

**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA *in vitro* PARA ESTUDIOS DE  
*Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* EN RAÍCES DE PAPA  
(*Solanum tuberosum* subsp. *andigena* L.) Var. DIACOL CAPIRO**

**EVALUATION OF AN *in vitro* SYSTEM FOR THE STUDY  
OF *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* IN POTATO  
ROOTS (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena* L.) Var. DIACOL  
CAPIRO**

JULIANA SOLER ARANGO<sup>1\*</sup>, WILFREDO BENAVIDEZ<sup>2</sup>, ELIZABETH GILCHRIST  
RAMELLI<sup>3</sup>, JUAN GONZALO MORALES<sup>4</sup>, JUAN CARLOS PÉREZ NARANJO<sup>5</sup>

Recibido: 25-10-12, aceptado: 7-12-12, versión final: 21-12-12  
Artículo Investigación

**RESUMEN:** La papa es uno de los principales cultivos de importancia a nivel mundial. Según la Cadena Agroalimentaria de la papa de Colombia, la sarna polvosa está dentro de los siete principales problemas fitosanitarios de este cultivo en las zonas productoras. La enfermedad es causada por el patógeno *Spongospora subterranea*, que disminuye la producción y calidad de los tubérculos. La naturaleza obligada del patógeno imposibilita su aislamiento y el mantenimiento de cepas, dificultando su investigación. En este trabajo se buscó estandarizar el cultivo de raíces de papa *in vitro* infectadas con el patógeno, para permitir su mantenimiento y proliferación y avanzar así en las investigaciones posteriores sobre biología del patógeno y su interacción con sus hospedantes. En un medio gelificado *in vitro* y en un ambiente controlado se asociaron las raíces de las plantas al microorganismo, mientras que la parte aérea desarrolló fotosíntesis. Se realizaron evaluaciones durante dos meses después de inoculadas las raíces con quistosoros desinfectados, período de tiempo que fue condicionado por la contaminación del sistema de cultivo. Sin embargo, en observaciones al microscopio, se lograron detectar las estructuras de *S. subterranea*.

**PALABRAS CLAVE:** Ácido naftalen-acético (ANA), quistosoros, sarna polvosa de la papa.

**ABSTRACT:** The potato is one of the main crops with global importance. According to the Colombian board of potato producers, the powdery scab is within the seven main phytosanitary problems of this crop in producing areas. The disease is caused by the pathogen *Spongospora subterranea*, which reduces the tubers yield and quality. The obligate nature of *S. subterranea* and the difficulty of isolating and maintaining strains have hampered the research on this disease. In this work we wanted to standardize the *In vitro* culture of potato roots infected with the pathogen, to allow its maintenance and proliferation, and subsequent research on the biology of the pathogen and in the interaction with their plants hosts. Here the plant roots were associated

<sup>1</sup> Ingeniera Biológica, M. Sc. Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

<sup>2</sup> Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín

<sup>3</sup> Ingeniera Agrónoma, M. Sc. Biotecnología, Doctora Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

<sup>4</sup> Ingeniero Agrónomo, M. Sc. Bioquímica, PhD, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Departamento de Ciencias Agronómicas

<sup>5</sup> Ingeniero Agrónomo, M. Sc. Fitopatología, PhD, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Escuela de Geociencias

\* Autor para correspondencia: e-mail: jsoler@unal.edu.co

with the microorganism in an In vitro media under a controlled environment, whereas the aerial part developed photosynthesis. Evaluations conducted during two months after the roots were inoculated with disinfected cystosori showed that the duration of this culture system was conditioned by the contamination of the root media. However, in microscopic observations we were able to detect in potato roots the structures of *S. subterranea*.

**KEYWORDS:** Naphthalene acetic acid, cystosori, potato powdery scab

## 1 INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum*) es uno de los principales cultivos a nivel mundial. Por su valor nutricional, ocupa el cuarto puesto en importancia después del trigo, el maíz y el arroz (Gebhardt y Valkonen, 2001). Según la Cadena Agroalimentaria de la papa de Colombia, la sarna polvosa está dentro de los siete principales problemas fitosanitarios de este cultivo en las zonas productoras (Cevipapa, 2010). La sarna polvosa de la papa es una enfermedad que se reproduce en raíces y tubérculos, es causada por el fitopatógeno *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* y disminuye la producción y calidad de los tubérculos hasta en un 40% (Harrison *et al.*, 1997; Gilchrist *et al.*, 2009, Merz y Falloon, 2009; Gilchrist *et al.*, 2011). Desde su descubrimiento en 1841 en Braunschweig, Alemania, esta enfermedad se ha expandido por las principales zonas de producción de papa en todo el mundo debido al comercio internacional de tubérculos-semilla infectados y a la falta de tratamientos efectivos (Harrison *et al.*, 1997; Merz 2008). En 1891 y 1913 fue identificada en Suramérica y Norteamérica, respectivamente (Harrison *et al.*, 1997). En Colombia y en particular en Antioquia es conocida desde 1937 (Castaño, 1978).

*Spongospora subterranea* es un protozoario que pertenece al orden Plasmodiophorales del filo *Cercozoa* (Braselton, 1995; Harrison *et al.*, 1997). Los miembros de este orden se caracterizan por presentar un estado vegetativo, generar un plasmodio multinucleado, tener zoosporas biflageladas y estructuras de resistencia (Schwartz, 1914; Devos *et al.* 2005). Harrison y colaboradores (1997) realizaron una aproximación al ciclo de vida de *S. subterranea*, éste comienza cuando las zoosporas biflageladas penetran con la ayuda de un aparato único en los Plasmodiophorales en la raíz o en el tubérculo (Merz, 2008). Una vez en el interior de las células vegetales, las zoosporas presentan una división nuclear cruciforme que origina un plasmodio multinucleado, luego se forman zoosporangios que generan zoosporas secundarias que pueden diseminar la infección hacia otras raíces, estolones y tubérculos, o pueden agruparse y formar estructuras de resistencia llamadas quistosoros. Las células del hospedero se agrandan por la acumulación de los quistosoros y forman agallas en las raíces o pústulas en los tubérculos.

La naturaleza obligada del patógeno *S. subterranea* dificulta considerablemente su investigación. La técnica de cultivo *in vitro* de raíz se ha desarrollado en las últimas décadas y se han establecido sistemas de doble cultivo usando raíces para la multiplicación de varios microorganismos obligados, incluyendo hongos micorrícicos arbusculares (de Souza y Declerck, 2003), *Plasmodiophora brassicae* (Asano *et al.*, 1999), el primer sistema de cultivo in vitro de *S. subterranea*, induciendo *in vitro*

raíces de papa con *Agrobacterium rhizogenes* (Qu y Christ, 2007) y recientemente el cultivo *in vitro* de *Plasmodiophora brassicae* y *Spongospora subterranea* en callos de sus respectivos hospederos, *Brassica rapa* y *Solanum tuberosum* (Bulman *et al.*, 2011) . A pesar de la gran variedad de aplicaciones, el uso de cultivos de sólo raíces puede presentar algunas limitaciones importantes por la ausencia de tejidos fotosintéticos, un equilibrio hormonal normal y una fuente de relaciones fisiológicas (Voets *et al.*, 2005).

Para establecer exitosamente un cultivo axénico de raíces es necesario contar con las fitohormonas apropiadas. Las auxinas son hormonas reguladoras del crecimiento vegetal, que pueden promover la elongación y división celular en concentraciones bajas (Chen *et al.*, 2002), en el cultivo *in vitro*, las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción de callo. El ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA), es una auxina sintética ampliamente utilizada en la horticultura para estimular la formación de raíces adventicias (Roca y Mroginski, 1991; Chen *et al.*, 2002). En el presente estudio se estandarizó un sistema para el cultivo *in vitro* de raíces, con el fin de cultivar el fitopatógeno obligado *S. subterranea*. Disponer de un patosistema controlado permitirá avanzar en investigaciones posteriores sobre la biología del patógeno, su ciclo de vida y su interacción con el hospedero y, así en la formulación de nuevas alternativas de control para la sarna polvosa.

## 2 METODOLOGÍA

### 2.1 Establecimiento del sistema de cultivo *in-vitro*

Las plántulas de papa se obtuvieron de cultivares de papa Diacol Capiro en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico Paysandú, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, localizado en el corregimiento de Santa Elena-Medellín, Antioquia. Se tomaron los extremos apicales de las plantas en estado vegetativo con aproximadamente 3 meses de edad. La superficie de los explantes fue esterilizada en una solución de hipoclorito de calcio al 2 % (Mix-Wagner, 1999), se cortaron segmentos de 1,5 cm de longitud y se cultivaron en frascos con 20 ml de medio MS (Murashige y Skoog) suplementado con 100 mg/l de mioinositol, 0,5 mg/l de ácido nicotínico, 0,5 mg/l de piridoxina (HCL), 0,4 mg/l de tiamina (HCL), 2 mg/l de glicina, 20 g/l de azúcar y 8 g/l de agar. El pH fue ajustado a 5,8 y se esterilizó a 121 °C por 20 minutos. El establecimiento del sistema autotrófico se llevó a cabo basándose en la metodología de Voets *et al.* (2005); se realizaron dos agujeros de 2 mm de diámetro en una caja petri plástica que contenía medio MSR (*Modified Strullu Romand*) modificado (sin sacarosa y sin vitaminas). Una plántula de papa con 30 días de crecimiento en medio MS se insertó en cada agujero, la raíz se colocó sobre la superficie del medio y el brote aéreo quedó por fuera del agujero. El agujero de la caja se selló con plastilina para evitar contaminaciones y deshidratación, las cajas de petri se cerraron con vinilpel, se cubrieron con papel aluminio y se incubaron en vertical en una cámara de crecimiento a 22/18 °C (día/noche), con una humedad relativa del 70% y con un fotoperiodo de 16 h. Cada 4, 9 y 15 semanas se agregaron 10 ml de medio líquido MSR modificado estéril para mantener un nivel adecuado de nutrientes para la planta.

## 2.2 Evaluación del efecto del ácido naftalenacético (ANA)

Con el propósito de obtener una mayor producción de pelos absorbentes en el sistema de cultivo *in vitro*, se adicionó al medio MSR modificado 0.02, 0.1, 0.5 y 2 mg/l de ANA y se evaluó un control sin auxinas. Para cada tratamiento se realizaron 5 repeticiones con 2 plantas cada uno. Se contó el número de raíces y se tomó la longitud foliar y de la raíz a los 20 días después de la siembra en el sistema, y se determinó la variación en el porcentaje de la longitud foliar y de las raíces respecto a la longitud foliar y de la raíz inicial. Los datos fueron analizados por ANOVA después de probar los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Para comparar el promedio de cada variable con el control se realizó una prueba de Dunnett.

## 2.3 Infección de plantas en el sistema para el establecimiento de *Spongospora subterranea*

El inóculo para infectar el cultivo *in vitro* de raíces se obtuvo de agallas de raíces de plantas infectadas naturalmente con *S. subterranea*, en un cultivo comercial, en el Municipio de La Unión (Antioquia). Se lavaron las raíces con agallas con agua de red, se sumergieron en una solución de etanol al 96 % durante 10 segundos, se lavaron con agua destilada estéril, se sumergieron en una solución de hipoclorito al 6% por 2 minutos, se lavaron con agua destilada estéril, se sumergieron en una solución de etanol al 70% durante 1 minuto, se lavaron nuevamente con agua destilada estéril. Finalmente, se sumergieron en una solución de cloramina T al 2 % (w/v) por 10 minutos, luego se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron con toallas estériles. Las agallas desinfectadas se maceraron en una licuadora con 30 ml de agua destilada estéril por 3 minutos y se filtraron a través de dos capas de gasa estéril. Se lavó el macerado 3 veces en agua destilada estéril por centrifugación a 1700 g por 5 minutos (descartando el sobrenadante), se dejó 20 minutos en una solución de etanol al 70% y se lavó 3 veces en agua destilada estéril por centrifugación a 1.700 g por 5 minutos (descartando el sobrenadante). Los quistosoros se suspendieron en una solución fresca de cloramina T (2% w/v) más Tween-20 (0,05% v/v), se incubaron a temperatura ambiente durante 25 minutos y luego se lavaron dos veces con agua destilada estéril por centrifugación. El pellet resultante se suspendió en una solución antibiótica que contenía 5 ml de ampicilina de sodio a 1 g/l, 5 ml de gentamicina a 1 g/l, 5 ml de ceftriaxona a 1 g/l y se incubó a 25 °C en oscuridad durante toda la noche. Se lavó la suspensión dos veces en agua destilada estéril por centrifugación y se suspendieron los quistosoros en agua destilada estéril.

Para realizar la infección de las raíces con el patógeno se escogieron las 10 plantas del mejor tratamiento del ensayo de concentraciones de ANA. Cuando las plántulas cumplieron 4 semanas de

siembra y tenían las raíces bien establecidas se realizó la infección, se inocularon 10 ml de una suspensión de  $2,4 \times 10^4$  quistosoros/ml previamente desinfectados. Para realizar el seguimiento de la infección, cada dos días se escogió una planta al azar y se tomaron muestras de raíces finas en condiciones asépticas, las plantas se taparon nuevamente y se incubaron en vertical en una cámara de crecimiento a 22/18 °C (día/noche), con una humedad relativa del 70% y con un fotoperiodo de 16 h. Este seguimiento se realizó hasta los 42 días. Para determinar si se presentó infección por *Spongospora subterranea*, a las muestras de raíces finas se les adicionó azul de tripano en lactofenol al 0,1 % durante 5 minutos, luego se lavaron con agua destilada y finalmente se examinaron usando un microscopio óptico Nikon Eclipse E-200, en busca de quistosoros, plasmodios o zoosporangios (Harrison *et al.*, 1997; Falloon *et al.*, 2003). Se realizó seguimiento a la formación de estructuras características del patógeno cada dos días y se llevó registro fotográfico de todo el proceso. Se realizaron 4 ensayos para estandarizar el tiempo de traspaso de las plántulas, la temperatura y la humedad relativa del sistema, y 3 ensayos para estandarizar las condiciones para inoculación del patógeno.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Evaluación del efecto del ácido naftalenacético (ANA)

A los 20 días después de la siembra, no se observó ninguna variación en el número de raíces para los tratamientos comparados con el control (0 mg/l de ANA) (Figura 1).

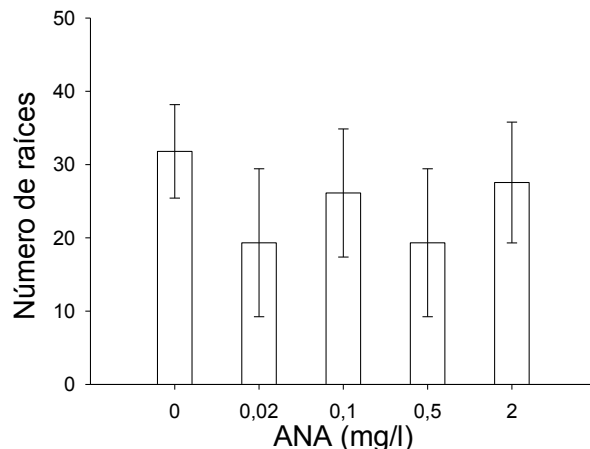


Figura 1: Número de raíces en medio MSR modificado sin ANA (control), con 0.02, 0.1, 0.5 y 2 mg/l de ANA, 20 días después de la siembra. Las barras representan los intervalos de confianza al 95%.

Se encontró que a las concentraciones 0,02 y 0,1 mg/l de ANA, no se presentaron cambios en la longitud foliar. Mientras que a las concentraciones 0,5 y 2 mg/l de ANA se observó disminución de la longitud foliar, respecto al control 0 mg/l (Figura 2).

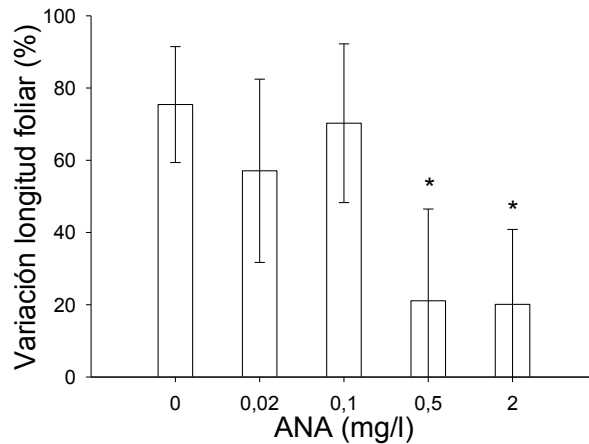


Figura 2: Aumento en la longitud foliar respecto a la longitud inicial de cada planta, expresado en porcentaje (%), en medio MSR modificado sin auxinas (control), con 0,02, 0,1, 0,5 y 2 mg/l de ANA, 20 días después de la siembra. Las barras representan los intervalos de confianza al 95%. Los \* indican diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) con respecto al control.

Para la variable longitud de raíces, no se observó efecto significativo en las concentraciones 0,02 y 0,1 mg/l de ANA; sin embargo concentraciones de 0,5 y 2 mg/l de ANA, disminuyeron significativamente su crecimiento (Figura 3).

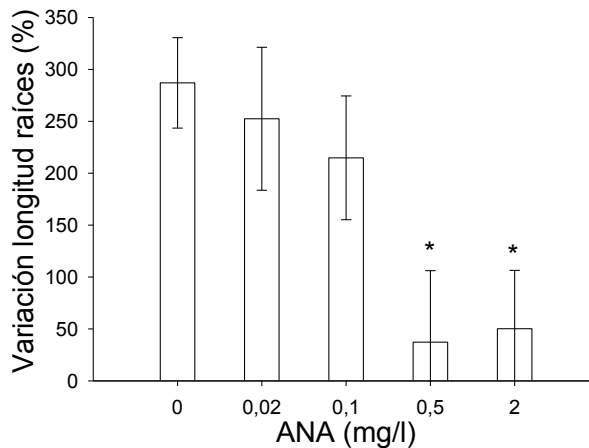


Figura 3: Aumento en la longitud de las raíces respecto a la longitud inicial de cada planta, expresado en porcentaje (%), en medio MSR modificado sin ANA (control), con 0,02, 0,1, 0,5 y 2 mg/l de ANA, 20 días después de la siembra. Las barras representan los intervalos de confianza del 95%. Los \* indican diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) con respecto al control.



A los 20 días después de la siembra de las plantulas en el medio MSR modificado (control), se observaron raíces largas, con pocos pelos absorbentes y con formación de raíces laterales; se observó una mayor cantidad de pelos absorbentes en las plántulas con 0,1 mg/l de ANA, no se encontró diferencia entre el control y el tratamiento a 0,02 mg/l de ANA, en cuanto a la cantidad de pelos absorbentes. Con 0,5 y 2 mg/l ANA se observaron raíces cortas y muy gruesas, con muchos pelos absorbentes y sin raíces laterales (Figura 4).

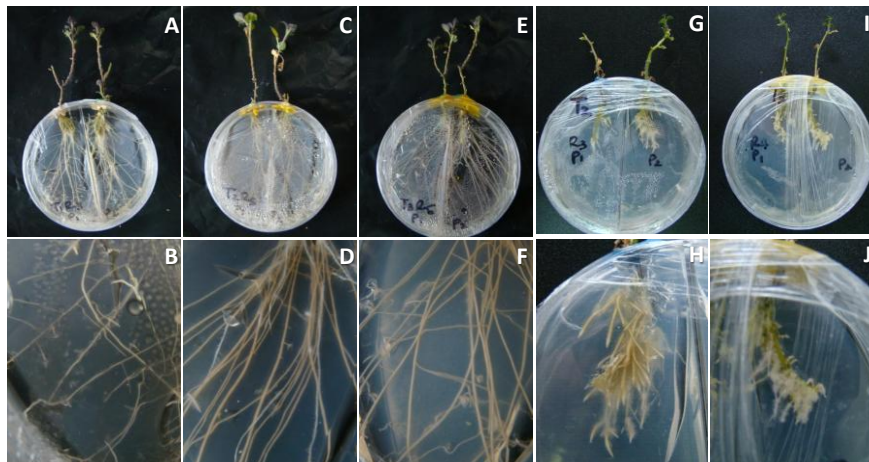


Figura 4: Sistema de cultivo autotrófico in vitro de raíces de plantas de papa a los 20 días después de la siembra en medio MSR modificado, sin ANA (control) (A y B), con 0,02 mg/l de ANA (C y D), con 0,1 mg/l de ANA (E y F), con 0,5 mg/l de ANA (G y H) y con 2 mg/l de ANA (I y J).

### 3.2 Infección del sistema de cultivo autotrófico para el establecimiento de *Spongospora subterranea*

Con base en los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones de ANA, para el cultivo final de raíces con el patógeno no se suplementó esta hormona. El sistema de cultivo autotrófico se realizó en medio MSR (*Modified Strullu Romand*) sin sacarosa y sin vitaminas en cajas petri plásticas. Se realizó el seguimiento de la infección cada dos días montando placas de las raíces en el microscopio, se registraron formación de plasmodios multinucleados y zoosporangios en el interior de las células o en los pelos radiculares, también se observaron quistosoros alrededor de las raíces. Al segundo día después de inoculadas se observó la presencia del patógeno (quistosoros) alrededor de las raíces (Figura 5 A) y algunos pelos absorbentes con estructuras del patógeno como plasmodios o zoosporangios (Figura 5 B). A los 4 días, se observaron quistosoros alrededor de la raíz y la presencia de plasmodios o zoosporangios (Figura 5 C y D). A los 6 y 8 días después de la inoculación se observaron estructuras de resistencia, plasmodios, en los pelos radiculares (Figura 5 E, F, G y H).

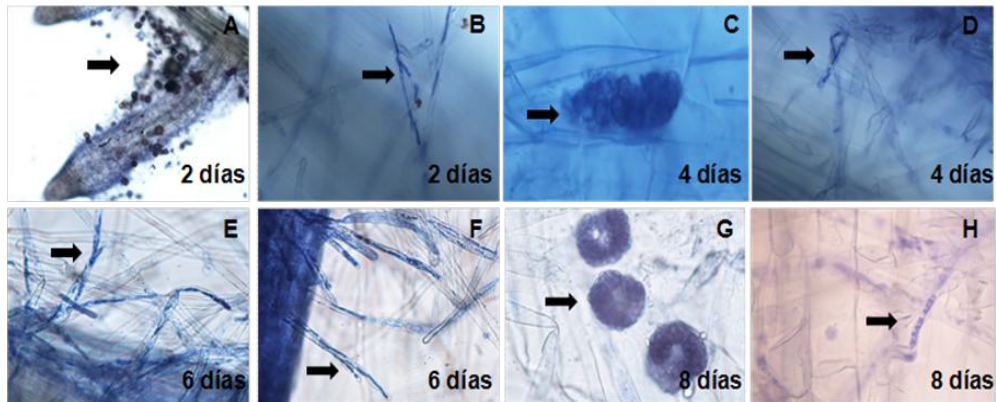


Figura 5: Raíces de papa *S. tuberosum* infectadas con *S. subterranea* teñidas con azul de lactofenol al 5% durante 5 minutos. Estructuras de resistencia (objetivo 4X) (A) y plasmodios o zoosporangios (aumento 40X) (B) a los 2 días de infección. Plasmodios dentro de las células vegetales (objetivo 100X) (C) y en los pelos radiculares en 40X (D) a los 4 días de infección. Plasmodios o zoosporangios en los pelos radiculares (objetivo 40X) (E y F) a los 6 días de infección. Estructuras de resistencia (objetivo 40X) (G) y zoosporangios en los pelos radiculares (H) a los 8 días de infección.

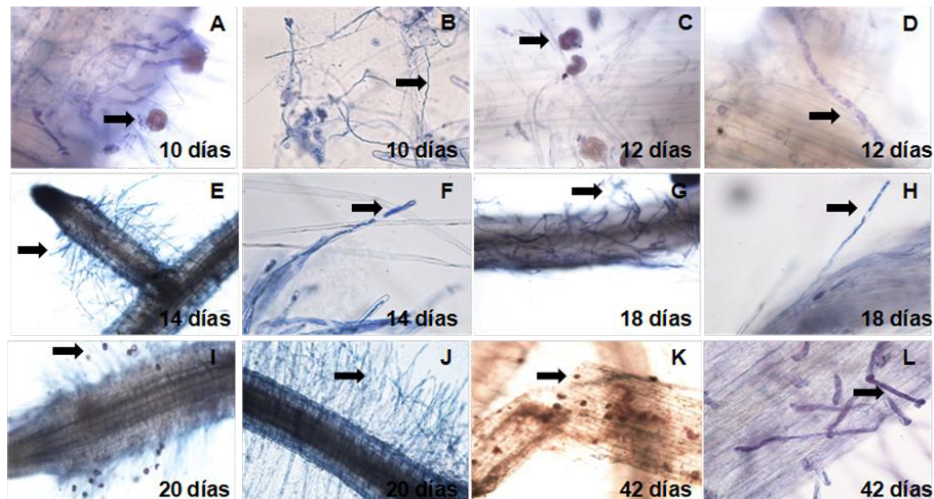


Figura 6: Raíces de papa *S. tuberosum* infectadas con *S. subterranea* teñidas con azul de lactofenol al 5% durante 5 minutos. A los 10 días de infección se observaron estructuras de resistencia (objetivo de 40X) (A) y contaminación de un hongo con hifas septadas (B). De los 12 a los 42 días de inoculación se observaron plasmodios en los pelos radiculares (D, E, F, G, H, J y L) y se observaron estructuras de resistencia (C, I y K).

A los 10 días se presentó una contaminación con un hongo con hifas septadas (Figura 6 B). De los 12 a los 42 días de inoculación se observó una gran cantidad de plasmodios multinucleados y zoosporangios en los pelos radiculares y se encontraron estructuras de resistencia (quistosoros).



Las evaluaciones al microscopio se realizaron hasta los 42 días después de la infección. En un periodo de 76 días después de la inoculación no se observó formación de agallas en raíces (Figura 7).

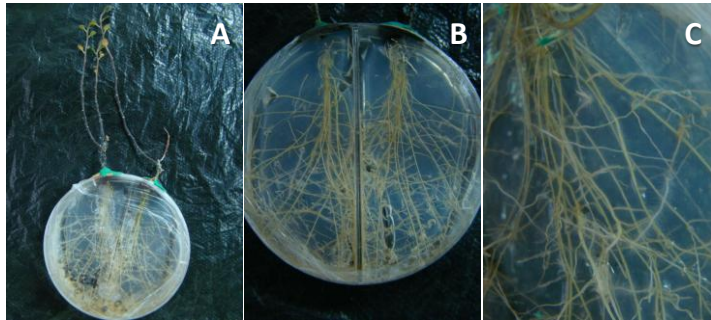


Figura 7: Sistema de cultivo autotrófico in vitro de papa *Solanum tuberosum* a los 76 días después de inoculadas con estructuras de resistencia de *S. subterranea*.

## 4 DISCUSIÓN

Las investigaciones básicas sobre la sarna polvosa de la papa se dificultan por la naturaleza obligada del patógeno *Spongospora subterranea*, que no puede aislarse o estudiarse sobre sustratos artificiales. En este trabajo se desarrolló un sistema *in vitro* de cultivo de raíces que permitió observar formación de estructuras del patógeno en el interior de las raíces mientras ocurría el desarrollo de la planta hospedera sin confinamiento en el mismo ambiente de las raíces. Se utilizó el método en el que se asocian las raíces de las plantas al microorganismo en un medio gelificado *in vitro*, mientras que la parte aérea desarrolla fotosíntesis en el ambiente bajo condiciones controladas de humedad relativa, luz y temperatura.

El efecto de las auxinas en la inducción y elongación de las raíces depende del tipo de especie y de la concentración utilizada (Nandagopal y Kumari, 2007), en este trabajo se encontró que en el cultivo autotrófico de la especie *Solanum tuberosum* variedad Diacol Capiro, las concentraciones de 0,02 y 0,1 mg/l de ANA no aumentaron ni inhibieron el número de raíces, la elongación de raíces y/o la longitud foliar con respecto a las plantas del control (0 mg/l de ANA) (Figuras 1, 2 y 3). Mientras que las concentraciones de 0,5 y 2 mg/l de ANA disminuyeron la elongación de raíces y la longitud foliar con respecto a las plantas del tratamiento control (Figuras 2 y 3). Se observó una mayor cantidad de pelos absorbentes en las plántulas con 0.1 mg/l de ANA y no se presentó diferencia entre 0,02 mg/l de ANA y el control. Mientras que con 0,5 y 2 mg/l de ANA se observaron raíces muy cortas y gruesas, con muchos pelos absorbentes y sin raíces laterales (Figura 4). En general, altos niveles de auxinas promueven la producción de raíces adventicias, a la vez que inhiben la elongación de estas (Nandagopal y Kumari, 2007) y altos contenidos de auxinas estimulan la producción de etileno, en muchas clases de células vegetales. Este suele inhibir la elongación de los

tallos y las raíces especialmente en dicotiledoneas (Burg, 1973; Salisbury y Ross, 2000), como la papa. Al inhibir la elongación, los tallos y las raíces se hacen más gruesos debido a que ocurre una mayor expansión isodiamétrica y no longitudinal de las células, ya que el depósito de microfibrillas de celulosa se establece radialmente en lugar de longitudinalmente (Burg 1973; Salisbury y Ross, 2000). Las concentraciones 0,5 y 2 mg/l de ANA además de inhibir la longitud del tallo y de las raíces presentaron engrosamiento de éstas; posiblemente porque estimularon la producción de etileno en esta especie de papa. La formación de raíces laterales solo se observó en el control a los 20 días después de la siembra de las plántulas de papa en el medio MSR modificado; sin embargo las raíces de las plántulas en medio con 0,5 y 2 mg/l de ANA presentaron una mayor cantidad de pelos absorbentes. Se recomienda ensayar concentraciones más bajas de ácido naftalenacetico (ANA), siguiendo el mismo procedimiento, ya que las concentraciones ensayadas anteriormente posiblemente estimularon la producción de etileno lo que conllevó a que actuaran como inhibidores del crecimiento.

En este estudio, se realizaron evaluaciones durante dos meses después de inoculadas las raíces con quistosoros desinfectados de *S. subterranea*. Las estructuras observadas en este trabajo concuerdan con las reportadas por Bulman y colaboradores (2011), Hoyos y colaboradores (2009), por Braselton (Plasmodiophorid Home Page), por Qu y Christ (2007) y por Saavedra y colaboradores (2004). El tiempo final lo condicionó la contaminación del sistema de cultivo después de inoculado a pesar de haber desinfectado el inóculo. Qu y Christ (2007), establecieron el primer cultivo dual *in vitro* de *S. subterranea* y pelos radiculares de papa, usando transformación de raíces con *Agrobacterium rhizogenes*. Los autores inocularon los pelos radiculares con una suspensión de quistosoros desinfectados, y encontraron que un 75% de pelos radiculares mostraron infección con plasmodios y zoosporangios 14 días después de la inoculación. Además, observaron formación de agallas en los pelos radiculares inoculados con quistosoros después de 6 semanas de infección, pero el tamaño y el número de agallas fue menor que en raíces de plantas de papa. Qu y Christ (2007) reportaron una contaminación del sistema *in vitro* del 85% luego de los 10 días de infección con quistosoros desinfectados, por lo que el protocolo de desinfección no elimina totalmente los microorganismos asociados al patógeno. Bulman y colaboradores (2011), reportaron un sistema de cultivo *in vitro* dual de los plasmodios *Plasmodiophora brassicae* y *Spongospora subterranea* en callos de sus respectivas plantas hospedantes, *Brassica rapa* y *Solanum tuberosum*, en este sistema ambos patógenos obligados fueron capaces de mantenerse estables a largo plazo en ausencia de reguladores de crecimiento vegetal, además, lograron subcultivar los callos infectados con *S. subterranea* durante un año y mantener el potencial infectivo del patógeno.

En el presente estudio, para la estandarización del sistema, se determinó que el tiempo de traspaso de las plántulas en medio MS al sistema autotrófico con medio MSR modificado fue de 1 mes y las condiciones del sistema fueron 19°C y 70% de humedad relativa. Para estandarizar la inoculación del patógeno se realizaron tres ensayos, de los cuales en el mejor de los casos, de 30 plántulas que se pasaron al sistema autotrófico, solo 7 plantas sobrevivieron las 4 semanas de establecimiento de las raíces, para la infección con el inóculo de *S. subterranea*, resultando en una eficiencia del sistema del

23%. En el presente trabajo, no se observó la formación de agallas en el sistema radicular después de 76 días de infección, posiblemente por la contaminación que se presentó por hongos en las raíces, es posible que la contaminación del sistema se presentara al destapar las cajas en el muestreo de raíces finas para el seguimiento de la infección, por lo que se recomienda tener más repeticiones y realizar el muestreo de raíces solo una vez por planta. Es muy importante desarrollar un protocolo eficiente de control de la contaminación que permita evaluar tiempos más largos de la interacción en el sistema. Además, es importante comprobar la presencia de las estructuras del patógeno por medio de técnicas moleculares.

Se determinaron diferentes estructuras del ciclo de vida del patógeno *S. subterranea*, como plasmidios, zoosporangios y quistosoros. Ya que no se conoce totalmente el ciclo de vida del patógeno, el perfeccionamiento de este sistema será de gran utilidad para estudiar la biología, desarrollo e interacción con sus diferentes hospederos, así como nuevas estrategias de manejo de la enfermedad.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por Colciencias, mediante su apoyo con la beca Jóvenes Investigadores e Innovadores 2010 (J. Soler) y la financiación del proyecto "Uso de *Trichoderma asperellum* en el manejo integrado de la sarna polvosa de la papa" código 15959 - Contrato: 298 de 2008. Los autores agradecen al Dr. Richard Falloon por su asesoría.

## Referencias

- Asano, T.; Kageyama, K.; Hyakumachi, M. (1999), Surface disinfestation of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* used to infect hairy roots of *Brassica* spp. Phytopathology **89(49)**: 314- 319.
- Braselton, J. P. Plasmodiophorid Home Page.  
<http://www.ohio.edu/people/braselto/plasmos/> [Consultada en febrero 2012].
- Burg, S. P. (1973). Ethylene in Plant Growth. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **70(2)**: 591-597.
- Bulman, S., Candy, J. M., Fiers, M., Lister, R., Conner, A. J., & Eady, C. C. (2011). Genomics of Biotrophic, Plant-infecting Plasmodiophorids Using In Vitro Dual Cultures. *Protist*, 162(3), 449-461.
- Castaño, J. J. (1978), *Trayectoria de la Fitopatología en Colombia (1571-1974)*. Editorial Letras, Medellín. 164 p.

- Cevipapa. (2010), Centro Virtual de Investigación de la cadena agroalimentaria de la papa. <http://www.cevipapa.org.co/>. [Consultada en Abril 2010].
- Chen, L. M.; Cheng, J. T.; Chen, E. L.; Yiu, T. J.; Liu, Z. H. (2002), Naphthaleneacetic acid suppresses peroxidase activity during the induction of adventitious roots in soybean hypocotyls. *J Plant Physiol.* **159**: 1349–1354
- De Souza, F. A.; Declerck, S. (2003), Mycelium development and architecture, and spore production of *Scutellospora reticulata* in monoxenic culture with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycologia.* **95(6)**: 1004–1012.
- Devos, S.; Vissenberg, K.; Verbelen, J. P.; Prinsen, E. (2005), Infection of Chinese cabbage by *Plasmodiophora brassicae* leads to a stimulation of plant growth: impacts on cell wall metabolism and hormone balance. *New Phytol* 166:241–250
- Falloon, R. E.; Genet, R. A.; Wallace, A. R.; Butler, R. C. (2003), Susceptibility of potato (*Solanum tuberosum*) cultivars to powdery scab (caused by *Spongospora subterranea* f. sp. *Subterranean*), and relationships between tuber and root infection. *Australasian Plant Pathology.* **32**: 377-385.
- Gebhardt, C.; Valkonen, J. P. T. (2001), Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annual Review of Phytopathology.* **39**: 79–102.
- Gilchrist, E.; Jaramillo, S.; 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.* 62:4783-4792.
- Gilchrist, E.; Soler, J.; Merz, U.; Reynaldi, S. (2011), Powdery scab effect on the potato *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* growth and yield. *Tropical Plant Pathology.* **36(6)**: 350-355
- Harrison, J. G.; Searle, R. J.; Williams, N. A. (1997), Powdery Scab Disease of Potato- A Review. *Plant Pathology.* **46**: 1-25.
- Hoyos, L.; Villegas, M.; González, E. (2009), Observaciones histológicas de estructuras celulares asociadas a *Spongospora subterranea* f sp. *subterranea* en papa. *Revista Facultad Nacional de Agronomía – Medellín.* **62(2)**: 5039-5045.
- Merz, U.; Falloon, R. E. (2009), Review: Powdery Scab of Potato-Increased Knowledge of Pathogen Biology and Disease Epidemiology for Effective Disease Management. *Potato Research.* **52**: 17–37.

- Merz, U. (2008), Powdery Scab of Potato-Occurrence, Life Cycle and Epidemiology. Symposium paper. *American Journal Potato Research*. **85**: 241–246.
- Mix-Wagner, G. (1999), The conservation of potato cultivars. *Potato Research*. **42**: 427-436.
- Nandagopal, S.; Kumari, B. D. R. (2007), Effectiveness of auxin induced in vitro root culture in chicory. *Journal of Central European Agriculture*. **8**:73–79
- Qu, X.; Christ, B. J. (2007), In vitro culture of the obligate parasite *Spongospora subterranea* (Cercozoa; Plasmodiophorida) associated with root-inducing transferred-DNA transformed potato hairy roots. *Journal Eukaryotic Microbiology*. **54(6)**: 465-467.
- Roca, W. M.; Mroginski, L. A. (1991), *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. CIAT (Centro internacional de agricultura tropical). Cali, Colombia. pp 32.
- Salisbury, F.; Ross, C. (2000), *Fisiología de las plantas*. (Tr.) A. Alonso. Primera Edición. Editorial Paraninfo Thomson learning. España. pp 578-580 y 622-624.
- Saavedra, C. O.; Gómez, S. J.; Ángel, J. E. (2004). Detección de secuencias específicas de ADN de *Spongospora subterranea* en suelo y tubérculos de papa. *Revista Colombiana de Biotecnología*. **6(1)**: 14-23.
- Voets, L. ; Dupre de Boulois, H. ; Renard, L.; Strullu, D. G. ; Declerck, S. (2005), Development of an autotrophic culture system for the in vitro mycorrhization of potato plantlets. *FEMS Microbiol Lett*. **248**: 111–118.
- Schwartz, E. J. (1914). The plasmodiophoraceae and their relationship to the mycetozoa and the chitridae. *Annals of Botany* 28:110.