, para ninguna de las fuentes de inóculo empleadas. Probablemente el periodo de cultivo resultó muy corto para el desarrollo de las mismas. Reportes previos han señalado que es necesario al menos seis semanas para la aparición de estas estructuras (Merz *et al.*, 2004; Montero-Astúa *et al.*, 2004; Nitzan *et al.*, 2009).

Detección específica de *S. subterranea* por PCR

Las pruebas de PCR con los iniciadores Sps1 y Sps2 realizadas a los extractos de ADN obtenidos de los esporos MAnd08 y TUni06 y

a los aislamientos SSUsa, SSJpn, SSSco y SSD, empleados como controles positivos, generaron un producto de amplificación de ~390pb (Figura 6), el cual coincidió con el especificado por Bell *et al.* (1999). De esta forma, la identidad de las esporas del organismo patógeno pudo ser determinada. No obstante, las esporas de resistencia representan una de las varias estructuras somáticas adquiridas por este organismo durante su ciclo de vida, por lo que

fueron realizados ensayos posteriores a fin de confirmar otras formas adicionales.

A partir de los extractos de ADN genómico procedente del material vegetal obtenido en campo, fue posible también la amplificación de un fragmento de ~390pb, indicando de esta manera que todas las muestras analizadas se encontraron efectivamente infectadas por *S. subterranea* (Figura 7a). De esta forma se corroboró la correspondencia de las lesiones y estructuras presentes en raíces, estolones y tubérculos al organismo en estudio. Un aspecto a resaltar es la detección del parásito a partir de tubérculos asintomáticos, lo que indicó un posible estado de infec-

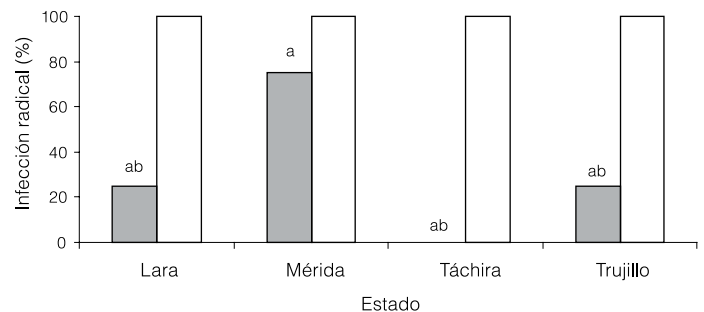


Figura 5. Infección en raíces de plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L.) cvs. 'Kennebec' y 'Granola' inoculadas con suelo naturalmente infestado. Barra gris: cv. 'Granola'. Barra blanca: cv. 'Kennebec'. Todas las plantas de 'Kennebec' fueron infectadas, por lo que el análisis estadístico se realizó solo con las plantas de 'Granola'. Prueba de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$)

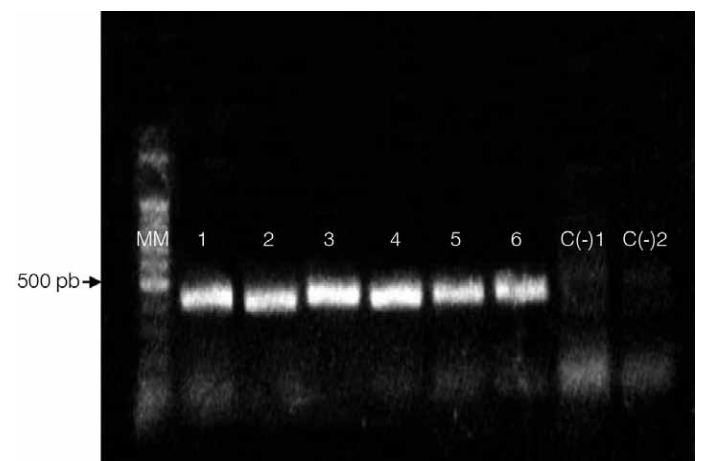


Figura 6. Amplificación de un fragmento específico a *Spongopora subterranea* a partir de ADN proveniente de esporas de resistencia de diferentes orígenes geográficos. MM: marcador de peso molecular (100bp; Promega, Madison, EEUU). 1: MAnd08, 2: TUni06, 3: SSUsa, 4: SSJpn, 5: SSSco, 6: SSDen, C(-)1: control negativo agua, C(-)2: control negativo ADN cv. 'Kennebec'.

ción latente del mismo, observación previamente señalada por van de Graaf *et al.* (2005). No obstante, su importancia desde el punto de vista de la epidemiología de la enfermedad se desconoce.

De manera similar, en el material vegetal proveniente del bioensayo se obtuvo el amplicón esperado (390pb), corroborando de esta forma la infección de las raíces de las plántulas, la identidad de las estructuras observadas y la infectividad de los esporos del patógeno bajo el sistema de cultivo empleado (Figura 7b). En tal sentido, las muestras del cv. 'Kennebec' sometidas a dicho análisis mostraron ser positivas en su totalidad, mientras que solo el 66,67% de las plantas del cv. 'Granola' lo fueron (Figura 7b, línea 4-6). Es necesario recordar que las plantas evaluadas a través de esta metodología fueron inoculadas con el aislamiento TUni06, el cual fue obtenido a partir de tubérculos colectados en el Páramo El Rosal, estado Táchira, resultado que coincide con la prueba biológica, donde el cv. 'Granola' no se infectó con el suelo proveniente de esa localidad.

Bell *et al.* (1999) reportaron una alta sensibilidad de la prueba específica, siendo capaz de detectar ADN equivalente a más de un esporosoro (a partir de diluciones), por lo que cabe presumir que la no amplificación del producto en las restantes muestras del cv. 'Granola', pueda ser debida a algún problema de inhibición de la enzima ADN polimerasa, o al poco tiempo de contacto con el organismo patógeno, o a una baja cantidad de organismos viables disponible para la infección, todo ello debido a que la inmunidad del genotipo no ha sido reportada (Falloon *et al.*, 2003). Nakayama *et al.* (2007) señalaron que para este tipo de bioensayos la infección puede llevarse a cabo en un periodo de 4h; no obstante, Bouček *et al.*

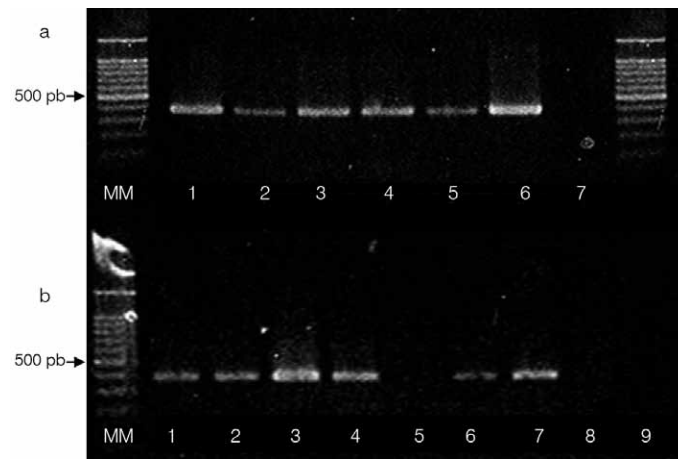


Figura 7. Amplificación de un fragmento específico a *Spongospora subterranea* a partir de ADN de tejido de papa (*Solanum tuberosum* L.) proveniente de campo y laboratorio. a: muestras de campo; 1: peridermis de tubérculo sintomático, 2: peridermis de tubérculo asintomático, 3: raíz, 4: agalla radical, 5: estolón, 6: control positivo (ADN esporosoros TUni06), 7: control negativo (ADN Vitroplanta cv. 'Kennebec' no inoculada). b: plantas inoculadas artificialmente (bioensayo); 1-3: cultivar 'Kennebec', 4-6: cultivar 'Granola', 7: control positivo (ADN esporosoros TUni06), 8: control negativo (ADN Vitroplanta cv. 'Kennebec' no inoculada), 9: control reacción (sin ADN). MM: arcador molecular 100bp (Promega, Madison, EEUU).

(2000) reportaron un aumento de la capacidad discriminativa del ensayo propuesto por Merz (1989), mediante el incremento del periodo de incubación de 7-15 días. Como la prueba realizada confronta el hospedante sano al inóculo primario viable, es posible que el incremento del tiempo del periodo de incubación aumente las probabilidades de infección al incrementar los niveles de inóculo. Tal aseveración se encuentra respaldada por reportes previos que argumentan una posible germinación escalonada del patógeno bajo condiciones ambientales favorables.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Ainhoa Bacaicoa, María Sanabria y Naileth Méndez por su colaboración en los procedimientos de laboratorio, y al proyecto BID-Fonacit II y al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado por el financiamiento del Proyecto N° 008-AG-2007.

REFERENCIAS

- Bell K, Roberts J, Verral S, Cullen D, Williams N, Harrison J, Toth I, Cooke D, Duncan J, Claxton J (1999) Detection and quantification of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* in soils and on tubers using specific PCR primers. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 905-915.
- Bittara F, Rodríguez D, Sanabria M, Monroy J, Rodríguez J (2009) Evaluación de fungicidas y productos vegetales en el combate de la sarna polvorienta de la papa. *Interciencia* 34: 265-269.
- Bouček-Mechiche D, Ruer D, Andrivon D, Jouan B (2000) The detection of *Spongospora subterranea* by bioassays, molecular and serological methods. En Merz U, Lees A. (Eds.) *Proc. First European Powdery Scab Workshop*. Scottish Agricultural College. Aberdeen, Scotland. pp 61-66.
- Braselton J (2001) Plasmodiophoromycota. En McLaughlin DJ, McLaughlin EG, Lemke PA (Eds.) *The Mycota VII Part A. Systematics and Evolution*. Springer. Berlin, Alemania. pp 81-90.
- Bulman S, Marshall J (1998) Detection of *Spongospora subterranea* in potato tuber lesions using the polymerase chain reaction (PCR). *Plant Pathol.* 47: 759-766.

- Cavalier-Smith T, Chao E (2003) Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist* 154: 341-358.
- Díaz C, Alcalá D (1984) Informes sobre la presencia del hongo *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh en siembras de papa en el Estado Táchira. Estación Experimental El Cuji, Lara. FONAIAP. Venezuela. 2 pp.
- De Haan E, van den Bovenkamp G (2005) Improved diagnosis of powdery scab (*Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*) symptoms on potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Res.* 48: 1-14.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Falloon R, Wallace A, Braithwaite M, Genet R, Nott H, Fletcher J, Braam W (1996) Assessment of seed tuber, in-furrow and foliar chemical treatments for control of powdery scab (*Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*) of potato. *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.* 24: 341-353.
- Falloon R, Genet R, Wallace A, Butler R (2003) Susceptibility of potato (*Solanum tuberosum*) cultivars to powdery scab (caused by *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*), and relationships between tuber and root infection. *Australasian Plant Pathol.* 32: 377-385.
- Falloon R, Curtin D, Lister R, Butler R (2004) The obligate soilborne pathogen *Spongospora subterranea* affects host (*Solanum tuberosum*) root function. En Ophel Keller FM, Hall BH (Eds.) *Proc. 3rd Australasian Soilborne Diseases Symposium*. South Australian Research and Development Institute. Adelaide, Australia. pp 30-31.
- Forsund E (1971) *Streptomyces scabies* and *Spongospora subterranea* observed on potatoes grown in different types of soil irrigated in different levels and times. *Potato Res.* 14: 334-335.
- García R, Garnica J, Espinosa Y (2004) Estudio de epifitias en la roña de la papa (*Spongospora subterranea*) en el Estado Mérida, Venezuela. *Rev. Latinoam. de la Papa*. Suplemento especial. Marzo, Oral 40.
- Harrison J, Rees E, Baker H, Lowe R (1993) Detection of sporeballs of *Spongospora subterranea* on potato tubers by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Pathol.* 42: 181-186.
- Harrison J, Searle R, Williams N (1997) Powdery scab disease

- of potato - A review. *Plant Pathol.* 46: 1-25.
- Hutchison L, Kawchuk L (1998) *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. *Can. J. Plant Pathol.* 20: 118-119.
- Jones D (1978) Scanning electron microscopy of cystosori of *Spongospora subterranea*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 70: 292-293.
- Jones R, Harrison B (1969) The behavior of Potato Mop-Top Virus in soil, and evidence for its transmission by *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh. *Ann. Appl. Biol.* 63: 1-17.
- Kirkham R (1986) Screening for resistance to powdery scab disease of potatoes. *Austr. J. Exp. Agric.* 26: 245-247.
- Lahert H, Kavanagh J (1985) The fine structure of the cystosorus of *Spongospora subterranea*, the cause of powdery scab of potato. *Can. J. Bot.* 63: 2278-2282.
- Lister R, Falloon R, Curtin D, Butler R (2004) *Spongospora subterranea* reduces host (*Solanum tuberosum*) growth. En Ophel Keller FM, Hall BH (Eds.) *Proc. 3rd Australasian Soilborne Diseases Symposium*. South Australian Research and Development Institute. Adelaide, Australia. pp 135-136.
- Merz U (1989) Infectivity, inoculum density and germination of *Spongospora subterranea* resting spores: a solution-culture test systems. *Eur. Plant Protect. Organiz. Bull.* 19: 585-592.
- Merz U (1997) Microscopical observations of the primary zoospores of *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*. *Plant Pathol.* 46: 670-674.
- Merz U (2000) Potato production and the powdery scab situation in Switzerland. En Merz U, Lees A. (Eds.) *Proc. First European Powdery Scab Workshop*. Scottish Agricultural College. Aberdeen, Scotland. pp. 15-18.
- Merz U, Martínez V, Schwärzel R (2004) The potential for rapid screening of potato cultivars (*Solanum tuberosum*) for resistance to powdery scab (*Spongospora subterranea*) using a laboratory bioassay. *Eur. J. Plant Pathol.* 10: 71-77.
- Montero-Astúa M, Vásquez V, Rivera C (2004) Potato powdery scab, caused by *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*, in Costa Rica. *Potato Res.* 47: 25-34.
- Nakayama T, Horita H, Shimanuki T (2007) *Spongospora subterranea* soil contamination and its relationship to severity of powdery scab on potatoes. *J. Gen. Plant Pathol.* 73: 229-234.
- Nitzan N, Boydston R, Batchelor D, Crosslin J, Hamlin L, Brown C (2009) Hairy nightshade is an alternative host of *Spongospora subterranea*, the potato powdery scab pathogen. *Am. J. Potato Res.* 86: 297-303.
- Ortega E, Rodríguez Y (2004) Virus del mop top: una amenaza para la producción de papas en Venezuela. *INIA Divulga 1*: 36-40.
- Paz B (1984) La roña de la papa en los Andes. Boletín Divulgativo. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela (FONAIAP). Estación experimental Mérida. Mérida, Venezuela. *Vol. 1*: 12-14.
- Qu X, Kavanagh J, Egan D (2000) *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*: molecular variation, PCR detection and isolation in vitro. En Merz U, Lees A. (Eds.) *Proc. First European Powdery Scab Workshop*. Scottish Agricultural College. Aberdeen, Scotland. pp. 75-77.
- Qu X, Kavanagh J, Egan D, Christ B (2006) Detection and quantification of *Spongospora subterranea* by PCR in host tissue and naturally infested soils. *Am. J. Potato Res.* 83: 21-30.
- Van de Graaf P, Lees A K, Cullen D W, Duncan JM (2003) Detection and quantification of *Spongospora subterranea* in soil, water and plant tissue samples using real-time PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 589-597.
- Van de Graaf P, Lees A, Wale S, Duncan J (2005) Effect of soil inoculum level and environmental factors of potato powdery scab caused by *Spongospora subterranea*. *Plant Pathol.* 54: 22-28.
- Walsh J, Merz U, Harrison J (1996) Serological detection of sporeballs of *Spongospora subterranea* and quantification in soils. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 589-597.
- Ward L, Beales P, Barnes A, Lane C (2004) A real-time PCR assay based method for routine diagnosis of *Spongospora subterranea* on potato tubers. *J. Phytopathol.* 152: 633-638.