

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* EN PLANTAS SEÑUELO Y CULTIVOS DE PAPA EN COLOMBIA MEDIANTE qPCR

Detection and Quantification of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* in Bait Plants and Potato Fields in Colombia using qPCR

NEVAR GARCÍA BASTIDAS¹, M.Sc.; JUAN GONZALO MORALES²,
Ph. D.; PAOLA GONZÁLEZ JAIMES³, Ph. D.; PABLO ANDRÉS
GUTIÉRREZ¹, Ph. D.; MAURICIO MARÍN MONTOYA⁴, Ph. D.

¹ Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Colombia.
nevar.garcia@gmail.com; paguties@unal.edu.co

² Departamento de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias
Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Colombia.
jgmoraleso@unal.edu.co

³ Laboratorio de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias.
Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín.
epgonzalez@elpoli.edu.co

⁴ Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Colombia.
mamarinm@unal.edu.co

Autor de correspondencia: Mauricio Marín Montoya, Departamento de
Biociencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.
Sede Medellín, Colombia. A.A. 3840. Fax: +57-4 430 93 32.
mamarinm@unal.edu.co

Presentado el 20 de septiembre de 2012, aceptado el 3 de enero de 2013, correcciones el 6 de febrero de 2013.

RESUMEN

La sarna polvosa de la papa (*Solanum tuberosum*, *S. phureja*) causada por *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* (Sss), es una de las enfermedades más limitantes de este cultivo. En Colombia, se han empleado diferentes métodos de detección asintomática de Sss, incluyendo bioensayos con plantas señuelo, PCR de ITS y pruebas de ELISA. Sin embargo, sus niveles de sensibilidad son bajos o requieren tiempos extensos. Una alternativa para complementar dichas herramientas es la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). En este trabajo se evaluó dicha técnica utilizando los juegos de cebadores SsTQF1-SsTQR1; Spon421F-Spon494R y SscolF-SscolR (diseñados en este estudio), bajo la metodología de SYBR Green®; mientras que con Taqman® se evaluaron los cebadores SponF-SponR y la sonda SponP. Una vez determinada la funcionalidad de los cebadores, se descartó por inespecificidad, el par Spon421F-Spon494R; para los

restantes se realizaron curvas estándar basadas en diluciones seriadas de quistosoros. Las pruebas de qPCR detectaron a Sss en las 20 muestras evaluadas de plantas señuelo de *Nicotiana benthamiana* y papa, utilizando los cebadores SsTQF1-SsTQR1 (Ct: 10,57-29,34) y SscOLF-SscOLR (Ct: 14,39-34,08); mientras que 19 de las muestras fueron positivas con SponF-SponR-SponP (Ct: 15,63-38,93). A partir de 20 muestras de raíces de papa de cultivos de La Unión (Antioquia, Colombia), fue posible detectar el patógeno en 17 de ellas con SscOLF-SscOLR, estimándose una concentración de 6470 a $1,39 \times 10^{10}$ quistosoros/mL. Estos resultados indican la ocurrencia de altos niveles de inóculo de Sss en esta región y enfatizan en la necesidad de fortalecer los programas de certificación de tubérculo-semilla en Colombia.

Palabras clave: PCR en tiempo real, sarna polvosa, *Solanum phureja*, *Solanum tuberosum*.

ABSTRACT

In recent years, potato crops (*Solanum tuberosum*, *S. phureja*) have been seriously affected by powdery scab; a disease caused by *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* (Sss). In Colombia, asymptomatic detection of Sss has been achieved with bait plants, PCR of ITS regions and ELISA tests. Unfortunately, these techniques have low sensitivity and may require long processing times. In this work, Quantitative real time PCR (qPCR) was tested for detection of Sss using different sets of primers. Primers SsTQF1-SsTQR1, Spon421F-Spon494R and SscOLF-SscOLR (designed in this study), were tested using SYBR Green®, while primers SponF-SponR were tested using the Taqman® probe SponP. Primers Spon421F-Spon494R were discarded due to lack of specificity. Standard curves were obtained from serial dilutions of cystosori. The 20 *N. benthamiana* and potato bait plants evaluated tested positive for Sss using primers SsTQF1-SsTQR1 (Ct: 10.57-29.34) and SscOLF-SscOLR (Ct: 14.39-34.08) and 19 samples were positive with primers SponF-SponR-SponP, with Ct values ranging between 15,63 and 38,93. Sss was detected in 17 out of 20 root samples from potato crops in La Unión (Antioquia) using primers SscOLF-SscOLR, with an estimated concentration of 6470- 1.39×10^{10} cystosori/mL. These results suggest high levels of Sss in the potato fields from this region and recall the importance of strengthening seed-certification programs in Colombia.

Keywords: powdery scab, real time PCR, *Solanum phureja*, *Solanum tuberosum*.

INTRODUCCIÓN

Spongospora subterranea (Wallroth) Lagerheim f. sp. *subterranea* Tomlinson (Sss) es un patógeno obligado protozoario que produce plasmodios capaces de infectar el sistema radicular y los tubérculos de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L. y *Solanum phureja* Juz. et. Buk), causando la enfermedad denominada sarna polvosa de la papa (Harrison et al., 1997). Este microorganismo también infecta otras plantas cultivadas y no cultivadas, principalmente dentro de la familia botánica Solanaceae. El patógeno se ha reportado en todos los continentes, pero es principalmente limitante sobre el rendimiento y la calidad de los tubérculos, en zonas con bajas temperaturas y suelos con altos

contenidos de materia orgánica como las islas británicas, el norte de Europa y los Andes suramericanos (Merz y Falloon, 2009; Santala *et al.*, 2010). En las raíces, la enfermedad se manifiesta en forma de agallas que afectan la absorción de nutrientes y agua. En estados avanzados de la infección las raíces se desintegran, liberando una gran cantidad de estructuras de resistencia (quistosoros), las cuales pueden perdurar por varias décadas en el suelo, sirviendo como fuente de inóculo para cultivos posteriores (Merz, 2008). Por otra parte, en los tubérculos se presentan lesiones pustulosas, corchosas, con centros polvosos formados por la agregación de los quistosoros del patógeno. Con el tiempo, es frecuente la ruptura del peridermo, aunque el nivel de penetración en los tubérculos es generalmente superficial (Harrison *et al.*, 1997; Merz, 2008).

En términos generales se ha estimado que la sarna polvosa puede disminuir la producción de tubérculos hasta en un 50 %, dependiendo del momento de infección del patógeno y de la variedad afectada. Recientemente, Gilchrist *et al.* (2011) estimaron que en la variedad Diacol Capiro, la sarna polvosa causa una reducción del 23 % sobre la longitud de las plantas, del 32 % en el peso seco foliar y del 30 % en el peso de los tubérculos; aunque el número de estos no fue afectado.

El manejo de la sarna polvosa se fundamenta en la siembra de material certificado en lotes libres del patógeno, para lo cual es necesario contar con sistemas altamente sensibles de detección del microorganismo. Para esto, se han utilizado diferentes métodos incluyendo la utilización de plantas trampa de *Nicotiana benthamiana* Domin, tomate (*Solanum lycopersicum* L.) o papa (Merz, 1989), pruebas de ELISA y flujo lateral con anticuerpos policlonales (Harrison *et al.*, 1993) y monoclonales (Walsh *et al.*, 1996; Merz *et al.*, 2005; Bouchek-Mechiche *et al.*, 2011), y PCR convencional con los cebadores específicos Spo8-Spo9 (Bulman y Marshall, 1998); Sps1-Sps2 (Bell *et al.*, 1999) y SsF-SsR (Qu *et al.*, 2006). Sin embargo, estas metodologías generalmente presentan bajos niveles de sensibilidad, requieren períodos de tiempo superiores a 24 h para obtener resultados o no permiten la cuantificación del nivel de inóculo del patógeno presente en los suelos o plantas afectadas. Dichas restricciones pueden ser suplidas con el uso de la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Con esta metodología, el ADN de un organismo puede ser detectado y cuantificado durante los ciclos iniciales de amplificación por PCR justo después de que comienza la fase exponencial. De esta forma, se realiza la medición de la fluorescencia generada por la liberación de un colorante intercalante en la doble cadena de ADN (generalmente SYBR Green®) o por la ruptura de una sonda específica marcada con fluorocromos. Dicho nivel de fluorescencia puede ser asociado a una concentración conocida de ADN o de propágulos de un patógeno, por comparación con curvas estándar preestablecidas. La técnica de qPCR permite obtener resultados en tan solo 6 h, incluyendo la extracción de ADN y el análisis de la amplificación (Shena *et al.*, 2004).

Para la detección de Sss, se han evaluado diferentes formatos de qPCR a partir del ADN del patógeno presente en fuentes tan diversas como aguas, suelos, plantas señuelo, raíces y tubérculos de papa (Van de Graaf *et al.*, 2003). Su utilidad ha sido probada con muestras de tubérculos obtenidas directamente en el campo, confirmándose su capacidad para detectar Sss en tejidos asintomáticos y con niveles de sensibilidad, al menos 100 veces superiores, respecto a las pruebas de ELISA y PCR convencional (Ward *et al.*, 2004). Adicionalmente, Qu *et al.* (2011) diseñaron una prueba de qPCR múltiple

para la detección simultánea de Sss y *Streptomyces scabies*, agente causal de la sarna común de la papa, a partir del diseño de cebadores y sondas TaqMan®, marcadas con fluorocromos diferentes. En dicho estudio se detectaron ambos patógenos en niveles tan bajos como 100 fg y con valores del ciclo umbral (Ct) en el rango de 22 a 38. En Colombia, la detección de Sss en tubérculos y suelos, se ha realizado principalmente por la evaluación visual de la sintomatología de la enfermedad en raíces y tubérculos, la utilización de bioensayos con plantas señuelo (Ramírez *et al.*, 2009), el conteo directo de quistosoros previo tamizaje de muestras de suelos (Jaramillo y Botero, 2007; Ramírez *et al.* 2009) y la utilización de PCR convencional utilizando cebadores específicos (Carreño, 2009; Osorio, 2012). Para esto, se han utilizado combinaciones de diversos cebadores que permiten la amplificación de la región ITS del ADNr del patógeno (Spo1-Spo2; Spo8-Spo9 y Sps1-Sps2) (Saavedra *et al.*, 2004; Carreño 2009; Osorio, 2012). Las pruebas de qPCR se constituyen en una herramienta altamente sensible y eficiente para la detección y cuantificación de los niveles de inóculo de Sss en plantas y suelos, en esta investigación se evaluó la utilidad de los cebadores y sondas previamente reportados en la literatura para esta técnica, sobre aislamientos colombianos del patógeno. Adicionalmente, se diseñó un par de cebadores con base en secuencias de las regiones ITS del ADNr de los tres Tipos de Sss presentes en el país, y se validó su utilidad a partir de muestras de raíces de papa y de plantas señuelo de *N. benthamiana* y *S. phureja*.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS

La evaluación inicial de los juegos de cebadores para qPCR, se realizó a partir de 15 muestras de raíces de papa (*S. tuberosum* y *S. phureja*) con síntomas de sarna polvosa, obtenidas en cuatro cultivos diferentes del municipio de La Unión (Antioquia) (5° 58' 38" N y 75° 24' 54" O). Una vez seleccionados los cebadores, se realizaron evaluaciones de qPCR en diez plantas de *N. benthamiana* y diez plantas de *S. phureja*, previamente inoculadas con quistosoros de Sss provenientes de los municipios de La Unión y Santa Rosa de Osos (Antioquia), Zipaquirá, Tabio, Subachoque y Villa Pinzón (Cundinamarca), Tunja, Siachoque, Soracá, Oicatá (Boyacá) y Pasto e Ipiales (Nariño). La inoculación se realizó siguiendo la metodología de Vélez (2007); las plantas se mantuvieron en casa de malla en el Centro Experimental Paysandú, ubicado en el corregimiento Santa Elena, municipio de Medellín (Antioquia, 6° 12' 37" N y 75° 30' 11" O, 2550 msnm). Finalmente, se tomaron 20 muestras aleatorias de raíz en cuatro cultivos de papa del municipio de La Unión (Antioquia), con el fin de validar la utilidad de las pruebas de qPCR para la detección de Sss en tejidos asintomáticos.

DETECCIÓN DE SSS POR PCR CONVENCIONAL

Para confirmar la presencia de Sss en las 15 muestras de raíces con síntomas de agallas, se realizaron reacciones de PCR empleando los cebadores específicos Spo8 (5' CTG GGT GCG ATT GTC TGT TG 3') y Spo9 (5' CAC GCC AAT GGT TAG AGA CG 3') que amplifican fragmentos de 391 pb de la región ITS del ADNr (Bulman y Marshall, 1998). El ADN fue obtenido utilizando el *kit DNeasy Plant* (Qiagen, E.E. U.U.), a partir de 100 mg de tejido radicular macerado en presencia de nitrógeno líquido y siguiendo las instruc-

ciones del fabricante. Para determinar la concentración del ADN extraído, se utilizó la lectura de absorbancia mediante un Nanodrop 2000C (Thermo, E.E. U.U.). La integridad del ADN se determinó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % suplementado con bromuro de etidio (10 mg/ml). La visualización de las bandas se realizó utilizando el sistema digital de análisis Bio Doc Analyze (Biometra, Alemania). Las reacciones de PCR incluyeron 0,1 µM de cada cebador, 1 U de Taq ADN polimerasa recombinante (Fermentas, Lituania), 0,2 mM de cada dNTP, 1X de buffer de enzima, 2 mM MgCl₂, 50 ng de ADN y un volumen total de 25 µL. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador T3 (Biometra, Alemania) y consistieron de una desnaturación inicial a 98 °C por 3 min seguida por 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min y un período final de extensión a 72 °C por 10 min. Luego de la amplificación, se tomaron 5 µL de los productos de reacción y se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %.

Los amplicones del tamaño esperado, fueron purificados mediante el *kit QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, E.E. U.U.), para proceder a su secuenciación directa en las dos direcciones utilizando los cebadores empleados en el PCR y el *kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (PE Applied Biosystems, E.E. U.U.). Su corrido y separación se realizó en un secuenciador ABI Prism 3730xl (PE Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas con cada cebador fueron editadas mediante el *software* BioEdit 6.0.6 (Hall, 1999), construyéndose secuencias consenso y confirmándose su validez por comparación con las bases de datos moleculares del NCBI utilizando el programa BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>).

EVALUACIÓN DE qPCR PARA DETECCIÓN DE Sss

Una vez confirmada la presencia de Sss, se procedió a evaluar la utilidad por PCR convencional de los cebadores diseñados para pruebas de qPCR, a partir del ADN de 12 de los aislamientos colombianos de Sss. Los cebadores evaluados fueron: SsTQF1 (5' CCG GCA GAC CCA AAA CC 3') y SsTQR1 (5' CGG GCG TCA CCC TTC A 3') (Van de Graaf *et al.*, 2003), Spon421F (5' TGG CTT CTG ATT CGT CTC TAA CC 3') y Spon494R (5' TCA TTT GAG ATC TAG AGT CAG AAA TGG 3') (Ward *et al.*, 2004), SponF (5' CTT TGA GTG TCG GTT TCT ATT CTC CC 3') y SponR (5' GCA CGC CAA TGG TTA GAG ACG 3') (Qu *et al.* 2011). Adicionalmente, con base en las secuencias de los aislamientos de Sss secuenciados en este estudio y de aquellas previamente reportadas por Osorio (2012), para los tres tipos de Sss presentes en el país, se realizó un análisis de alineamiento mediante el programa Clustal W (Larkin *et al.*, 2007) y se diseñaron los cebadores SscolF (5' TGA AAG CAT GCC TCT TTG AGT GTC GG 3') y SscolR (5' CTT TCA AGC CAT GGA CCG ACC AGA G 3'), con la ayuda del programa Primer 3 (Rozen y Skaletsky, 2000). La especificidad de estos cebadores se evaluó por comparaciones mediante BlastN con las bases de datos moleculares del NCBI. Las reacciones de PCR y su separación por electroforesis se realizaron bajo las condiciones indicadas previamente. Por último, para verificar su naturaleza, se purificaron y secuenciaron al menos dos amplicones obtenidos con cada par de cebadores.

Una vez confirmada la especificidad de los cebadores por PCR convencional, se procedió a evaluarlos mediante qPCR con SYBR Green®. Las reacciones se realizaron utilizando el *kit* Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas), en 25 µL de reacción

conteniendo 12,5 μ L del *kit*, 10 μ L de agua estéril libre de nucleasas, 0,75 μ L de cada cebador (10 μ M) y 50 ng de ADN. Las reacciones fueron realizadas en un equipo Rotor-Gene Q-5plex Platform (Qiagen) y consistieron de 95 °C por 2 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 15 seg y 60 °C durante 1 min para los cebadores SsTQF1-SsTQR1, Spon421F-Spon494R y SscolF-SscolR; mientras que para los cebadores SponF-SponR las condiciones fueron 95 °C durante 2 min y 40 ciclos de 95 °C durante 25 seg y 60 °C durante 1 min. El juego de cebadores SponF-SponR fue también evaluado bajo el formato Taqman®, utilizando la sonda SponP (5' FAM-TCT TTC AAG CCA TGG ACC GAC CAG A- BHQ-1 3') diseñada por Qu *et al.* (2011). En estas reacciones se utilizó el *kit* Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas) en 25 μ L de reacción conteniendo 12,5 μ L del *kit*, 9,5 μ L de agua destilada libre de nucleasas, 0,75 μ L de cada cebador (10 μ M), 0,5 μ L de sonda (10 μ M) y 50 ng de ADN. Las reacciones consistieron de 95 °C por 2 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 15 seg y 60 °C durante 1 min. La adquisición de fluorescencia se realizó después de cada ciclo de amplificación y los valores de Ct para cada muestra fueron definidos utilizando los valores por defecto del *software* Rotor-Gene Q ver. 1.7, siendo consideradas como positivas aquellas muestras que superaron el valor umbral antes del ciclo 40 (Shena *et al.*, 2004). Las eficiencias de las reacciones se calcularon con la fórmula $E = 10^{(-1/m)}$, donde E es la eficiencia de la amplificación y m la pendiente de la curva estándar generada a partir de la concentración de quistosoros vs los valores de Ct. Todos los ensayos presentaron dos controles negativos con agua destilada estéril y un control positivo consistente en ADN de una muestra de Sss obtenida directamente de quistosoros del patógeno por Osorio (2012). Finalmente, para corroborar la presencia de bandas únicas en las amplificaciones de qPCR, se realizaron corridos electroforéticos en gel de agarosa al 2,5 %.

PREPARACIÓN DE CURVAS ESTÁNDAR

Se realizaron curvas estándar para ser utilizadas con cada uno de los tres juegos de cebadores seleccionados bajo los sistemas SYBR Green® y Taqman®, a partir de la preparación de diluciones seriadas de quistosoros de Sss, obtenidos de muestras de agallas de raíces de *S. phureja*, maceradas y tamizadas en mallas de 90 y 25 μ m. De esta forma, 100 mg de quistosoros fueron diluïdos en 10 mL de agua destilada y se procedió a su conteo directo utilizando una cámara de Neubauer, obteniéndose un promedio de 16.520.000 quistosoros/mL con base en cinco lecturas independientes. A partir de esta concentración inicial se preparó una suspensión de 12.500.000 quistosoros/mL y sus diluciones respectivas de 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000. Posteriormente se procedió a extraer el ADN de los quistosoros presentes en dichas diluciones, mediante el *kit* ULTRA Clean™ Soil DNA isolation (MO Bio Laboratories, E.E. U.U.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las reacciones de qPCR se realizaron bajo las condiciones descritas anteriormente.

VALIDACIÓN DE LAS PRUEBAS DE qPCR

Se realizaron evaluaciones mediante qPCR a partir de 20 muestras de raíces de plantas señuelo y de 20 muestras obtenidas en forma aleatoria de cultivos de papa del municipio de La Unión (Antioquia). El ADN fue extraído utilizando el *kit* DNeasy Plant

(Qiagen) y las pruebas se realizaron con los cebadores SsTQF1-SsTQR1 y SscolF-SscolR bajo el formato de SYBR Green® y SponF-SponR con la sonda Taqman® SponP. Las condiciones de las amplificaciones fueron similares a las descritas anteriormente para ambos formatos de qPCR. La cuantificación del inóculo de Sss en dichas muestras, se realizó por comparación con los valores de Ct en la curva estándar realizada para cada juego de cebadores.

RESULTADOS

DETECCIÓN DE SSS POR PCR CONVENCIONAL

Se confirmó la presencia de Sss en 14 de las 15 muestras de papa con síntomas de sarna polvosa conseguida del municipio de La Unión, obteniéndose amplicones de 391 pb en las reacciones de PCR convencional con los cebadores Spo8-Spo9 (Fig. 1A). Cinco de estos amplicones fueron secuenciados y el análisis de BlastN indicó valores de identidad entre el 96 % al 99 %, con valores e entre $1e^{-173}$ y 0,0 y porcentajes de cobertura del 99 al 100 %, con respecto a secuencias de Sss previamente depositadas en las bases de datos moleculares del NCBI (AY604172, AF102819, EF593112, AY604171 y AF305697).

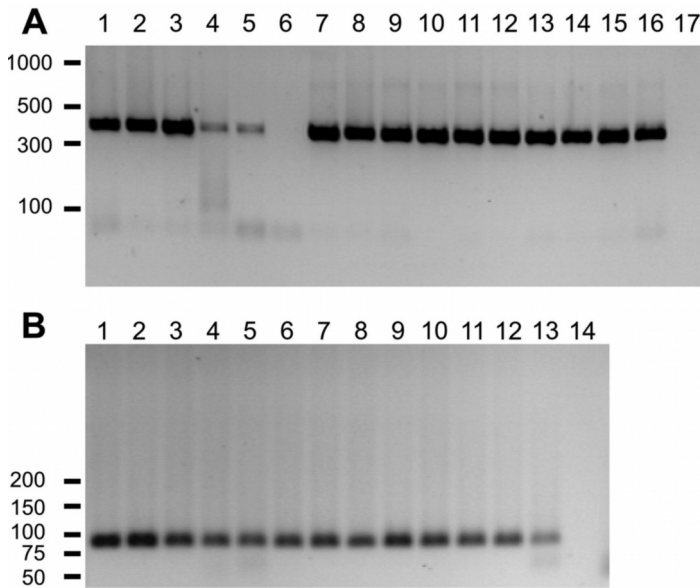


Figura 1. A. Detección de *Spongospora subterranea* mediante PCR convencional con los cebadores específicos Spo8-Spo9, a partir de 15 muestras de raíces de papa con síntomas de sarna polvosa, obtenidas en el municipio de La Unión (Antioquia). Marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas); 1 a 15: muestras de raíces; 16: control positivo (ADN de quistosoros de Sss), 17: control negativo. B. qPCR con los cebadores específicos diseñados en este estudio (SscolF-SscolR), a partir de 12 muestras de raíces de papa con síntomas de sarna polvosa, obtenidas en el municipio de La Unión (Antioquia). Marcador de peso molecular 25 pb (Promega), 1 a 12: muestras de raíces de papa, 13: control positivo (ADN de quistosoros de Sss), 14: control negativo.

EVALUACIÓN DE qPCR PARA DETECCIÓN DE SSS

Una vez confirmada la presencia de Sss, se evaluó la amplificación y especificidad de los cebadores Spon421F-Spon494R, SponF-SponR y ScolF-ScolR, SsTQF1-SsTQR1 mediante PCR convencional. Para los tres primeros juegos de cebadores, se obtuvieron los productos del tamaño esperado de 72, 138 y 97 pb, respectivamente, mientras que la amplificación con SsTQF1-SsTQR1 generó múltiples bandas, incluyendo la del tamaño esperado de 61 pb. El análisis de secuencias de al menos dos amplicones seleccionados para todos los cebadores, permitió confirmar la identidad de estos por comparaciones con las bases de datos moleculares (Tabla 1).

Muestra	Identidad en GenBank	n.º accesión	Tamaño (pb)	% dentidad	Valor e
Cebadores ScolF-ScolR					
L1R1	<i>Spongospora subterranea</i>	EF593112	68	85 %	4×10^{-10}
L4R1	<i>Spongospora subterranea</i>	EF593112	66	88 %	6×10^{-08}
L1R2	<i>Spongospora subterranea</i>	EF593112	60	95 %	3×10^{-17}
L4R1	<i>Spongospora subterranea</i>	EF593112	67	86 %	3×10^{-06}
Cebadores Spon421F-Spon494R					
L1R2	<i>Spongospora subterranea</i>	AY604171	37	100 %	0,002
L1R1	<i>Spongospora subterranea</i>	AY604171	40	97 %	3×10^{-06}
Cebadores SsTQF1-SsTQR1					
L1R2	<i>Spongospora subterranea</i>	EF593112	33	95 %	0,007
L2R2	<i>Spongospora subterranea</i>	EF593112	25	95 %	0,005
Cebadores SponF-SponR					
L1R1	<i>Spongospora subterranea</i>	EF593112	100	100 %	9×10^{-41}
L2R2	<i>Spongospora subterranea</i>	EF593112	98	100 %	4×10^{-39}
L1R3	<i>Spongospora subterranea</i>	EF593112	97	100 %	4×10^{-39}
L3R1	<i>Spongospora subterranea</i>	EF593112	98	100 %	4×10^{-39}

Tabla 1. Resultados de BlastN a partir de secuencias de regiones ITS del ADNr obtenidas con la utilización de cuatro juegos de cebadores diseñados para la detección de *Spongospora subterranea* mediante qPCR.

Las pruebas de amplificación utilizando qPCR permitieron detectar a Sss en las 12 muestras sintomáticas utilizadas para la evaluación, cuando se utilizaron los juegos de cebadores SsTQF1-SsTQR1, SponF-SponR y ScolF-ScolR; lográndose valores de Ct que oscilaron entre 23,31-35,44; 13,21-25,93 y 14,89-32,71, respectivamente. El empleo de los cebadores Spon421F-Spon494R, no permitió la detección del patógeno en ninguna de las muestras evaluadas y por esto se descartó su utilización en las pruebas de qPCR posteriores. Finalmente, con el fin de confirmar la especificidad de los amplicones obtenidos, se corrieron geles de electroforesis a partir de los productos de qPCR, encontrándose bandas únicas del tamaño esperado para los tres juegos de cebadores seleccionados, incluyendo aquellos diseñados en este estudio (Fig. 1B).

PREPARACIÓN DE CURVAS ESTÁNDAR

Las curvas estándar realizadas para los tres juegos de cebadores seleccionados, arrojaron coeficientes de correlación R^2 de 0,984; 0,968 y 0,961, así como pendientes de

-3,69, -3,82 y -3,63 para los cebadores SsTQF1-SsTQR1, SscOLF-SscOLR, y SponF-SponR, respectivamente. Por esto, las eficiencias de las reacciones calculadas fueron de 0,89, 0,83 y 0,88 para dichos juegos de cebadores (Fig. 2).

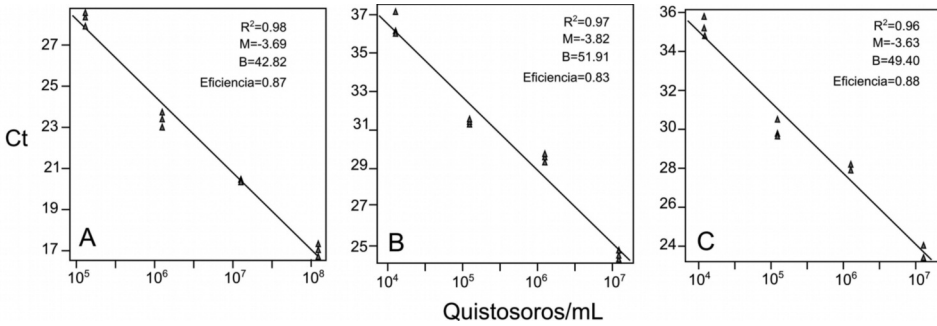


Figura 2. Curvas estándar construídas en las pruebas de qPCR para la cuantificación de quistosoros de *Spongopsora subterranea*. (A). Cebadores SscOLF-SscOLR. (B). Cebadores SsTQF1-SsTQR1. (C). Cebadores SponF- SponR. Se presentan los valores del coeficiente de correlación (R^2), la pendiente (M), el intercepto (B) y la eficiencia de la reacción.

VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE QPCR

Los resultados de las pruebas de validación de qPCR, indicaron que bajo el sistema de SYBRGreen® con los dos juegos de cebadores evaluados (SsTQF1-SsTQR1 y SscOLF-SscOLR), se detectaron como positivas para Sss las 20 muestras de plantas señuelo inoculadas con quistosoros del patógeno provenientes de los cuatro principales departamentos productores de papa en Colombia (Fig. 3); mientras que con el sistema Taqman® con SponF-SponR, se detectó a Sss en 19 de las muestras. Los valores de Ct calculados en estas evaluaciones para plantas señuelo ocurrieron en el rango de 10,56 a 38,39 y las concentraciones de quistosoros/mL determinadas con base en las curvas estándar construídas para cada par de cebadores, se presentaron entre los ordenes de magnitud de 1×10^3 a 1×10^9 (Tabla 2).

Por otra parte, en las evaluaciones realizadas a partir de las 20 muestras de raíces obtenidas en La Unión (Antioquia), se detectó la presencia del patógeno en 18 de las muestras utilizando el sistema SYBR Green® con los juegos de cebadores SsTQF1-SsTQR1, al igual que con el sistema Taqman® usando los cebadores SponF-SponR; mientras que con los cebadores SscOLF-SscOLR dicha detección se realizó en 17 de las 20 muestras evaluadas (Fig. 3). En este caso los valores de Ct se presentaron en un rango de 13,09 a 39,9 y las concentraciones estimadas de quistosoros/mL oscilaron entre 6,35 y 1×10^{10} (Tabla 2).

DISCUSIÓN

La sarna polvosa de la papa causada por Sss, es una de las enfermedades más limitantes en la actualidad para el cultivo de la papa en Colombia. A pesar de que este patógeno fue reportado en el país desde la década de 1960, fue recientemente cuando su

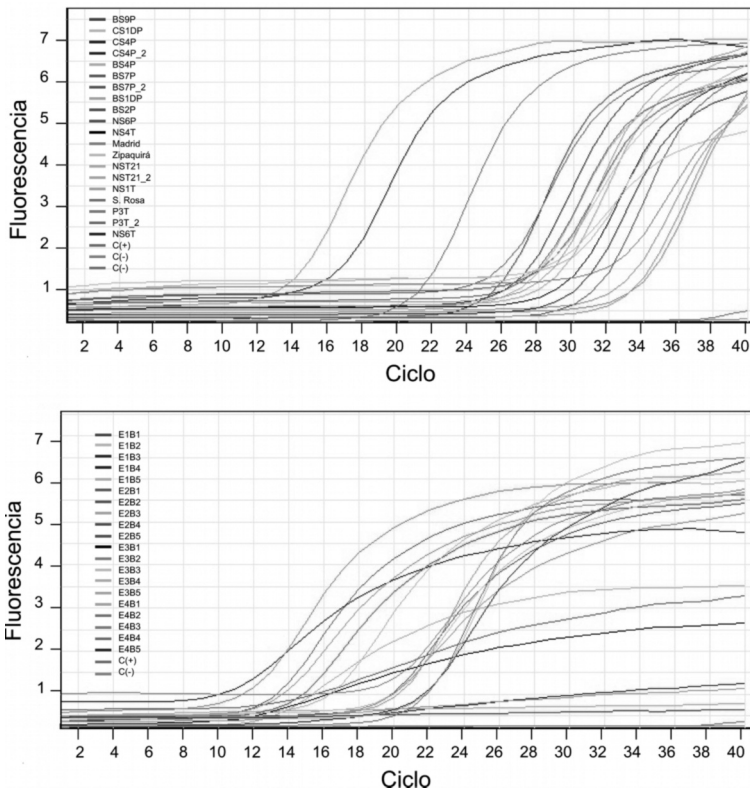


Figura 3. Curvas de amplificación por qPCR utilizando el sistema SYBR Green® y los cebadores SscOLF-SscOLR para la detección de *Spongospora subterranea* a partir de 20 muestras de plantas señuelo de *Nicotiana benthamiana* y *Solanum phureja* (arriba) y 20 muestras de papa obtenidas en cuatro cultivos del municipio de La Unión (Antioquia) (abajo).

importancia económica se tornó relevante. Adicionalmente, en los últimos años se ha confirmado que este patógeno actúa como vector del *Potato mop-top virus* (PMTV) en las diferentes regiones colombianas cultivadoras de papa del país (Vélez, 2007; Gil *et al.*, 2011). La re-emergencia en la última década de la sarna polvosa de la papa en Colombia, se debe entre otros aspectos a la deficiente calidad del tubérculo-semilla utilizado por la mayoría de los agricultores, las deficiencias en las prácticas de rotación de cultivos, la ausencia de variedades tolerantes a dicho patógeno y la carencia/deficiencia de asistencia técnica estatal o gremial, que no cuenta con herramientas apropiadas para el diagnóstico asintomático y para la certificación de semilla libre de Sss y PMTV (Osorio, 2012). Este último aspecto es clave para el manejo de la sarna polvosa, por cuanto los primeros síntomas de la enfermedad en las raíces generalmente se presentan en estados avanzados del desarrollo de los cultivos, justo antes de la floración de las plantas, mientras que en los tubérculos pueden incluso sólo ser evidentes durante el período de poscosecha (Merz, 2008). Así mismo, dependiendo de las variedades cultivadas, es posible la presencia de síntomas en tubérculos pero no en raíces, o viceversa

Sistema de PCRq		SYBR Green®			Taqman®	
Cebadores	SsTQF1-SsTQR1		SscolF-SscolR		SponF-SponR	
Muestras	Ct*	Quistosoros/mL	Ct	Quistosoros/mL	Ct	Quistosoros/mL
Muestras de plantas señuelo						
BS9-P	21,34	6,75x10 ⁵	25,33	8,82x10 ⁶	28,37	6,43x10 ⁵
CS10-P	23,82	1,44x10 ⁵	27,91	1,86x10 ⁶	30,72	1,41x10 ⁵
CS4-P	12,41	1,77x10 ⁸	17,06	1,28x10 ⁹	19,06	2,65x10 ⁸
CS4-PII	23,58	1,67x10 ⁵	27,26	2,76x10 ⁶	29,52	3,06x10 ⁵
BS4-P	25,51	5,03x10 ⁴	29,22	8,46x10 ⁵	31,62	7,90x10 ⁴
BS7-P	23,38	1,90x10 ⁵	26,64	4,00x10 ⁶	29,09	4,05x10 ⁵
BS7-PII	27,55	1,41x10 ⁴	31,02	2,87x10 ⁵	33,93	1,77x10 ⁴
BS10-P	10,56	5,63x10 ⁸	14,39	6,37x10 ⁹	15,63	2,44x10 ⁹
BS2-P	25,26	5,88x10 ⁴	28,27	1,50x10 ⁶	31,43	8,94x10 ⁴
NS6-P	25,75	4,32x10 ⁴	29,38	7,72x10 ⁵	32,49	4,49x10 ⁴
NS4-T	25,85	4,06x10 ⁴	30,09	5,04x10 ⁵	31,95	6,36x10 ⁴
Madrid-T	29,14	5,23x10 ³	33,9	5,07x10 ⁴	38,39	9,87x10 ²
Zipacquirá-T	26,1	3,48x10 ⁴	30,12	4,93x10 ⁵	31,97	6,28x10 ⁴
NS12-T	27,05	1,93x10 ⁴	31,53	2,12x10 ⁵	33,25	2,75x10 ⁴
NS12-TII	26,72	2,37x10 ⁴	31,83	1,76x10 ⁵	33,27	2,71x10 ⁴
NS1-T	25,33	5,61x10 ⁴	29,01	9,62x10 ⁵	30,58	1,54x10 ⁵
S.ROSA-T	29,34	4,62x10 ³	34,08	4,55x10 ⁴	36,63	3,09x10 ³
P3-T	29,21	4,99x10 ³	33,21	7,70x10 ⁴	>40	-
P3-TII	28,76	6,62x10 ³	33,37	6,98x10 ⁴	38,13	1,17x10 ³
NS6-T	27,49	1,46x10 ⁴	30,42	4,13x10 ⁵	35,91	4,91x10 ³
Muestras de papa obtenidas en campo						
F1R1	39,9	6,35	>40	-	>40	-
F1R2	15,21	3,10x10 ⁷	15,81	2,70x10 ⁹	14,33	5,64x10 ⁹
F1R3	18,96	2,98x10 ⁶	14,36	6,47x10 ⁹	14,12	6,47x10 ⁹
F1R4	>40	-	37,32	6,47x10 ³	18,62	3,53x10 ⁸
F1R5	>40	-	>40	-	>40	-
F2R1	19,31	2,40x10 ⁶	21,48	8,91x10 ⁷	16,15	1,75x10 ⁹
F2R2	21,24	7,19x10 ⁵	20,8	1,35x10 ⁸	21,78	4,56x10 ⁷
F2R3	18,99	2,92x10 ⁶	20,97	1,21x10 ⁸	22,32	3,23x10 ⁷
F2R4	13,79	7,47x10 ⁷	13,85	8,79x10 ⁹	14,31	5,74x10 ⁹
F2R5	16,37	1,50x10 ⁷	15,72	2,86x10 ⁹	16,3	1,58x10 ⁹
F3R1	37,12	3,61x10 ¹	18,04	7,09x10 ⁸	14,12	6,46x10 ⁹
F3R2	11,41	3,31x10 ⁸	13,09	1,39x10 ¹⁰	13,09	1,26x10 ¹⁰
F3R3	19,58	2,02x10 ⁶	22,11	6,11x10 ⁷	23,8	1,24x10 ⁷
F3R4	18,32	4,45x10 ⁶	17,45	1,01x10 ⁹	18,03	5,17x10 ⁸
F3R5	21,12	7,77x10 ⁵	21,17	1,08x10 ⁸	21,53	5,37x10 ⁷
F4R1	21,76	5,20x10 ⁵	>40	-	14,56	4,88x10 ⁹
F4R2	20,82	9,36x10 ⁵	22,49	4,85x10 ⁷	22,81	2,35x10 ⁷
F4R3	21,36	6,68x10 ⁵	21,1	1,12x10 ⁸	21,8	4,52x10 ⁷
F4R4	15,76	2,19x10 ⁷	14,87	4,77x10 ⁹	15,49	2,67x10 ⁹
F4R5	20,45	1,18x10 ⁶	22,45	4,99x10 ⁷	24,52	7,79x10 ⁶

Tabla 2. Detección y cuantificación por qPCR de *Spongospora subterranea* a partir de 20 muestras de plantas señuelo inoculadas con quistosoros del patógeno provenientes de suelos infestados en diferentes departamentos de Colombia y 20 muestras de raíces de papa colectadas al azar en cuatro cultivos de papa en el municipio de La Unión (Antioquia). * Valores de Ct superiores a 40, corresponden a resultados negativos.

(Jaramillo y Botero, 2007), o aún que se presente confusión con los síntomas de la Roña común, causada por *S. scabies* (Qu *et al.*, 2011).

Por lo anterior, en este estudio se planteó la evaluación de diferentes sistemas de qPCR para la detección asintomática de Sss, como una estrategia para complementar las metodologías actualmente disponibles para este fin en el país, que incluyen pruebas de ELISA, PCR convencional con cebadores específicos dirigidos a las regiones ITS del ADNr y bioensayos con plantas señuelo (Osorio, 2012). Adicionalmente, se diseñó un juego de cebadores para qPCR (SscOLF-SscOLR), con base en secuencias de regiones ITS de aislamientos colombianos de Sss. Los resultados indicaron la funcionalidad de tres de los cuatro juegos de cebadores evaluados para la detección de aislamientos colombianos de Sss, dos bajo el sistema de SYBRGreen® [SsTQF1-SsTQR1 (Van de Graaf *et al.*, 2003) y SscOLF-SscOLR (de este estudio)] y uno utilizando el formato Taqman® [SponF-SponR y sonda SpoP (Qu *et al.*, 2011)]. Los cebadores Spon421F-Spon494R (Ward *et al.*, 2004), no presentaron amplificación por qPCR con el ADN de los 12 aislamientos colombianos de Sss inicialmente evaluados, por lo que fueron descartados para las pruebas de validación posteriores. Esta situación puede deberse a la inespecificidad de estos cebadores, con respecto a las secuencias de las regiones ITS que presentan los aislamientos colombianos de Sss. En este sentido, estudios recientes realizados por Carreño (2009) y Osorio (2012), han encontrado que en el país se presenta un mayor nivel de variación entre las poblaciones del patógeno. Así por ejemplo, Osorio (2012), determinó la presencia de tres Tipos principales de Sss en Colombia, dos de los cuales (Tipos I y II) corresponden a los Tipos mundialmente reportados (Qu y Christ, 2004), mientras que el tercero (Tipo III) solo se ha registrado en Colombia y se presentó en mayor proporción (65 % de 127 aislamientos analizados), con porcentajes de divergencia del 5 % y 2 %, con respecto a los Tipos I y II, respectivamente.

En el presente estudio se validó la utilidad de la técnica de qPCR para su utilización a partir de muestras de raíces asintomáticas de plantas señuelo de *N. benthamiana* y *S. phureja*, previamente inoculadas con quistosoros de Sss obtenidos en los cuatro principales departamentos productores de papa del país (Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Nariño), así como con muestras de raíces de papa, tomadas aleatoriamente de cuatro cultivos ubicados en La Unión (Antioquia). En el primer ensayo fue posible la detección del patógeno en la totalidad de las muestras cuando se utilizó el sistema SYBRGreen® con los dos juegos de cebadores evaluados, mientras que con el sistema Taqman®, se detectó el patógeno en 19 de las 20 muestras. La prueba arrojó valores de Ct tan bajos como 10,56, pero en general se presentaron en el rango de 20 a 33, aunque con algunas detecciones en ciclos extremos (Ct: 38 a 39). Para el caso de las muestras de campo, las pruebas detectaron el patógeno en 18 de las 20 muestras, y en este caso los valores de Ct se presentaron en el rango de 13,09 a 39,9, aunque con mayor frecuencia los ciclos de umbral se presentaron entre 18 y 25. Por esto, fue evidente que los niveles de infección de Sss, representados por la presencia de diferentes estructuras del plasmodiofórido incluyendo plasmodios, zoosporangios, zoosporas y quistosoros, fue mayor en los materiales de papa cultivados en La Unión que en las plantas señuelo. Esta situación se puede explicar por el escalamiento de inóculo de Sss presente en los suelos de este municipio, en donde se ha cultivado continuamente por varias décadas papa en sistemas de rotación con pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov.), lo que en términos

epidemiológicos en lugar de conducir a la reducción de los propágulos del patógeno en el suelo, ha causado su aumento, por cuanto se ha demostrado que el pasto kikuyo es un hospedero de Sss en Colombia (Arcila *et al.*, 2011).

Además, del uso de la qPCR para la detección de Sss, esta técnica puede ser utilizada para cuantificar en forma relativa o absoluta los niveles de inóculo de los patógenos (Shena *et al.*, 2004). En este trabajo se realizó la cuantificación absoluta de Sss en términos de quistosoros/mL, por comparación del valor Ct con curvas estándar, basadas en el conteo directo de suspensiones de quistosoros, obtenidos de agallas de raíces de *S. phureja*. De esta forma, en las pruebas de validación realizadas con plantas señuelo fue posible establecer concentraciones de quistosoros/mL en los tejidos radiculares en los órdenes de 1×10^3 a 1×10^9 ; mientras que en las pruebas de campo, dichos valores se presentaron en un rango de 6,35 a 1×10^{10} quistosoros/mL. Estas evaluaciones reflejan un alto nivel de variación con respecto a los del inóculo presentes entre plantas, incluso de un mismo lote, lo que se pudiera deber entre otros factores, a la distribución errática que presenta el patógeno en los suelos (Merz y Fallon, 2009), a las diferencias en los microclimas y microestructura del suelo en cada sitio de siembra y a las variaciones en las reacciones de defensa de las plantas, dada la falta de uniformidad genética de los materiales de siembra que comúnmente se cultivan en el país. Por esto, es fundamental que en trabajos tendientes a evaluar la presencia del patógeno en lotes de cultivo destinados a producir semilla certificada o para evaluar resistencia al patógeno de materiales vegetales mejorados, se realice un muestreo amplio y se considere el análisis por qPCR, de varias submuestras por cada área bajo análisis.

Por otra parte, aunque el objetivo de este trabajo no era evaluar los niveles de sensibilidad de la técnica de qPCR, en comparación con las otras metodologías utilizadas para la detección de Sss, es importante destacar que la técnica fue capaz de detectar cantidades tan bajas como 2,4 quistosoros/mL, lo cual se acerca a los límites de sensibilidad reportados por Van de Graaf *et al.* (2003), para esta prueba (<2 quistosoros/gr suelo y >0,5 quistosoros/mL en raíces de plantas señuelo). Se ha calculado que dichos límites de detección son superiores en al menos 100 veces, con respecto a las pruebas de ELISA y PCR convencional (Ward *et al.*, 2004), mientras que en términos de ADN, Qu *et al.* (2011) reportan que la qPCR utilizando sonda Taqman®, puede detectar hasta 100 fg de Sss y *S. scabies*.

En trabajos previos realizados por nuestro grupo para detectar Sss en plantas de papa y suelos con antecedentes del patógeno (Osorio, 2012), utilizando PCR convencional con los cebadores Spo8-9 y SsF y SsR diseñados por Bulman y Marshall (1998) y Qu *et al.* (2006), se presentaba como principal restricción, la ausencia de amplificación, cuando se realizaban extracciones de ADN convencionales que no empleaban kits comerciales, o en su defecto la generación de amplificaciones inespecíficas, lo cual desde el punto de vista práctico afecta el diagnóstico del patógeno. Además de la falta de especificidad de los cebadores, se ha reportado que dichos problemas se deben principalmente a la inhibición de la Taq polimerasa por parte de metabolitos secundarios como el ácido clorogénico, el cual se produce en los tejidos de papa afectados por la sarna polvosa y otras enfermedades; así como por la presencia de ácidos húmicos y fúlvicos en los suelos, que actúan quelatando los componentes de las reacciones de PCR (Singh *et al.*, 1998). Aunque la técnica de qPCR también es afectada por estos

factores, los mayores niveles de sensibilidad que ofrece la técnica, pueden conducir al diagnóstico del patógeno, aún bajo condiciones de inhibición parcial, por cuanto la detección se basa en las primeras fases de los ciclos de PCR y no depende de la acumulación exponencial de los productos finales, como ocurre con la PCR convencional (Shena *et al.*, 2004). Por esto, los resultados del estudio abren la posibilidad de aplicar las metodologías de qPCR evaluadas para la detección y cuantificación rutinaria de Sss en Colombia, siendo posible seleccionar formatos basados en SYBRGreen® o en sistemas Taqman®, dependiendo de las necesidades de los usuarios y de la disponibilidad de recursos. Adicionalmente, el uso de qPCR representa ventajas evidentes con respecto a los tiempos de procesamiento, por cuanto todo el proceso desde la llegada de la muestra hasta la entrega de resultados requiere máximo de 6 h.

Como un esquema general de detección asintomática de Sss, se sugiere el empleo inicial de técnicas de ELISA y/o PCR convencional utilizando anticuerpos y/o cebadores específicos para el patógeno, respectivamente, y para aquellos casos que presentan valor agregado (ej. materiales de semilla prebásica o básica, líneas élites de mejoramiento genético, etc.), importancia epidemiológica (ej. detección de Sss en zonas libres del patógeno, puertos de ingreso al país, etc.) en los que se requieren pruebas confirmatorias, o en proyectos de investigación, se recomienda utilizar la metodología de qPCR, pues dados sus altos costos actuales, es difícil su utilización rutinaria en la práctica agrícola nacional. Se espera que los organismos de sanidad vegetal estatales, los gremios de productores y especialmente las compañías productoras de tubérculo-semilla certificadas en el país, incorporen estas herramientas de detección de Sss en sus actividades de diagnóstico fitosanitario.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó en el marco del proyecto 090-2007S4527-87-08, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia y la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Se agradece a Inés Osorio por proveer las plantas señuelo para las evaluaciones bajo condiciones de casa malla; así como a Catalina Zuluaga del Politécnico Colombiano y a Jaime Isaza Cadavid, por facilitar las muestras de tubérculos para la generación de las curvas estándar.

BIBLIOGRAFÍA

ARCILA I., OCHOA J, ZULUAGA C, GONZÁLEZ EP. Inoculación de especies cultivables para la identificación de hospederos de *Spongospora subterranea* fsp *subterranea*. En: Memorias del XXX Congreso Colombiano y XVI Latinoamericano de Fitopatología. Bogotá; 2011. p. 64.

BELL K, ROBERTS J, VERRALL S, CULLEN D, WILLIAMS N, HARRISON J, *et al.* Detection and quantification of *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* in soils and on tubers using specific PCR primers. *Eur J Plant Pathol.* 1999;105(9):905-915.

BOUCHEK-MECHICHE K, MONTFORT F, MERZ U. Evaluation of the Sss AgriStrip rapid diagnostic test for the detection of *Spongospora subterranea* on potato tubers. *Eur J Plant Pathol.* 2011;131(2):277-287.

BULMAN SR, MARSHALL JW. Detection of *Spongospora subterranea* in potato tuber lesions using the polymerase chain reaction (PCR). *Plant Pathol.* 1998;47(6):759-766.

CARREÑO AJ. Evaluación de la variabilidad genética de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* mediante la comparación de regiones ITS del ADN ribosomal de cepas procedentes de las regiones productoras de papa en Colombia [Tesis de Maestría]. Bogotá: Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia; 2009. p. 104.

GIL JF, GUTIÉRREZ PA, COTES JM, GONZÁLEZ EP, MARÍN M. Caracterización genotípica de aislamientos colombianos del *Potato mop-top virus* (PMTV, Pomovirus). *Actual Biol.* 2011;33(94):69-84.

GILCHRIST E, SOLER J, MERZ U, REYNALDI S. Powdery scab effect on the potato *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* growth and yield. *Trop Plant Pathol.* 2011;36(6):350-355.

HALL TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999;41:95-98.

HARRISON JG, REES EA, BARKER H, LOWE R. Detection of spore balls of *Spongospora subterranea* on potato tuber by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Pathol.* 1993;42(2):181-186.

HARRISON JG, SEARLE RJ, WILLIAMS NA. Powdery scab disease of potato - a review. *Plant Pathol.* 1997;46(1):1-25.

JARAMILLO S, BOTERO JM. Respuesta de diferentes poblaciones de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* a la rotación entre dos cultivares de papa (*Solanum tuberosum* ssp. *andigena*). *Rev Fac Nal Agr Medellín.* 2007;60(2):3859-3876.

LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R, MCGETTIGAN PA, MCWILLIAM H, *et al.* ClustaW and ClustaX version 2. *Bioinformatics.* 2007;23(21):2947-2948.

MERZ U. Infectivity, inoculum density and germination of *Spongospora subterranea* resting spores: a solution culture test system. *Bull OEPP.* 1989;19(3):585-592.

MERZ U. Powdery scab of potato - occurrence, life cycle and epidemiology. *Am J Potato Res.* 2008;85(4):241-246.

MERZ U, FALLOON RE. Review: Powdery scab of potato-increased knowledge of pathogen biology and disease epidemiology for effective disease management. *Potato Res.* 2009;52(1):17-37.

MERZ U, WALSH JA, BOUCHEK-MECHICHE K, OBERHÄNSLI TH, BITTERLIN W. Improved immunological detection of *Spongospora subterranea*. *Eur J Plant Pathol.* 2005;111(4):371-379.

OSORIO IE. Variabilidad genética de *Spongospora subterranea* y su virus asociado PMTV en Colombia [Tesis de Maestría] Medellín: Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia; 2012. p. 135.

QU XS, CHRIST BJ. Genetic variation and phylogeny of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* based on ribosomal DNA sequence analysis. *Am J Potato Res.* 2004; 81(6):385-394.

QU XS, KAVANAGH JA, EGAN D, CHRIST BJ. Detection and quantification of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* by PCR in host tissue and naturally infested soils. *Am J Potato Res.* 2006;83(1):21-30.

QU XS, WANNER LA, CHRIST BJ. Multiplex real-time PCR (TaqMan) assay for the simultaneous detection and discrimination of potato powdery and common scab diseases and pathogens. *J Appl Microbiol.* 2011;110(3):769-777.

RAMÍREZ LA, GONZÁLEZ EP, ZULUAGA CM, COTES JM. Evaluación de Tres metodologías de rápida multiplicación de 30 accesiones de *Solanum tuberosum* grupo *phureja*. Rev Fac Nal Agr Medellín. 2009;62:11-13.

ROZEN S, SKALETSKY JH. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol Biol. 2000;132:365-386.

SAAVEDRA CO, GÓMEZ ST, ÁNGEL JE. Detección de secuencias específicas de ADN de *Spongospora subterranea* en suelo y tubérculos de papa. Rev Col Biotecnol. 2004;7(1):14-23.

SANTALA J, SAMUILOVA O, HANNUKKALA A, LATVALA S, KORTEMAA H, BEUCH U, *et al.* Detection, distribution and control of Potato mop-top virus, a soil-borne virus, in northern Europe. Ann Appl Biol. 2010;157(1):163-178.

SCHENA L, NIGRO F, IPPOLITO A, GALLITELLI D. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. Eur J Plant Pathol. 2004;110:893-908.

SINGH RP, SINGH M, KING RR. Use of citric acid for neutralizing polymerase chain reaction inhibition by chlorogenic acid in potato extracts. J Virol Methods. 1998;74:231-235.

VAN DE GRAAF PV, LEES AK, CULLEN DW, DUNCAN JM. Detection and quantification of *Spongospora subterranea* soil, water and tissue samples using real-time PCR. Eur J Plant Pathol. 2003;109(6):589-597.

VÉLEZ B. 2007. Detección e identificación del *Potato mop-top virus* (PMTV) en áreas de producción de papa donde se encuentra *Spongospora subterranea* en dos departamentos de Colombia. [Tesis de Maestría]. Bogotá: Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia; 2007. p. 115.

WALSH JA, MERZ U, HARRISON JG. Serological detection of spore balls of *Spongospora subterranea* using monoclonal antibodies. Plant Pathol. 1996;44(3):335-365.

WARD E, KANYUKA K, MOTTERAM J, KORNKYUKHIN D, ADAMS MJ. The use of conventional and quantitative real-time PCR assays for *Polymyxa graminis* to examine host plant resistance, inoculum levels and intraspecific variation. New Phytol. 2004;165(3):875-885.