

# Análisis histológico de *Spongospora subterranea* f. sp *subterranea* a partir de raíces infectadas de papa (*Solanum tuberosum* L.)

## Histological Analysis of *Spongospora subterranea* f. sp *subterranea* from Infected Potato Roots (*Solanum tuberosum* L.)

Carol Liliana Puentes-Díaz<sup>1</sup> [orcid.org/0000-0002-0866-304X](https://orcid.org/0000-0002-0866-304X)  
Lizzete Dayana Romero Moya<sup>2\*</sup> [orcid.org/0000-0001-9388-5853](https://orcid.org/0000-0001-9388-5853)

<sup>1</sup> Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA, Centro de Investigación Palmira. Palmira, Valle del Cauca, Colombia.

<sup>2</sup> State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China.

\*Autor de correspondencia: 2020y90100067@caas.cn

### Resumen

**Objetivo.** Analizar histológicamente las estructuras de *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh f. sp *subterranea* Tomlinson (Sss) localizados en los tejidos radicales de plantas de papa infectadas con este patógeno en condiciones controladas de laboratorio en la Universidad Nacional de Colombia. **Materiales y métodos.** Se realizaron inoculaciones con quistosoros de Sss en solución Hoagland en plantas hidropónicas de papa var. Capiro, posterior a la inoculación se realizó la tinción de raíces para observar estructuras de infección típicas del patógeno bajo microscopía. **Resultados.** Mediante la metodología propuesta se logró observar diferentes estructuras de Sss, como plasmidios esporangiales, zoosporangios, plasmidios esporogénicos y quistosoros. **Conclusión.** A partir de las observaciones realizadas se logró identificar diferentes estados de infección de *Spongospora subterranea* f. sp *sub-*

### Abstract

**Objective.** Perform the histological analysis the structures of *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh f. sp *subterranea* Tomlinson (Sss) located in the root of potato plants infected with this pathogen under controlled laboratory conditions at the National University of Colombia. **Materials and Methods.** Inoculations with cystosors of Sss in Hoagland solution were performed on hydroponic potato plants var. Capiro. After inoculation, the root was stained to observe typical infected structures of the pathogen under microscopy. **Results.** Through the proposed methodology it was possible to observe different Sss structures such as sporangial plasmodia, zoosporangia, sporogenic plasmodia, and cystosoros. **Conclusion.** Based on the observations, it was possible to identify different states of infection of *Spongospora subterranea* f. sp *subterranea* and the development of each one of the phases of the

terranea y se verificó el desarrollo de cada una de las fases del ciclo de vida del patógeno en los tejidos radicales de papa var. Capiro.

### Palabras clave

Hidroponía, plasmodio, quistosoros, roña, zoosporangio.

pathogen's life cycle in the root tissues of potato var. Capiro was verified.

### Keywords

Cystosori, hydroponics, plasmodia, scrab, zoosporangium.

## Introducción

La roña o sarna polvosa en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.), causada por *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh f. sp. *subterranea* Tomlinson (*Sss*), es una enfermedad ampliamente diseminada y mundialmente distribuida (CABI, 2022), que afecta la calidad del tubérculo debido a la deformación ocasionada por la presencia de lesiones roñosas sobre la superficie de estos, las cuales disminuyen su calidad y comercialización como semilla y producto fresco o procesado (Falloon *et al.*, 2016); también ocasiona agallas en las raíces, afectando el desarrollo normal y reduciendo los rendimientos cuando la incidencia de la enfermedad es alta (Saavedra *et al.*, 2004; Van de Graaf *et al.*, 2007; Merz y Falloon, 2008; Simango y van der Waals, 2017).

*Sss* es un Plasmodioforidio (clase Phytomyxea, orden Plasmodiophorida, familia Plasmodiophoraceae, género *Spongospora*), que se caracteriza por tener división nuclear cruciforme, plasmodio multinucleado, zoosporas biflageladas y formación de esporas de resistencia (Qu y Christ, 2004; Braselton, 2022). *Sss* sólo puede multiplicarse dentro de tejidos vivos del hospedero debido a su naturaleza de parásito obligado (Merz y Falloon, 2008). Este patógeno sobrevive por muchos años en el suelo en forma quiescente, como quistes uninucleados o binucleados de pared gruesa, y resiste a condiciones adversas. Las esporas de resistencia miden aproximadamente 4 mm de diámetro y se agrupan en estructuras más grandes denominadas quistosoros, que individualmente dan origen a las zoosporas (Falloon *et al.*, 2011).

Los quistosoros pueden sobrevivir por muchos años en el suelo, después de ser liberados de las raíces, estolones o tubérculos semilla infectados (Shah *et al.*, 2012; Merz y Fallon, 2017), siendo éste el medio más probable por el cual el patógeno se disemina a través de la mayoría de las regiones productoras del mundo (Lucero, 1998; Falloon *et al.*, 2016).

El ciclo de vida de *Sss* se divide en dos fases: esporangial y esporogénica. En cada una de las fases el proceso de infección inicia cuando una zoospora uninucleada, atraída por los exudados de las raíces se enquista sobre las células epidermales de las raíces del hospedero. La zoospora produce una estructura tubular (Rohr) que contiene a la vez una estructura en forma de lanza (Stachel), el contenido de la zoospora (incluyendo el Rohr y el Stachel) pasa a una derivación del cuerpo principal de la zoospora (llamado, Adhessorium); una vez dentro del citoplasma celular, el contenido de la zoospora empieza a crecer, el cual es caracterizado por divisiones nucleares cruciformes, dando origen a un plasmodio multinucleado (con frecuencia uno por célula) (Merz, 2008; Falloon *et al.*,

2011), el cual después se convierte en estructuras que contienen muchos zoosporangios (esporangiosoros). Cada zoosporangio contiene tres o cuatro zoosporas secundarias, mismas que son descargadas a través de diferentes aperturas zoosporangiales y por poros en la pared celular (Braselton, 2016).

Las condiciones que determinan la fase esporogénica o esporangial aún son desconocidas. La fase esporangial ocurre en células epidermales de las raíces del hospedero incluyendo los pelos radicales, donde numerosas zoosporas secundarias son formadas en compartimentos dentro del zoosporangio de pared delgada, el cual se desarrolla de plasmodios esporangiosoros multinucleados en las células epidermales de la raíz del hospedero o pelos radicales. Las zoosporas secundarias biflageladas salen del hospedero e inician nuevos ciclos de infección (Merz, 2008).

La fase esporogénica resulta después de las divisiones nucleares y escisión del plasmodio esporogénico, generando hipertrofia e hiperplasia de los tejidos radicales y desarrollando las esporas de resistencia agrupadas en quistosoros. Cada espora de resistencia libera una zoospora primaria biflagelada heteroconte. Estas infecciones pueden ocurrir en las células corticales de la raíz y en las células epidermales y subepidermales del tubérculo (Braselton, 2022).

La comprensión del ciclo de vida de un patógeno, así como realizar un diagnóstico oportuno que permita la observación de sus diferentes estructuras, contribuirá en la generación de estrategias de manejo para mitigar las pérdidas que éste ocasiona en los cultivos, por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue realizar el análisis histológico de las estructuras de Sss localizadas en los tejidos radicales de plantas hidropónicas de papa var Capiro (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena*) infectadas con este patógeno en condiciones controladas de laboratorio.

## Materiales y métodos

Este estudio se realizó en la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, a partir de plantas hidropónicas de papa variedad Capiro (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena*) e inoculadas con *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*.

### *Establecimiento de plantas de papa*

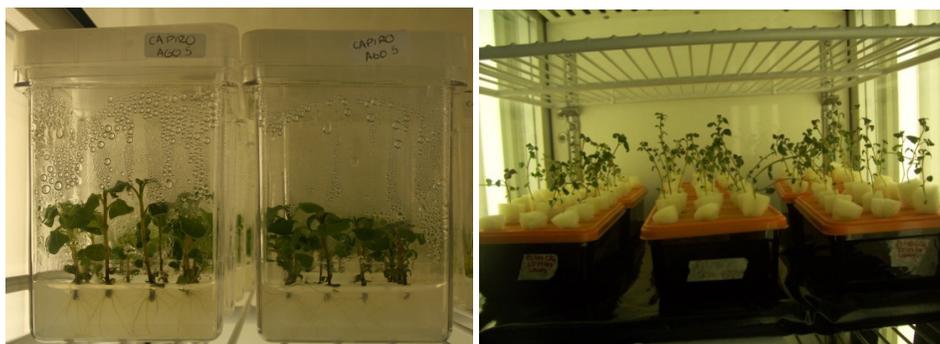
Crecimientos apicales de plantas de papa provenientes de brotes, fueron sembrados en cajas magenta en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (figura 1A), cuando las plantas tuvieron tres semanas de crecimiento, fueron transferidas a cultivos hidropónicos, los cuales consistieron en recipientes oscuros con tapa perforada. En cada perforación se colocó una planta sostenida en espuma (figura 1B). El recipiente contenía solución Hoagland (Hoagland y Arnon, 1938) y se mantuvieron en cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 12 h luz a 18 °C y 12 h oscuridad a 16 °C, con una intensidad lumínica mayor a 10 000 lx y una humedad relativa de 75% por siete días.

Figura 1

Plantas de papa variedad Capiro: A) Plantas *in vitro* previo a cultivo hidropónico. B) Cultivo hidropónico de plantas

A

B



Fotografías de Carol Liliana Puentes Díaz.

### *Preparación de la suspensión de quistosoros desinfectados de Sss*

Para la desinfección de los quistosoros se utilizó la metodología de Asano *et al.* (1999) con modificaciones. Se usaron agallas maduras de raíces y pústulas en tubérculos, los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 10% durante 10 min. Las lesiones de los tubérculos fueron raspadas con cuchilla de bisturí, el raspado o agallas se maceraron levemente en mortero con 50 mL de agua destilada estéril por tres minutos. El macerado se filtró en una tela de gasa estéril doblada ocho veces, se centrifugó a 1 200 rpm durante cinco minutos. Se decantó y repitió la operación cinco veces. La suspensión de quistosoros fue preparada con agua destilada estéril y ajustada a una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas/mL. La suspensión de esporas ajustada se centrifugó a 1 200 rpm por cinco minutos y el sobrenadante se descartó. En una solución de cloramina-T al 2% (p/v) se incorporó el precipitado por 20 min y luego se lavó tres veces en agua destilada estéril por centrifugación cada vez. El precipitado se colocó en una solución antibiótica de 1g/L de sulfato de colistina, 1g/L de clorhidrato de vancomicina y 1g/L de cefotaxima sódica en agua destilada, se incubó a 25 °C por una noche. Pasado un día, la suspensión se centrifugó a 3 000 rpm dos veces en agua destilada estéril. Finalmente, esta solución se mantuvo en cámara de crecimiento bajo las mismas condiciones que las plantas hidropónicas en solución Hoagland.

### *Inoculación de raíces con Sss*

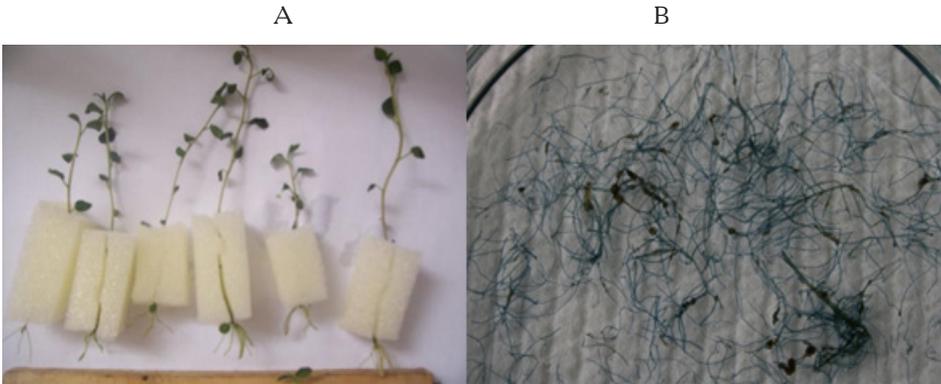
Pasados los siete días de incubación en la cámara de crecimiento, las plantas fueron trasladadas a un nuevo recipiente que contenía la solución de quistosoros más la solución Hoagland por tres días. Posteriormente, las raíces fueron lavadas con agua destilada estéril y se trasladaron nuevamente a un recipiente con únicamente solución Hoagland por 36 días (figura 2A).

### Tinción de raíces inoculadas con *Sss*

La tinción de raíces se realizó de acuerdo con la metodología desarrollada por Phillips y Hayman (1970). Se separaron las raíces del tallo y se lavaron con abundante agua, se clarificaron con solución KOH al 10% a 60 °C por 10 min, y en seguida se lavaron nuevamente con agua destilada estéril en un tamiz para evitar pérdidas durante el enjuague. Las raíces se dejaron inmersas en una solución de KOH al 10% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% durante 7 minutos, lavándolas nuevamente con agua destilada estéril. Enseguida las raíces se acidificaron en una solución HCl 1N durante 10 min y se decantaron sin enjuagar las raíces. Por último, se adicionó azul de tripano al 0.05% para realizar la tinción, posteriormente se lavaron y se dejaron en reposo por 12 h en agua destilada estéril para eliminar el exceso de colorante (figura 2B). El almacenamiento se realizó en glicerol al 50% para evitar la deshidratación de los tejidos.

Figura 2

Plantas y tejido radical de papa var. Capiro en cultivo hidropónico:  
 A) Plantas de papa inoculadas en estado asintomático. B) Raíces de papa posterior al proceso de tinción con síntomas de agallas



Fotografías de Lizzete Dayana Romero Moya.

### Observación de raíces infectadas con *Sss*

Las observaciones microscópicas del tejido radical se realizaron cada tres días iniciando al día 10 después de inoculación y hasta el día 36. Para la observación de las raíces infectadas se cortaron en segmentos de un centímetro y se montaron en láminas portaobjetos cubriéndolas con laminillas. Se observaron en un microscopio óptico marca Carl Zeiss, Ref. Axiostar plus en aumentos de 40 y 100x.

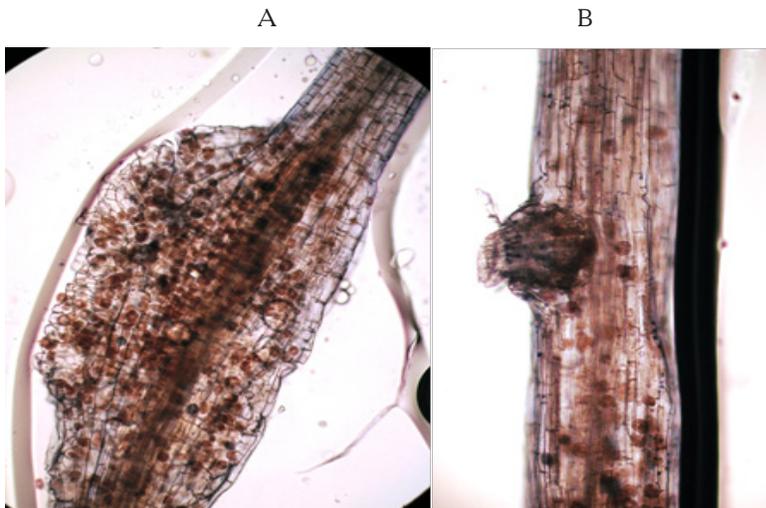
## Resultados

La mayoría de las raíces mostraron los síntomas característicos de infección por *Spongospora ubterranea* f. sp *ubterranea* permitiendo la observación microscópica de las diferentes

estructuras que representan el ciclo de vida del patógeno. Se pudo observar quistosoros en el tejido radical agregados en estructuras denominadas agallas (figura 3A y 3B) en estado de formación y en estado maduro (figura 4).

Figura 3

Quistosoros desarrollados intracelularmente: A) Hipertrofia e hiperplasia de los tejidos radicales (40X). B) Quistosoros intracelulares en tejido radicales sin agruparse en agallas (40X)



Fotografías de Carol Liliana Puentes Díaz.

Figura 4

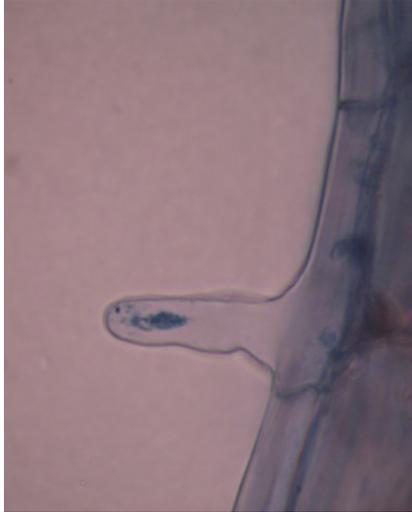
Quistosoros (agrupación de esporas de resistencia) de *Sss* (100X)



Fotografía de Lizzete Dayana Romero Moya.

También se observó en los tejidos radicales, el plasmodio esporangial (figura 5) que se desarrolló en los tejidos epidermales o en pelos radicales, el plasmodio multinucleado esporangial condujo a la formación del zoosporangio de paredes delgadas (figura 6).

Figura 5  
Plasmodio esporangial (100X)



Fotografía de Carol Liliana Puente Díaz.

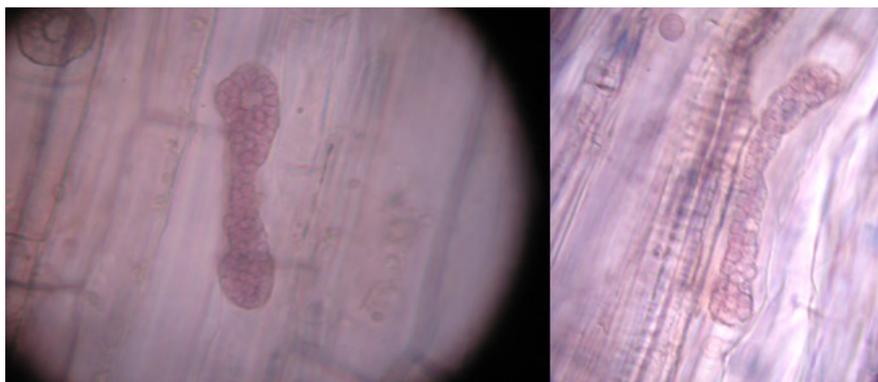
Figura 6  
Zoosporangio en proceso de formación (100X)



Fotografía de Lizzete Dayana Romero Moya.

Las zoosporas pueden desarrollarse en fase esporogénica o esporangial, de acuerdo con el tejido que infecte, desarrollando diferentes estructuras, ya sean plasmidios esporangiales que dan origen a un zoosporangio o plasmidios esporogénicos (figura 7) que dan lugar a las esporas de resistencia (esporosoros).

Figura 7  
Plasmidios esporogénicos (100X)



Fotografías de Carol Liliana Puentes Díaz.

## Discusión

El diagnóstico fitopatológico permite identificar el agente causal de una enfermedad, siendo la base para establecer un adecuado esquema de manejo (Restrepo y Vargas, 2007); en este trabajo se implementó una técnica de histología de raíces de papa infectadas con *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* que permite observar e identificar las estructuras del patógeno en sus diferentes fases del ciclo de vida, lo cual puede ser implementado como una herramienta rápida de diagnóstico teniendo en cuenta que el organismo en estudio es un parásito obligado.

Uno de los principales síntomas de la enfermedad roña de la papa es la generación de agallas en las raíces de las plantas (Falloon *et al.*, 2016), esto se observó en el presente estudio, ya que hubo formación de estas estructuras en las raíces inoculadas con *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*, al observar a nivel microscópico dichas formaciones, se determinó la generación de quistosoros agregados que por su desarrollo esporogénico, causan hiperplasia e hipertrofia de las células de los tejidos radicales, de acuerdo con lo informado por Merz y Falloon (2008) y Braselton (2022). Según Braselton (2022), las esporas de resistencia agrupadas en quistosoros se forman a partir del plasmidio esporogénico, la morfología de éstas es un carácter taxonómico importante para la distinción de géneros (Falloon *et al.*, 2016). Las esporas de resistencia germinan produciendo las zoosporas primarias (Braselton, 2022), sin embargo, estas zoosporas no fueron observadas en este estudio, ya que éstas se desarrollan en el medio debido a estímulos propios de los tejidos de radicales de su hospedero.

Aunque se logró observar estructuras de fase esporangial como la formación del plasmodio esporangial y el zoosporangio, lo cual concuerda con lo observado por Braselton (2022), tampoco se logró observar la liberación de zoosporas secundarias, ya que al igual que las zoosporas primarias necesitan la presencia de los exudados de las raíces de papa (Amponsah *et al.*, 2023). Las estructuras de cada una de las fases del ciclo de vida de *Sss* observadas en este estudio se desarrollaron en los tejidos radicales epidermales de la raíz (plasmodios esporangiales y zoosporangios) y en los tejidos corticales de esta (plasmodios esporogénicos y quistosoros), corroborando así lo informado por Braselton (2022).

La metodología implementada en este trabajo puede ser útil en el estudio de otros patógenos de la familia Plasmodiophoraceae. Esta técnica permite la observación del proceso infectivo y de todas las estructuras que hacen parte del ciclo de vida del patógeno en los tejidos del hospedante, por lo tanto, se convierte en la base para el correcto diagnóstico fitopatológico.

## Conclusiones

A partir de las observaciones realizadas bajo microscopía de los tejidos de las muestras de raíz de papa var. Capiro inoculadas con *Sss*, se logró identificar diferentes estados de infección del patógeno, por lo tanto, la metodología empleada permitió que este desarrollara diferentes estructuras de su ciclo de vida en tejidos radicales, tales como plasmodios esporangiales, zoosporangios, plasmodios esporogénicos y quistosoros, finalizando en la formación de las agallas en raíces.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá – Facultad de Ciencia Agrarias, por la financiación de este trabajo enmarcado en el programa de maestría en Ciencia Agrarias; así como a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) por la colaboración para la publicación del presente estudio.

## Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

## Contribución de los autores

Carol Liliana Puentes Díaz: concepción, ejecución de la idea de investigación, montaje de ensayos, toma de fotografías, redacción y revisión de la versión final del manuscrito.

Lizzete Dayana Romero Moya: concepción, ejecución de la idea de investigación, montaje de ensayos, toma de fotografías, redacción y revisión de la versión final del manuscrito.

## Literatura citada

Amponsah, J.; Tegg R.S.; Thangavel, T. y Wilson, C.R. (2023). Chemotaxis and motility of *Spongopora subterranea* zoospores in response to potato root exudate constituents and pH. *Phytopathology*. PMID: 36774556.

- Asano, T.; Kageyama, K. y Hyakumachi, M. (1999). Surface disinfection of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* used to infect hairy roots of *Brassica* spp. *Phytopathology*. 89(4): 314-319.
- Braselton, J.P. (2016). Generalized plasmodiophorid life cycle based on several sources. In: Plasmodiophorid Home Page. <https://people.ohio.edu/braselto/plasmodiophorids/plasmos/cycles.html>; (Consultado 26 diciembre 2022).
- Braselton, J.P. (2022). *Plasmodiophorid Home Page*. Ohio University. <https://people.ohio.edu/braselto/plasmodiophorids/> (Consultado 26 septiembre 2022).
- CABI. (2022). *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* (powdery scab). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/51088/> (Consultado 04 septiembre 2022).
- Falloon, R.; Merz, U.; Lister, R.; Wallace, A.R. y Hayes, S.P. (2011) Morphological enumeration of resting spores in sporosori of the plant pathogen *Spongospora subterranea*. *Acta Protozool.* 50: 121-132.
- Falloon, R.; Merz, U.; Butler, R.; Curtin, D.; Lister, R.A. y Thomas, S.M. (2016). Root infection of potato by *Spongospora subterranea*: knowledge review and evidence for decreased plant productivity. *Plant Pathology*. 65(3): 422-434. Doi: <https://doi.org/10.1111/ppa.12419>
- Hoagland, D. y Arnon, D. (1938). The water-culture method for growing plants without soil. California agricultural experiment station. Circular 34. <http://hdl.handle.net/2027/uc2.ark:/13960/t51g1sb8j/> (Consultado el 26 septiembre 2022).
- Lucero, H. (1998). Sarna pulverulenta de la papa. *Rev. Fac. Cienc. Agrar.* 30 (1). [https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos\\_digitales/10060/301cap-10.pdf](https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/10060/301cap-10.pdf) (Consultado el 26 junio 2022).
- Merz, U. (2008). Powdery scab of potato-occurrence, life cycle and epidemiology. *Am. J. Potato Res.* 85(4): 241.
- Merz, U. y Falloon, R. (2008). Review: Powdery scab of potato - increased knowledge of pathogen biology and disease epidemiology for effective disease management. *Potato Res.* 52(1): 17-37.
- Merz, U. y Falloon, R. (2017). Proceedings of the 3rd International Powdery Scab Workshop. *Potato Res.* 60:195-215.
- Phillips, J. y Hayman, D. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Tran. Br. Mycol. Soc.* 55(1): 158-160.
- Qu, X. y Christ, B. (2004). Genetic variation and phylogeny of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* based on ribosomal DNA sequence analysis. *Am. J. Potato Res.* 81(6): 385-394.
- Restrepo, S. y Vargas, Á. (2007). Biotecnología: herramienta de diagnóstico de enfermedades en plantas. *Palmas*. 28 (especial): 366-372.
- Saavedra, C.; Gómez, J. y Díaz, Á. (2004). Detección de secuencias específicas de ADN de *Spongospora subterranea* en suelo y tubérculos de papa. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 6(1): 14-23.
- Shah, F. A.; Falloon, R.; Butler, R. y Lister, R. (2012). Low amounts of *Spongospora subterranea* sporosorus inoculum cause severe powdery scab, root galling and reduced water use in potato (*Solanum tuberosum*). *Australas. Plant Pathol.* 41(2): 219-228.
- Simango, K. y van der Waals, J.E. (2017). Effects of Different Soil Treatments on the Development of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* in Potato Roots and Tubers in the Greenhouse. *Potato Res.* 60: 47-60. <https://doi.org/10.1007/s11540-017-9340-5>
- Van de Graaf, P.; Wale, S. y Lees, A. (2007). Factors affecting the incidence and severity of *Spongospora subterranea* infection and galling in potato roots. *Plant Pathology*. 56(6): 1005-1013.

Recepción: 22 de diciembre de 2022

Arbitraje: 20 de enero de 2023

Dictamen: 18 de febrero 2023

Aceptado: 04 de marzo 2023