

# CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y PATOGENICA EN COLOMBIA DE *Sphaerotheca pannosa* Var. *rosae*, AGENTE CAUSAL DEL MILDEO POLVOSO EN LA ROSA

Elizabeth Álvarez<sup>1</sup>, José Luis Claroz<sup>1</sup>, John B. Loke<sup>1</sup> y Camilo Echeverri E<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Apartado Aéreo 6713 Cali, Colombia <sup>2</sup>  
Asociación Colombiana de Exportadores de Flores, Santa Fé de Bogotá  
E-mail [e.alvarez@cgiar.org](mailto:e.alvarez@cgiar.org)

## RESUMEN

Se estableció una colección de 45 aislamientos de *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* a partir de plantas de rosa afectadas con mildew polvoso, enfermedad causada por este patógeno. Para efectos de este estudio, se hizo una evaluación molecular previa mediante RAPD a todos los aislamientos y se seleccionaron 16 aislamientos contrastantes, como representativos de la variabilidad presente en *S. pannosa*, los cuales provenían de fincas de floricultores, ubicadas en cinco municipios de la Sabana de Bogotá. Se desarrolló una metodología práctica para la conservación en cápsulas de gelatina, de este patógeno obligado, lo que permitió tener fuente de inóculo permanente para los análisis patológicos y moleculares que se realizaron. Los estudios de patogenicidad en los cultivares Aalsmeer Gold, Charlotte, Classy, Konfetti, Livia y Tineke demostraron que en este último no había esporulación del aislamiento Sp6, pero este aislamiento si causó enfermedad en los otros cultivares. Por su parte, el resto de aislamientos, esporularon en todos los cultivares, lo que sugiere la presencia de al menos dos patotipos en la población analizada lo que sugiere una interacción patógeno-hospedante. Mediante PCR se amplificó la región del Espacio Interno Transcrito (ITS) del gen 5.8S del ADN ribosomal y se obtuvo una banda homogénea y reproducible de un peso molecular de 295 pb. El producto amplificado fue digerido con enzimas de restricción, las cuales mostraron un patrón de bandas igual para todos los aislamientos con cada enzima, lo que indica que todos los aislamientos corresponden a una sola especie. Se pudieron detectar polimorfismos intraespecíficos con 11 cebadores RAPD y un cebador microsatélite RAMS, los cuales permitieron la identificación de tres grupos genéticos a un 60% de similitud (Índice de Dice), estableciéndose que existe variación genética dentro de la especie. La alta correlación (+0,89) entre origen y variación genética y entre esta y la variación patogénica (+0,63), sugiere que existen diferencias en el ambiente y/o en el manejo de la enfermedad entre fincas, como también en los cultivares de rosa utilizados en cada finca.

**Palabras clave:** rosa, mildew polvoso, *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*, especialización patogénica, patotipos, variación genética

## SUMMARY

A collection of 45 isolates of *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* was established from rose plants infected with powdery mildew, one of the diseases caused by this pathogen. After a preliminary molecular screening using RAPD, 16 isolates, collected in floricultural enterprises located in five municipalities of the savannas of Bogotá, Colombia, were selected as representative of the variability present in *S. pannosa*. A practical methodology to conserve this obligated pathogen was developed using gelatin capsules, thus providing a permanent source of inoculum for pathological and molecular analyses. Pathogenicity studies conducted with rose cultivars Aalsmeer Gold, Charlotte, Classy, Konfetti, Livia, and Tineke showed that isolate Sp6 did not sporulate in cultivar Tineke, although this isolate affected all other cultivars. The other isolates sporulated on all cultivars, suggesting the presence of at least two pathotypes in the target population. A pathogen-host plant interaction therefore exists. The Internal Transcribed Space (ITS) of the 5.8S gene of ribosomal DNA was amplified using PCR, and a homogeneous and reproducible band, with a molecular weight of 295 bp, was obtained. The amplified product was digested with restriction enzymes that showed a similar band pattern for all isolates, indicating that the isolates belonged to the same species. Intraspecific polymorphisms were detected with 11 RAPD primers and a RAMS microsatellite primer. Three genetic groups, with 60% similarity (Dice index), were detected, indicating intraspecific genetic diversity. The high correlation (+0.89) between origin and genetic diversity, and between this and pathogenic variation (+0.63), suggests that differences exist in environment conditions and/or disease management among farms or in rose cultivars used.

**Keywords:** rose, powdery mildew, *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*, pathogen specificity, pathotypes, and genetic variation

## INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades que más limitan la producción de rosas en Colombia es la que se conoce como mildew polvoso, enfermedad causada por el hongo *Sphaerotheca pannosa* (Wallr. Fr) Lévl. var. *rosae* Woronichin. Este hongo pertenece a la clase Ascomycetes, subclase Himenomicetes, y al orden Erisifales (Alexopoulos 1962).

La enfermedad fue descrita por primera vez en 1819 por Wallroth como *Sphaerotheca pannosa* (Wallr. Fr) Lévl (Braun 1995). Esta enfermedad está ampliamente diseminada en los cultivos de rosas y afecta la calidad estética de la *Rosa* spp. en el invernadero, lo que ocasiona pérdidas económicas graves al

momento de la exportación. Tradicionalmente se ha controlado con fungicidas comerciales; de ellos los más comunes son los sulfatos o los inhibidores de la biosíntesis de esterol (Schepers 1985). En otros países se ha observado que aislamientos de *S. pannosa* resistentes a los fungicidas pueden sobrevivir durante varios años en el campo; por eso, el riesgo de aumentar una población resistente haciendo aplicaciones continuas de fungicidas, es muy alto (Reuveni et al. 1996).

Otros autores reportan algunos métodos parciales de control de la enfermedad como son el uso diario y abundante de agua, que inhibe el crecimiento de las conidias, haciendo que la eficiencia de la enfermedad disminuya (Yarwood 1939; Perera y Wheeler 1975).

También se han utilizado, como estrategias de control parcial de la enfermedad, el uso de detergentes tales como Tween 80 y Zohar LQ-215 que han mostrado efectos inhibitorios, así como una gran variedad de aceites (Cohen et al. 1996; Horst et al. 1992; Ohtsuka y Nakazawa 1991). Al igual que el agua, los detergentes y aceites controlan la enfermedad cuando se aplican permanentemente al cultivo.

La necesidad de desarrollar métodos alternativos para el control de enfermedades en los cultivos de flores se hizo más apremiante por dos razones: una la exigencia continua de diversos sectores sociales para que se redujeran los niveles de pesticidas en el agua de drenaje de los invernaderos, y por otro lado los requerimientos de los floricultores en cuanto a

la disponibilidad de variedades resistentes a la enfermedad que sean comercialmente aceptadas.

Para contribuir a la solución de estos problemas se debe conocer genéticamente el comportamiento del patógeno causante de la enfermedad, aplicando como herramientas útiles para este propósito las metodologías patológicas, moleculares y estadísticas disponibles. Con ellas se puede hacer una caracterización completa en aislamientos seleccionados y representativos de la variabilidad genética que pueda existir en la especie *S. pannosa*. Se tienen en cuenta, para la selección y colección de estos aislamientos, variables naturales como diferencias en origen geográfico, lesiones encontradas en diferentes sitios de la planta, y distintos grados de severidad en el ataque producido por el patógeno.

La caracterización patogénica y molecular permite desarrollar información básica, acerca de la composición genética del patógeno, así como las estrategias de sobre vivencia que haya podido desarrollar para mantener la enfermedad en el cultivo de rosas a través del tiempo.

Con estos conocimientos previos es posible generar criterios que ayuden, de manera eficaz y en poco tiempo, a la toma de decisiones de manejo, acertadas y duraderas para el cultivo de rosas; y que beneficien tanto al medio ambiente en que se cultiva la rosa, como a los floricultores y a los productores de rosas en Colombia.

A diferencia de la mayoría de estudios hechos con otros microorganismos no obligados que causan enfermedades en cultivos vegetales, *S. pannosa* es un patógeno obligado, que no permite mantenerlo en medio de cultivo *in vitro* en laboratorio; sino que únicamente se puede mantener *in vivo* en el tejido vegetal; de la misma manera para el manejo de las técnicas moleculares en este tipo de hongos, surge como una limitante, la carencia de métodos de extracción y amplificación de ADN desarrollados para este tipo de patógenos. En ambos casos se debieron adoptar estrategias y mecanismos de trabajo muy diferentes a los tradicionalmente conocidos y convertirlos en metodologías confiables, prácticas y repetibles que podrán utilizarse eficazmente en estudios relacionados de caracterización patológica y molecular en microorganismos obligados.

El objetivo principal de este estudio fue identificar la variabilidad genética y patogénica en aislamientos de *S. pannosa* var. *rosae* representativos de las fincas con alta producción de rosas en la Sabana de Bogotá, en Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección y mantenimiento de los aislamientos

Se colectaron hojas de plantas de rosa afectadas por mildew polvoso, en Mayo y Diciembre de 1999. Los aislamientos fueron

obtenidos de los cultivares Aalsmeer Gold, Charlotte, Classy, Konfetti, Livia y Tineke, provenientes de fincas ubicadas en cinco municipios del departamento de Cundinamarca, Colombia a saber: Madrid, Suesca, Gachancipá, Cota y Zipaquirá (Figura 1 a). Para el mantenimiento de las hojas que tenían síntomas de la enfermedad se utilizó el método descrito por Verhaar, 1988, con las modificaciones descritas a continuación: los folíolos infectados se colocaron en frascos pequeños de vidrio que contenían 15 mL de sacarosa en solución a concentraciones de 2,0; 1,5; 1,0; 0,5; 0,1; 0,02; 0,01; 0,005; 0,001 y 0,000 gr/L. Las soluciones de sacarosa se prepararon con agua destilada estéril y se envasaron en los recipientes en donde se habían colocado los folíolos, asegurando el peñol a la boca del frasco con papel "parafilm M". En seguida los recipientes con las muestras de hojas se colocaron dentro de una gradilla plástica en un cuarto de crecimiento equipado con 10 lámparas de una intensidad de 5.000 Lux cada una, las cuales se mantuvieron encendidas por 12 horas diarias durante el tiempo del estudio. La temperatura del cuarto osciló entre 20 - 24°C en el día y 14 - 18°C durante la noche, y la humedad relativa se mantuvo al 100% todo el tiempo.

### Incremento del inóculo

Para incrementar el inóculo del patógeno se tomaron plantas de rosa sanas una de cada cultivar y se inoculó cada una con un determinado aislamiento en un cuarto de crecimiento, utilizando las mismas condiciones de luz, temperatura y humedad relativa descritas anteriormente. Las conidias producidas en las plantas se recolectaron mediante un colector de esporas y se utilizaron para dos propósitos: para la conservación en cápsulas de gelatina dentro de la colección de *S. pannosa* establecida, y para hacer la extracción de ADN para el análisis molecular.

### Propagación de las plantas de rosa

La multiplicación de las plantas de rosa se hizo en los invernaderos del CIAT, en Palmira Valle del Cauca, Colombia.

Las plantas de los diferentes cultivares fueron obtenidas mediante enraizamiento de esquejes. Se cortaron trozos de aproximadamente 10 cm de longitud con dos yemas, superior e inferior, y se sembraron en bandejas colocadas en una cámara plástica ubicada dentro de un invernadero. Se utilizó una mezcla de arena y suelo en proporción 3:1 como medio de soporte, y el enraizamiento de los esquejes se logró haciendo aspersión suave y permanente de agua. Pasado un mes, aproximadamente, se obtuvieron plántulas con raíces bien formadas que se transplantaron a materos para que crecieran en una casa de malla. A estas plantas se les hicieron aplicaciones periódicas preventivas de Omite (propargite), Siste-

min (dimethoato) y fertilizante 15-15-15 (N-P-K).

### Métodos de inoculación

Se probaron diferentes métodos de inoculación reportados en la literatura para patógenos obligados. La aspersión de conidias con circulación de aire, tomado de Reifschneider y Boiteux (1988), con algunas modificaciones, fue el método más eficiente en el estudio de patogenicidad. Esta aspersión se hizo utilizando un difusor de conidias accionado por un ventilador con un cilindro plástico y una rejilla metálica en la salida del aire, donde se colocan las muestras de hojas afectadas por mildew polvoso. El ventilador forma un flujo de aire constante que transporta las conidias hacia las hojas de las plantas que se desea inocular, proceso que se repite por tres minutos para cada aislamiento. Para obtener buena cantidad de conidias se utilizó un colector fabricado para este propósito y cedido para este estudio por el Dr. M. Levi de la Universidad de Purdue (West Lafayette, IN). Este colector esta compuesto de un tubo metálico con tres orificios: el primero permite la entrada de las conidias, el segundo va conectado a una bomba de vacío y el tercero permite la salida de las conidias. Tiene además una cámara donde se acumulan las conidias, las cuales se transfieren después cápsulas de gelatina estériles para su almacenamiento (Figura 1b). Los aislamientos se conservan en estas cápsulas a 4°C para posteriores estudios.

### Pruebas de patogenicidad

Para los estudios de patogenicidad se utilizaron 16 aislamientos de *S. pannosa*, representativos de cada finca y se inocularon los siguientes cultivares de rosa: Aalsmeer Gold, Charlotte, Classy, Konfetti, Livia y Tineke. Se inoculó además un cultivar de rosa común obtenido en Palmira, sin clasificación conocida, como control local. La multiplicación de las plantas de rosa, el método de inoculación y las condiciones de incubación fueron descritas anteriormente.

La patogenicidad se evaluó semanalmente mediante el recuento del número de colonias de *S. pannosa* var. *rosae* en las tres primeras hojas verdaderas de cada planta inoculada. Se registró también la presencia del hongo en botones florales y tallos. Se hicieron en total cuatro evaluaciones en los días 7, 14, 21 y 28 después de la inoculación. Para cada aislamiento se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE). Se analizaron los datos obtenidos por agrupamiento, usando la técnica de Ward basada en la varianza mínima.

### Caracterización molecular

**Extracción de ADN:** Para extraer ADN de buena calidad y en cantidades fácilmente amplificables requeridas para caracterizar cada aislamiento con técnicas moleculares, fue necesario hacer una evaluación de cuatro métodos utilizados para distintas clases de patóge-

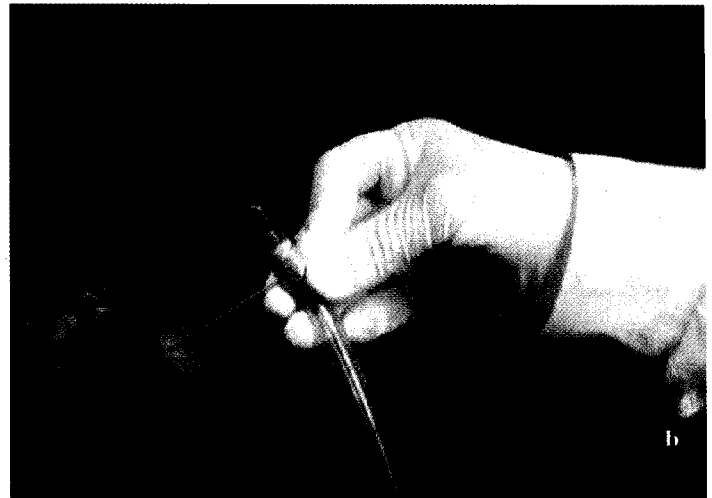
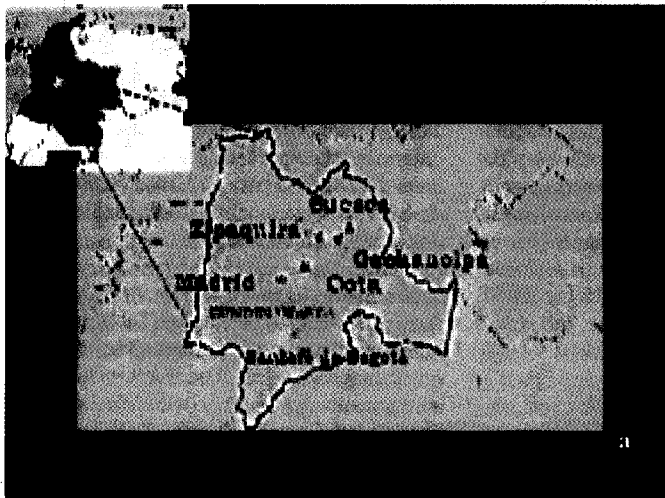


Figura 1. a Sitios de recolección de aislamientos de *S. pannosa*, en la Sabana de Bogotá b Colector de esporas accionado con vacío c Variedad tineke, una de las variedades menos susceptibles al ataque de *S. pannosa* d Variedad Aasmeer gold, muy susceptible al ataque de *S. pannosa*.

nos en otros estudios:

- El descrito por Walsh et al. (1991) con algunas modificaciones hechas en el presente trabajo. Este método utiliza una resina conocida como Chelex® 100 especial para extraer ADN, de muestras muy pequeñas.

Durante el proceso, con la ayuda de un estereoscopio; se tomó una pequeña cantidad de las conidias de cada aislamiento previamente almacenadas en cápsulas de gelatina, y se depositaron dentro de un tubo de Eppendorf de 1,5 ml. Para cada aislamiento se tomó aproximadamente la misma cantidad de conidias. A cada muestra se le agregó la resina Chelex® 100 al 5% y la suspensión se agitó vigorosamente en un mezclador (Vortex Genie) durante 5 segundos. Las muestras se incubaron luego a 56°C durante dos horas y se agitaron nuevamente en el mezclador durante cinco segundos. Los tubos se colocaron en un baño maría a 98°C durante ocho minutos. De nuevo se agitaron durante cinco segundos en el mezclador y se centrifugaron a 15,000 r.p.m. durante cinco minutos. De la fase sobrenadante se recuperó el ADN el cual se transfirió a otro tubo para hacer la amplificación.

- El segundo método de extracción consistió en el raspado de conidias al estereoscopio, utilizando un alfiler entomológico de 0,01 mm de grosor; se desprendieron cuidadosamente las conidias que estaban cubriendo el tejido vegetal, colocándolas dentro de un tubo para PCR de 0,25 µl con la mezcla de reacción. Luego se llevaron a un termociclador programable para su amplificación.

- En el tercer método se recolectaron las conidias utilizando la punta plástica de la pipeta. Esta punta se humedeció con la mezcla de reacción y se frotó suavemente sobre la superficie del tejido vegetal afectado, luego se colocaron dentro de un tubo de 0,25 µl y se agitó toda la mezcla con la pipeta para la reacción de PCR.

- El cuarto método utilizó el protocolo de Möller et al. (1992) modificado por Bardin et al. (1997). Las hojas de rosa colonizadas por el hongo se maceraron con nitrógeno líquido o arena de mar; la extracción de ADN se hizo utilizando 400 µl de tampón de lisis TES por muestra (100 mM Tris HCl, pH 7,5; 2 mM EDTA; sulfato dodecyl de sodio -SDS- al 2%,

p/v). Se hizo un lavado del micelio macerado y las conidias con CHCl<sub>3</sub>/alcohol isoamílico (24:1, v/v). La precipitación del ADN se hizo en un volumen de isopropanol al 100%. Una vez seco el precipitado, se resuspendió en 25 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA). El ADN se cuantificó en un fluorómetro (Hofer DyNA Quant 200) y simultáneamente se observó la calidad del ADN en un gel de agarosa de 1% (p/v) colocado en un tampón TBE 0,5X (0,04 mM Tris-HCl, 0,008 M acetato de sodio y 0,001 mM EDTA) durante una hora. El gel se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 100 µg/ml. El ADN extraído se colocó en un termociclador para su amplificación.

#### Amplificación del ADN utilizando PCR.

La reacción para la amplificación de ADNr mediante PCR se hizo en un volumen final de 25 µl; que contenía 0,25 mM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) con 25 mM de MgCl<sub>2</sub>; 15 mM de cada cebador (ITS1 e ITS2) para PCR 2,5 µl de tampón 10x para la enzima *Taq* polimerasa, todo diluido en agua destilada estéril. La amplificación se llevó a

cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA) utilizando el siguiente perfil térmico:

- una denaturación preliminar a 94°C durante 1 minuto;
  - una denaturación de 30 segundos a 94°C;
  - un apareamiento de 30 segundos a 55°C;
  - una extensión de 1 minuto a 72°C;
  - 45 ciclos desde el paso 2 hasta el paso 4;
  - una extensión final de 8 minutos a 72°C.
- Los productos amplificados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% (p/v) en tampón TBE 0,5 X durante 5 horas a 70 V. En cada gel se incluyó un marcador con un peso molecular conocido (100 pb) de GIBCO-BRL. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 10 mg/mL y luego se fotografiaron bajo luz ultravioleta utilizando un analizador de imágenes Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA).

#### Restricción de los fragmentos amplificados

Para la restricción del producto amplificado (ITS-RFLP) se probaron seis enzimas de restricción: *CfoI*, *AclI*, *MspI*, *HindI*, *DraI* y *HfoI*. Una muestra de 15 µL del producto amplificado de la reacción de PCR fue digerida con una mezcla de reacción de 1 µL de enzima de restricción y 2 µL de tampón 10X para la enzima. La suspensión se incubó durante 16 horas a una temperatura promedio de 37°C; a cada muestra se le agregaron 3 µL de tampón de carga para electroforesis y las muestras se colocaron luego en un gel de agarosa a una concentración de 1,5% diluida en tampón 0,5X TBE, añadiendo a la mezcla 10 mg/mL de bromuro de etidio. Después de la polimerización del gel, las muestras se sometieron a electroforesis durante 5 horas a 70 V constantes. Para cada gel se colocó un marcador de peso molecular 100pb de GIBCO-BRL.

**Amplificación con RAPD y RAMS.** La metodología utilizada en la técnica polimorfismos del ADN amplificados aleatoriamente (RAPD), es idéntica a la descrita para PCR, donde en lugar de utilizar cebadores ITS se utilizaron 28 deca-cebadores que amplificaron al azar fragmentos del genoma de las muestras de *S. pannosa*. También se probó un cebador tipo microsatélite denominado ACA diseñado y utilizado para estudiar diversidad genética en microorganismos, conocido como microsatélite RAMS (Hantula et al. 1996; Luster et al. 1999). El perfil térmico utilizado en ambos casos fue:

- una denaturación inicial de 95°C durante 3 minutos;
- una alineación de 57°C durante 30 segundos;
- una extensión de 72°C durante 2 minutos;
- una denaturación a 95°C durante 30 segundos;
- 44 ciclos desde el paso 2 hasta el paso 4;
- una alineación a 50°C durante 30 segundos;
- una extensión final de 72°C durante 10 minutos.

Los patrones electroforéticos de los frag-

mentos de ADN visualizados como bandas, fueron cuantificados utilizando como criterio la presencia o ausencia de bandas, asignando un valor de uno para la presencia y de cero para la ausencia. Las bandas registradas para elaborar la matriz de similaridad, fueron tomadas del rango entre 100 y 1500 p b. Para estimar la relación genética que existe entre los aislamientos, se construyó un árbol filogenético empleando el método de ligamiento promedio (UPGMA) con las opciones SAHN y TREE del paquete estadístico NTSYS-pc 2.01 (F. J. Rohlf, Exeter Software, Nueva York).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Recolección y mantenimiento de los aislamientos

Mediante la metodología utilizada para la conservación de las muestras provenientes de rosas colombianas infectadas con *S. pannosa* var. *rosae* en recipientes de vidrio con solución

temente las conidias perdieron viabilidad.

Esta metodología posibilitó el establecimiento de una colección de *S. pannosa* donde las conidias de cada aislamiento son conservadas dentro de cápsulas de gelatina a 4°C por tres meses, después de los cuales cada aislamiento se renovó para mantener siempre viable la colección y disponible para su utilización en los estudios requeridos.

### Incremento del inóculo

Los aislamientos obtenidos (Tabla 1) fueron identificados como *S. pannosa* var. *rosae* bajo microscopía de luz. Todos reprodujeron los síntomas en las hojas y tallos de las plantas inoculadas. Los aislamientos Sp1, Sp3, Sp8 y Sp10 afectaron también el botón floral de la planta. Se observó que las hojas jóvenes y en proceso de alargamiento, fueron las más afectadas. En los experimentos realizados en CIAT (Palmira) no se observó la formación de estructuras reproductivas o cleistotecios.

**Tabla 1.** Origen de los aislamientos de *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* utilizados en el estudio, hongo causante de la enfermedad mildew polvoso.

Aislamiento	Cultivar de rosa	Origen <sup>a</sup>	
		Finca	Municipio
Sp1	Livia	Rosas Colombianas	Madrid
Sp2	Tineke	Rosas Colombianas	Madrid
Sp3	Aalsmeer Gold	Rosas Colombianas	Madrid
Sp4	Classy	Rosas Colombianas	Madrid
Sp5	Konfetti	Rosas Colombianas	Madrid
Sp6	Charlotte	El Tandil	Zipaquirá
Sp7	Aalsmeer Gold	El Tandil	Zipaquirá
Sp8	Livia	El Tandil	Zipaquirá
Sp9	Aalsmeer Gold	El Pino	Cota
Sp10	Konfetti	El Pino	Cota
Sp11	Classy	El Pino	Cota
Sp12	Aalsmeer Gold	El Aljibe	Suesca
Sp13	Livia	El Aljibe	Suesca
Sp14	Konfetti	El Aljibe	Suesca
Sp15	Tineke	El Aljibe	Suesca
Sp16	Charlotte	El Ciprés	Gachancipá

<sup>a</sup> En el departamento de Cundinamarca

de sacarosa, reportada en Los Países Bajos por Verhaar (1998). Con las modificaciones hechas en el presente estudio y descritas anteriormente, se comprobó que el método desarrollado funciona en forma eficiente y además es reproducible, lográndose adaptar a las condiciones del trópico. Las modificaciones consistentes en utilizar un rango más amplio de concentraciones de sacarosa que el estipulado por Verhaar (1988) facilitaron el mantenimiento de *S. pannosa* en forma activa. Los folíolos de rosa permanecieron vivos y vigorosos mientras que el hongo se mantuvo esporulando por un periodo hasta de tres semanas.

La eficiencia máxima del método se observó utilizando el rango entre 0,0% y 0,02% de solución de sacarosa y fue óptima la concentración de 0,01% de sacarosa manteniendo el inóculo vivo y creciendo sobre los folíolos durante tres semanas; se conservó el color verde típico en las hojas de rosa. En el rango entre 0,1% y 2,0% se observó amarillamiento del tejido vegetal antes de las dos semanas, afectando el crecimiento del hongo consecuen-

Las esporas se almacenaron en cápsulas de gelatina a 4°C en la colección de *S. pannosa*; se pudo comprobar que los aislamientos almacenados a 4°C por un periodo de tres meses, se mantuvieron viables pues infectando el tejido vegetal en el cuarto de crecimiento.

### Propagación de las plantas de rosa

Con el método desarrollado en los invernaderos del programa de Fitopatología de Yuca en CIAT, en Palmira, Valle del Cauca, se obtuvo enraizamiento rápido de esquejes para la producción de plántulas de rosa en todos los cultivos enviados desde las fincas de floricultores de la sabana de Bogotá. En un periodo entre 3 y 4 semanas, se pudieron obtener esquejes enraizados y posteriormente plántulas de rosa como material limpio para investigación. Este sistema de propagación rápida de esquejes de rosa, tratados con fungicida antes de la siembra, permitió producir en cuatro semanas material vegetal limpio para

los experimentos e inoculaciones programadas.

### Métodos de inoculación

La aspersión de conidias mediante el flujo constante de aire con un ventilador, permitió obtener inoculaciones uniformes en los diferentes experimentos realizados. Los síntomas de la enfermedad obtenidos con este método, fueron el encrespamiento de las hojas y secamiento de los folíolos. El hongo colonizó, además de la parte foliar, los tallos y los botones florales de la planta. En las plantas afectadas por la enfermedad se observó una suspensión de su crecimiento normal. Se pudieron apreciar diferencias entre aislamientos respecto a la infección de los botones florales, lo cual indica que hay especialización en el patógeno para infectar determinado tejido.

La incidencia de los aislamientos en los cultivares Livia y Konfetti, oscila entre 6 y 93 colonias por planta, después de hacer las evaluaciones programadas. Se registró un promedio de 28 folíolos afectados por planta, lo que indica que el inóculo es infectivo y las condiciones de infección fueron óptimas. Los cultivares Classy y el cultivar local identificado, procedente de Palmira, presentaron los menores promedios de colonias por planta (Figura 1c). Mientras que los cultivares Konfetti y Aalsmeer Gold fueron los más susceptibles al ataque de *S. pannosa*, con inoculaciones artificiales (Figura 1d). Mostrando que existe algún tipo de resistencia genética al patógeno.

Diversos métodos de inoculación se desarrollaron en el pasado para reproducir síntomas de Mildeo Polvoso en Rosa; la mayoría de ellos utilizan una gran cantidad de inóculo y se deben hacer por largo tiempo. Se pudo observar que para reproducir síntomas de mildeo polvoso de manera artificial y en nuestras condiciones, el método más eficiente es la aspersión de conidias jóvenes con circulación permanente de aire, simulando las condiciones naturales en que ocurre la infección; y se hizo de una manera más práctica que la torre de inoculación utilizada por Reifschneider y Boiteux en 1988, que era operada con vacío. Este método tiene como ventaja que no necesita gran cantidad de inóculo, pues utiliza un equipo manual de muy bajo costo, que distribuye el inóculo de manera uniforme sobre las plantas de rosa, en condiciones controladas de luz, humedad relativa y temperatura.

### Pruebas de patogenicidad

Una vez establecidas todas las condiciones de mantenimiento e incremento del inóculo, y un sistema apropiado de propagación de plantas de rosa, se pudieron evaluar los resultados de los ensayos de patogenicidad.

En cuanto a la patogenicidad, se observó interacción entre los aislamientos, el cultivar y el origen de este. (Figura 2), no obstante la no inclusión de todas las variedades por escasez de plantas. Estos resultados indican diversas relaciones entre los genes de resistencia de los

cultivares y los genes de virulencia de los aislamientos del patógeno.

Los estudios de patogenicidad en los cultivares Aalsmeer Gold, Charlotte, Classy, Konfetti, Livia y Tineke demostraron que en el cultivar Tineke no había esporulación del aislamiento Sp6, mientras que este aislamiento si causó enfermedad y esporuló abundantemente en los otros cultivares. En el área afectada por Sp6 en las plantas de Tineke se observó tejido vegetal necrosado pero sin esporulación del hongo, lo cual indica incompatibilidad. Sp2 afectó solamente un área muy reducida en Classy, mientras en los otros cultivares el área afectada fue mayor. Del mismo modo, Sp4 afectó a Konfetti con un área de infección muy reducida pero si afectó a los otros cultivares (Tabla 2). Estas observaciones indican una interacción patógeno-hospedante y sugiere la existencia de al menos dos patotipos de este patógeno en la población analizada. El cultivar Livia es susceptible a todos los aislamientos del patógeno. El estudio realizado halló evidencias que prueban la existencia de razas en la población de aislamientos provenientes de la Sabana de Bogotá. Sin embargo es indispensable coleccionar más aislamientos y realizar muestreos en otras zonas del país. Además es importante determinar la frecuencia de aislamiento de cada raza.

Bender y Coyier (1984) demostraron la existencia de aislamientos de *S. pannosa* var. *rosae* con adaptación diferencial de sus hos-

En el futuro, los muestreos que se realicen para detectar la presencia de cleistotecios, la evaluación de la resistencia del patógeno a los fungicidas, y el estudio de las causas de las diferencias en patogenicidad entre aislamientos de diferente origen, tendrán mucha importancia al tomar las decisiones de manejo adecuadas y duraderas para el cultivo. La existencia de razas de *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* no ha sido demostrada previamente en Colombia. La identificación de razas de mildeo polvoso será de utilidad en el desarrollo de cultivares en que se haya mejorado la resistencia al hongo.

Mediante análisis de regresión simple se obtuvo un coeficiente de correlación de (+0,79) entre las variables origen y variación genética. También se detectó correlación entre variación genética y variación patogénica ( $r = +0,63$ ).

### Caracterización molecular

**Extracción de ADN:** Por la dificultad que se presenta con este tipo de patógenos obligados para ser cultivados en medio *in vitro* y por los pocos reportes que existen para extracción de ADN en estos, se debieron probar 4 métodos y hacer modificaciones para poder estandarizar al final un método rápido práctico y reproducible para este tipo de patógenos.

De los métodos probados para lograr la amplificación de las secuencias de ADN aisla-

**Tabla 2.** Determinación de razas de *S. pannosa* var. *rosae* de la rosa mediante inoculación artificial bajo condiciones controladas.

Aislamiento	Raza	Reacción de compatibilidad							
		Esporulación			Área afectada				
		Tineke	Classy	Konfetti	Local Palmira	Tineke	Classy	Konfetti	Local Palmira
Sp6 (Bogotá)	1	I <sup>a</sup>	- <sup>b</sup>	C <sup>c</sup>	C	C	-	C	C
Sp2 (Bogotá)	2	C	C	C	C	C	I	C	C
Sp4 (Bogotá)	3	-	-	C	C	-	-	I	C
Otros (Dagua)	4	C	C	C	C	C	C	C	C

<sup>a</sup> = incompatible <sup>b</sup> = no determinada <sup>c</sup> C = compatible

pedantes originales, y pudieron diferenciar cinco razas a nivel de invernadero en Estados Unidos.

La relación entre origen y variación genética/patogénica indica que existen diferencias en el manejo de la enfermedad entre fincas o por factores ambientales.

La existencia de razas exige un manejo integrado del mildeo polvoso que comprende medidas como: cuarentena y desinfección de materiales nuevos antes de llevarlos a los invernaderos comerciales; rotación de fungicidas de diferente acción; evitar la diseminación del patógeno de una finca a otra; sembrar cultivares con resistencia horizontal.

La baja patogenicidad observada al inocular los aislamientos en el cultivar Tineke, indica que es un cultivar que tiene potencial para desarrollar resistencia horizontal, y surge como una buena alternativa para el control permanente del mildeo polvoso.

de *S. pannosa*, el método que utiliza la resina Chelex<sup>®</sup> 100, mostró ser el más repetible y el que permitió obtener un mejor rendimiento con cantidades de ADN fácilmente amplificables. Estas características facilitaron la utilización de los marcadores moleculares PCR, RAPD y RAMS para el estudio de diversidad genética en este patógeno. Otra característica importante del método es que durante el proceso de extracción no se involucra el uso de solventes orgánicos, como si lo hacen la mayoría de los métodos convencionales de extracción reportados para microorganismos.

**Amplificación del ADN utilizando PCR:** La amplificación de la región ITS del gen ribosomal 5.8S en los aislamientos analizados de *S. pannosa* var. *rosae*, dio lugar a fragmentos de igual tamaño, visualizables como una banda continua de 295 pb (pares de bases), con los iniciadores de la reacción de amplificación

utilizados, ITS1 e ITS2, lo que indica que los aislamientos pertenecen a una misma especie.

**Restricción de los fragmentos amplificados:** De seis enzimas de restricción probadas para digerir el producto amplificado de los aislamientos de *S. pannosa* var. *rosae*, las enzimas *AluI* y *HindI* digirieron totalmente el producto de ADN amplificado; se observaron dos bandas constantes de cada aislamiento con patrones electroforéticos idénticos para todos los aislamientos, aunque en diferente posición para cada enzima. Con el análisis de restricción con enzimas no fue posible detectar diferencias intraespecíficas.

**Amplificación con RAPD y RAMS:** Un considerable grado de polimorfismo fue detectado mediante el uso de RAPD en 16 aislamientos de *S. pannosa* var. *rosae* provenientes de las fincas de los floricultores de la Sabana de Bogotá (Figura 3). Se examinaron 28 cebadores, de los cuales se utilizaron los 12 más polimórficos para el análisis estadístico.

Estos cebadores mostraron coherencia y

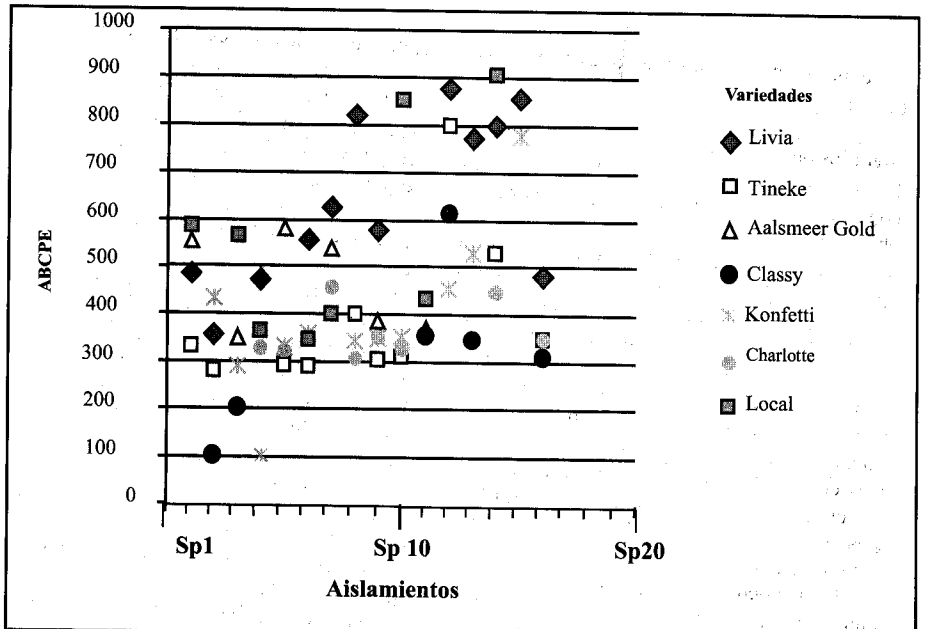


Figura 2. Diversidad Patogénica detectada en la población de *S. pannosa* var. *rosae* en plantas inoculadas en un cuarto de crecimiento. Origen de los aislamientos Sp1- Sp5: Madrid; Sp6-Sp8: Zipaquirá; Sp9 y Sp10: Cota; Sp11-Sp15: Suesca; y Sp16 Gachancipá.

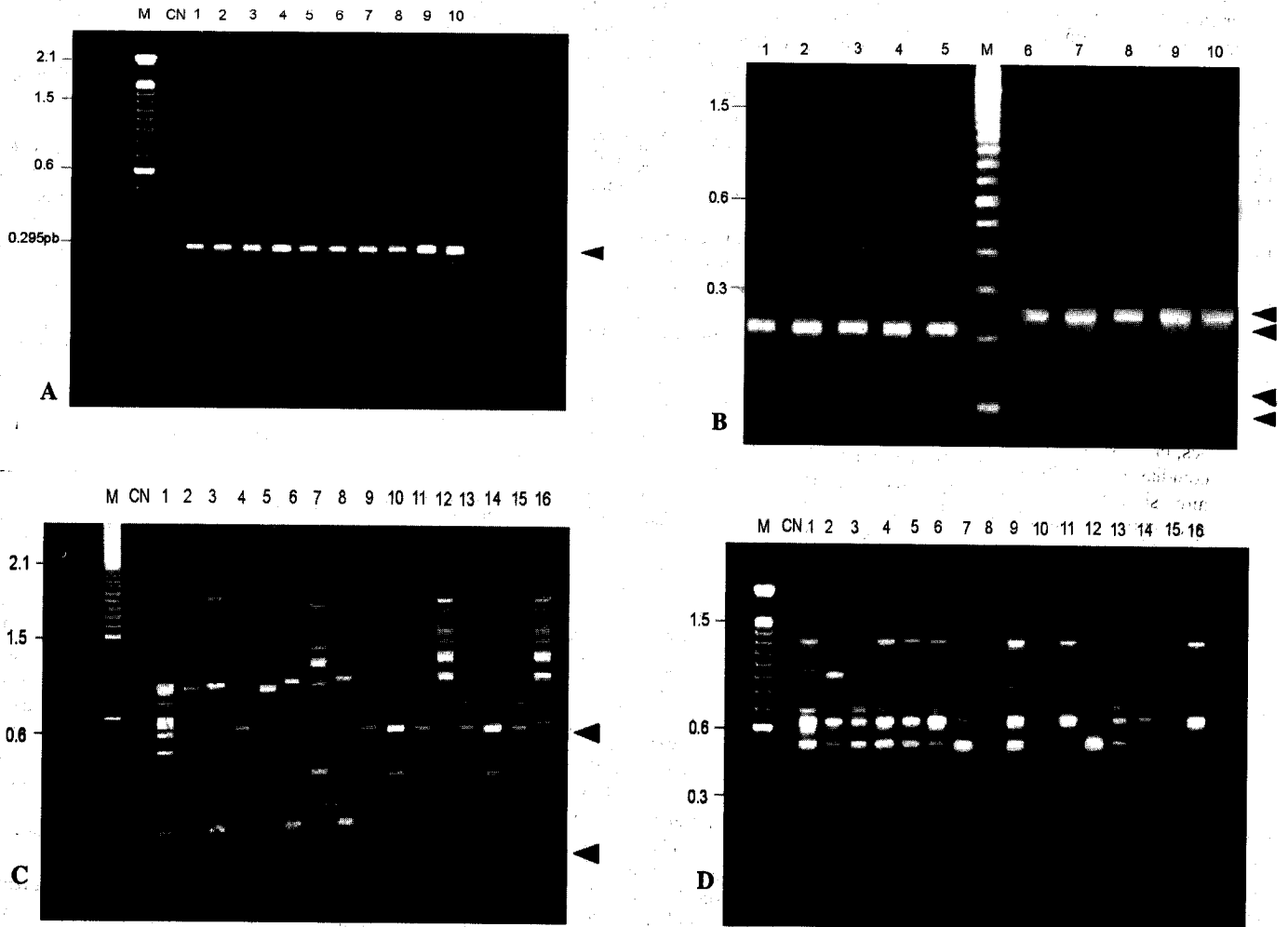


Figura 3. Se observan cuatro marcadores moleculares evaluados en los aislamientos de *S. pannosa* provenientes de la Sabana de Bogotá. En todos los casos el carril rotulado con M corresponde al marcador de tamaño molecular de 100pb, y el carril marcado con CN corresponde al control negativo. Los valores a la izquierda de cada Figura están dados en Kilobases. **A** Amplificación de la región ITS (ITS-1, ITS-2) en los aislamientos Sp-1 hasta Sp-10. **B**. Patrones de restricción de PCR amplificando ADNr, del carril 1 a 5 aislamientos digeridos con la enzima *AluI* y del 6 al 10 los mismos aislamientos digeridos con la enzima *HindI*. **C**. Polimorfismos detectados en 16 aislamientos examinados con el primer OPO-02. **D** Patrones electroforéticos obtenidos con el cebador microsatéelite ACA en la población estudiada de 16 aislamientos de *S. pannosa*.



reproducibilidad en los diferentes eventos de electroforesis; el cebador OPO-02 refleja el grado de polimorfismo que se logró detectar en la especie *S. pannosa* var. *rosae*. También se utilizó un cebador tipo microsatélite denominado ACA, reportado para hongos, (Hantula et al. 1996; Luster et al. 1999) que evalúa una región muy específica del genoma, mostrando un grado considerable de polimorfismo en los aislamientos de la población examinada.

Para el análisis estadístico realizado a partir de los datos obtenidos con la aplicación de los marcadores moleculares en los aislamientos de *S. pannosa* se leyeron 143 bandas y se construyó un dendrograma basado en las 87 bandas más polimórficas encontradas en la lectura de los geles. Este análisis dio como resultado un total de tres grupos genéticos diferentes en la población de los 16 aislamientos analizados, con un índice de similitud de Dice de 0,60, lo que refleja un alto grado de variación dado el tamaño de la población examinada (Figura 4).

En el estudio molecular del hongo biótrofo

quiere el uso de solventes orgánicos para la extracción de ácidos nucleicos.

La utilización de marcadores moleculares basados en las metodologías del PCR mostraron claramente su aplicación como método de diagnóstico acertado para la identificación del patógeno que está ocasionando la enfermedad en las plantas de rosa, permitiendo diferenciar aislamientos de acuerdo a su origen y en algunos casos al tejido que ataca.

Los marcadores RAPD y RAMS son herramientas útiles para conocer el grado de variabilidad presente en el patógeno, así como las diferentes formas genéticas que puede tener, lo cual no es detectable con los estudios de observación morfológica o patogénica. El conocimiento de formas genéticas diferentes del patógeno, sugiere que se deben utilizar variedades con resistencia horizontal y estrategias de manejo del cultivo iguales para todas las fincas productoras de rosas en la Sabana de Bogotá.

#### CONCLUSIONES

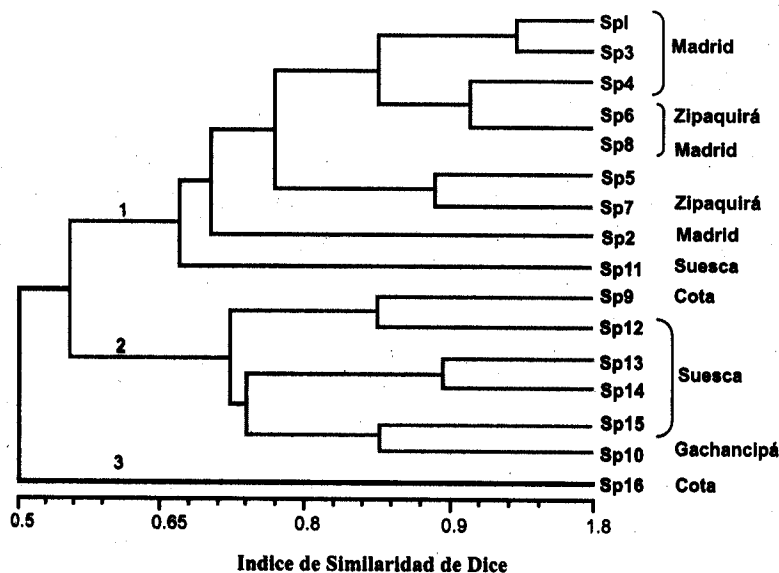


Figura 4.. Dendrograma construido con UPGMA basado en una matriz de similitud de 87 bandas

*S. pannosa* var. *rosae* se tuvo como principal dificultad la estandarización de una metodología apropiada para la extracción de ADN, debido a su característica de patógeno obligado; no existe aún una metodología para cultivar este hongo *in vitro* y las conidias obtenidas para la extracción son muy pequeñas; por tal razón se evaluaron cuatro métodos de extracción de ADN, produciendo los mejores resultados, el método de extracción que utiliza la resina Chelex® 100 adoptado de un protocolo usado en medicina forense (Walsh et al. 1991) para evaluar muestras donde la cantidad de tejido con que se cuenta es escasa.

Este método no necesita grandes cantidades de muestra de hongo y además, no re-

Los aislamientos provenientes de fincas ubicadas en el pie de monte son más patogénicos que los del altiplano, esto indica que existen diferencias de manejo del cultivo de la rosa entre fincas, como también las diferencias climatológicas en la Sabana de Bogotá tienen un efecto sobre la estructura genética del patógeno. En estudios futuros se identificará si existen interacciones entre la patogenicidad, el ambiente y el hospedante.

La identificación de interacción patógeno y hospedante de mildew polvoso será de mucha utilidad para el desarrollo de cultivares. El conocimiento de nuevos patotipos implica que se deben usar cultivares con

resistencia horizontal y estrategias de manejo del cultivo. La utilización de marcadores moleculares pasados en las metodologías de PCR mostró claramente su aplicación como herramienta del diagnóstico acertada para la identificación del patógeno causante de enfermedad en plantas de rosa. Los marcadores RAPD y RAMS fueron útiles para conocer la variación genética del patógeno permitiendo, diferenciar aislamientos de acuerdo a su origen.

#### AGRADECIMIENTOS

A ASOCOLFLORES por la financiación del proyecto presentado. A la Dra. Silvia Guzmán, Jefe de Producción de Rosas Colombianas y al Ing. Gilberto Fernández, del Grupo Chía, por facilitar las muestras y los cultivares de rosa. Al Dr. Morris Levy, de la Universidad de Purdue, IN, E.E.U.U. por el envío del colector de esporas. A Juan Bernardo Pérez, por la construcción de la torre de inoculación y la propagación de los esquejes de rosa, A Elizabeth Barona por el soporte para la representación geográfica de los sitios de muestreo, al Ing. Germán Llano por el apoyo en el análisis estadístico y al experto Guillermo Castellanos del CIAT por las sugerencias técnicas en el manejo del hongo. A la estudiante de la Universidad Católica de Manizales, Lina María Tabares y Sandra Patricia Cuero, por su colaboración en las actividades de laboratorio e invernadero.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexopoulos, C. J. 1962. Introductory Mycology. XIII - 613 PP. John Wiley. New York.
- Bardin, M., Nicot, P., Normand, P. y Lemaire, J. M. 1997. Virulence variation and DNA polymorphism in *Sphaerotheca fuliginea* causal agent of powdery mildew of cucurbit. Europ. Journal of Plant Pathology. 103: 545-554.
- Bender, C. L. y Coyier, D. L. 1984. Isolation and identification of *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*. Phytopathology 74:100-103.
- Bender, C. L. y Coyier, D. L. 1986. Pathogenic variation in Oregon populations of *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*. Plant Disease 70: 383-385.
- Braun, U., 1995. The powdery mildews (*Erysiphales*) of Europe. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 337 p.
- Cohen, R., Shtienberg, D. y Edelstein, M., 1996. Suppression of powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in cucumber by the detergent Zohar LQ-215. Eur. J. Plant Pathol. 102: 69-75.
- Hantula, J., Dusabenyagasani, M. y Hamelin, R. C. 1996. Random amplified microsatellites (RAMS): a novel method for characterizing genetic variation within ungi. European Journal for Pathology 26: 159-166.

- Horst, R. K., Kawamoto, S. O. y Porter, L. I. 1992. Effect of sodium bicarbonate and oils on the control of powdery mildew and black spot of roses. *Plant Disease* 76: 247-251.
- Luster, G. D., Goley, D. E., Weber, L. E. y Paxson, K. L. 1999. Molecular fingerprinting of weed pathogens utilizing Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) and Random Amplified Microsatellite (RAMS) PCR. *Phytopathology* 89:S47.
- Möller, E. M., Bahnweg, G., Sanderman y Geiger, H. H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acid Res.* 20: 6115-6116.
- Ohtsuka, N., y Nakasawa, Y. 1991. The influence of machine oil on conidia and hyphae of cucumber Powdery Mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 57: 598-602.
- Perera, R. G., and Wheeler, B. E. J., 1975. Effect of water droplets on the development of *Sphaerotheca pannosa* on rose leaves. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 64: 313-319.
- Reifschneider, F. J. B y Boiteux, L. S. 1988. A vacuum-operated settling tower for inoculation of powdery mildew fungi. *Phytopathology* 78: 1463-1465.
- Reuveni, M., Agapov, V. y Reuveni, R. 1995. Suppression of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) by foliar sprays of phosphate and potassium salts. *Golan Research Institute, University of Haifa, Israel. Plant Pathology* 44 (1) : 31-39.
- Schepers, H. T. A. M., 1985. Fitness of isolates of *Sphaerotheca fuliginea* resistant or sensitive to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis. *Neth. J. Plant Pathol.* 91: 65-76.
- Verhaar, M. A. 1998. Studies on biological control of powdery mildew in cucumber (*Sphaerotheca fuliginea*) and rose (*S. pannosa*) by means of mycoparasites. WAU dissertation no. 2525. University of Wageningen, Los Países Bajos.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A y Higuchi, R. 1991. Chelex® 100 as medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4): 506-513.
- Yarwood, C. E., 1939. Control of powdery mildew with water spray. *Phytopathol.* 29: 288-290.

Reprinted with permission from ASCOLFI. Originally published in *Fitopatología Colombiana* 25(1):7-14, Copyright 2001.

RI  
Lo  
ma  
Co  
ent  
Est  
ést  
sid  
es  
pre  
SC  
áci  
der  
SA  
bla  
ino  
sint  
15  
frot  
líne  
de  
tier  
ción  
SC  
cuc  
lada  
SA  
info  
cia  
sint  
Pal  
IN  
El F  
rica  
Mej  
tien  
de  
ácid  
desa  
con  
las i  
la si  
les e  
dade  
SA3  
de g  
que  
abió  
bióti  
porta