

DetECCIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE ADN DE *Spongospora subterranea* EN SUELO Y TUBÉRCULOS DE PAPA

DETECTION OF DNA SPECIFIC SEQUENCES OF *Spongospora subterranea* IN SOIL AND POTATO TUBERS

Cristian Oswaldo Saavedra Rodríguez*,
Sandra Janeth Gómez González**, Jorge Evelio Ángel Díaz**

RESUMEN

Con el fin de identificar de manera precoz el agente causal de la sarna polvosa de la papa (*Spongospora subterranea* f. *subterranea*) tanto en semillas como en suelos aptos para el cultivo de este tubérculo, se ha desarrollado una prueba basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de tres secuencias ITS (espaciadores de transcripción interna específicos del ADNr) de 372, 390 y 391 pb presentes en el genoma de *S. subterranea*. Para ello se estandarizó una metodología de extracción y purificación de ADN del microorganismo a partir de tejido vegetal infectado (agallas de raíz de papa y pústulas en papa) obtenido en pruebas de propagación del patógeno en invernadero. Una vez optimizada la PCR y determinada su sensibilidad, se validó la metodología molecular examinando muestras de tejido vegetal infectado y suelo infestado por el patógeno, provenientes de los departamentos de Cundinamarca y Nariño. La PCR detectó ADN del microorganismo tanto en el material vegetal infectado, como en las muestras de suelo analizadas (las 30 submuestras del área experimental fueron PCR positivas). Estos resultados muestran que dicha metodología se presenta no sólo como una técnica útil para la detección rápida del patógeno en suelo, sino también como una herramienta para determinar la presencia del microorganismo en suelos declarados libres de éste y como una alternativa eficaz para el control de calidad en la producción de semilla certificada de papa libre del patógeno.

Palabras clave: sarna polvosa, quistosoros, espaciador de transcripción interna, PCR, plasmodiofóridos.

ABSTRACT

A test has been developed for early identification of the casual agent for potato powdery scab (*Spongospora subterranea* f. *subterranea*). Identification was carried out in seeds and soil where this tuber is grown. A polymerase chain reaction (PCR) was set up for detecting 372, 390 and 391 bp ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences (ITS) in the *S. subterranea* genome. A method for extracting and purifying DNA from infected plant material (potato root nodes and pustules on the potato) was standardised. Plant tissue was obtained by potato tuber propagation using an inoculum from the pathogen in greenhouse conditions. After the PCR had been optimised and its sensitivity determined, a molecular methodology was validated by examining plant material infected with *S. subterranea* and soil samples infested with the pathogen obtained from the departments of Cundinamarca and Nariño. The PCR detected *S. subterranea* DNA from infected material and soil samples (all thirty samples from the experimental area analysed proved PCR positive). These results show that this molecular method was not just useful for the early detection of the pathogen in soil samples but as a tool for detecting or determining the possible presence of this micro-organism in places that have been declared free of *S. subterranea* and an effective form of quality control in producing the certified potato seed.

Key words: Powdery scab, cystosori, internal transcribed spacer, PCR, plasmodiophorid.

INTRODUCCIÓN

Spongospora subterranea f. sp. *subterranea* (*S. subterranea*) es un parásito intracelular que produce plasmodios infectantes en el sistema radical de la

planta de papa y su tubérculo (*Solanum tuberosum* L) causando la roña o sarna polvosa de la papa, enfermedad que se distribuye ampliamente a nivel mundial en zonas altas con temperaturas bajas y ricas en materia orgánica (Guerrero, 2002); esta enfermedad

* Licenciado en biología. Laboratorio de Diagnóstico Molecular Vegetal, Instituto Colombiano Agropecuario. Correo electrónico: crissarrod@hotmail.com

** Biólogo, Ph. D. Director Laboratorio de Diagnóstico Molecular Vegetal, Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) Tibaitatá, km 14 vía Mosquera. Correo electrónico: jorgecol@hotmail.com

Recibido: julio 25 de 2003. **Aceptado:** mayo 21 de 2004.

es la responsable de la depreciación en la calidad de los tubérculos debido a la presencia de lesiones en forma de pústula en la epidermis de los mismos y a la disminución en la producción de papa en variedades susceptibles. En la actualidad la sarna polvosa es una enfermedad cuya incidencia está en aumento debido a la persistencia de *S. subterranea* por varios años en forma de estructuras de resistencia (quistosoros), a la carencia de variedades de papa resistentes, a su fácil dispersión y poca susceptibilidad a tratamientos agroquímicos, entre otros factores (Harrison *et al.*, 1997).

En Colombia se reportó en 1965 y se encuentra ampliamente distribuida en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Nariño, afectando entre un 50 y un 80% la producción de los tubérculos según la edad de cultivo, implicando pérdidas económicas en el sector agroindustrial, problemas fitosanitarios por la diseminación del patógeno a zonas libres de la enfermedad, y para los productores de semilla de papa, el rechazo en el programa de semilla certificada.

La enfermedad se diagnostica de una forma tardía en semillas y cultivos debido a su difícil detección tanto en el suelo como en semillas asintomáticas; de ahí que sea necesario implementar una metodología rápida, altamente sensible y específica que permita detectar al microorganismo en suelo y semilla de papa, para el control fitosanitario del patógeno en programas de producción de semilla certificada libre de *S. subterranea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

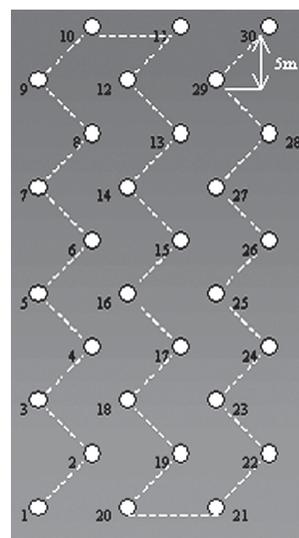
Obtención de muestras

El análisis del material biológico se efectuó a partir de tejido vegetal infectado con síntomas típicos causados por *S. subterranea* (agallas en raíces de plantas y pústulas en epidermis de tubérculos), y de suelos aptos para el cultivo de papa con presencia de este patógeno. Las muestras fueron suministradas y enviadas por el Programa de Producción de Semilla Certificada del ICA, seccional Cundinamarca, y por el Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario, seccional Nariño, al Laboratorio de Diagnóstico Molecular Vegetal ICA-Tibaitatá; una vez recibido este material, se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la posterior determinación macroscópica, microscópica y molecular del patógeno.

El Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario seccional ICA-Pasto suministró 32 muestras de suelo de un campo experimental infestado con *S. subterranea*; 30 de estas submuestras (suelo entre 0 cm y 20 cm de profundidad) correspondían a cada uno de los puntos muestreados de dicho campo. Las otras dos muestras restantes son mezclas de suelo de los 30 puntos señalados de las submuestras entre 0-10 cm y 10-20 cm (gráfica 1). Los detalles del tipo de muestra analizado y su procedencia se observan en la tabla 1.

Detección macroscópica y microscópica en tejido vegetal infectado

Una vez recibido y almacenado el material biológico, se efectuó una descripción macroscópica de las lesiones típicas de la enfermedad tanto en semillas de papa como en raíces infectadas. Al microscopio se determinó la presencia de quistosoros tanto en pústulas como en agallas de raíz por medio de un montaje húmedo observado bajo los aumentos de 40X y 100X.



Gráfica 1. Esquema obtención de muestras en suelo de un lote experimental de aproximadamente 1 Ha infestado con *S. subterranea*: recorrido realizado en zig-zag en el departamento de Pasto para la toma de 30 muestras del suelo entre 0-20 cm de profundidad (cada número corresponde a un punto de muestreo).

Propagación de *S. subterranea* bajo condiciones de invernadero

Para poder efectuar una estandarización en la extracción y amplificación de ADN de *S. subterranea* a partir de tejido vegetal infectado se efectuaron pruebas de propagación del microorganismo bajo condiciones de invernadero. Para esto, se inocularon 50 g de raíces con agallas provenientes de los departamentos de Nariño (municipio de Pasto, vereda Río Bobo) y Cundinamarca (municipio de Zipaquirá, vereda Páramo de Guerrero) en materas con capacidad para 2 kg con suelo proveniente de la granja San Jorge del ICA (Cundinamarca); posteriormente se sembraron por triplicado dos especies de semilla de papa (*S. tuberosum*, variedad Parida Pastusa y *S. phureja*, criolla) y se determinó el estado de desarrollo de las plantas y la presencia de infección radical por *S. subterranea* cada 12 días; una vez determinada la presencia de agallas en la raíz se procedió a la detección microscópica de quistosoros y a la extracción de ADN a partir de éstos.

de guanidina, 10 mM EDTA, 50 mM de Tris HCl [pH 7.5], 8% mercaptoetanol), incubando a temperatura ambiente por 24 horas. El ADN extraído se purificó utilizando volúmenes iguales de cloroformo-isoamil alcohol (24:1), se precipitó con un volumen de isopropanol y acetato de sodio 3 M (pH 5.2), seguido por dos lavados con etanol 70%; el ADN obtenido se rehidrató en 50 µL de TE (Bulman *et al.*, 1998).

El segundo método se basó en la extracción de ADN por macerado de 0.25 g de muestra con 1 g de arena de revoque con nitrógeno líquido, resuspendido posteriormente en una solución de leche semidescremada. Luego de concentrar la suspensión (por centrifugación) el sobrenadante se sometió a un buffer de extracción a base de SDS (0.3% SDS, 0.14 M NaCl, 50 mM de acetato de sodio pH 5.1). El ADN se purificó con un volumen de fenol-cloroformo-isoamil alcohol (25:24:1), mientras que la precipitación se efectuó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto, 0.1 volúmenes de acetato de sodio y glicógeno por 12 horas, seguido por dos lavados con etanol 70%, el ADN obtenido se resuspendió en 50 µL de TE (Volossiuk *et al.*, 1995).

El tercer método utilizado fue un protocolo modificado del propuesto por Aponte (1998) para la extracción de ADN de aislamientos *Mycosphaerella fijensis*; el protocolo modificado consistió en una disrupción celular de 0.25 g de agallas de raíz con nitrógeno líquido, seguido de una incubación a 65 °C con un buffer de extracción (50 mM Tris HCl, 50 mM EDTA, 3 % SDS, 1% 2β mercaptoetanol) por 30 minutos. El ADN extraído fue purificado primero con un volumen de fenol saturado (pH 8.0) y luego con un volumen de cloroformo-isoamil alcohol (24:1), posteriormente se precipitó con 0.5 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) durante 12 horas, seguido por dos lavados con etanol 70% y resuspensión en 50 µL de TE; una vez obtenida la suspensión de ADN, ésta se sometió al proceso de purificación por columnas GFX™ Genomic Columns (Amersham Farmacia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las extracciones de ADN a partir de muestras de suelo del departamento de Nariño (municipio de Pasto) fueron sometidas a los protocolos de extracción de ADN para *Mycosphaerella fijensis* modificado y al protocolo del estuche comercial ULTRA CLEAN SOIL DNA (Mo Bio Laboratories) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 1. Tipo y procedencia del material biológico examinado para la detección de *S. subterranea* por PCR

Tipo de muestra	Lugar	
	Municipio	Departamento
Suelo con infestación natural y raíces de papa con agallas de roña polvosa	Pasto	Nariño
Raíces de papa con agallas de roña polvosa variedad Parida Pastusa	Pasto	Nariño
Tubérculos con pústulas epidérmicas variedad Diacol Capiro	Zipaquirá	Cundinamarca
Tubérculos con pústulas epidérmicas variedad Diacol Capiro	Usme	Cundinamarca
Suelo de cultivo experimental infestado por <i>S. subterranea</i>	Pasto	Nariño

Extracción de ADN a partir de suelo y tejido vegetal infectado

El proceso de extracción de ADN del material obtenido en invernadero se realizó utilizando tres métodos. El primero consistió en someter 0.25 g de agallas de raíz a una solución de guanidina (5 M isotiocianato

El ADN extraído de los diferentes materiales biológicos y orgánicos fue corrido en gel de agarosa 0.8% preteñido con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y visualizado en un transiluminador UV para determinar la calidad y el estado de la molécula. En cada electroforesis se incluyó un marcador de 1 kb (DNA Extensión Ladder-Invitrogen™). En el caso de las muestras de suelo procedentes del campo experimental del municipio de Pasto, se determinó la concentración (en $\text{ng}/\mu\text{L}$) y el nivel de contaminantes proteicos ($A_{260/280}$) y húmicos ($A_{260/230}$) del ADN extraído por espectrofotometría (Biophotometer EPPENDORF 6131).

PCR a partir de ADN de *S. subterranea*

Los procesos realizados para la detección de *S. subterranea* por PCR fueron la preparación de los reactantes utilizados en la mezcla maestra para cada reacción y la posterior amplificación en un termociclador MJ Research PTC-200. Las concentraciones finales de los compuestos para un volumen de reacción de 25 μL destinados a la amplificación de ADN de *S. subterranea* a partir de pústulas de epidermis de tubérculos y agallas de raíces, fueron 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl_2 , 160 μM dNTP, 250 nM de cada oligonucleotido, 0.8 unidades de *Taq* polimerasa (TucanTaq-Corpogen) y 1 μL de ADN molde. Para el análisis de ADN total de suelo proveniente del municipio de Pasto, la mezcla maestra para PCR, con un volumen final de 25 μL , contenía las mismas concentraciones de reacción mencionadas anteriormente, además de Triton® X-100 al 0.1% y albúmina sérica bovina al 0.04%.

Los programas de termociclado utilizados para la amplificación de los tres productos de PCR se muestran en la tabla 2. Los oligonucleótidos usados para la amplificación específica de tres fragmentos de 372, 390 y 391 pares de bases fueron Spo1-Spo2, Spo8-Spo9 y Sps1-Sps2 respectivamente, cuyas regiones blanco son secuencias específicas de ITS del ADNr de *S. subterranea* (tabla 3) (gráfica 2) (Bell *et al.*, 1999; Bullman *et al.*, 1998).

Para visualizar los productos de amplificación de la PCR se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 2% preteñidos con bromuro de etidio al 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb (100 pb DNA Ladder-Invitrogen™).

Límite de detección de la PCR en muestras de suelo

La sensibilidad o límite de detección de la PCR usando los oligonucleótidos Spo8 y Spo9 fue determinada por la inoculación de 0.25 g de suelo libre de *S. subterranea* con 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1 y 0.1 formas de resistencia (quistosoros) de agallas de raíz procedentes del municipio de Pasto (Nariño); una vez efectuada la inoculación, se procedió a la extracción y amplificación de ADN total de suelo con el fin de determinar la cantidad mínima de quistosoros detectables por PCR en este tipo de muestras.

Para el conteo de estructuras de resistencia en suspensión se pesó 0.01 gramos de agalla de raíz de la cual se obtuvieron los quistosoros que fueron suspendidos en 1 mL de agua destilada y se efectuó el recuento de formas de resistencia por medio de una cámara de Neubauer (French *et al.*, 1982). Una vez estimado el número de formas presentes, se elaboraron diluciones seriadas 1/10 a 1/10⁶ en agua destilada para obtener de 10^5 a 0.1 quistosoros respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección macroscópica y microscópica en tejido vegetal infectado

La figura 1 muestra lesiones irregulares en forma de pústula en la superficie de tubérculos de papa, típicas de la enfermedad; las lesiones causadas por el rompimiento de células infectadas en la superficie del tubérculo presentan un color castaño púrpura circunscrito por epidermis (pústulas). De igual forma, la presencia de agallas en hilera en forma de rosario, de color castaño oscuro (lo que indica un avanzado estado de infección por *S. subterranea*), fueron observadas en muestras de raíz provenientes del departamento de Nariño (figura 2). Las lesiones observadas en ambos tipos de muestras concuerdan con las patologías típicas de la sarna polvosa causadas por dicho patógeno, donde se evidenció en las agallas y pústulas la presencia de un polvillo color castaño que conforma las estructuras de resistencia (quistosoros) (Guerrero, 2002; Agrios, 1996).

Es importante aclarar que las expresiones patológicas observadas en los tubérculos y raíces obedecen a una patogénesis característica de los diferentes sitios geográficos de donde provienen las muestras; es decir, en las zonas de cultivo de papa

Tabla 2. Programas de termociclado empleados para la amplificación de tres fragmentos específicos presentes en los ITS del ADNr de *S. subterranea*

Oligonucleótidos	Ciclos	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión
Spo1-Spo2	1	94 °C 2 min	*NA	NA
	35	94 °C 30 seg	53 °C 30 seg	72 °C 45 seg
	1	NA	NA	72 °C 10 min
Spo8-Spo9	1	94 °C 2 min	NA	NA
	35	94 °C 30 seg	57 °C 30 seg	72 °C 45 seg
	1	NA	NA	72 °C 10 min
Sps1-Sps2	1	95 °C 2 min	NA	NA
	35	95 °C 20 seg	64 °C 25 seg	72 °C 50 seg
	1	NA	NA	72 °C 10 min

* NA: no amplificación.

del departamento de Nariño que se encuentran infectadas por *S. subterranea*, la enfermedad se presenta en el sistema radical de la planta, lo que produce un descenso hasta del 50% en la producción total de la cosecha de la variedad Parda Pastusa (Guerrero, 2000). Caso contrario ocurre con los cultivos infectados en Cundinamarca, donde la producción no se afecta, pero la calidad de los tubérculos es depreciada debido a la presencia de pústulas en la epidermis. Lo anterior sugiere que la resistencia de las raíces y los tubérculos a *S. subterranea* podría estar bajo un control poligénico independiente, como lo propone N. Fornier (citado por Harrison *et al.*, 1997), al observar pelos radicales susceptibles a la infección en plantas cuyos tubérculos mostraron una resistencia considerable a la sarna polvosa.

La confirmación de infección por *S. subterranea* en los tejidos vegetales analizados se determinó por la presencia de quistosoros del patógeno sobre las pústulas de tubérculos enfermos (figura 3a) y en las

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de tres fragmentos específicos presentes en los ITS del ADNr de *S. subterranea*.

Oligonucleótidos	Secuencia	*Tm
Sps1	5'-CCTGGGTGCGATTGTCTGTT-3'	58.8 °C
Sps2	5'-CACGCCAATGGTTAGAGACG-3'	56.8 °C
Spo1	5'-ATTGTCTGTTGAAGGGTG-3'	50.4 °C
Spo2	5'-GGTTAGAGACGAATCAGAA-3'	49.4 °C
Spo8	5'-CTGGGTGCGATTGTCTGTTG-3'	57.3 °C
Spo9	5'-CACGCCAATGGTTAGAGACG-3'	56.8 °C

* Tm: temperatura de alineamiento.

agallas maduras de las raíces (figura 3b). Dichas estructuras fueron observadas al microscopio en aumentos de 40X y 100X.

Propagación de *S. subterranea* bajo condiciones de invernadero

Se observaron los primeros síntomas de infección radical por *S. subterranea* en tubérculos de papa criolla (cultivada con suelo infestado por el patógeno proveniente de Nariño) y Parda Pastusa (cultivada con suelo infestado por el patógeno proveniente de Cundinamarca) a los 60 días de siembra;

para las siguientes dos semanas se obtuvieron agallas en estado maduro tanto en plantas de la variedad Parda Pastusa como en criolla; estos resultados concuerdan con las observaciones de Guerrero (2000) quien señala que en Colombia, en especial en el departamento de Nariño, la variedad Parda Pastusa es la más susceptible a infección por *S. subterranea* posiblemente por factores genéticos de la misma.

Extracción de ADN a partir de suelo y tejido vegetal infectado

De los tres métodos de extracción utilizados para la obtención de ADN a partir de las agallas de raíz infectadas en las pruebas de invernadero y de tejido



Gráfica 2. Ubicación de los sitios de alineamiento de los oligonucleótidos específicos dentro de los espaciadores de transcripción interna (ITS) de *S. subterranea* (secuencia tomada del análisis realizado por Bullman *et al.*, 1998).

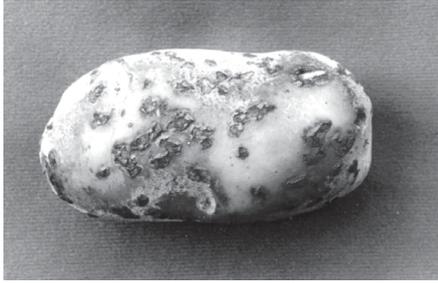


Figura 1. Tubérculo de la variedad Diacol Capiro proveniente del departamento de Cundinamarca, con síntomas de sarna polvosa causados por *S. subterranea*.



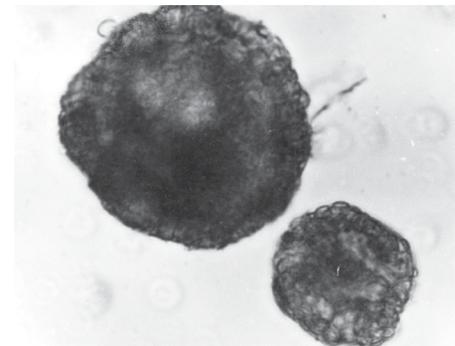
Figura 2. Agallas en raíces de planta de papa variedad Parda Pastusa infectada por *S. subterranea* provenientes del departamento de Nariño.

epidérmico de los tubérculos infectados se pudo obtener un ADN de calidad óptima para las pruebas de amplificación, utilizando el protocolo de Aponte (1998), seguido por el uso de columnas de purificación. La figura 4 muestra una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% donde se observa el efecto del uso de columnas de purificación (GFX™ Genomic Columns, Amersham Farmacia) en tejidos vegetales y suelo (líneas 2, 4, 6 y 8), con respecto al ADN no purificado por este método con el mismo tipo de muestras (líneas 1, 3, 5 y 7); como se puede observar, las columnas de purificación disminuyen sustancialmente la cantidad de ADN inicial y a su vez la concentración de sustancias inhibitoras de PCR, brindando un molde óptimo para la amplificación, como se muestra en la figura 6.

Por otro lado, el ADN total de suelo extraído de las 30 submuestras analizadas provenientes del campo experimental de Pasto mediante el estuche comercial Ultra Clean Soil DNA (Mo Bio Laboratories), pre-



(a)



(b)

Figura 3. Estructuras de resistencia (quistosoros) de *S. subterranea* observadas a 40x tomadas de: (a) agallas de raíz, y (b) pústulas de epidermis con roña polvosa.

sentó un alto nivel de contaminantes húmicos (promedio $A_{260/230}$ 0.79 ± 0.08) y proteicos (promedio $A_{260/280}$ 1.27 ± 0.18) típicos de este tipo de muestra. Dichos resultados son similares a los reportados por Zhou *et al.* (1996), en un estudio donde se recuperó ADN de diversos tipos de suelo, utilizando tres tratamientos de extracción diferentes, y se obtuvo $A_{260/230}$ para compuestos húmicos de 0.88 y $A_{260/280}$ de 1.23 para compuestos proteicos, usando un buffer de extracción a base de SDS-CTAB (Zhou *et al.*, 1996). Sin embargo, a pesar de la presencia de contenidos húmicos y proteicos, el estuche comercial permitió obtener un ADN de buena cantidad (la concentración promedio de ADN extraído fue de 154 ± 64.8 ng/ μ L) y calidad donde se observa un ADN no degradado y apropiado para las pruebas de PCR (figura 5).

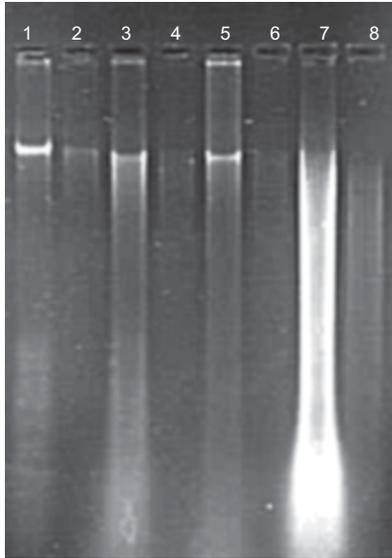


Figura 4. Efecto del uso de columnas de purificación de ADN en tejidos vegetales y suelo infectados con *S. subterranea*. Líneas 1 y 3, ADN de agallas de raíz (Mariño) y pústulas de tubérculo (Cundinamarca) sin tratamiento con columnas, respectivamente; líneas 5 y 7, ADN de suelo (Nariño y Cundinamarca) sin tratamiento con columnas; líneas 2, 4, 6 y 8, ADN purificado con columna de las mismas muestras de agallas de raíz, pústulas de tubérculo y suelo mencionadas anteriormente.

PCR a partir de ADN de *S. subterranea*

El ADN extraído a partir del tejido vegetal infectado en invernadero fue sometido al tratamiento de purificación por columnas y diluido posteriormente en proporción 1/50; dicho ADN molde arrojó señal de am-

plificación positiva al efectuar una PCR utilizando los oligonucleotidos Sps 1-2, Spo 1-2 y Spo 8-9 para *S. subterranea*; los productos de amplificación observados al nivel de 400 pb (figura 6), concuerdan con las pruebas de PCR realizadas por Bell *et al.* (1999) quienes obtuvieron un producto de 391 pb usando los iniciadores Sps1-2, y por Bullman *et al.* (1998) quienes obtuvieron productos de 372 y 390 pb usando los iniciadores Spo1-2 y Spo 8-9, respectivamente. Estos resultados confirman la homología genética que existe entre los aislamientos de ADN de *S. subterranea* obtenidos de material vegetal infectado de distintas zonas del país con los aislamientos de diferentes variedades de papa evaluados en otros países (Bell *et al.*, 1999; Bullman *et al.*, 1998); además, pone de manifiesto la utilidad diagnóstica de los ITS, al poder amplificar dichas secuencias empleando oligonucleótidos específicos de la especie para la detección del patógeno tanto en suelo como en semillas para garantizar la sanidad del cultivo de papa.

No obstante, el uso de columnas de purificación y la disminución de inhibidores por medio de diluciones de ADN total de suelo (figura 4, líneas 6 y 8) no arrojaron el mismo resultado de amplificación obtenido a partir de tejido vegetal infectado, debido a diversos componentes de origen orgánico e inorgánico presentes en el suelo que inhiben la PCR y que, a su vez, pueden degradar, inhibir y/o capturar la molécula de ADN (figura 4, línea 7), inhabilitándola para la reacción de amplificación (Wilson, 1997).

Caso contrario ocurrió con el ADN extraído a partir de las muestras de suelo provenientes del cam-

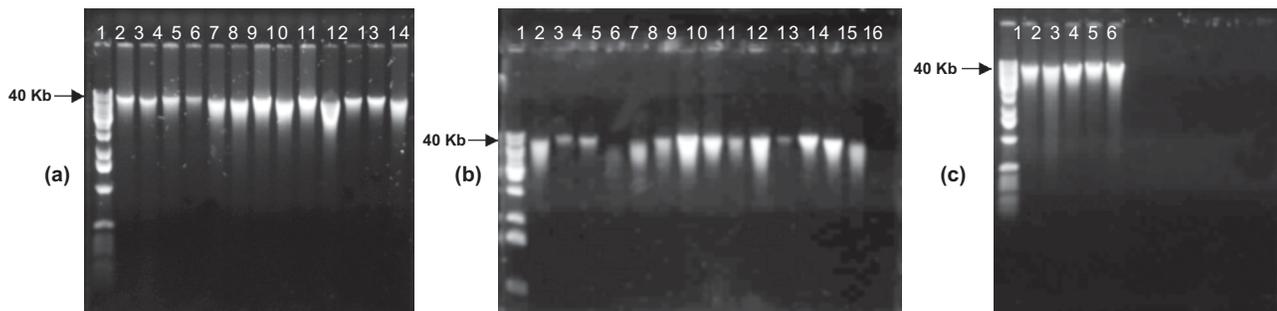


Figura 5. Extracción de ADN total de 30 muestras de suelo de un cultivo experimental de papa infestado con *S. subterranea* ubicado en el departamento de Nariño (ver gráfica 1). En las tres figuras aparece en la línea 1 el marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen). (a) Líneas 2-13: corresponden a ADN de los puntos de muestreo de 1 al 12 (ver gráfica 1); línea 14: corresponden al

control negativo de extracción (suelo libre de ADN de *S. subterranea*). (b) Líneas 2-15: corresponden a ADN de los puntos de muestreo del 13 al 26 (ver gráfica 1); línea 16: corresponden al control negativo de extracción. (c) Líneas 2-5: corresponden a ADN de los puntos de muestreo 27 a 30 respectivamente; línea 6: control negativo de extracción.

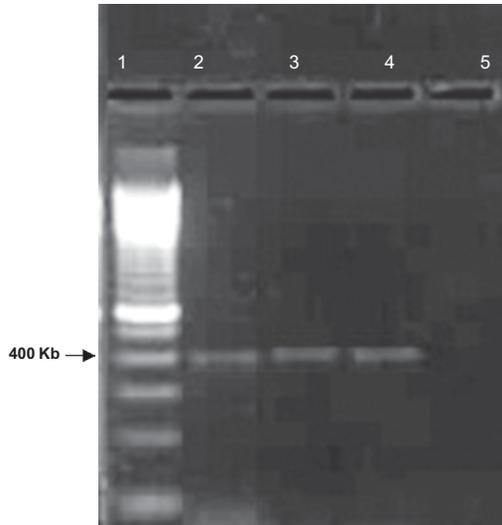


Figura 6. Amplificación de ITS de *S. subterranea* con oligonucleótidos específicos (ver gráfica 2). Línea 1: marcador de peso molecular de 100 pb; línea 2: producto de amplificación con los iniciadores Sps 1 y Sps 2; línea 3: producto de amplificación con los iniciadores Spo 1 y Spo 2; línea 4: producto de amplificación con los iniciadores Spo 8 y Spo 9; línea 5: control de reacción negativo.

po experimental de Pasto que, a pesar de tener niveles altos de compuestos húmicos y proteicos, arrojó señal de amplificación positiva en las 30 submuestras de suelo analizadas utilizando los oligonucleótidos Spo1 y Spo 2 (figura 7). Estos resultados se obtuvieron debido a la estabilización de la enzima frente a la presencia de ácidos húmicos y de tal vez otros inhibidores entre la actividad de la *Taq* polimerasa y el ADN blanco (Kuske *et al.*, 1998; McGregor *et al.*,

1996); así como al uso de un ADN óptimo para reacciones de amplificación obtenido a partir del estuche comercial de extracción de ADN total de suelo.

Con lo anterior se puede demostrar la especificidad de los oligonucleótidos Spo1-2 en la detección directa de *S. subterranea* en el suelo, puesto que no se observaron otros productos de amplificación diferentes al esperado; esto indica que no existe reacción cruzada entre los oligonucleótidos utilizados y el ADN de otros microorganismos del suelo. De igual forma, los oligonucleótidos Spo 8-9 y Sps 1-2 arrojaron resultados similares de amplificación en las 30 muestras analizadas (estas pruebas se analizaron por duplicado).

Límite de detección de la PCR en muestras de suelo

El estudio realizado por Bell *et al.* (1999) para la detección y cuantificación de *S. subterranea* logró determinar entre 1 y 3 quistosoros por gramo de suelo, utilizando un método de columnas de purificación Sephadex; en este caso, se logró detectar hasta 10 quistosoros de *S. subterranea* en 0.25 gr de suelo inoculado (la prueba se realizó por duplicado), utilizando el estuche comercial de extracción de ADN de suelo. Aunque los resultados obtenidos por Bell *et al.* (1999) difieren de los obtenidos en esta investigación, se debe aclarar que la visualización de los productos de amplificación equivalentes al ADN de un (1) quistosoro se efectuó por medio de una técnica de tinción de ácidos nucleicos (SYBR Gold staining),

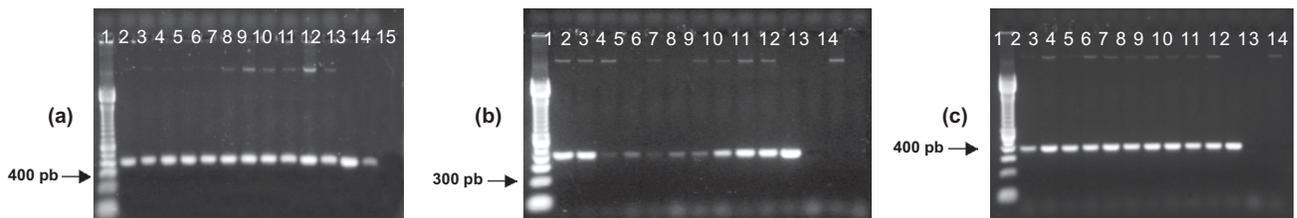


Figura 7. Productos de amplificación de 372 pb con los oligonucleótidos Spo1 y Spo 2 a partir de ADN total extraído de muestras de suelo infestado con *S. subterranea* provenientes del campo experimental del departamento de Nariño (ver gráfica 1). En las figuras 7a, 7b y 7c en la línea 1 aparece el marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). (a) Línea 2: mezcla de suelo de los 30 puntos de muestreo tomadas entre 0-10 cm de profundidad, línea 3: mezcla de suelo de los 30 puntos de muestreo tomadas entre 10-20 cm de profundidad; Líneas 3-13: amplificación

de ADN de los puntos de muestreo del 1 al 10 (ver gráfica 1); líneas 14-15: controles positivo y negativo de reacción. (b) Líneas 2-11: amplificación de ADN de los puntos de muestreo del 11 al 20 (ver gráfica 1); líneas 12-13: controles positivo y negativo de reacción, respectivamente; línea 14: control de extracción negativo (suelo libre de *S. subterranea*). (c) Líneas 2-11: amplificación de ADN de los puntos de muestreo del 21 al 30 (ver gráfica 1); líneas 12 y 13: controles positivo y negativo de reacción respectivamente; línea 14: control de extracción negativo.

la cual permite una mejor resolución de productos de PCR menores de 1 ng, diferente a la usualmente utilizada con bromuro de etidio. Por tal motivo es probable que la metodología usada en el presente trabajo pueda amplificar fragmentos de ADN a partir de una forma de resistencia y que no puedan ser visualizados en gel de agarosa preteñidos con bromuro de etidio, o que se haya dado la ausencia total de quistosoros en la dilución 1/10⁶ utilizada para la inoculación en suelo y posterior extracción de ADN. No obstante, los resultados obtenidos muestran una sensibilidad 250 veces mayor con respecto a la técnica ELISA con anticuerpos monoclonales específicos para la cuantificación de quistosoros en suelo (esta metodología permite la detección confiable de inóculo hasta 10⁴ quistosoros por gramo de suelo) (Rodríguez *et al.*, 2002); dicho aspecto es de suma importancia, ya que el conocimiento de la cantidad de inóculo presente en un suelo apto para el cultivo permitirá predecir el grado de severidad de la enfermedad en la cosecha.

La importancia de la PCR en la detección de *S. subterranea* radica en la sensibilidad y especificidad de la técnica para tal fin. Como se ha mostrado, la metodología utilizada fue altamente específica para detectar única y exclusivamente ADN de *S. subterranea* en suelo, agallas de raíz y pústulas de tubérculos infectados, además de detectar ADN de al menos 10 estructuras de resistencia (quistosoros) por cada 0.25 gramos de suelo, confiriéndole una alta sensibilidad en la determinación del patógeno.

Los resultados del presente trabajo de desarrollo tecnológico pueden ser aplicados en los programas de sanidad vegetal y producción de semilla de papa para el diagnóstico, control y manejo de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Colombiano Agropecuario y a su oficina de Planeación Nacional por la financiación de la presente investigación, y al doctor Omar Guerrero Guerrero por el suministro de las muestras para el desarrollo de este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. 1996. *Fitopatología*. México D.F.: Editorial Limusa.
- Aponte, S. 1998. Caracterización molecular y análisis de variabilidad genética en los aislamientos de *Mycosphaerella fijiensis* provenientes del Magdalena medio y Santander colombiano. Tesis para optar el título de biólogo. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Bell, K.; Roberts, J.; Verall, S.; Cullen, D.; Williams, N.; Harrison, J.; Toth, I.; Cooke, D.; Duncan, J.; Claxton, J. 1999. Detection and quantification of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* in soils and on tubers using specific PCR primers. *European Journal of Plant Pathology*. 105: 905-915.
- Bullman, S. R.; Marshall, J. W. 1998. Detection of *Spongospora subterranea* in potato tuber lesions using the polymerase chain reaction (PCR). *Plant Pathology*. 47: 759-766.
- French, E.; Herbert, T. T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José de Costa Rica. 287.
- Guerrero, O. 2002. Descripción y manejo de las principales enfermedades de la papa. ICA-subgerencia de Protección y Regulación Agrícola seccional Nariño. San Juan de Pasto. 32.
- Guerrero, O. 2000. La roña o sarna polvosa de la papa en el departamento de Nariño. Resumen. *Papas Colombianas*. 2ª edición. 3 (1-2):27-129.
- Harrison, J. G.; Searle R. J.; Williams, N. A. 1997. Powdery scab disease of potato-a review. *Plant Pathology*. 46: 1-25.
- Kuske, C. R.; Banton, K. L.; Adorada, D. L.; Stark P.C.; Hill, K.K.; Jackson, J. P. 1998. small-scale DNA sample preparation method for filed PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2463-2472.
- Mc Gregor, D. P.; Forster, S.; Steven, J.; Adair, J.; Leary, C. E.; Leslie, D. L.; Harries, J. W.; Titball, W. R. 1996. Simultaneous detection of microorganisms in soil suspension based on PCR amplification of bacterial 16S rRNA fragments. *Bio Techniques*. 21:463-472.
- Rodríguez, K.; Murcia, B.; Huertas, W.; Guzmán, M.; García, C. 2002. Estandarización de la técnica DAS-ELISA para la cuantificación de *Spongospora subterranea* en suelo. Memorias XXIII congreso ASCOLFI. Julio, Bogotá D.C.
- Volossiuk, T.; Robb, J.; Nasar, R. 1995. Direct DNA extraction for PCR mediated assays of soil organisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 3972-3976.
- Wilson, I. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3741-3751.
- Zhou, J.; Bruns M.; Tiedje, J. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:316-322.



Biología Colombiana para el mundo

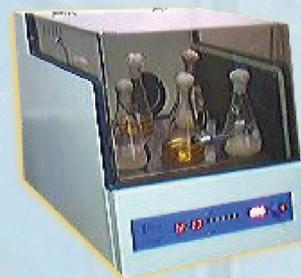
EQUIPOS PARA FERMENTACIÓN

- ✓ Shakers
- ✓ PHmetros
- ✓ Oxímetros
- ✓ Autoclaves
- ✓ Fermentadores
- ✓ Bombas Peristálticas
- ✓ Cabinas de Flujo Laminar
- ✓ Controladores de Proceso
- ✓ Columnas para Células inmovilizadas

● Asesoría en Diseño de Bioprocesos, Microbiología y Biotecnología

● Estudios en Planta Piloto de Procesos de Fermentación

● Asesoría en Producción de: Biofertilizantes, Bioinsecticidas, Biofungicidas, Degradadores de Materia Orgánica e Hidrocarburos



Calle 91 No. 29-38 of. 202 Bogotá
Teléfono 2562662, Fax 2562671, Celular 300-556-7955
Página web: www.pbmcolombia.com
E-mail: danilozuluaga@hotmail.com