

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FITOQUÍMICA DE OCHO GENOTIPOS DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) Y SU RELACIÓN CON LA INFECCIÓN POR *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh.

Francisco Bittara¹, Dorian Rodríguez¹, Alexander Hernández¹,
María E. Sanabria¹ y Nayleth Méndez¹

RESUMEN

La sarna polvorienta de la papa es una enfermedad causada por *Spongospora subterranea*, cuyo control debe realizarse a través de la integración de diversas medidas, de las cuales la resistencia varietal, probablemente, represente el componente principal. El presente estudio se realizó con la finalidad de caracterizar ocho genotipos de papa desde el punto de vista molecular y fitoquímico y relacionar estas características con su reacción frente a la infección por *S. subterranea*. La reacción a la infección se evaluó en un cobertizo con plantas obtenidas *in vitro* de los cultivares Granola, Esperanza, Kennebec y los clones 393180-32, 393194-1, 393193-16, 392634-21 y 392636-31 plantados en bolsas de polietileno e inoculadas con esporos obtenidos del campo. La evaluación se realizó cuantificando los zoosporangios en las raíces y realizando el análisis fitoquímico a las 8 semanas de establecido el ensayo. La caracterización molecular, mediante el uso de secuencias sencillas repetidas (SSR), se llevó a cabo en plantas *in vitro* de seis semanas de edad. Se utilizaron 20 iniciadores flanqueantes a SSR nucleares. Los resultados mostraron diferencias entre los genotipos de papa en cuanto a su susceptibilidad al agente patógeno, en los que los clones 392636-31 y 393193-16 presentaron los menores contenidos de zoosporangios por milímetro cuadrado de raíz. El iniciador STM-1016 permitió una clasificación de los clones muy similar a la obtenida con el análisis de la infección de los clones, reflejando la ubicación de 393193-16 y 392636-31 en solo un grupo. El análisis fitoquímico mostró diferencias entre los genotipos en cuanto a los metabolitos secundarios, sugiriendo una asociación de los flavonoides con un menor grado de infección de los materiales.

Palabras clave adicionales: Zoosporangios, secuencias sencillas repetidas, flavonoides, susceptibilidad

ABSTRACT

Molecular and phytochemical characterization of eight potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes and its relationship with infection by *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh.

Potato powdery scab is a disease caused by *Spongospora subterranea*, whose control should be realized by integrating several practices, of which, plant resistance is probably the main component. The present study was conducted to determine the molecular and phytochemical characteristics of eight potato genotypes and the relationship with their reactions to infection by *S. subterranea*. Reactions to infection were evaluated with *in vitro* plants of the cvs. Granola, Esperanza, Kennebec and the clones 393180-32, 393194-1, 393193-16, 392634-21 y 392636-31, planted in plastic bags and inoculated with spores obtained from a potato field. Evaluation was realized by quantifying root zoosporangia and phytochemical analyses after 8 weeks. Molecular characterization, by using repeated simple sequences (RSS), was performed in six-week-old *in vitro* plants. Twenty RSS nuclear flank primers were used. Results showed differences among potato genotypes with regard to susceptibility to the pathogen, where the clones 392636-31 y 393193-16 had the lowest amount of zoosporangia per squared millimeter of root. Primer STM-1016 allowed a classification of the clones very similar to the one obtained by analysis of infection, locating clones 393193-16 in the same 392636-31 group. Phytochemical analysis showed differences among genotypes respect to secondary metabolites, suggesting an association between flavonoids and the degree of infection of the materials.

Additional key words: Zoosporangia, repeated simple sequence, flavonoids, susceptibility

INTRODUCCIÓN

Spongospora subterranea (Walls.) Lagerh. es un endoparásito obligado de la familia

Plasmodiophoridae (Phylum Cercozoa) (Cavalier-Smith y Chao, 2003), el cual puede sobrevivir en el suelo por muchos años, a través de esporas de resistencia, e invadir las células de las raíces y

Recibido: Marzo 28, 2012

Aceptado: Diciembre 3, 2012

¹ Postgrado de Fitopatología. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Apdo. 400. Barquisimeto, Venezuela. e-mail: bittarafco@yahoo.es; rdorian@ucla.edu.ve; mesanabria@ucla.edu.ve; ahernandez@ucla.edu.ve

estolones de la papa, por medio de zoosporas secundarias, en los primeros estadios de desarrollo de la planta (Merz, 1997). No existe un único método de control que por si solo sea eficiente (Merz, 2000a; Wale, 2002), ya que éste ha resultado ser particularmente difícil, debido a la longevidad de los esporosoros (Merz, 2000b), el grado de efectividad y/o aplicabilidad de los tratamientos químicos (Falloon, 2008) y la posibilidad del patógeno de sobrevivir en campo en ausencia de cultivo (Qu y Christ, 2006). Por consiguiente, el manejo de la enfermedad debe realizarse a través de la integración de diversas medidas de control, dentro de las cuales el uso de la resistencia del cultivo probablemente represente el componente principal en el manejo sostenible de la enfermedad (Falloon, 2008).

La reacción diferencial de materiales de papa a *S. subterranea* ha sido reportada tanto en tubérculos como en raíces (Merz et al., 2004; Baldwin et al., 2008; Falloon, 2008). Se ha propuesto que la herencia de la resistencia es del tipo cuantitativa y que existe evidencia de reacción diferencial de un mismo cultivar a aislamientos del patógeno de diversas procedencias geográficas (Falloon et al., 2003; Merz et al., 2004), lo que ha sugerido la posibilidad de la existencia de patotipos de la especie (Falloon et al., 2003). No obstante, la similitud entre los diversos genotipos y su relación con la enfermedad no han sido previamente estudiadas.

Tradicionalmente, la evaluación de la resistencia a *S. subterranea* ha sido llevada cabo con pruebas de campo, sin embargo, estos suelen resultar costosos, laboriosos y requieren de tiempo, además, su éxito depende de las condiciones ambientales que permitan el establecimiento de la infección (Merz y Falloon, 2009). Debido a ello, se han propuesto ensayos bajo condiciones controladas adecuadas para el desarrollo de la enfermedad (Baldwin et al., 2008). No obstante, el trabajo de selección sigue siendo un proceso arduo, por lo que Merz et al. (2004) propusieron un ensayo para la selección en laboratorio, basándose en la relación proporcional de la infección en raíces y tubérculos, en donde los cultivares con mayor resistencia mostraron un menor nivel de zoosporangios en raíces.

Aunque la relación entre infección de raíces y tubérculos no está muy clara (Merz et al., 2004;

Falloon, 2008; van de Graaf et al., 2007), Falloon et al. (2003) demostraron que los cultivares resistentes de manera general mostraron un número menor de zoosporangios de *S. subterranea* en las raíces que los susceptibles, lo cual indicó que la resistencia se encuentra expresada en los sitios de penetración de las zoosporas a las células de la raíz y estolón.

Todos estos mecanismos de resistencia se encuentran bajo el dominio de los genes por lo que la identificación de cualquiera de ellos puede ser de gran utilidad en los programas de mejoramiento genético (Day, 1974; Laurentin et al., 2003). Las bases bioquímica y fisiológica de la resistencia de las plantas a los hongos, oomycetos y bacterias patogénicas han sido asociadas a compuestos antimicrobianos formados tanto anterior como posterior a la infección (Hammerschmidt, 1999). Tales compuestos son de bajo peso molecular y derivados del metabolismo secundario de las plantas, los cuales pueden ser clasificados como: fenoles, flavonoides, antocianinas, aminoácidos no protéicos, glucósidos cianogénicos, poliacetilenos, alcaloides y péptidos (Pérez de la Vega, 1993). La relación de algunos de estos grupos a las reacciones de resistencia/susceptibilidad de *S. tuberosum* a *S. subterranea* no ha sido previamente estudiada. El presente estudio fue llevado a cabo con el objeto de caracterizar ocho genotipos de papa (*Solanum tuberosum* L.) desde el punto de vista molecular y fitoquímico y relacionar estas características con su reacción frente a la infección por *Spongospora subterranea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Infección de ocho genotipos de papa por *Spongospora subterranea*. Se utilizaron plantas de cultivo *in vitro* de los cultivares ‘Granola’, ‘Esperanza’, ‘Kennebec’, junto a los clones avanzados 393180-32, 393194-1, 393193-16, 392634-21 y 392636-3. Estos clones provienen de la Población B desarrollada por el Centro Internacional de la Papa (CIP) (Landeo et al., 1995). Para el ensayo se empleó el método de evaluación en invernadero, con plantas desarrolladas en bolsas e inoculadas con esporosoros de la peridermis de papa, utilizado por Baldwin et al. (2008).

El experimento fue conducido en un cobertizo,

con temperaturas de 14-24 °C (min-max). Las vitroplantas fueron trasplantadas a bolsas de polietileno negro (15 x 15 x 15 cm) llenadas previamente con sustrato estéril compuesto por una mezcla de cáscara de arroz, aserrín de coco y suelo orgánico en proporciones 2:1:1, respectivamente; al momento del trasplante se mezclaron 3 g de fertilizante (12-24-12) con el sustrato. Como fuente de inóculo se emplearon esporos obtenidos a partir de lesiones de tubérculos del cv. Andinita, en el estado Mérida, Venezuela. De éstos, 0,2 g de peridermis con lesiones (equivalente a $7,55 \cdot 10^5$ esporos) fueron aplicados al fondo del hoyo de siembra previo al trasplante. Se colocó una planta por genotipo en cada bolsa. Las plantas fueron regadas por capilaridad, para lo cual, las bolsas plásticas fueron colocadas en bandejas de aluminio de 6 cm de altura y regadas diariamente hasta el nivel máximo de la bandeja (Baldwin et al., 2008).

En la octava semana luego de la siembra se llevó a cabo un muestreo para la cuantificación de zoosporangios en las raíces y la caracterización fitoquímica de la planta.

Caracterización molecular de los genotipos de papa. Se realizó la caracterización molecular, mediante el uso de secuencias sencillas repetidas (SSR) (Milbourne et al., 1998; Mathias et al., 2007). Se utilizaron plantas *in vitro* de 6 semanas de edad. El ADN se purificó mediante el método descrito por Doyle y Doyle (1990).

Se emplearon los siguientes 20 pares de iniciadores, amplificados por PCR: STM1049, STM2022, STM3023, STM1031, STP_oA58, STM0031, STM1052, STM2013, STM1104, STM1016, STGBSS, STWAX-2, STM3012, STM1106, STM0037, STM0030, STM2030, STM1064, STM1058 y STM1017 (Milbourne et al., 1998). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 15 µL que contenían 50 ng de ADN total, 1X de buffer de reacción, 2,5 mM de MgCl₂, 150 µM de cada dNTP, 0,25 µM de cada iniciador y 1 U de Tag polimerasa. La amplificación fue realizada con una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de separación (95 °C por 30 s), alineamiento (temperatura según iniciador, por 25 s) y extensión (72 °C por 30 s) con un ciclo final de 72 °C por 5 min. Los productos obtenidos fueron separados en geles de poliácridamida al

10 % en buffer TBE y teñidos con nitrato de plata.

La medida de similitud utilizada vino dada por el coeficiente general de Gower (1971). Por último, se realizó el análisis de los individuos a través del método de agrupamiento de pares no ponderados, usando la media aritmética (UPGMA). Los datos fueron analizados con el programa PATN versión 3.11 (Griffith University, Australia).

Caracterización fitoquímica de los genotipos de papa

A. Análisis cualitativo de metabolitos secundarios: Todas las plantas de un mismo genotipo fueron procesadas como una sola muestra y la determinación de los metabolitos secundarios (MS) fue realizada en tubérculos/estolones, raíces y parte aérea de la planta (hojas y tallos). La metodología de obtención de los extractos etanólicos y la determinación de los grupos de MS fue realizada siguiendo la propuesta de Marcano y Hasegawa (2002) y Sanabria et al. (1998). El extracto crudo se obtuvo por maceración con etanol (96 %) y posterior separación de éste por medio de un rotavapor Büchi. En el análisis, se determinó la presencia o ausencia de los siguientes compuestos: 1) Alcaloides: Al extracto etanólico crudo se le añadió ácido clorhídrico 10 % y la mezcla se colocó en un embudo de separación. La primera fase se logró con cloroformo y la segunda, acuosa que permaneció en el embudo, se alcalinizó con hidróxido de amonio y posteriormente se lavó con cloroformo para obtener una segunda fase, lo cual permitió la determinación de alcaloides débilmente básicos, básicos y sales cuaternarias de amonio. Con la ayuda de un tubo capilar se colocó una gota de cada fase, por separado, en una placa de sílica-gel y se roció con reactivo de Dragendorff. En aquellos casos en los que la fase resultara positiva para la presencia de alcaloides (por la formación de una mancha oscura), se trataron con el reactivo de Meyer, lo que provoca la formación de un precipitado blanco en una pequeña cantidad del extracto crudo. 2) Antraquinonas: El extracto etanólico, disuelto y filtrado con hidróxido de potasio 0,5 N, fue acidificado con ácido acético y agitado con benceno. Al alcalinizar con hidróxido de amonio, la manifestación de una coloración rojiza indicó la presencia de antraquinonas. 3) Flavonoides: Al

extracto etanólico se le agregó ácido clorhídrico concentrado y virutas de magnesio. En aquellos casos positivos, la mezcla tomó una coloración roja a rojiza. A fin de corroborar los resultados, se colocaron gotas del extracto en papel de filtro y se rociaron con una solución de cloruro de aluminio; la presencia de flavonoides quedó demostrada por la aparición de una mancha amarilla fluorescente al observar bajo luz ultravioleta. 4) Polifenoles y taninos: Al extracto etanólico se le añadieron unas gotas de cloruro férrico 1 %, y luego gelatina 1 % en cloruro de sodio de igual concentración. La formación de un precipitado demostró la presencia de polifenoles y taninos. 5) Saponinas: Una pequeña porción del extracto se agitó fuertemente en agua; la aparición de una espuma consistente de unos veinte minutos de duración después de dejar reposar la mezcla, demostró la presencia de

saponinas. 6) Aceites esenciales: Detectados mediante la presencia del olor característico que le confieren al material vegetal.

B. Análisis cuantitativo de metabolitos secundarios: Luego de realizar el análisis cualitativo, se procedió a cuantificar aquellos MS cuya presencia resultó positiva, mediante el uso de cromatografía en papel de filtro (Filtrak, $d = 125 \text{ mm}$; $80 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$). Se registraron los valores de peso fresco de las raíces, tubérculos/estolones y parte aérea, así como los volúmenes de etanol empleados. Una gota de $10 \mu\text{L}$ de extracto crudo fue corrida junto al solvente específico según el grupo de estudio (Cuadro 1). Posteriormente, los metabolitos fueron cuantificados empleando la metodología reportada por Vásquez et al. (2008) y expresados en miligramos de metabolito por mililitro del material vegetal.

Cuadro 1. Metabolitos secundarios (MS) analizados a través de la cromatografía en papel, solvente empleado, método de revelado y resultado a esperar en positivos

MS	Solvente	Revelado	Resultado esperado
Alcaloides	Butanol, ácido acético y agua destilada (9:2:1)	Luz ultravioleta	Coloración anaranjada
Antraquinonas	Ácido acético glacial	Hidróxido de amonio	Coloración rojiza
Flavonoides	Benceno, ácido acético y agua destilada (9:1)	Luz ultravioleta	Coloración amarilla a verde fosforescente
Polifenoles y taninos	Ácido acético glacial y agua destilada (9:1)	Cloruro férrico (1%)	Coloración parda

C. Análisis e interpretación de los datos: Para el análisis de los datos se construyó una matriz conjunta con los valores cuantitativos y cualitativos obtenidos de cada MS para cada genotipo y órgano de la planta evaluado. El hecho de reportar conjuntamente los resultados correspondientes a los análisis cualitativo y cuantitativo permitió ampliar el número de variables para la matriz y enriquecer así la información obtenida. Para el análisis cualitativo, se utilizó el reporte de presencia/ausencia de alcaloides débilmente básicos, básicos y sales cuaternarias de amonio, antraquinonas, flavonoides, polifenoles y taninos, saponinas y aceites esenciales. Para los datos cuantitativos se emplearon los valores de alcaloides totales, antraquinonas, flavonoides, polifenoles y taninos. Seguidamente, los datos obtenidos fueron transformados utilizando el procedimiento de estandarización por rangos con el objeto de dar el mismo peso y tamaño a todas las variables MS

estudiadas, permitiendo una contribución homogénea de los caracteres en los análisis posteriores (Sokal y Sneath, 1963).

A continuación, se realizó el cálculo de las relaciones entre los genotipos, a través de la elaboración de una matriz de disimilitud empleando para ello el índice o coeficiente general de Gower (1971). El análisis de clasificación de los individuos se llevó a cabo a través del método de agrupamiento de pares no ponderados usando la media aritmética (UPGMA), a fin de dar a todos los caracteres incluidos el mismo peso, para de esta forma reflejar las distancias verdaderas entre los individuos (Sokal y Sneath, 1963; Quinn y Keough, 2002). Dicho análisis fue realizado empleando en conjunto y por separado los valores obtenidos en todos los órganos analizados.

Por otra parte, con la finalidad de establecer cuál de los metabolitos estudiados fue más discriminatorio en la clasificación de los genotipos

evaluados y determinar la existencia de relaciones entre los metabolitos y la infección por *S. subterranea*, se realizó un análisis de ordenación de los caracteres mediante la técnica de escalamiento multidimensional (MDS) y el análisis de correlación de componentes principales (PCC). Los análisis se llevaron a cabo tomando en cuenta los metabolitos presentes en las raíces y tubérculos debido a que éstos representan los sitios de infección del patógeno; de esta manera, los valores de los metabolitos en dichos órganos fueron analizados según fue descrito previamente. Todos los procedimientos empleados fueron realizados con el programa PATN versión 3.11 (Griffith University, Australia)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Infección de los ocho genotipos de papa por *S. subterranea*

Los síntomas de infección se observaron sólo en raíces a las 8 semanas de iniciado el ensayo. Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre los genotipos de papa, en cuanto a la cantidad de zoosporangios por milímetro cuadrado de raíz. Los clones 392634-21 y 393194-1 presentaron los mayores contenidos de éstos y fueron estadísticamente iguales a 'Kennebec' y al clon 393180-32 (Figura 1); mientras que los clones 392636-31 y 393193-16 mostraron los menores valores y fueron estadísticamente similares a los cultivares Esperanza y Granola.

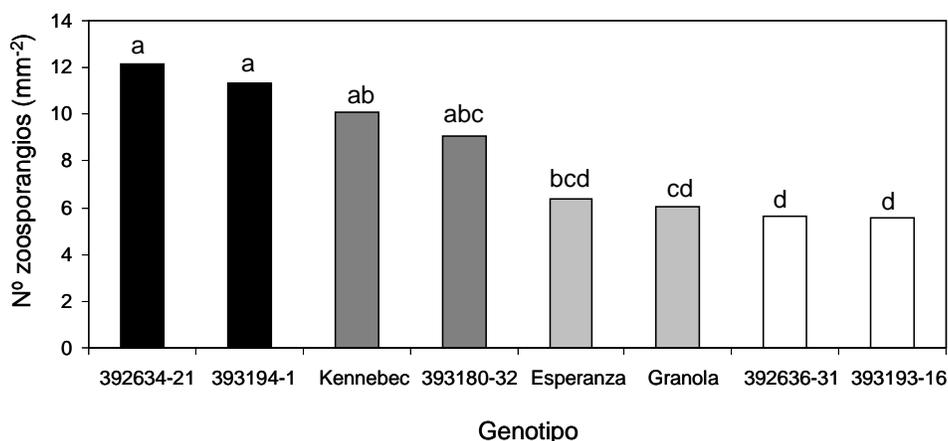


Figura 1. Número promedio de zoosporangios por superficie de raíces en ocho genotipos de papa inoculadas artificialmente con *Spongospora subterranea* y sus grupos homogéneos. Prueba de medias según LSD ($P \leq 0,05$)

Caracterización molecular de los genotipos de papa y su relación a la infección por *S. subterranea*

El análisis de los productos de amplificación mostró diferencias entre los ocho genotipos estudiados. Los valores del coeficiente de disimilitud de Gower detectó una amplia variabilidad entre los individuos evaluados, con rangos entre 0,1503 y 0,5233 (Cuadro 2). En el dendrograma mostrado en la Figura 2 se observa que se generaron dos grupos principales compuestos por el genotipo 393193-16 (B) y el resto de los individuos (A), lo que indica que el genotipo 393193-16 presenta la menor similitud con el resto de los materiales. Para el grupo compuesto por los siete genotipos restantes es posible evidenciar la formación de dos subgrupos,

uno conformado por los cvs. Esperanza, Granola y Kennebec y otro por los clones avanzados 393194-1, 393180-32, 392636-31 y 392634-21. A su vez, los genotipos Kennebec y 392634-21 representaron los materiales con menor similitud en sus subgrupos respectivos. Con la excepción del clon 393193-16, el análisis permitió la agrupación de los genotipos estudiados en clones y variedades. Los cultivares evaluados, a diferencia de los clones avanzados, son clasificados como *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, conocido comúnmente como papa europea. Dichas diferencias en la especiación y probablemente los progenitores empleados para la obtención de estos materiales podrían explicar su agrupación; no obstante, el clon 393193-16, a pesar de ser un material originado a partir de la

población B, mostró el menor grado de similitud con los demás individuos incluidos en este experimento. La población B desciende de la selecciones de la población A, desarrollada por el Centro Internacional de la Papa, y que incluía cultivares primitivos de las especies *S. tuberosum*

ssp. *andigena*, *S. phureja*, *S. stenotomum* y cultivares de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* (Landeo et al., 1995), por lo que su agrupación puede responder a los genes predominantes obtenidos a partir de los diversos padres empleados.

Cuadro 2. Coeficientes de disimilitud de Gower entre ocho genotipos de papa analizados a través de la amplificación de secuencias sencillas repetidas (SSR)

Genotipos	393194-1	393193-16	392634-21	392636-31	393180-32	Esperanza	Granola
393193-16	0,3938						
392634-21	0,3575	0,5233					
392636-31	0,3212	0,4560	0,3990				
393180-32	0,1503	0,4301	0,3938	0,3057			
Esperanza	0,4404	0,4404	0,4249	0,4404	0,4041		
Granola	0,3368	0,3886	0,4560	0,3886	0,3523	0,3316	
Kennebec	0,4197	0,4922	0,3938	0,4922	0,4352	0,4249	0,3420

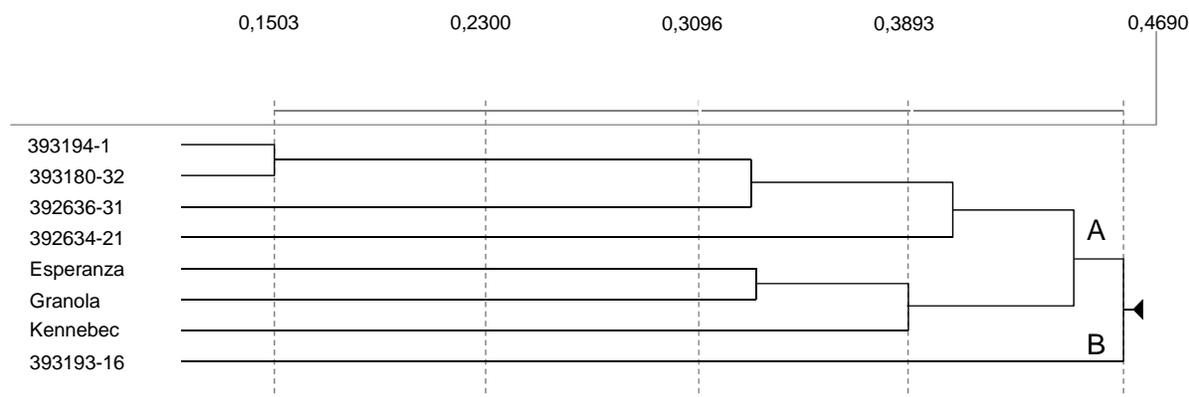


Figura 2. Dendrograma de ocho genotipos de papa basado en los valores de disimilitud de Gower a partir del análisis de secuencias sencillas repetidas (SSR) y el algoritmo de clasificación UPGMA

En cuanto a la relación entre la caracterización por SSR y la infección de raíces por *Spongospora subterranea*, se encontró que de los 20 iniciadores, el STM-1016 generó una clasificación de los genotipos muy similar a la obtenida a través del análisis de varianza y prueba de medias (Figura 3), lo que demuestra la potencialidad de este iniciador para la evaluación de la infección en raíces. Se generaron dos grupos principales en la representación gráfica: grupo A, compuesto por los genotipos 393194-1, 393180-32 y 392634-21, 'Kennebec', 'Esperanza' y 'Granola', y grupo B por los clones 393193-16 y 392636-31. De esta manera, el grupo B incluye a los materiales con menor grado de infección por *S. subterranea*. A su vez, el grupo A se encuentra subdividido en dos, el subgrupo A1 donde se incluyen los clones

393194-1, 393180-32, 392634-21 y el cv. Kennebec, y el A2 conformado por los cvs. Granola y Esperanza. Los grupos A1 y A2 mostraron valores de infección altos e intermedio, respectivamente.

Los iniciadores STM1049, STM3023, STM3012 y STM0032 ofrecieron la mayor contribución para la clasificación del clon 393193-16 como un grupo aparte. Asimismo, el resultado sugiere que el grupo de iniciadores empleados tiene la potencialidad para discriminar entre genotipos de *Solanum tuberosum* con diversos grados de reacción a la enfermedad. No obstante, es importante resaltar que los resultados se aplican sólo a la infección de raíces. Debido a que aún no se conoce una relación concluyente entre la infección en la

raíz y aquella que puede ser encontrada en el tubérculo (Falloon et al., 2003; Merz et al., 2004; van de Graaf et al., 2007), no es posible la

realización de inferencias, por lo que deberían llevarse a cabo estudios más detallados de este aspecto.

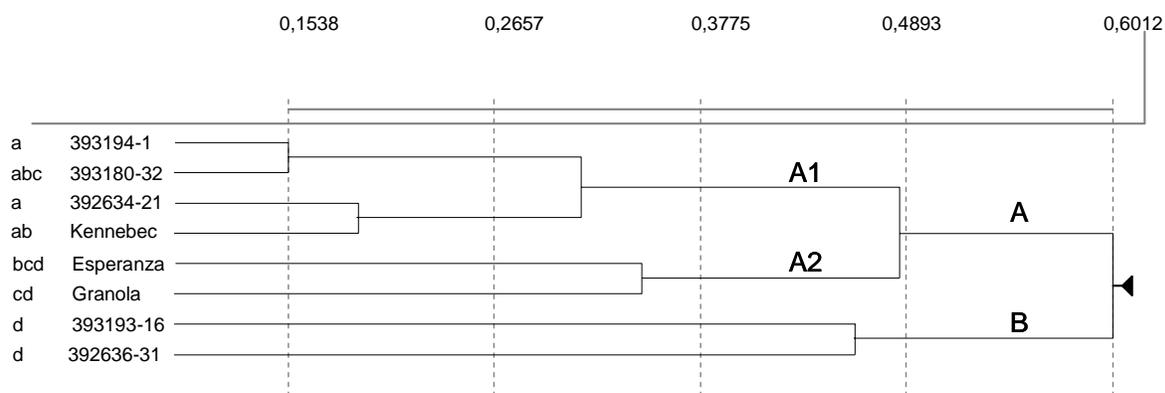


Figura 3. Dendrograma de ocho genotipos de papa basado en la discriminación de alelos amplificados por el iniciador STM-1016 y grupos homogéneos de medias de infección en raíz por *Spongospora subterranea*. A y B representan los grupos y A1 y B1, los sub-grupos. Prueba de medias según LSD ($P \leq 0,05$)

Relación entre la caracterización fitoquímica de los genotipos de papa y la infección por *S. subterranea*.

Las antraquinonas estuvieron ausentes en todos los genotipos estudiados, mientras que los aceites esenciales estuvieron siempre presentes (Cuadro 3). La ausencia de antraquinonas y la presencia de aceites esenciales en algunos de estos materiales fue previamente reportada por González et al. (2008) al evaluar en campo, un grupo mayor de genotipos, entre los cuales se incluían 'Esperanza', 'Granola', 'Kennebec' y el clon 392180-32. Marcano y Hasegawa (2002) señalaron que la ausencia de antraquinonas puede ser explicada por ser éstas precursoras de otros grupos de MS, por lo que puede ser detectada sólo en ciertas etapas del desarrollo de la planta. Además, es posible que dicho compuesto pudiese estar presente en concentraciones no detectables por la metodología empleada para su identificación.

De forma general, fue posible observar que la distribución de los grupos de MS varió según el órgano y el genotipo en cuestión (Cuadro 4), donde los flavonoides en tubérculos fueron los compuestos con mayor frecuencia y concentración. 'Granola' representó el genotipo con más altos niveles de polifenoles y taninos en hojas y tallos aéreos, lo cual concuerda con los

resultados reportados por González et al. (2008) en la evaluación de éste y otros materiales en condiciones de campo. La relación de los polifenoles y taninos ha sido asociada a la defensa de la planta contra plagas y enfermedades (Izco, 2004); sin embargo, 'Granola' ha sido reportado como un genotipo altamente susceptible al agente causal de la candelilla tardía *Phytophthora infestans* (García et al., 2005) por lo que este grupo de MS podría estar relacionado más bien a otros caracteres.

En la representación gráfica de los individuos evaluados con relación a los MS (Figura 4) se generaron dos grupos principales compuestos por los clones 393194-1, 392634-21, 393193-16 y 393180-32 (grupo A), y por el resto de los individuos (grupo B). Sin embargo, tal clasificación agrupó al clon 393193-16 junto a los individuos que mostraron el mayor grado de infección por el patógeno (Figura 1), por lo que dicha agrupación resultó contradictoria a los resultados obtenidos en las pruebas de inoculación. No obstante, y partiendo del análisis de agrupación realizado mediante los SSR, fue posible determinar que dicho genotipo resultó poseer un grado de disimilitud suficiente para ser clasificado como un individuo aparte dentro de los ocho materiales evaluados. Por tal razón, y a fin de buscar una mayor homogeneidad

de las condiciones establecidas, se procedió a realizar un nuevo análisis de clasificación considerando al clon 393193-16 como un individuo aparte.

Cuadro 3. Evaluación cualitativa de metabolitos en los extractos etanólicos en diferentes órganos de ocho genotipos de papa inoculados artificialmente con *Spongospora subterranea*

Genotipo	Sección	ALC		SCA	ANT	FLAV	PYT	SAP	AE
		DB	B						
Esperanza	P A	+	-	-	-	+	+	+	+
	R	+	+	+	-	+	-	+	+
	T/E	-	-	+	-	+	+	-	+
Granola	P A	+	+	-	-	+	+	+	+
	R	+	+	+	-	-	-	-	+
	T/E	-	-	-	-	+	-	-	+
Kennebec	P A	+	+	+	-	+	+	+	+
	R	+	+	-	-	-	-	-	+
	T/E	-	-	-	-	+	+	-	+
393194-1	P A	+	+	+	-	+	+	+	+
	R	-	-	-	-	+	-	-	+
	T/E	-	-	-	-	+	-	-	+
393193-16	P A	+	+	-	-	+	+	+	+
	R	-	-	-	-	+	-	-	+
	T/E	+	-	-	-	+	+	+	+
392634-21	P A	+	+	+	-	+	+	+	+
	R	-	-	-	-	+	+	-	+
	T/E	-	-	-	-	+	+	+	+
392636-31	P A	+	-	+	-	+	+	+	+
	R	-	+	+	-	+	-	+	+
	T/E	-	-	-	-	+	+	+	+
393180-32	P A	+	+	+	-	+	+	+	+
	R	-	-	-	-	+	-	+	+
	T/E	-	-	-	-	+	+	-	+

PA: tallo aéreo+hojas; R: raíces; T/E: tubérculos/estolones; ALC: alcaloides; DB: débilmente básicos; B= básicos; SCA: sales cuaternarias de amonio; ANT: antraquinonas; FLAV: flavonoides; PYT: polifenoles y taninos; SAP: saponinas; AE: aceites esenciales. (+): presente; (-): ausente

Cuadro 4. Contenido (mg·mL⁻¹) de alcaloides, flavonoides y polifenoles y taninos en diferentes órganos de ocho genotipos de papa inoculados artificialmente con *Spongospora subterranea*

MS	Alcaloides			Flavonoides			Polifenoles y taninos		
	PA	R	T/E	PA	R	T/E	PA	R	T/E
393194-1	211,61	ND	161,15	1414,13	9408,02	15563,44	521,15	ND	ND
393193-16	369,97	106,6	ND	135,34	5414,62	13790,42	124,74	ND	58,05
392634-21	111,34	ND	ND	1764,65	5615,22	1849,54	88,5	2556,71	4178,66
392636-31	181,55	ND	101,57	2732,3	1510,54	11100,81	2078,76	ND	607,78
393180-32	42,97	ND	ND	997,27	801,9	10226,15	105,73	ND	433,99
Esperanza	53,88	23,48	93,53	2200,48	524,47	20742,12	377,16	ND	8620,09
Granola	1873,28	ND	529,59	8204,54	ND	19129,02	29605,95	ND	ND
Kennebec	99,52	ND	293,9	1261,77	ND	5282,49	165,19	ND	7234,78

MS: metabolito secundario; PA: parte aérea (tallo + hojas); R: raíz; T/E: tubérculo y estolón. ND: No detectado

La nueva reclasificación de los siete materiales restantes en base a los grupos de metabolitos

previamente señalados se muestra en la Figura 5. Dicha agrupación presenta la formación de dos

Bittara et al. Caracterización de genotipos de papa y su relación con *S. subterranea*

grupos principales: A, con los clones 393194-1 y 392634-21 y B, el resto de los genotipos. De esta manera, los materiales con mayor grado de

infección por el patógeno fueron agrupados como un único grupo (A) y los genotipos con grados de infección media y baja en otro grupo (B).

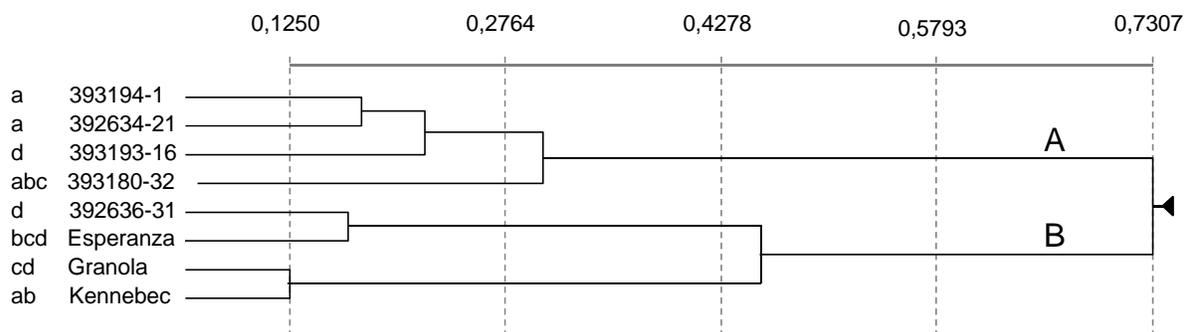


Figura 4. Dendrograma de ocho genotipos de papa basado en los valores de disimilitud de Gower a partir del análisis de grupos de metabolitos secundarios presentes en raíces. A y B representan los grupos. Prueba de medias según LSD ($P \leq 0,05$)

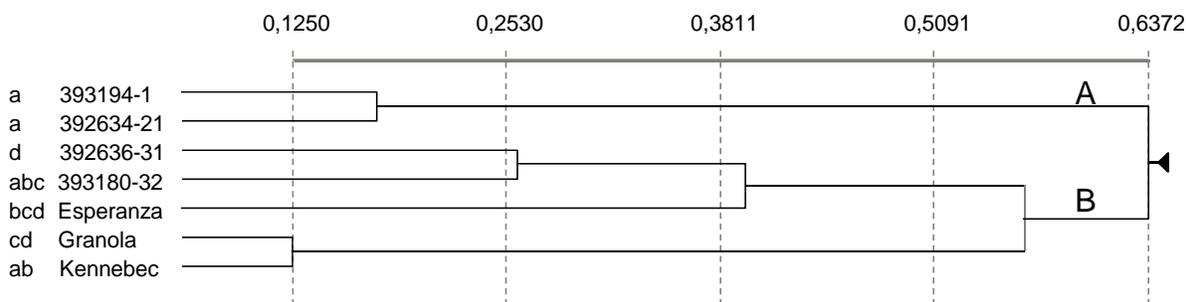


Figura 5. Dendrograma de siete genotipos de papa (excluido 393193-16) basado en los valores de disimilitud de Gower a partir del análisis de grupos de metabolitos secundarios presentes en raíces. A y B representan los grupos. Prueba de medias según LSD ($P \leq 0,05$)

A través del análisis de ordenación por escalamiento multidimensional (MDS) se pudo constatar el posicionamiento de los individuos; así, luego del análisis de ajuste de PCC (Cuadro 5), se determinó que los individuos que presentaron un mayor grado de infección fueron ordenados por los polifenoles y taninos, mientras que aquellos que presentaron menor grado de infección estuvieron ordenados por la presencia de flavonoides y alcaloides (Figura 6). Asimismo, se observa que los cultivares Kennebec y Granola se encontraron formando un sugbrupo diferente y mostraron estar ordenados principalmente por la presencia de alcaloides débilmente básicos. De forma general, la asociación de las

variables estudiadas explicó de mejor manera la relación entre la enfermedad y los MS para el grupo de los clones que para los cultivares, sugiriendo que el grado de separación entre éstos influye en los metabolitos que pudiesen estar relacionados con la enfermedad. McKee (1973) señaló que cada variedad, por definición, debe diferir de otras de su misma especie en una o más características específicas, sean estas químicas, fisiológicas o morfológicas, por lo que las diferencias en los MS evaluados en cada genotipo puede ser explicada por los mecanismos de regulación que permiten la presencia de tales compuestos para la defensa en unas plantas y no en otras.

Cuadro 5. Valores del análisis de correlación de componentes principales (PCC) a partir del estudio de grupos de metabolitos secundarios presentes en raíces de siete genotipos de papa inoculados artificialmente con *Spongospora subterranea*

Variable	Eje X	Eje Y	Eje Z	r-cuadrado
ALC R1	-0,405	-0,584	-0,703	0,564
PYT R1	0,466	0,301	0,832	0,662
ALC DB R2	-0,951	0,150	-0,271	0,899
ALC B R2	-0,340	0,019	0,940	0,906
ALC SCA R2	-0,045	-0,370	0,928	0,743
SAP R2	0,338	-0,833	0,438	0,921
FLAV R2	0,491	-0,740	-0,461	0,939

ALC: alcaloides, DB: débilmente básicos, B: básicos, SCA: sales cuaternarias de amonio, FLAV: flavonoides; PYT: polifenoles y taninos; SAP: saponinas; R: raíz; 1: analizado cuantitativamente; 2: analizado cualitativamente

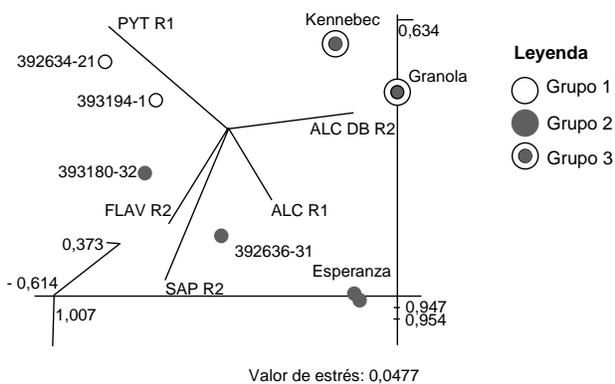


Figura 6. Análisis de ordenación de escalamiento multidimensional (MDS) basado en la matriz de distancia de Gower para siete genotipos de papa (excluyendo el clon 393193-16) y las mediciones cualitativas y cuantitativas de seis metabolitos secundarios extraídos en raíz. Los símbolos representan los tres grupos en que quedan divididos los genotipos de acuerdo a la presencia/ausencia y la concentración de los distintos metabolitos secundarios. ALC: alcaloides; DB: Débilmente básicos; FLAV: flavonoides; PYT: polifenoles y taninos; SAP: saponinas; R: raíz; 1: analizado cuantitativamente; 2: analizado cualitativamente

Falloon et al. (2003) señalaron que, así como la resistencia por parte de *Solanum tuberosum* a *Spongospora subterranea* parece estar determinada por la asociación de la acción aditiva de varios genes, igualmente es probable que tales genes respondan de manera diferente según el genotipo y su interacción con el ambiente. Tal aseveración puede verse respaldada por los

resultados presentados en este trabajo, en donde los clones 393194-1 y 393180-32, a pesar de presentar un alto grado de similitud en base a los estudios moleculares y de composición de grupos de metabolitos presentes, no respondieron de igual manera a la enfermedad, por lo que otros mecanismos de defensa de la planta podrían estar actuando, como los mecanismos de control en el balance hormonal de la planta hospedante (Ludwig-Müller y Schuller, 2008).

Los mecanismos de resistencia debidos a la acción de los MS en la defensa de las plantas en diferentes patosistemas han sido reportados en otras investigaciones (Swain, 1977; Bell, 1981; Bennett y Wallsgrove, 1994), por lo que la relación encontrada en nuestro estudio entre aquellos genotipos que presentaron menor grado de infección y la presencia de flavonoides sugiere la participación de éstos dentro de tales mecanismos de defensa, particularmente en las raíces. Debido a la naturaleza de estos compuestos es necesario determinar su acción en pro de dicha defensa en vista de que tales grupos de MS pueden actuar en los procesos de señalización y formación en las plantas (Hammerschmidt, 1999).

CONCLUSIONES

La reacción de los genotipos empleados a la infección por *Spongospora subterranea* pudo ser discriminada en raíces de *Solanum tuberosum*. Los clones avanzados 392636-31 y 393193-16 resultaron los genotipos con el menor grado de infección y 393194-1 y 393641-21 los de mayor nivel de infección radical. No se pudo discriminar para el caso de la parte aérea de la planta o los

tubérculos

Se encontraron diferencias en base al estudio de similitud a partir de SSR, y el iniciador STM-1016 logró describir una agrupación similar a la correspondiente a los resultados para la evaluación de infección en raíces

La agrupación realizada por los metabolitos secundarios mostró diferencias entre los genotipos, y se obtuvo una relación entre la presencia de flavonoides y los cultivares con menor grado de infección.

AGRADECIMIENTO

Al CDCHT de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado por la subvención al proyecto 008-AG-2007.

LITERATURA CITADA

- Baldwin, S., R. Genet, R. Butler y J. Jacobs. 2008. A greenhouse assay for powdery scab (*Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*) resistance in potato. *Potato Research* 51: 163-173.
- Bell, A. 1981. Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology* 32: 21-81.
- Bennett, R. y R. Wallsgrove. 1994. Tansley Review N° 72 Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *New Phytologist* 127: 617-633.
- Cavalier-Smith, T. y E. Chao. 2003. Phylogeny and classification of Phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist* 154: 341-358.
- Day, P. 1974. Genetics of Host-Parasite Interaction. Freeman & Co. San Francisco, United States. 238 pp.
- Doyle, J. y J. Doyle. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Falloon, R. 2008. Control of powdery scab of potato: Towards integrated disease management. *American Journal of Potato Research* 85: 253- 260.
- Falloon, R., R. Genet, A. Wallace y R. Butler. 2003. Susceptibility of potato (*Solanum tuberosum*) cultivars to powdery scab (caused by *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*), and relationships between tuber and root infection. *Australasian Plant Pathology* 32: 377-385.
- García R., L. Niño y A. Vargas. 2005. Problemas sanitarios relacionados con la producción de tubérculos-semilla de papa. Producción de semillas de papa en Venezuela. Serie de Manuales de Cultivo INIA N° 5. Capítulo III. pp. 56-116.
- González, M., M.E. Sanabria, D. Rodríguez y Z. Briceño. 2008. Determinación y cuantificación de metabolitos secundarios foliares en cultivares y clones avanzados de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture* 52: 52-54.
- Gower, J. 1971. A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics* 27: 857-871.
- Hammerschmidt, R. 1999. Phytoalexins: what have we learned after 60 years?. *Annual Review of Phytopathology* 37: 285-306.
- Izco, J. 2004. Caracteres taxonómicos: composición química. Botánica. McGraw-Hill Interamericana de España S.A.V. Barcelona. 814 p.
- Landeo, J., M. Gastelo, H. Pinedo y F. Flores. 1995. Breeding for horizontal resistance to late blight in potato free of R-genes. In: L.J. Dowley, E. Bannan, L.R. Cooke, T. Keane y E. O'Sullivan 150. (eds.) *Phytophthora infestans*. European Association for Potato Research. Dublin. pp. 268-274.
- Laurentin, H., C. Pereira y M. Sanabria. 2003. Phytochemical characterization of six sesame (*Sesamum indicum* L.) genotypes and their relationships with resistance against the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* Gennadius. *Agronomy Journal* 95: 1577-1582.
- Ludwig-Müller, J. y A. Schuller. 2008. What can we learn from clubroots: alterations in host roots and hormone homeostasis caused by *Plasmiodiophora brassicae*. *European Journal of Plant Pathology* 121: 291-302.
- Marcano, D. y M. Hasegawa. 2002. Fitoquímica Orgánica. UCV-CDCH. Caracas, Venezuela. 588 p.
- Mathias, M., B. Sagredo y J. Kalazich. 2007. Uso de Marcadores SSR para Identificación de

- germoplasma de papa en el Programa de Mejoramiento de INIA de Chile. *Agric. Téc., Chillán* 67(1): 3-15.
19. McKee, G. 1973. Chemical and biochemical techniques for varietal identification. *Seed Science Technology* 1: 181-199.
20. Merz, U. 1997. Microscopical observations of the primary zoospores of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. *Plant Pathology* 46: 670-674.
21. Merz, U. 2000a. Potato production and the powdery scab situation in Switzerland. *In: Proceedings of the First European Powdery Scab Workshop*. Merz U., Lees A. (eds.). Scottish Agricultural College, Aberdeen, Scotland. pp. 15-18.
22. Merz, U. 2000b. Experiments on direct control and yield loss made in New Zealand. *In: Merz U. y Lees A. (eds.). Proceedings of the First European Powdery Scab Workshop*. Scottish Agricultural College, Aberdeen, Scotland. pp. 51-52.
23. Merz, U. y R. Falloon. 2009. Review: Powdery scab of potato-Increased knowledge of pathogen biology and disease epidemiology for effective disease management. *Potato Research* 52: 17-37.
24. Merz, U., V. Martínez y R. Schwärzel. 2004. The potential for rapid screening of potato cultivars (*Solanum tuberosum*) for resistance to powdery scab (*Spongospora subterranea*) using a laboratory bioassay. *European Journal of Plant Pathology* 110: 71-77.
25. Milbourne, D., R. Meyer, J. Bradshaw, E. Baird, N. Bonar, J. Provan, W. Powell y R. Waugh. 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding* 3: 127-136.
26. Milbourne, D., R. Meyer, A. Collins, L. Ramsay, C. Gebhardt y R. Waugh. 1998. Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Molecular Genomics and Genetics* 259: 233-245.
27. Pérez de la Vega, M. 1993. Biochemical characterization of populations. *In: M. Hayward, N. Bosemark e I. Romagosa. (eds.). Plant Breeding: Principles and Prospects*. Chapman and Hall. London. pp. 184-200.
28. Posso, D. y T. Ghneim. 2008. Manual de laboratorio: Uso de marcadores microsatélites para la estimación de diversidad genética en plantas. IVIC. Caracas, Venezuela. 75 p.
29. Qu, X. y B. Christ. 2006. The host range of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* in the United States. *American Journal of Potato Research* 83: 343-347.
30. Quinn, G. y M. Keough. 2002. *Experimental design and data analysis for biologist*. Cambridge University Press. United Kingdom. 537 p.
31. Sanabria, M., O. Crescente y A. De Caserta. 1998. Metabolitos secundarios como un carácter quimiotaxonómico para tres especies del género *Heliconia* L. (*Heliconiaceae*) del Estado Sucre, Venezuela. *Ernstia* 8: 27-39.
32. Sokal, R. y P. Sneath. 1963. *Principles on Numerical Taxonomy*. Ed. W.H. Freeman. San Francisco, CA.
33. Swain, T. 1977. Secondary compounds as protective agents. *Annual Review of Plant Physiology* 28: 479-501.
34. van de Graaf, P., S. Wale y A. Lees. 2007. Factors affecting the incidence and severity of *Spongospora subterranea* infection and galling in potato roots. *Plant Pathology* 56: 1005-1013.
35. Vásquez C., O. Aponte, J. Morales, M.E. Sanabria y G. García. 2008. Biological studies of *Oligonychus punicae* (Acari: Tetranychidae) on grape vine cultivars. *Exp. Appl. Acarol.* 45: 59-69.
36. Wale, S. 2002. Potential for chemical control of *Spongospora subterranea*, cause of powdery scab of potatoes and vector of potato mop-top virus. *The Brighton Crop Protection Conference. Pest and Disease. Volumes 1-2*. Bright, UK. pp. 129-134.