

# Detección de *Spongospora subterranea* (Wallroth) Lagerheim f. sp *subterranea* mediante secuencias específicas de ADN en suelos y tubérculos para semilla de papa

Sandra J. Gómez,<sup>1</sup> Cristian O. Saavedra R.G.,<sup>2</sup> Jorge E. Ángel D.,<sup>3</sup> Omar Guerrero G.,<sup>4</sup> Héctor Muñoz V.<sup>5</sup>

**L**

La sarna polvosa o roña polvosa es en la actualidad una de las enfermedades más importantes por el daño que causa a raíces, estolones y tubérculos de la planta de papa; su incidencia se ha incrementado debido a la falta de medidas de control efectivas, a la sobrevivencia por décadas del agente causal en forma de estructuras de resistencia (quistosoros) en el suelo, a la carencia de variedades de papa resistentes, a la fácil dispersión y diseminación por medio de la semilla, así como por desconocimiento en el uso económico de tratamientos con agroquí-

micos, entre otros factores. En Colombia se reportó en 1965, se encuentra ampliamente distribuida en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Antioquia, en donde afecta la producción de tubérculos en diferentes grados de severidad, con pérdidas económicas para agricultores por la reducción en la cantidad de semillas aptas para la certificación oficial, y en riesgos fitosanitarios por la diseminación del patógeno en medio de la semilla a zonas libres de la enfermedad.

La roña polvosa es causada por *Spongospora subterranea*, parásito intracelular obligado cuyas zoosporas primarias, estructuras producidas por los zoosporangios de resistencia formados dentro de los quistosoros, nadan en la fracción acuosa del suelo donde establecen contacto con los distintos órganos subterráneos, raíces, estolones, tallos y tubérculos, penetran generalmente por las lenticelas, heridas o estomas hasta alcanzar el interior de las células y formar allí sus estructuras de reproducción. Cuando la semilla germina y produce las primeras raíces,



- 1 Bióloga. Investigador Laboratorio de Diagnostico Molecular Vegetal (LDMV) ICA-Tibaitatá
- 2 Lic. Biología. Investigador LDMV ICA-Tibaitatá. E. mail: crissarrodd@hotmail.com
- 3 B. Sc., M. Sc., Ph.D. Biología molecular. Director LDMV ICA-Tibaitatá. E. mail: jorgecol@hotmail.com
- 4 I. A., M. Sc. Fitopatología. Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario. ICA-Tibaitatá. E. mail: omarguer@hotmail.com
- 5 I. A., M. Sc. Fitopatología. Laboratorio de Semillas ICA-LANIP

las zoosporas ingresan a sus células epidérmicas, donde inicialmente producen un sobrecrecimiento que luego se transforman en verrugas, nódulos sucesivos o agallas a lo largo de las raíces o estolones, a manera de rosarios de color blanco crema.

Entre las prácticas de manejo de la enfermedad se recomienda: evitar la contaminación de los suelos mediante el uso de semilla infectada con el patógeno, utilizar aguas de riego descontaminadas, recoger y eliminar todos los residuos de cosecha, evitar el uso de tubérculos enfermos en alimentación animal (costumbre que se ha venido extendiendo en el altiplano cundiboyacense), no fertilizar con estiércol de ganado vacuno alimentado con tubérculos infectados, y efectuar rotaciones de cultivos para interferir con el ciclo de la enfermedad.

Debido a que esta afección generalmente se diagnostica al momento de la cosecha, ya que las plantas atacadas no manifiestan síntomas visibles y dado el problema epidemiológico que se presenta en las principales regiones productoras de papa, se consideró necesario evaluar la técnica de PCR, con el fin de implementar dicha metodología, no solo como una técnica útil para la detección rápida en suelo, sino también como una herramienta para prevenir la dispersión del microorganismo hacia suelos declarados libres de éste, así como para el control de calidad en la producción de semilla de papa libre del patógeno.

## Principios básicos y automatización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction* o PCR), es una técnica utilizada para la amplificación *in vitro* de secuencias determinadas de ácido desoxirribonucleico (ADN), a partir de la extensión simultánea de iniciadores específicos unidos a las cadenas complementarias del ADN; el método de la PCR fue ideado y denominado por Mullis y colaboradores en la Corporación Cetus, aunque el principio fue descrito en detalle por Khorana y colaboradores en los años 80. La PCR es una excelente técnica en el análisis de ADN y ARN, debido a que ambos pueden ser amplificados de manera exponencial. Dicha técnica imita el fenómeno de replicación o reproducción del ADN que ocurre de forma natural en las células vivas; la mayor parte de ADN es de doble cadena, es decir,

cada cadena de ADN está apareada con otra complementaria, durante la amplificación las dos cadenas se separan y una enzima especializada (una proteína que inicia reacciones químicas), llamada polimerasa, hace una copia de cada una de las cadenas utilizando la original como plantilla o modelo. La polimerasa necesita otros dos ingredientes para copiar ADN: el primero, es una reserva de los cuatro bloques básicos, que constituyen la molécula de ADN llamados nucleótidos o bases, y el segundo, es un fragmento de ADN conocido, denominado oligonucleótido, cebador o primer, formado por varios nucleótidos que indican el sitio de replicación.

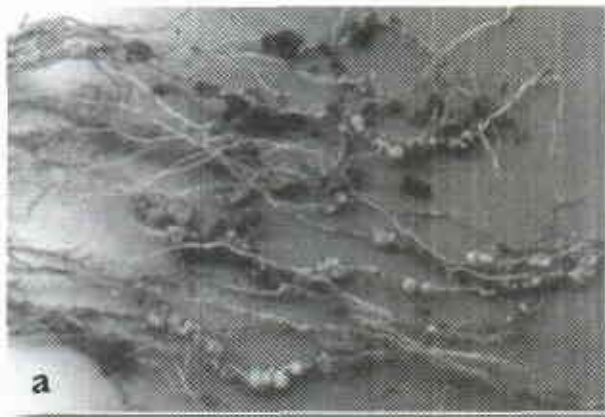
El proceso global consiste en una serie de ciclos y cada ciclo consta de tres etapas cuya diferencia es la temperatura a la que transcurren. Primero, cada ciclo comienza separando las dos hebras complementarias que constituyen la doble hélice de ADN, esto se logra calentando la molécula a 94-95°C para romper los puentes de hidrógeno que unen las hebras entre sí, este paso se llama desnaturalización del ADN; segundo, se baja la temperatura entre 65 y 50 °C según el tipo de iniciadores utilizados, a esta temperatura los cebadores encuentran las regiones complementarias y se unen a ellas delimitando la región de ADN que quiere ser amplificada, este paso se denomina alineamiento; y tercero, se incrementa la temperatura a 72°C para que la *Taq* polimerasa empiece a sintetizar ADN añadiendo nuevas bases a los iniciadores que están enlazados copiando cada una de las cadenas de ADN, a esta fase se le denomina extensión. Estos tres ciclos tienen lugar en el mismo tubo de amplificación y constituyen un ciclo completo de PCR, para un total de 30-40 ciclos aproximadamente, donde los componentes de la reacción suelen acabarse en este nivel, dejando como resultado más de 100 millones de copias de ADN. Los requerimientos de la reacción son simples, deoxinucleótidos para proveer energía y síntesis para las nuevas secuencias de ADN, DNA polimerasa, iniciadores, templado (ADN) y buffer de reacción, el cual contiene  $Mg^{+2}$ .

## Metodología

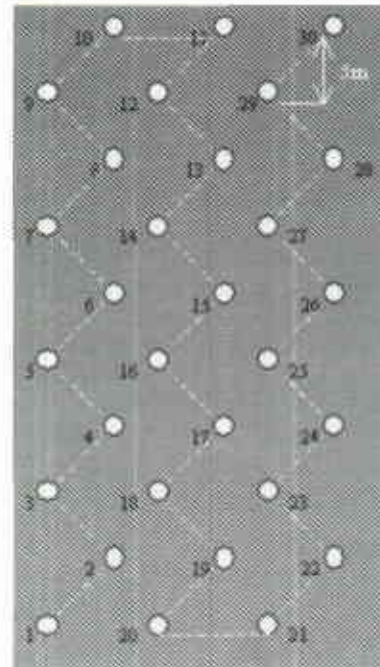
### Obtención de muestras infectadas con *S. subterranea*

El análisis del material biológico se efectuó a partir de tejido vegetal con síntomas y signos típicos de la roña

polvosa (agallas en raíces de plantas y pústulas en epidermis de tubérculos) (Figuras 1a y 1b), y de suelos cultivados con papa, donde se manifestó el patógeno. Las muestras fueron recolectadas y enviadas por el Programa de Producción de Semilla Certificada del ICA, Seccional Cundinamarca y por el Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario de Pasto al Laboratorio de Diagnóstico Molecular Vegetal ICA-Tibaitatá (Tabla 1); la seccional ICA-Nariño suministró 32 muestras de suelo de un campo experimental infestado con *S. subterranea*; 30 de estas muestras (tomadas de la capa superior entre 0 cm y 20 cm de profundidad) correspondían a cada una de los 30 puntos muestreados de dicho campo. Las dos muestras restantes son mezclas totales de suelo de la subsuperficie entre 0-10 cm y 10-20 cm respectivamente, de los mismos 30 sitios muestreados (Figura 2).



**Figura 1.** Síntomas de roña polvosa causados por *S. subterranea* en: (a) Agallas en raíces de planta de papa infectada por *S. subterranea* provenientes del departamento de Nariño; (b) tubérculos de papa de la variedad Diacol Capiro, con síntomas de roña en su epidermis, provenientes del departamento de Cundinamarca.



**Figura 2:** Esquema del recorrido realizado en zig-zag en un lote experimental del municipio de Pasto (de aproximadamente 1 Ha) con infección natural de *S. Subterranea* para su detección a partir de 30 muestras del subsuelo entre 0-20 cm de profundidad (cada número corresponde a punto de muestreo)

### Detección macroscópica y microscópica en tejido vegetal infectado

Una vez recibido el material biológico, se efectuó una descripción microscópica de las lesiones típicas de la enfermedad tanto en semillas de papa como en raíces infectadas. Bajo el microscopio, en aumentos de 40x y 100x se determinó la presencia de quistosoros tanto en pústulas de tubérculos como en agallas de raíz.

### Propagación de *S. subterranea* bajo condiciones de invernadero

La estandarización para la extracción y amplificación de ADN de *S. subterranea* se efectuó a partir de tejido vegetal infectado, obtenido mediante la propagación del microorganismo bajo condiciones de invernadero. Para esto, se empleó como inóculo 50 gramos de mezcla de suelo infestado provenientes de los departamentos de Nariño (municipio de Pasto, vereda Río Bobo) y Cundinamarca (municipio de Zipaquirá, vereda Páramo Guerrero) en materas que contenían suelo proveniente

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	Pasto	Nariño
Tubérculos con pústulas epidérmicas variedad Diacol-Capiro	Zipaquirá	Cundinamarca
Tubérculos con pústulas epidérmicas variedad Parda Pastusa	Usme	Cundinamarca
Suelo de cultivo experimental infestado por <i>S. subterranea</i>	Pasto	Nariño

de la granja San Jorge del ICA (Cundinamarca); sobre el suelo-inóculo, se plantó la semilla de papa tamaño 3<sup>a</sup>. Se efectuaron siembras por triplicado de dos variedades diferentes de semilla de papa (Parda Pastusa y criolla (*S. phureja*)) 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 estos.

#### 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 raíces infectadas en las pruebas de invernadero y de tejido epidérmico infectado, se pudo obtener un ADN de calidad óptima para las pruebas de amplificación, utilizando el protocolo de Aponte (Aponte, 1998), seguido por el uso

de columnas de purificación GFX™ Genomic Columns (Amersham Farmacia). La extracción de ADN a partir de muestras de suelo del departamento de Nariño, municipio de Pasto, fue sometida al protocolo de extracción de ADN mediante el uso del estuche comercial ULTRA CLEAN SOIL DNA (Mo Bio Laboratories) conforme a las instrucciones del fabricante.

#### PCR a partir de ADN de *S. subterranea*

Fueron usados los cebadores Spo1-2, Spo 8-9 y Sps1-2 para la amplificación de 372, 390 y 391 pares de bases respectivamente, cuyas regiones blanco son secuencias específicas de ITS del ADNr de *S. subterranea* (Tabla 2). La amplificación fue desarrollada en un volumen final de reacción de 25 ml, el cual contenía 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 160 mM dNTP's, 250 nM de cada oligonucleótido, 0.8 unidades de *Taq* polimerasa (Tucan *Taq*-Corporgen), Triton® X-100 al 0.1%, albúmina sérica bovina

TABLA 2. Secuencia de los oligonucleotidos utilizados para la amplificación de tres fragmentos específicos presentes en los ITS del ADNr de *S. subterranea*. \*T<sub>m</sub>: temperatura de alineamiento.

Oligonucleótido	Secuencia	*T <sub>m</sub>
Sps 1	5' CCTGGGTGCGATTGTCTGTT 3'	58.8 °C
Sps2	5' CACGCCAATGGTTAGAGACG3	56.8 °C
Spo1	5'-ATTGTCTGTTGAAGGGTG-3'	50.4 °C
Spo2	5'-GGTTAGAGACGAATCAGAA-3'	49.4 °C
Spo8	5' CTGGGTGCGATTGTCTGTTG3'	57.3 °C
Spo9	5' CACGCCAATGGTTAGAGACG3'	56.8 °C

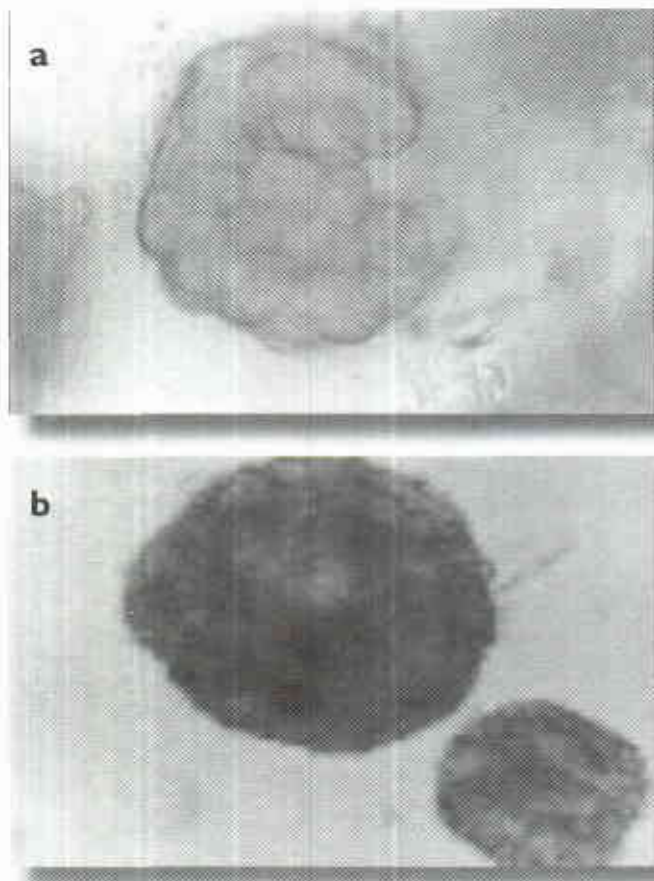
al 0.04% y 1 ml de templado de ADN. Las muestras fueron incubadas a 94 °C por 2 minutos para desnaturar el ADN. Se realizaron 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos y 56 °C por 30 segundos en un termociclador MJ Research PTC-200. Los productos de amplificación fueron visualizados tras una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, preteñido con bromuro de etidio.

## Resultados y discusión

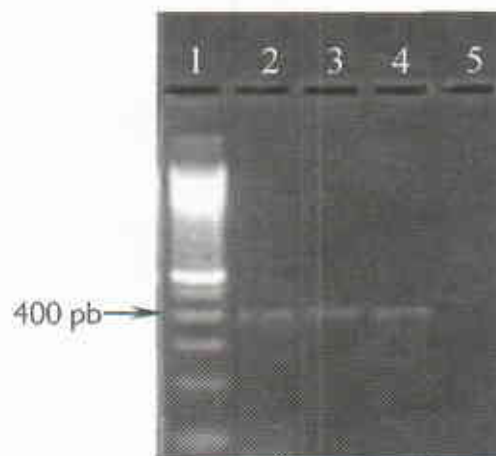
La infección por *S. subterranea* en los tejidos vegetales analizados (provenientes de los departamentos de Cundinamarca y Nariño), se determinó por la presencia de estructuras microscópicas de resistencia (quistosoros) en el polvillo característico que aparece sobre las pústulas de tubérculos enfermos (Figura 3a) y en las agallas de las raíces (Figura 3b).

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 templado arrojó señal de amplificación positiva al efectuar una PCR utilizando los oligonucleótidos Sps 1-2, Spo 1-2 y Spo 8-9 específicos para *S. subterranea*; los productos de amplificación observados al nivel de 400 pb (Figura 4) concuerdan con las pruebas PCR realizadas por Bell y colaboradores (1999) (quienes obtuvieron un producto de 391 pb usando los iniciadores Sps1-2) y por Bullman y colaboradores (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* obtenido de material vegetal infectado de distintas zonas del país, con los aislamientos de diferentes cultivares de papa realizados en otros países (Bell y col. 1999; Bulman y col. 1998); además, pone de manifiesto la utilidad diagnóstica de los ITS empleando oligonucleótidos especie-específicos para la detección del patógeno tanto en suelo como en semillas aptas para el cultivo de papa.

El ADN extraído a partir de las muestras de suelo provenientes del campo experimental de Pasto, a pesar de tener altos niveles de compuestos húmicos y proteicos, presentó señal de amplificación positiva en todas las 30 muestras de suelo analizadas utilizando los oligonucleótidos Spo1 y Spo 2 (Figura 5); estos resultados, se obtuvieron gracias a la estabilización de la enzima frente a la presencia de ácidos húmicos

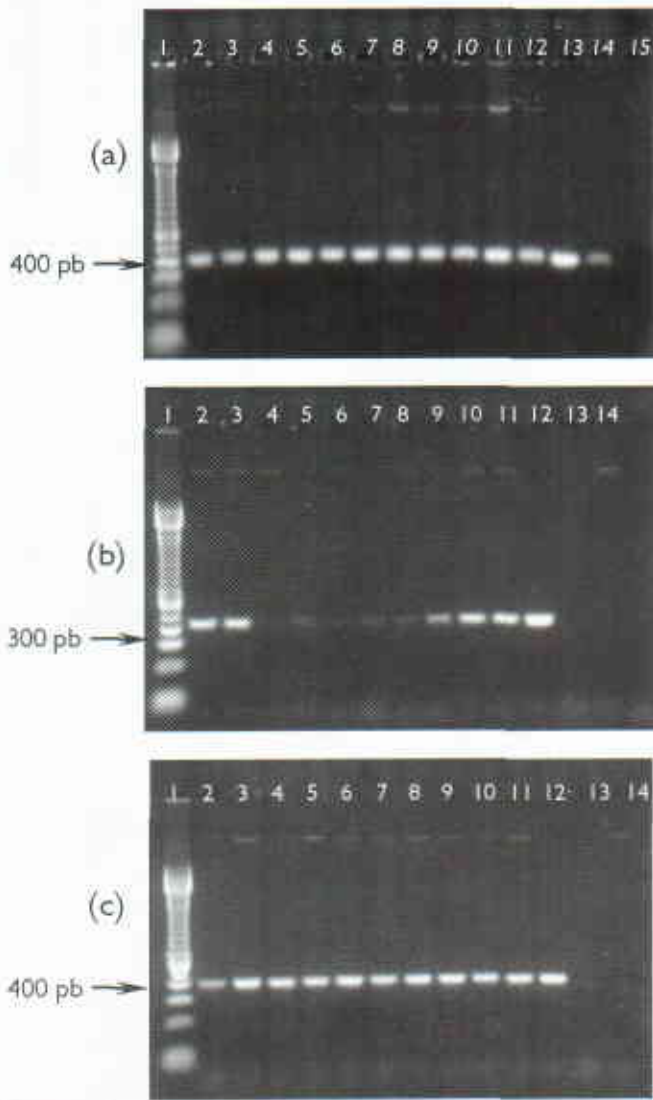


**Figura 3.** Estructuras de resistencia (quistosoros) de *S. subterranea* observados a 40x tomados de: (a) Agallas de raíz, y (b) Pústulas de epidermis con roña polvosa



**Figura 4.** Amplificación con oligonucleótidos específicos a partir de ADN purificado con columnas y diluido (proporción 1/50) de agalla de raíz infectada en invernadero. Línea 1: Marcador de peso molecular 100 pb; línea 2: producto de amplificación con los iniciadores Sps 1-Sps 2; línea 3: producto de amplificación con los iniciadores Spo 1-Spo 2; línea 4: producto de amplificación con los iniciadores Spo 8-Spo 9; línea 5: control de reacción negativo.

y tal vez de otros inhibidores entre la *Taq* polimerasa y el ADN blanco. Con lo anterior, se puede mostrar la especificidad de los oligonucleótidos Spo1-2, en la detección directa de *S. subterranea* en suelo, puesto que no se observaron otros productos de amplificación



**Figura 5.** Productos de amplificación de 372 pb obtenidos con los oligonucleótidos Spo1-2 de ADN total de suelo infestado con *S. Subterranea*, provenientes del campo experimental del departamento de Nariño. (a) Líneas 2-3: mezcla total de 30 muestras tomadas entre 0-10 cm y 10-20 cm de profundidad respectivamente; Líneas 3-13: muestras de las estaciones 1 a 10; líneas 14-15: controles positivo y negativo. (b) Líneas 2-11: muestras de las estaciones 11 a 20; líneas 12-13: controles positivo y negativo; línea 14: control de extracción negativo (suelo libre de *S. subterranea*). (c) Líneas 2-11: muestras de las estaciones 21 a 30; líneas 12-13: controles positivo y negativo; línea 14: control de extracción negativo. En las tres figuras, aparece en la Línea 1: marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

diferente 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 al dar reacciones de amplificación positiva en 30 estaciones muestreadas.

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, y presenta una alta sensibilidad, ya que fue capaz de detectar hasta 1 quistosoro en 0.25 gramos de suelo, lo que permitiría la implementación de dicha metodología en programas de monitoreo y manejo de la enfermedad, así como para estudios epidemiológicos de investigación a nivel nacional; además, estos resultados podrían postular la PCR como prueba de referencia para el diagnóstico de *S. subterranea* en material vegetal infectado y suelo, si se continúan manteniendo estos mismos resultados en estudios posteriores con un mayor número de muestras.

## Bibliografía

- AGRIOS, G. Fitopatología. Editorial Limusa, México D.F. 1996. p 296-297
- APONTE, S. Caracterización Molecular y análisis de variabilidad genética en los aislamientos de *Mycosphaerella fijiensis* provenientes del Magdalena medio y Santander Colombiano. 1998. Tesis para optar el título de Biólogo. Pontificia Universidad Javeriana.
- BELL, K., ROBERTS, J., VERALL, S. et al. Detection and quantification of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* in soils and on tubers using specific PCR primers. EN: European Journal of Plant Pathology. 1999. 105: 905-915 p.
- BULLMAN, S. R., MARSHALL, J. W. Detection of *Spongospora subterranea* in potato tuber lesions using the polymerase chain reaction (PCR). EN: Plant Pathol. 1998. 47: 759-766 p.
- GUERRERO, O. Descripción y manejo de las principales enfermedades de la papa. ICA-Subgerencia de Protección y Regulación Agrícola Seccional Nariño. San Juan de Pasto. 2002. 32 p.
- GUERRERO, O. La roña o sarna polvosa de la papa en el departamento de Nariño. Resumen. EN: Papas colombianas. 2ª edición. 2000. Vol 3. Nº1-2. 127-129 p.
- HARRISON, J. G., SEARLE R. J., WILLIAMS, N. A. powdery scab disease of potato-a review. EN: Plant Pathol. 1997. 46: 1-25 p.
- VOLOSSIUK, T., ROBB, J., NASAR, R. Direct DNA extraction for PCR mediated assays of soil organisms. EN: Applied and environmental microbiology. 1995. 61: 3972-3976 p.