

Cuantificación por análisis de imágenes de quistosoros de *Spongospora subterranea* en suelo

Quantification of *Spongospora subterranea* by cystosori image analysis in soil

Aída Inés Moreno Santamaría ^{1,3}, Sebastián Reynaldi ^{2,4}.

¹Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Bogotá, Colombia. ²Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Medellín, Colombia.

³ ✉ aiimorenosa@unal.edu.co; ⁴ ✉ sreynaldi@unal.edu.co



<https://doi.org/10.15446/acag.v72n3.106890>

2023 | 72-3 p 234-240 | ISSN 0120-2812 | e-ISSN 2323-0118 | Rec.: 2023-01-23 Acep.: 2024-02-06

Resumen

El protista *Spongospora subterranea* es el patógeno del suelo causante de la sarna polvosa de la papa. Es un parásito obligado que se reproduce en raíces y tubérculos, donde produce grupos de zoosporas enquistadas, quistosoros, los cuales pasan al suelo para generar un nuevo ciclo infectivo. La prevención de esta enfermedad requiere identificar y cuantificar los quistosoros del suelo. Con el propósito de automatizar el proceso, fotografiamos digitalmente quistosoros de diferentes cultivos bajo las mismas condiciones, y caracterizamos su tamaño y forma como área y circularidad con análisis de imágenes. El rango de área fue 1086-2247 μm^2 y el de circularidad fue 0.824-0.886. Con estos rangos analizamos un número creciente fotografías digitales (1-90) de un mismo suelo con quistosoros (infectado) y sin ellos (control), utilizando una rutina macro. El número de identificaciones resultó lineal, positiva y significativamente ($p < 0.001$) correlacionado con el número de fotografías analizadas tanto en el suelo infectado ($r^2 = 0.996$, $y = 1.679x$) como en el control ($r^2 = 0.968$, $y = 0.367x$). Las identificaciones en el suelo control infectado fueron cinco veces menores y fueron sustraídas a las identificaciones del suelo infectado para cada número de fotografías analizadas. Esta sustracción resultó lineal ($y = 1.048x$), positiva ($r^2 = 0.979$) y significativamente ($p < 0.001$) correlacionada con el promedio de quistosoros cuantificados visualmente en las mismas fotografías. Los resultados muestran que los quistosoros del suelo pueden ser cuantificados por análisis de imágenes. La automatización independiza la precisión de la cuantificación de la experiencia y habilidad de la persona que la realiza.

Palabras clave: cuantificación automática, estructuras de resistencia, patógeno del suelo, papa, sarna polvosa.

Abstract

The protist *Spongospora subterranea* is the soil-borne pathogen that causes the powdery scab of potatoes. This obligate parasite reproduces in roots and tubers, producing clusters of encysted zoospores or cystosori. These cystosori move to the soil and generate a new infective cycle. The prevention of this disease requires identifying and quantifying cystosori in the soil. In this study, cystosori from different crops were digitally photographed under the same conditions, to automate the process. The images were then analyzed to characterize their size and shape in terms of area and circularity. The ranges of the area and circularity were 1086-2247 μm^2 and 0.824-0.886, respectively. With these ranges, an increasing number of digital photographs (1-90) of the same soil with cystosori (infected) and without cystosori (control) were analyzed using a macro routine to automate the process. The number of identifications per photograph was linearly, positively, and significantly ($p < 0.001$) correlated with the number of photographs analyzed in both the infected ($r^2 = 0.996$, $y = 1.679x$) and control ($r^2 = 0.968$, $y = 0.367x$) soils. However, the number of identifications was five times higher in the infected soil. The identifications of the control soil were subtracted from those of the infected soil for each number of photographs analyzed. This subtraction was linear ($y = 1.048x$), positive ($r^2 = 0.979$), and significantly correlated ($p < 0.001$) with the average number of cystosori visually quantified in the same photographs. The results show that it is possible to quantify soil cystosori using image analysis. Automatization makes quantification accuracy independent of the operator's experience and skill.

Keywords: automated quantification, potato; powdery scab; resistance structure, soil pathogen.

Introducción

El protista *Spongospora subterranea* f. sp. *Subterranea* (Wallr.) Lagerh. 1892 es el patógeno del suelo causante de la sarna polvosa de la papa (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], Grupo Técnico Intergubernamental del Suelo [ITPS], Iniciativa Global sobre la Biodiversidad del Suelo [GSBI], Convenio sobre la Diversidad Biológica [CDB] y Comisión Europea [CE], 2021). Esta enfermedad afecta cosméticamente los tubérculos de papa (Balendres *et al.*, 2016) y reduce su producción (Gilchrist-Ramelli *et al.*, 2009; Gilchrist-Ramelli *et al.*, 2011 y Falloon *et al.*, 2016). *S. subterranea* es un parásito obligado que se reproduce en raíces y tubérculos. La reproducción resulta en conjuntos de zoosporas enquistadas llamados quistosoros, los cuales permanecen latentes en el suelo hasta tomar contacto con el agua (Beltrán-Sánchez *et al.*, 2009; Balendres *et al.*, 2017). *S. subterranea* es un patógeno del suelo porque sus zoosporas activas son reconocidas por nadar con sus dos flagelos (Beltrán-Sánchez *et al.*, 2009), lo cual sugiere que las esporas activas nadan hasta encontrar raíces y tubérculos donde comenzar un nuevo ciclo infectivo.

La sarna polvosa es una enfermedad que requiere de varias estrategias para ser superada, entre las más importantes está la prevención: cultivar papa en suelos bien drenados y libres de quistosoros de *S. subterranea* (Mesa *et al.*, 2017; Strydom *et al.*, 2024). Para poder escoger suelos libres de *S. subterranea* es necesario identificar y cuantificar los quistosoros de los suelos destinados para el cultivo de papa.

Los quistosoros de *S. subterranea*, como toda estructura biológica, presentan variabilidad en su morfología, esto condiciona su identificación a la experiencia y habilidad del operador (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine [NASEM], 2019). Independizar la presión, la identificación y cuantificación de la persona que las realiza requiere encontrar características que permitan automatizar el proceso por análisis de imágenes (Schroeder *et al.*, 2021). La cuantificación automática de los quistosoros permitiría comparar trabajos de diferentes autores y realizar una evaluación de los suelos de cultivo a gran escala.

Así, el objetivo es este trabajo fue identificar y cuantificar automáticamente quistosoros en fotografías digitales.

Materiales y métodos

Los quistosoros de *S. subterranea* tienen una forma esferoide o ligeramente ovoide al microscopio electrónico (Beltrán-Sánchez *et al.*, 2009). Al microscopio óptico, con un aumento de 10x, los quistosoros tienen la forma de una elipse con un radio mayor de entre 20 y 31.1 μm y un radio menor de entre 15.5 y 24.9 μm (Jaramillo-Villegas *et al.*,

2008 y Falloon *et al.*, 2011). Este tamaño y esta forma han sido utilizados para reconocer y cuantificar los quistosoros visualmente bajo el microscopio óptico con un aumento de 10x (Pérez-Pérez *et al.*, 2012) y podrían resultar viables para identificar quistosoros.

El programa ImageJ fue creado para analizar imágenes de estructuras biológicas, es público y de uso gratuito para investigación (Schneider *et al.*, 2012); ImageJ transforma las fotografías digitales a un formato que polariza la escala de grises (Gallagher, 2014). Sobre este formato se pueden caracterizar el área y la circularidad de las estructuras biológicas, para luego identificarlas y cuantificarlas automáticamente utilizando una rutina macro (Ferreira y Rasband, 2012). Esta rutina fue evaluada en suelo con y sin quistosoros para analizar la sensibilidad y selectividad de la cuantificación automática, la cual fue finalmente comparada con el conteo visual.

Obtención de quistosoros

Las suspensiones de quistosoros fueron realizadas según Pérez-Pérez *et al.* (2012), utilizando quistosoros obtenidos de raíces de papa *Solanum tuberosum* infectadas con *Spongospora subterranea* en diferentes cultivos. Las raíces infectadas fueron deshidratadas durante 15 días en desecador, para luego ser mezcladas con 1 l de agua de red y maceradas en una licuadora de cocina hasta lograr una suspensión de aspecto homogéneo. Esta suspensión fue guardada para caracterizar los rangos de área, la circularidad de los quistosoros y para luego mezclarla con suelo.

Preparación de suspensiones de suelo con y sin quistosoros

Se recolectó suelo de un lote donde nunca se cultivó papa. El suelo recolectado fue secado en un horno a 60 °C durante 30 horas y triturado con un rodillo de madera para homogenizarlo. Finalmente, 300 gr. del suelo seco y homogenizado se mezclaron con un 1 mL de la suspensión de quistosoros para formar el suelo infectado, o con un 1 mL de agua de red para formar el suelo control. Ambos suelos se tamizaron mecánicamente (Rotav, WS Tyler, EE. UU.), utilizando sucesivamente mallas de 500, 250 y 53 μm de poro. El tamizado comenzó con el suelo control para evitar contaminación. Los tamizados de la malla de 53 μm fueron almacenados por separado en desecador. Al momento del análisis, se prepararon suspensiones mezclando un gramo del tamizado de cada tipo de suelo con 10 mL de agua de red en tubos plásticos de 15 mL con tapa hermética.

Obtención de imágenes digitales de los suelos

Alícuotas de 20 μL de cada una de las suspensiones fueron colocadas en una cámara de Neubauer. Antes de tomar las alícuotas, cada tubo se giró 180° en tres

oportunidades para homogenizar la suspensión. Una vez colocada la alícuota en la cámara de Neubauer, los cuadrados grandes de la cámara fueron fotografiados con un objetivo (10x) de un microscopio óptico (Eclipse E200, Nikon, Japón) equipado con cámara digital (Digital Sight DS-Fi1, Nikon, Japón). Se tomaron en total 90 fotografías de cada suspensión.

Análisis de las imágenes de los suelos

Las fotografías digitales fueron analizadas mediante el programa ImageJ (Schneider *et al.*, 2012), siguiendo su manual (Ferreira y Rasband, 2012). Primero, se fijó la escala de conversión de píxeles a μm con el comando *Set Scale*, y se utilizaron los píxeles correspondientes a los 250 μm que miden los lados de los cuadrados grandes de la cámara de Neubauer. La escala resultante fue 1.045 píxeles por μm .

Segundo, se caracterizó el área y la circularidad de 81 quistosoros extraídos de las raíces de papa infectadas. Las fotografías en formato jpg que muestra la Figura 1A se pasaron a un formato 8-bit con el comando *Type* (Figura 1B). El formato 8-bit contrasta los objetos en la fotografía con una escala de 255 grises, las estructuras cercanas al negro (255) contrastan contra el blanco (0) del fondo (Ferreira y Rasband, 2012). Este contraste de grises se polarizó

en una imagen blanco y negro con el comando *Auto* (Figura 1C). La identificación de cada quistosoro se realizó con el comando *Wand Tool*. El comando *Measure* midió automáticamente el área y la circularidad de cada quistosoro identificado (Figura 1D). Este comando también reporta los valores de área y circularidad medidas en una planilla de cálculo. Los rangos de área y circularidad se determinaron con el mayor y menor valor de estas variables. Estos rangos se graficaron en diagramas de cajas y bigotes, e histogramas, utilizando una rutina en lenguaje R (<https://www.r-project.org/>).

Finalmente, se generó una rutina macro utilizando el comando *Record*. La rutina automatizó el uso de los comandos descritos arriba, a los cuales se les sumó *Analyze particle*, que realizó automáticamente las identificaciones utilizando los rangos de área y la circularidad.

El comando *Macro* aplicó la rutina de análisis de imágenes a las fotografías digitales de las suspensiones de suelo con y sin quistosoros.

El número de identificaciones realizadas automáticamente con la rutina se correlacionaron con el número de fotografías digitales utilizando una rutina en lenguaje R.

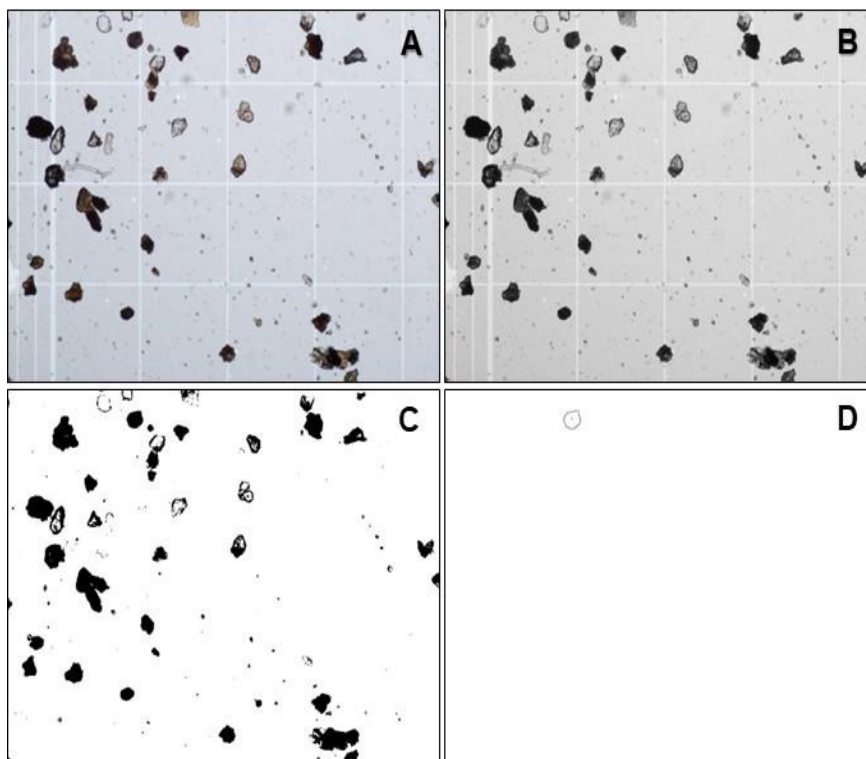


Figura 1. Procesamiento de la fotografía digital para el análisis de imágenes.

Nota. Fotografía original (A) convertida a un formato 8-bit (B), aplicación del comando *Threshold* para maximizar los contrastes de grises (C) e identificación automática utilizando los rangos de área y circularidad con el comando *Analyze particle* (D). *Threshold* y *Analyze particle* son comandos del programa de uso público ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

Conteo visual

Se realizaron conteos visuales, de acuerdo con Pérez-Pérez *et al.* (2012), en las mismas fotografías en las cuales se realizó el análisis de imágenes con la rutina de ImageJ arriba descrita. Se realizaron tres conteos independientes de cada fotografía. El promedio de estos conteos se correlacionó con las identificaciones realizadas por la rutina de análisis de imágenes en el suelo infectado, luego de sustraer las identificaciones realizadas en el suelo control. Esta correlación también se realizó utilizando una rutina en lenguaje R.

Resultados

Caracterización del área y circularidad

El menor valor de área de los quistosoros fue $1086 \mu\text{m}^2$ y el mayor valor fue $2247 \mu\text{m}^2$ (Tabla 1), determinado el rango de área que se utilizó en la rutina de análisis de imágenes. La mediana del área resultó 25.5 % mayor que el menor valor y un 11 % mayor que el primer cuartil (Tabla 1). También, la mediana resultó un 14 % menor al tercer cuartil y un 35 % menor al mayor valor (Tabla 1). El diagrama de caja y bigotes muestra que la mayoría de los quistosoros fueron menores a $1750 \mu\text{m}^2$ (Figura 2A). El histograma de 30 intervalos muestra que la mayoría de los quistosoros se concentra en los 15 menores intervalos. Los quistosoros con un área mayor a $2000 \mu\text{m}^2$ fueron los más escasos (Figura 2B).

El menor valor de circularidad de los quistosoros fue 0.824 y el mayor valor fue 0.886 (Tabla 1), determinando el rango de circularidad que se utilizó para identificar los quistosoros. La mediana de circularidad resultó un 3.4 % mayor que el menor valor y un 1.3 % mayor que el primer cuartil (Tabla 1). También, la mediana resultó un 1 % menor que al tercer cuartil y un 3.7 % menor al mayor valor (Tabla 1). El diagrama de caja y bigotes muestra que la mayoría de los quistosoros resultaron con una circularidad dentro del intervalo comprendido por 0.84 y 0.86 (Figura 2C). El histograma muestra que los intervalos intermedios resultaron con el mayor número de quistosoros, la mayoría de los quistosoros tuvo un valor de circularidad similar (Figura 2D).

Análisis de imágenes

Los rangos de área y circularidad se utilizaron en una rutina en ImageJ para realizar identificaciones automáticas. Las identificaciones resultaron positiva y significativamente ($p < 0.001$) correlacionadas con el incremento de las fotografías digitales analizadas tanto en el suelo infectado como en el suelo control (Figura 3A). Las ecuaciones de regresión lineal están representadas en los gráficos con la línea puntuada (Figura 3), su pendiente fue 4.57 veces mayor para el

suelo infectado con respecto al suelo control (Figura 3A). En total, se realizaron 149 identificaciones en el suelo infectado y 31 identificaciones en el suelo control.

Las identificaciones en el suelo control fueron sustraídas de las identificaciones en el suelo infectado para cada número de fotografías analizadas. El resultado de estas sustracciones resultó lineal, positiva y significativamente ($p < 0.001$) correlacionado con el promedio de las identificaciones de un conteo visual para cada número de fotografías analizadas (Figura 3B).

Discusión

El análisis de imágenes pudo identificar quistosoros y cuantificarlos en el suelo infectado. El análisis de imágenes es automático, el cual supera los problemas de reproducibilidad o precisión de la cuantificación visual (NASEM, 2019). La independencia del operador permitiría comparar cuantificaciones reportadas por diferentes autores, aunque la necesidad de un suelo control puede limitar la aplicación generalizada del método de análisis de imágenes. Esta necesidad se debe a la exigencia de estructuras en el suelo con un tamaño y forma similares a los quistosoros caracterizados (Figura 3).

La caracterización de los quistosoros se realizó mediante el tamaño y la forma, las cuales, en el programa ImageJ, se analizan como área y circularidad (Ferreira y Rasband, 2012). La literatura reporta radios de quistosoros recolectados en cultivos en Colombia (Jaramillo-Villegas *et al.*, 2008) y a lo largo del mundo (Falloon *et al.*, 2011). Estos radios permiten calcular el área utilizando la fórmula del área de la elipse, la cual multiplica el radio mayor por el radio menor y por π (<https://en.wikipedia.org/wiki/Area>). El rango de área resultante ($1048\text{--}2412 \mu\text{m}^2$) contiene, para Falloon *et al.* (2011), el rango de Jaramillo-Villegas *et al.* (2008) y el medido en el presente trabajo (Tabla 1).

La circularidad resulta de multiplicar el área por 4π , y dividir el resultado de esta multiplicación por el cuadrado del perímetro. El valor uno de circularidad corresponde a un círculo y el 0.5 a un rectángulo, la forma elíptica se encuentra en el medio de este intervalo (Ferreira y Rasband, 2012). En el presente

Tabla 1. Área y circularidad de los quistosoros

	Área (μm^2)	Circularidad
Valor mínimo	1086	0.824
1 ^{er} Cuartil	1297	0.842
Mediana	1458	0.853
3 ^{er} Cuartil	1697	0.862
Valor Máximo	2247	0.886

Nota. La tabla muestra la distribución de los valores de área y circularidad de los quistosoros, sus valores extremos y sus cuartiles.

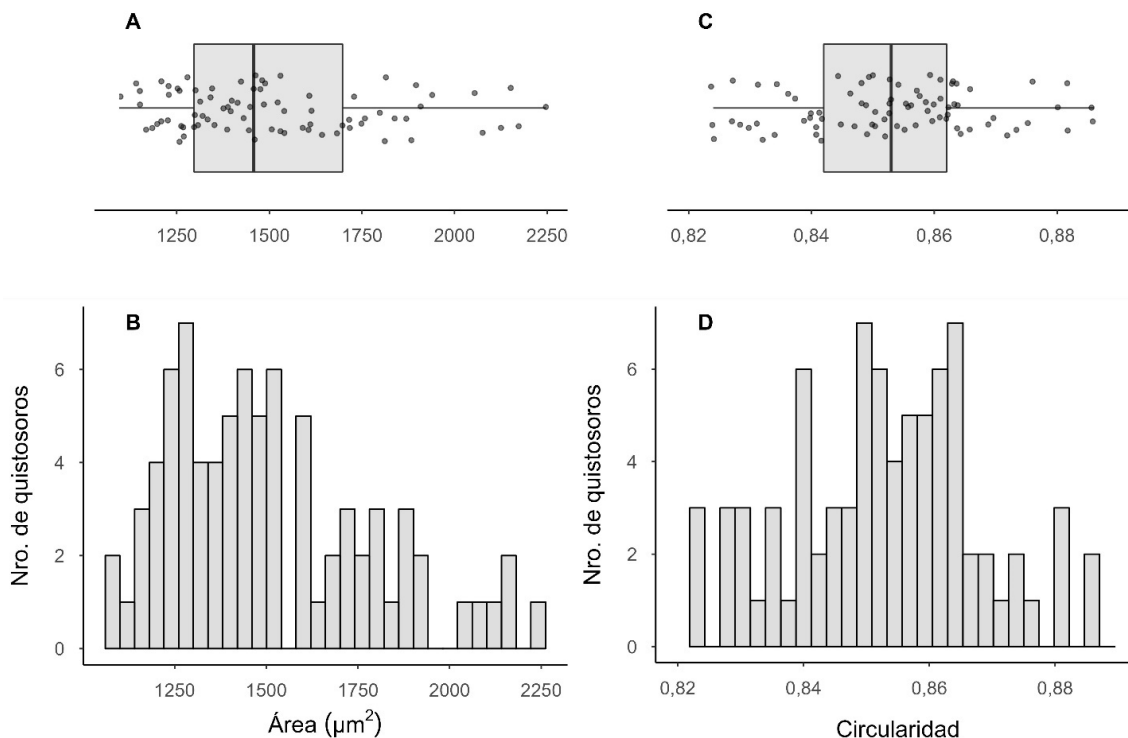


Figura 2. Rangos de área y circularidad de quistosoros de *S. subterranea*.

Nota. Los diagramas de cajas y bigotes (A y C) y los histogramas (B y D) muestran la distribución de los valores área (μm^2) y circularidad de los 81 quistosoros extraídos de diferentes cultivos. Los histogramas muestran el número de quistosoros distribuidos en 30 por intervalos de área y circularidad. En los diagramas de cajas y bigotes, el extremo menor de la caja corresponde al primer cuartil, la línea en negrita dentro de la caja representa a la mediana y el extremo mayor de la caja representa al tercer cuartil. Los extremos menores y mayores de los bigotes corresponden al menor y al mayor valor, respectivamente.

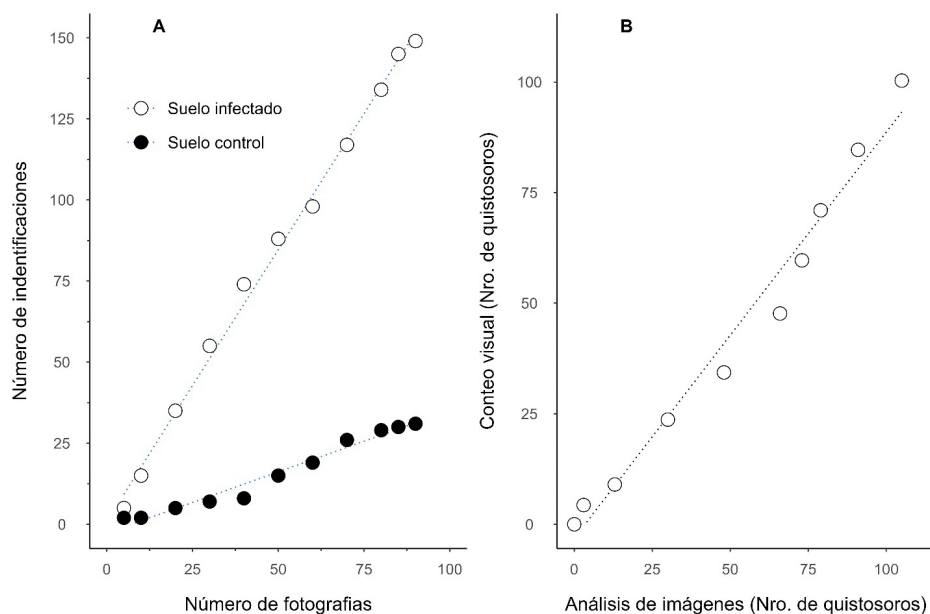


Figura 3. Sensibilidad, especificidad y exactitud del análisis de imágenes.

Nota. La figura 3A muestra la correlación positiva y significativa ($p < 0.001$) entre el número de identificaciones (y) y el aumento en las fotografías digitales (x) en el suelo con quistosoros (círculos blancos) y en el suelo control (círculos negros). El coeficiente de correlación (r^2) fue 0.996 para el suelo infectado y 0.971 para el suelo control. La línea punteada representa la regresión lineal, cuya ecuación fue $y = 1.679x$ para el suelo infectado y $y = 0.367x$ para el suelo control. La figura B muestra una correlación positiva y significativa ($p < 0.001$) entre el número de quistosoros cuantificados con análisis de imágenes mediante la rutina macro (y) y el número promedio de quistosoros cuantificados visualmente (x) en las mismas fotografías. La ecuación de regresión, línea punteada, resultó $y = 1.048x$ y el coeficiente de correlación (r^2) fue 0.983.

trabajo, la circularidad de los quistosoros resultó entre 0.82 y 0.89 (Figura 2), una forma elíptica más cercana al círculo que al rectángulo. La forma circular elíptica ha sido previamente reportada por Jaramillo-Villegas *et al.* (2008), Beltrán-Sánchez *et al.* (2009) y Falloon *et al.* (2011).

La bibliografía también menciona un color ocre característico de los quistosoros (Falloon *et al.*, 2011). Sin embargo, en el presente trabajo, estructuras con el área y circularidad caracterizada para quistosoros presentaron una tonalidad oscura, y, por el contrario, estructuras de color ocre no presentaban el área, ni la circularidad de los quistosoros (Figura 1). Estas observaciones se realizaron con quistosoros en muestras de suelo, donde el color de los quistosoros es difícil de distinguir.

El análisis de imágenes realizó identificaciones en el suelo control porque existen estructuras de área y circularidad contenidas en los rangos caracterizados para los quistosoros (Tabla 1). Estas identificaciones no parecen ser el resultado de una contaminación, porque su sustracción se correlacionó con el conteo visual (Figura 3B). Además, a diferencia de los quistosoros, las estructuras del suelo control no presentaron las formas esféricas más extremas, particularmente las cercanas al círculo (Figura 4A y C).

La circularidad de los quistosoros presentó un rango proporcionalmente mucho más estrecho que el presentado por el área (Tabla 1 y Figura 2), esto sugiere que la mayoría de los quistosoros tienen una forma elíptica similar, siendo una forma más característica que el tamaño. Sin embargo, la Figura 4 muestra que los rangos de área y circularidad de las estructuras del suelo control están contenidas por los rangos de los quistosoros, aun en las de circularidad, esto indica que no se pueden refinar los rangos sin perder capacidad de detección.

Las estructuras del suelo con tamaño y forma similar a los quistosoros parecen estar presentes en el suelo en una baja proporción porque se incrementaron con el aumento de fotografías analizadas con una tasa 4.57 veces menor que la de los quistosoros (Figura 3A), esto indica que su influencia en las cuantificaciones disminuye con el aumento de los quistosoros en el suelo. El suelo control es realmente útil para evaluar suelos con bajas concentraciones de quistosoros.

La necesidad de suelo control a bajas concentraciones de quistosoros se podría evitar procesando las muestras antes de realizar las fotografías digitales, buscando separar las estructuras en el suelo control y los quistosoros. Las diferencias de densidad podrían ofrecer una alternativa, aunque

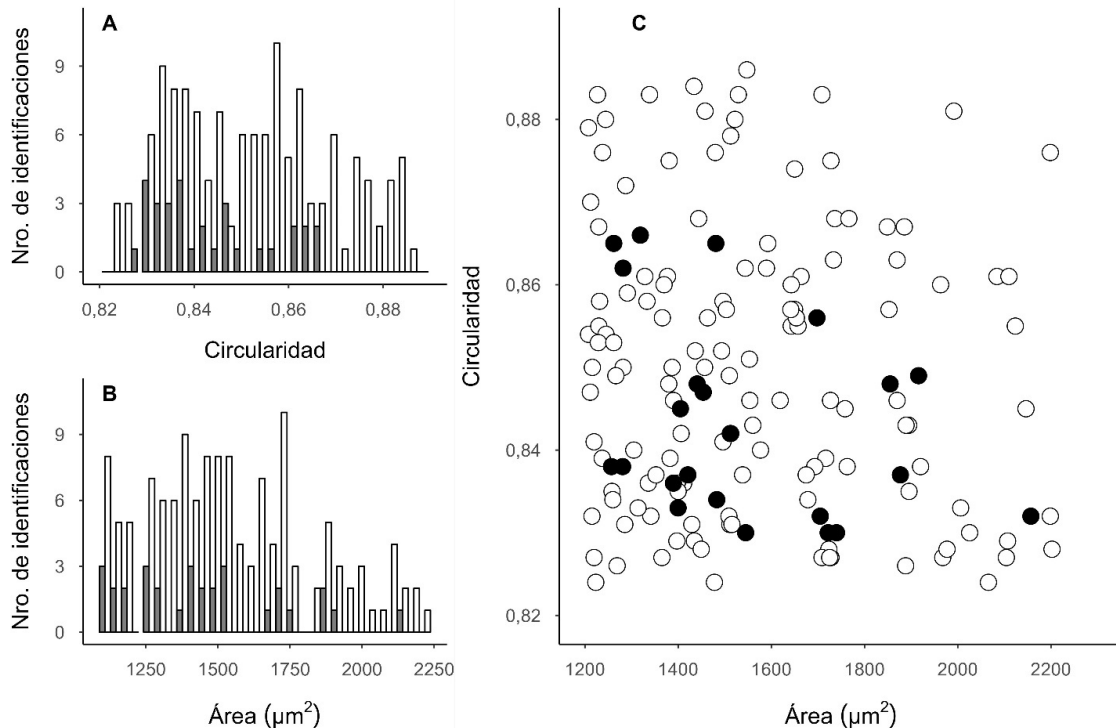


Figura 4. Área y circularidad en las identificaciones realizadas por análisis de imágenes.

Nota. Los histogramas muestran el número de identificaciones por rango de circularidad (A) y área (B) en el suelo infectado (barras claras) y en el suelo control (barras oscuras). El gráfico C muestra la dispersión de las identificaciones por sus valores de área y circularidad en el suelo infectado (círculos claros) y en el suelo control (círculos oscuros).

no se podría utilizar el tiempo que tarda la suspensión en precipitar, ya que podríamos perder quistosoros por la activación de las zoosporas que los forman (Beltrán-Sánchez *et al.*, 2009). Alternativamente, se podría evitar invertir el tubo con la suspensión de suelo; las estructuras con densidad similar a la del agua tenderían a permanecer en suspensión independientemente de la inversión del tubo. También se podrían centrifugar las muestras a diferentes intensidades y analizar los precipitados.

Futuros trabajos deberían investigar si las estructuras observadas en el control están asociadas al tipo de suelo utilizado, para esto se deben cuantificar los quistosoros en distintos tipos de suelos por análisis de imágenes.

Conclusiones

La caracterización de los quistosoros por área y circularidad coincidió con los datos de la literatura. La rutina de análisis de imágenes realizada con los rangos de área y circularidad fue sensible para identificar quistosoros en suelo. Sin embargo, existen estructuras en el suelo con área y circularidad similares a los quistosoros. Esto se pudo solucionar sustrayendo las identificaciones del suelo control a las identificaciones del suelo infestado. El resultado fue óptimo, mostrando que el análisis de imágenes es capaz de cuantificar quistosoros del suelo. Esto es muy relevante porque independiza la precisión de las cuantificaciones de la experiencia y habilidad del operador, lo cual permitiría en un futuro comparar las cuantificaciones de diferentes autores con un alto grado de confianza; sin embargo, la necesidad de suelo control puede limitar la aplicación de este método. Futuros trabajos deberán enfocarse en aumentar la especificidad de la metodología para posibilitar su aplicación aun a muestras que carezcan de suelo control.

Referencias

- Balendres, M.; Tegg, R. y Wilson, R. (2016). Key events in pathogenesis of *Spongospora* diseases in potato: a review. *Australasian Plant Pathology*, 45(3), 229-240. <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0398-3>
- Balendres, M.; Tegg, R. y Wilson, C. (2017). Resting spore dormancy and infectivity characteristics of the potato powdery scab pathogen *Spongospora subterranea*. *Journal of Phytopathology*, 165(5), 323-330. <https://doi.org/10.1111/jph.12565>
- Beltrán-Sánchez, E.; Gilchrist-Ramelli, E.; Jaramillo-Villegas, S. y Reynaldi, S. (2009). Influencia de las condiciones de incubación sobre la activación de zoosporas de *Spongospora subterranea*, en busca de un inóculo para el estudio de la sarna polvosa. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(2), 5055-5062. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n2/a04v62n2.pdf>
- Falloon, R.; Merz, U.; Lister, R.; Wallace, A. y Hayes, S. (2011). Morphological enumeration of resting spores in sporosori of the plant pathogen *Spongospora subterranea*. *Acta Protozoologica*, 50(2), 121-132. <https://doi.org/10.4467/16890027AP.11.013.0013>
- Falloon, R.; Merz, U.; Butler, R.; Curtin, D.; Lister, R. y Thomas, S. (2016). Root infection of potato by *Spongospora subterranea*: knowledge review and evidence for decreased plant productivity. *Plant Pathology*, 65(3), 422-434. <https://doi.org/10.1111/ppa.12419>
- Ferreira, T. y Rasband, W. (2012). ImageJ User Guide-IJ1.46r. <http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide>
- Gallagher, S. (2014). Digital image processing and analysis with ImageJ. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 9(1), A-3C. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.eta03cs9>
- Gilchrist-Ramelli, E.; Jaramillo-Villegas, S. y Reynaldi, S. (2009). Efecto sobre la sarna polvosa de cuatro aislamientos del hongo *Trichoderma asperellum* en tres tipos de suelo. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 4783-4792. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472009000100005
- Gilchrist-Ramelli, E.; Soler, J.; Merz, U. y Reynaldi, S. (2011). Powdery scab effect on the potato *Solanum tuberosum* ssp. andigena growth and yield. *Tropical Plant Pathology*, 36, 350-355. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762011000600002>
- Jaramillo-Villegas, S.; Pérez Avendaño, G. y Hoyos-Carvajal, L. (2008). Variación morfológica de quistosoros de *Spongospora subterranea* (wallr.) lagerh f. sp. subterranea. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 61(2), 4511-4517. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v61n2/a05v61n2.pdf>
- Mesa, P.; García, C. y Cotes, A. (2017). En búsqueda de una alternativa de manejo del camanduleo de la papa ocasionada por *Spongospora subterranea*. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11(2), 378-386. <https://doi.org/10.17584/rcch.2017v11i2.6150>
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine [NASEM]. (2019). *Reproducibility and replicability in science*. Washington, D. C: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25303>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]; Grupo Técnico Intergubernamental del suelo [ITPS]; Iniciativa Global sobre la Biodiversidad del Suelo [GSBI]; Convenio sobre la Diversidad Biológica [CDB] y Comisión Europea [CE]. (2021). *Estado del conocimiento sobre la biodiversidad del suelo - Situación, desafíos y potencialidades. Resumen para los formuladores de políticas*. Roma: FAO. <https://doi.org/10.4060/cb1929es>
- Pérez-Pérez, W.; Gilchrist-Ramelli, E. y Reynaldi, S. (2012). Producción de quistosoros de *Spongospora subterranea* (Walk.) Lagerh f. sp. subterranea Tomlinson durante un ciclo de cultivo de papa en tres tipos de suelo. *Acta Agronómica*, 61(2), 111-116. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122012000200003
- Schneider, C.; Rasband, W. y Eliceiri, K. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schroeder, A.; Dobson, E.; Rueden C.; Tomancak P.; Jug F. y Eliceiri K. (2021). The ImageJ ecosystem: Open-source software for image visualization, processing, and analysis. *Protein Science*, 30(1), 234-249. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.3993>
- Strydom, R. F.; Wilson, C. R.; Tegg, R. S.; Balendres, M. A. y van der Waals, J. E. (2024). Advancements in *Spongospora subterranea*: Current knowledge, management strategies, and research gaps. *Potato Research*, 1-41. <https://doi.org/10.1007/s11540-024-09701-8>