



Bioagro

ISSN: 1316-3361

bioagro@ucla.edu.ve

Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado  
Venezuela

García-Bastidas, Nevar; Gutiérrez-Sánchez, Pablo; Marín-Montoya, Mauricio  
Desarrollo de marcadores microsatélites y mitocondriales para estudios de variación genética de  
*Spongopora subterranea* f. sp. subterranea  
Bioagro, vol. 25, núm. 2, mayo-agosto, 2013, pp. 91-100  
Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado  
Barquisimeto, Venezuela

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85728427002>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

# DESARROLLO DE MARCADORES MICROSATÉLITES Y MITOCONDRIALES PARA ESTUDIOS DE VARIACIÓN GENÉTICA DE *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*

Nevar García-Bastidas<sup>1</sup>; Pablo Gutiérrez-Sánchez<sup>1</sup> y Mauricio Marín-Montoya<sup>1</sup>

## RESUMEN

*Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* (Sss), agente causal de la sarna polvosa de la papa, es uno de los patógenos más limitantes de este cultivo, al afectar el sistema radicular de las plantas y la calidad de los tubérculos. Aunque Sss es un patógeno obligado, puede permanecer latente en los suelos en forma de quistosoros. En la actualidad no existen métodos de control químico, ni variedades comerciales con resistencia a la enfermedad. Por esto, su manejo depende fundamentalmente de la siembra de tubérculos-semilla certificados en suelos libres de quistosoros. A mediano plazo, es necesaria la generación de materiales de papa resistentes a Sss, para lo que se requiere conocer la estructura poblacional y diversidad genética del patógeno. En este estudio se evaluó la presencia de regiones microsátélites a partir de la pirosecuenciación parcial del genoma de Sss, diseñándose cebadores para su amplificación. Similarmente, se obtuvieron cebadores específicos con base en secuencias del ADN mitocondrial (ADNmit), para su utilización como herramientas de análisis de variación y detección del patógeno. Luego de las evaluaciones de especificidad y variabilidad entre cepas representativas de los tres tipos de Sss, se seleccionaron cinco pares de cebadores que amplifican microsátélites con motivos AC, TGA, TGTC, GGTC y CCGTGC, y un amplio rango de repeticiones, así como tres pares de cebadores dirigidos al ADNmit, que generan amplicones con niveles de variación del 4 al 9 % entre los aislamientos estudiados. Estos resultados permitirán apoyar estudios poblacionales de Sss en el contexto de los programas de mejoramiento genético y certificación del tubérculo-semilla.

**Palabras clave adicionales:** PCR, sarna polvosa, secuencias simples repetidas, *Solanum tuberosum*

## ABSTRACT

### Development of mitochondrial and microsatellite markers for the study of genetic variation of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*

*Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* (Sss), the causal agent of powdery scab disease, is one of the most limiting pathogens of potato causing significant damage in both roots and tubers. In spite of being an obligate pathogen, Sss can remain dormant in soils in the form of cystosori. Currently, there is neither effective chemical treatment for Sss nor commercial resistant varieties of potato. The best strategy for controlling Sss consists in the use of certified tuber-seed in cystosori-free soils. It is very important to obtain Sss-resistant plants, a strategy that requires knowledge of the population structure and genetic diversity of the pathogen. In this study, the presence of microsatellite regions was investigated by partial genome pyrosequencing of Sss; specific primers for amplifying these potential markers were designed. Additional primers targeting mitochondrial DNA were designed as tools for Sss detection and variation studies. After evaluation of specificity and variability among strains of the three types of Sss, five primer pairs amplifying microsatellites with motives AC, TGA, TGTC, GGTC and CCGTGC, with varying repeats were chosen. Similarly, three primer pairs targeting the mitochondrial DNA resulted in amplicons with variation levels of 4-9 % in the tested Sss isolates. These results will be useful in future population studies of Sss aimed to support both genetic improvement and tuber-seed certification programs.

**Additional key words:** PCR, powdery scab, single sequence repeats, *Solanum tuberosum*

## INTRODUCCIÓN

La sarna polvosa es una de las enfermedades más limitantes para la producción de papa (*Solanum tuberosum* L.) en los países andinos

(Osorio et al., 2012a). Esta patología es causada por el plasmodiofórido *Spongospora subterranea* (Wallroth) Lagerheim f. sp. *subterranea* Tomlinson (Sss) (Merz y Fallon, 2009) que además es el vector del virus *mop-top* de la papa

Recibido: Diciembre 1, 2012

Aceptado: Mayo 6, 2013

<sup>1</sup>Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Colombia. e-mail: nevar.garcia@gmail.com, paguties@unal.edu.co, mamarinm@unal.edu.co

(PMTV) (Jones y Harrison, 1969), un virus prevalente en la región Andina y con carácter cuarentenario para diferentes países del mundo (Salazar, 2006).

La sarna polvosa de la papa es de difícil manejo debido a la capacidad de los quistosoros de Sss de sobrevivir en estado latente durante varias décadas en el suelo. Por otra parte, la infección de los órganos subterráneos de las plantas, afecta notablemente la eficiencia de los productos químicos o biológicos utilizados para su control, así como la viabilidad ambiental y económica de sus aplicaciones (Harrison et al., 1997; Merz, 2008).

Varios autores han identificado al mejoramiento genético por resistencia a Sss, como una prioridad para el manejo de la sarna polvosa (Merz, 2008; Merz y Falloon, 2009; Nitzan et al., 2010), más aún, cuando se han encontrado fuentes de resistencia en diversas especies de solanáceas y en materiales no comerciales de *S. tuberosum* (Nitzan et al., 2010) y *S. phureja* (Ramírez, 2011). Desafortunadamente, el conocimiento limitado que se tiene de los niveles de variación de las poblaciones de Sss dentro y entre las diferentes regiones cultivadoras, dificulta en gran medida la interpretación de las evaluaciones de resistencia, al no ser posible identificar si las respuestas de los materiales se deben a diferencias en los genotipos de los aislamientos del patógeno inoculados o presentes bajo condiciones de campo (Merz et al., 2012).

La condición de Sss de patógeno obligado de órganos subterráneos de plantas afecta los procesos de extracción de ADN, así como el uso de marcadores moleculares convencionales como AFLPs y RAPDs y el empleo de cebadores universales dirigidos a regiones ribosomales y funcionales de uso común en otros eucariotas (Osorio et al., 2012a), lo que en conjunto se manifiesta en el bajo volumen de información disponible sobre el genoma de Sss. Hasta el momento, los estudios de diversidad genética de Sss se han basado casi exclusivamente en las regiones ITS del ADN ribosomal (ADNr), siendo identificados dos ribotipos principales del patógeno en el mundo, denominados como tipos I y II (Bulman y Marshall, 1998; Qu et al., 2006). En Colombia, recientemente, Osorio et al. (2012b), definieron la presencia de un tercer tipo (III); que presenta un 5% y 2 % de divergencia

con respecto a los tipos I y II, respectivamente; mientras que Carreño (2009) identificó la ocurrencia de al menos cinco haplotipos del patógeno en diferentes regiones de Colombia, con algunas variantes aparentemente relacionadas con el tipo de órgano afectado.

En los últimos años se han desarrollado métodos alternativos de secuenciación no basados en el sistema Sanger, que facilitan la obtención de información genómica parcial o total de microorganismos no cultivables. Dichas tecnologías, denominadas de Secuenciación de Nueva Generación (NGS), en combinación con métodos bioinformáticos apropiados, ofrecen una oportunidad para aumentar el nivel de conocimiento que se tiene de patógenos como Sss, de manera que esta información pueda ser empleada para el diseño de herramientas alternativas de diagnóstico y de evaluación de la variabilidad genética. El objetivo de este trabajo fue identificar cebadores específicos para amplificar regiones microsátélites y mitocondriales polimórficas entre los tres tipos genéticos de Sss. Las secuencias fueron obtenidas mediante pirosecuenciación parcial del genoma de Sss y los cebadores diseñados fueron validados a partir de pruebas de PCR y secuenciación, utilizando aislamientos de Sss de diferentes regiones de Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Pirosecuenciación y análisis de secuencias.** Se obtuvieron quistosoros de Sss a partir de una muestra de 500 g de un suelo ubicado en la vereda Chuscalito del municipio de La Unión (Antioquia, Colombia) (05°58' N, 75°21' W). La muestra se colocó durante 48 h a 25±3 °C, y se procedió a la separación de los quistosoros utilizando tamices de 250 y 90 µm, siguiendo la metodología reportada por Jaramillo y Botero (2007). El ADN de los quistosoros fue extraído con el kit *PowerSoil DNA Isolation* (Mo Bio Laboratories) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se procedió a la fragmentación de la muestra a 2 kg·cm<sup>-2</sup> durante 1 min, para continuar con su purificación con el kit *MinElute PCR purification* (Qiagen). La pirosecuenciación se realizó en un equipo GS FLX 454 (Roche) usando la plataforma del Centro Nacional de Secuenciación Genómica (CNSG) de la

Universidad de Antioquia. Para la secuenciación se utilizaron los reactivos Titanium (Roche). Las lecturas de pirosecuenciación fueron ensambladas utilizando el programa Newbler (Roche). La pirosecuenciación permitió la obtención de un total de 1.861.321 lecturas, que una vez ensamblados dieron lugar a 54.060 *contigs* (fragmentos de ADN solapados) que representaron 3.812.768 pb. La identificación del origen de las diferentes poblaciones de ADN se realizó por comparación de las secuencias obtenidas con respecto a una base de datos local generada con todas las secuencias disponibles para solanáceas en la base de datos GenBank, lo que en combinación con el programa Blastn permitió remover secuencias de origen vegetal. Para el caso de las secuencias bacteriales y de otros microorganismos posiblemente asociados con quistosoros de *Sss*, se realizó una depuración de secuencias mediante análisis del porcentaje de GC y por identificación de regiones ITS (eucariotes) y 16S (procariotes) del ADNr. De esta forma se encontró que la mayoría del ADNr correspondía a *Sss* (56,9 %) y a *S. tuberosum* (38,8 %); mientras que un 4,3 % de las secuencias tenían un origen microbial diferente a *Sss*.

**Diseño y síntesis de cebadores.** El *contig* correspondiente a la secuencia mitocondrial de *Sss* fue identificado por la presencia de genes asociados a la cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa utilizando un programa Blastx local contra una base de datos de proteínas de protozoos. La secuencia correspondiente a la mitocondria fue el *contig* de mayor tamaño obtenido en la pirosecuenciación de *Sss*, con una longitud de 35.147 pb y ensamblado a partir de 1971 *contigs* parciales. Se diseñaron nueve cebadores específicos para la amplificación de regiones intra e intergénicas del genoma mitocondrial de *Sss* con tamaños entre 200 y 900 pb, utilizando el programa Primer3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)).

Las regiones microsatélite fueron identificadas mediante el empleo de un programa *Script* en lenguaje Perl diseñado por Álvarez et al. (2012). Este programa lee cada uno de los *contigs* obtenidos luego del proceso de depuración y ensamblaje, recorriendo la totalidad de las secuencias e identificando motivos repetidos, presuntamente relacionados con microsatélites. La búsqueda de regiones microsatélites se restringió a

motivos de una longitud entre dos y ocho nucleótidos (nt) con al menos tres repeticiones. Los cebadores fueron diseñados sobre las regiones flanqueantes utilizando el software Primer 3 con los siguientes criterios: a) Longitud entre 18 y 21 nt; b) Presencia de anclaje GC en el extremo 3'; c) Temperatura de anillamiento entre 52 y 60 °C, con diferencia entre ambos cebadores <3 °C; d) Porcentaje GC cercano a 50 %; e) Tm de cada cebador entre 58 y 60 °C; f) Ausencia de estructuras secundarias tipo horquillas, auto dímeros de cebador y de interacciones entre cebadores, y g) Ausencia de motivos repetitivos en los cebadores. La especificidad fue determinada utilizando el programa PrimerBlast. Los cebadores fueron sintetizados por la compañía Bioneer a una escala de 200 nmoles.

**PCR.** La amplificación y especificidad de los cebadores se evaluó utilizando nueve muestras de ADN previamente obtenidas por Osorio et al. (2012b), de aislamientos de *Sss* procedentes de cultivos de papa de los departamentos de Antioquia, Boyacá y Cundinamarca, que representaban los tres tipos del patógeno (I, II y III) (Cuadro 1). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µL, e incluyeron 1X de buffer de enzima [100 mM Tris-HCl (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> pH 8,8], 1 U de Taq ADN polimerasa (Fermentas), 0,1 µM de ambos cebadores (Cuadros 2 y 3), 0,2 mM de dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub> y 50 ng·µL<sup>-1</sup> de ADN. El programa de amplificación se realizó en un termociclador T3 (Biometra) y consistió de una desnaturalización inicial a 98 °C por 3 min, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 a 62 °C por 30 s (Cuadros 2 y 3), 72 °C por 1 min y un período final de extensión a 72°C por 10 min. Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2,0 % suplementado con bromuro de etidio (10 mg·mL<sup>-1</sup>) y visualizados utilizando el sistema digital Bio Doc Analyze (Biometra).

**Clonación de amplicones.** En el caso de los microsatélites, algunos de los amplicones purificados se clonaron en el vector pJET1.2 utilizando el kit *CloneJET PCR Cloning* (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante. La transformación se realizó en células competentes DH5α de *Escherichia coli* utilizando choque térmico (Sambrook y Rusell, 2001) y las bacterias recombinantes se obtuvieron por selección positiva, en medio sólido de Luria

Bertani (LB) que contenía ampicilina (100 mg·mL<sup>-1</sup>), gracias a que dicho vector presenta el gen letal *eco47IR*. La presencia de los fragmentos esperados en los clones recombinantes, fue confirmada por PCR de colonias, utilizando

los cebadores dirigidos a las regiones flanqueantes del sitio de clonación múltiple del vector (pJET 1.2 5'-CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC-3' y pJET 1.2 5'-AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG-3').

**Cuadro 1.** Aislamientos de *Spongopora subterranea* utilizados para la validación de los marcadores microsatélites diseñados en este estudio.

Aislamiento	Procedencia	Hospedero	Tipo
CT1	Villapinzón, Cundinamarca	<i>S. tuberosum</i> var. Diacol-Capiro	I
BT8	Tunja, Boyacá	<i>S. tuberosum</i> var. Parda Pastusa	I
AT4	La Unión, Antioquia	Suelo	I
BS1T	Oitacá, Boyacá	<i>S. tuberosum</i> var. Diacol-Capiro	II
BS2P	Oitacá, Boyacá	Suelo	II
BS8T	Soracá, Boyacá	Suelo	II
BS9P	Soracá, Boyacá	Suelo	III
CR2	Zipaquirá, Cundinamarca	<i>S. tuberosum</i> var. Parda Pastusa	III
CR2c	Zipaquirá, Cundinamarca	<i>S. tuberosum</i> var. Parda Pastusa	III

**Cuadro 2.** Regiones microsatélites identificadas en el genoma de *Spongopora subterranea* y cebadores diseñados para su amplificación.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tm °C	Amplicon	Motivo
Ss_ms_F1	CCTCTGCCAGACCAGACC	59,31	207	(GACCA)5
Ss_ms_R1	ACAACAGTCGCTCCTCTCG	59,14		
Ss_ms_F2	ACCATCTCTGTTGAACTTGTCG	59,26	111	(AGTGC)4
Ss_ms_R2	ATCGCTGATCTCCTCCAGTG	60,37		
Ss_ms_F3	GGGTCATCTCTGATTTCTACCG	59,96	416	(TGTC)5
Ss_ms_R3	CAATTACCGGATTCGGTGTC	60,19		
Ss_ms_F4	CCAGTTTGTTCCTGATTACG	60,36	247	(CCGA)6
Ss_ms_R4	CGATACTGTACTCCGACTGG	59,68		
Ss_ms_F5	CTGTGCGGTCAGTTCATC	60,26	153	(GGTC)4
Ss_ms_R5	CACCTCCAACGGAACACC	59,93		
Ss_ms_F6	GCCGTTTCATCTTGTGTGTCG	58,73	320	(GACA)6
Ss_ms_R6	CACTGATCCACCACTGATCC	58,89		
Ss_ms_F7	ACGAGATCAAGGACGAGACC	59,26	487	(TCA)6
Ss_ms_R7	TTGGCGAATTATTGACAGAGG	60,08		
Ss_ms_F8	ATGGCCGATAGAACATGAGG	59,92	447	(AC)4
Ss_ms_R8	GTGTCCAGGATACGGTCTGG	60,39		
Ss_ms_F9	CACGATGGGTCTTTGGTATG	58,85	278	(CCGTGC)4
Ss_ms_R9	TCAAGATGAAGCTGGTGTGG	59,83		
Ss_ms_F10	GCGATTGGAGAGAATTGACC	59,63	381	(TGA)7
Ss_ms_R10	AGTGTGTGCCACTTGAACG	59,79		

**Secuenciación de amplicones e insertos.** En el caso de productos de PCR, estos fueron previamente purificados mediante el kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen) para proceder a su secuenciación directa en ambas direcciones utilizando los cebadores empleados en el PCR y el kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (PE Applied Biosystems). Para la secuenciación de insertos, se seleccionó una colonia y se cultivó durante 16-18 h, 250

rpm y 37 °C en 5 mL medio LB líquido que contenía ampicilina, para proceder a la extracción de los plásmidos utilizando el kit *Plasmid Miniprep* (Qiagen) y finalmente a su secuenciación utilizando los cebadores del vector, tal como se indicó anteriormente. La secuenciación se realizó en un equipo ABI Prism 3730xl (PE Applied Biosystems, Macrogen). Las secuencias obtenidas con cada cebador fueron editadas mediante el software BioEdit 6.0.6 (Hall,

1999) para obtener una secuencia consenso. Los alineamientos múltiples fueron realizados mediante el programa ClustalW (Larkin et al., 2007). Los análisis filogenéticos por algoritmo

*Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987) y la determinación de los niveles de identidad fueron realizados con el programa Mega 5.0 (Tamura et al., 2011).

**Cuadro 3.** Cebadores diseñados con base en secuencias del ADN mitocondrial de *Spongospora subterranea*, para utilización como herramienta de detección molecular y variación genética

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tm °C	Amplicon	Ubicación
Ss_mit_sega_F	ATACCAAGTTGCATCAACGC	58,6	804	Proteína ribosomal S4 - NADH deshidrogenasa subunidad 5
Ss_mit_sega_R	TCCAACGATAACTCAAGGTGC	60,1		
Ss_mit_segb_r	AAGGTTCCAGTCGGTATAAAGC	58,7	836	NADH deshidrogenasa subunidad 6 - NADH deshidrogenasa subunidad 3
Ss_mit_segb_R	CGTGCGCCGTTTACATTAG	60,2		
Ss_mit_segc_F	ATTCGAGCTGTGTTCTGGC	60,4	759	ATP sintasa F0 subunidad 6 - NADH deshidrogenasa subunidad 2
Ss_mit_segc_R	GTTGGTTACATGCTGATGGG	58,8		
Ss_mit_segd_F	CAAGTATTCTTGGAACCTCCG	58,7	761	NADH deshidrogenasa subunidad 4 - ATP sintasa F0 subunidad 9
Ss_mit_segd_R	CCGGCTAATCCAATTGTAGC	59,5		
Ss_mit_sege_F	ATTCGTGCAATTCCATCTCC	59,9	953	ATP sintasa subunidad $\alpha$ - Citocromo oxidasa subunidad III
Ss_mit_sege_R	TTTCATGGTCTTCATGGTGC	59,5		
Ss_mit_segf_F	TGCTCTGCTGATAATGGTGG	59,8	971	Citocromo oxidasa subunidad I - Citocromo oxidasa subunidad I
Ss_mit_segf_R	GTTATTCGACGCCAACTTAGG	58,7		
Ss_mit_segg_F	TATTTGCTTTGGAGCTCAGG	58,1	790	Citocromo oxidasa subunidad I - NADH deshidrogenasa subunidad 4L
Ss_mit_segg_R	CCTCGGAATCAGCTATTGG	58,2		
Ss_mit_segh_F	TGGTGGTTTAAAGCGTCATC	58,6	216	Proteína ribosomal S4
Ss_mit_segh_R	TTTAAGGCAACCAGGCAAG	58,9		
Ssmit_segi_F	CCGCCTCCTAAAGAGTAACG	58,9	287	Hidrolasa
Ssmit_segi_R	CCTTGGAACTTCTTCAGCTC	60,3		

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

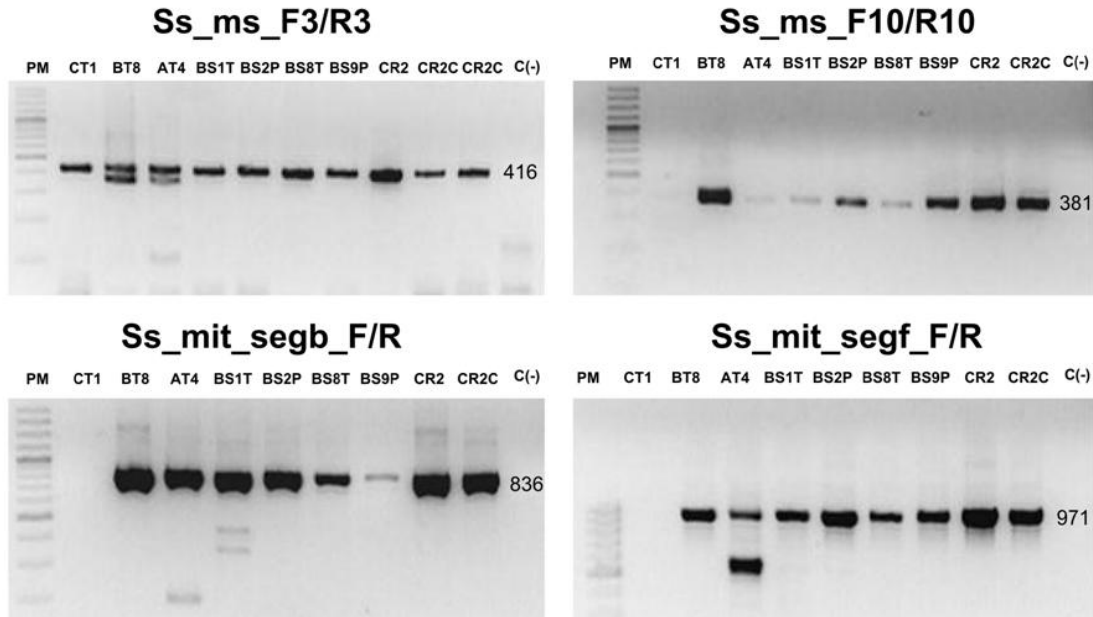
**Microsatélites.** En total se obtuvieron 10 regiones microsatélites que cumplieron con los parámetros descritos en la sección de materiales y métodos (Cuadro 2). Las pruebas de validación de los cebadores sobre aislamientos que representaron los tres tipos de Sss, permitieron seleccionar cinco marcadores (F1, F3, F8, F9 y F10), que generaron bandas del tamaño esperado en al menos dos de las muestras bajo análisis. En la Figura 1 se presentan las amplificaciones para el par de cebadores Ss\_ms\_F3/R3 y Ss\_ms\_F10/R10. La secuenciación de dichos amplicones indicó que la región microsatélite F1 fue monomórfica para los aislamientos evaluados, aunque presentó 11 repeticiones del motivo GACCA. El microsatélite F3, que contenía el motivo TGTC, identificó polimorfismo entre las dos bandas obtenidas en los aislamientos BT8 y AT4 representativas del tipo I de Sss, con cinco y una repetición del motivo, para los amplicones de mayor y menor

tamaño, respectivamente. El microsatélite F8 fue el que presentó mayor nivel de polimorfismo entre los cinco secuenciados, al presentarse cinco repeticiones del motivo AC en los aislamientos BT8 (tipo I) y BS9P (tipo III), 37 en BS1T (tipo II) y 13 en CR2 (tipo III). Por su parte, el microsatélite F9 con nueve repeticiones del motivo CCGTGC, no presentó polimorfismo. Finalmente el microsatélite F10 también se presentó polimórfico, con siete repeticiones del motivo TGA en el aislamiento CR2 (tipo III), cinco en BT8 (tipo I) y cuatro en BS8T (tipo II) (Figura 2). Los resultados de las secuencias obtenidas para los clones que contenían al menos una muestra amplificada por cada par de cebadores, coincidieron plenamente con el número de repeticiones de cada motivo microsatélite bajo evaluación (Figura 3), y confirmaron que los polimorfismos encontrados no se deben a artefactos de la reacción de PCR.

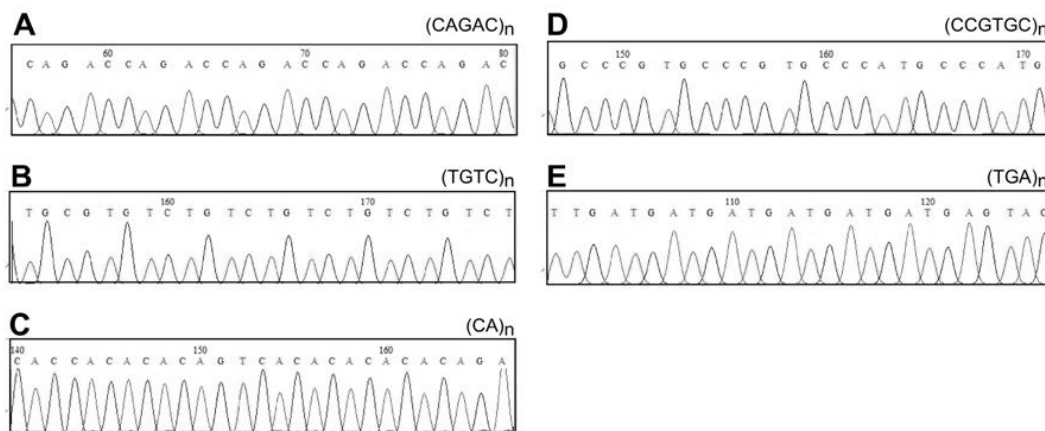
Aunque las evaluaciones se realizaron sobre aislamientos de Sss obtenidos en diferentes

regiones cultivadoras de papa de Colombia y representando los tres tipos previamente identificados por Osorio et al. (2012b), es necesario evaluar su rango de variación en un mayor número de aislamientos del patógeno de este país y de otros que registren la presencia de sarna polvosa. De gran interés resultó el hecho que algunos de los aislamientos de *Sss* presentaron dobles bandas con algunos de los marcadores, siendo confirmado mediante

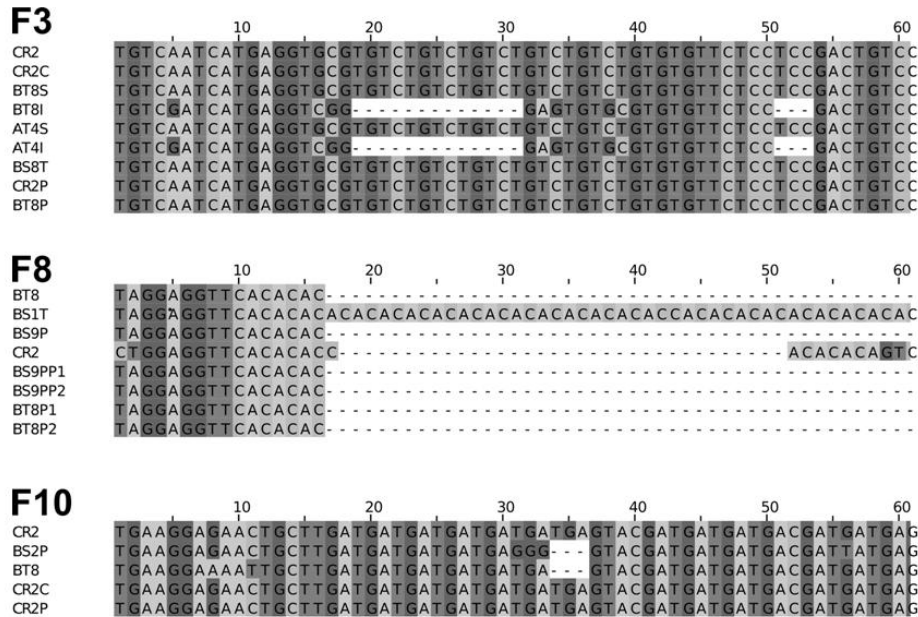
secuenciación que las diferencias entre éstas eran debidas a cambios del número de repeticiones de microsatélites y no a inserciones/deleciones en las regiones flanqueantes. Estos hallazgos merecen estudios posteriores que definan si el origen de dichas bandas se debe a la condición diploide que presenta el patógeno en una parte de su ciclo de vida (Harrison et al., 1997) o a la mezcla de genotipos en las muestras bajo análisis.



**Figura 1.** Amplicones obtenidos con los cebadores *Ss\_ms\_F3/R3*, *Ss\_ms\_F10/R10*, *Ss\_mit\_seg\_b\_F/R* y *Ss\_mit\_seg\_f\_F/R* a partir de ADN de muestras de *Spongospora subterranea* de cultivos de papa de tres departamentos de Colombia. PM: Marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas), C(-): Control negativo.



**Figura 2.** Motivos de microsatélites obtenidos con los cebadores *Ss\_ms\_F1-Ss\_ms\_R1* (A), *Ss\_ms\_F3-Ss\_ms\_R3* (B), *Ss\_ms\_F8-Ss\_ms\_R8* (C), *Ss\_ms\_F9-Ss\_ms\_R9* (D) y *Ss\_ms\_F10-Ss\_ms\_R10* (E).



**Figura 3.** Regiones microsatélites polimórficas identificadas entre aislamientos de *Spongospora subterranea* de diferentes regiones de Colombia. Clon: indica aquellos amplicones clonados en el vector pJET 1.2. para la confirmación de sus secuencias.

**Regiones mitocondriales.** La selección del genoma mitocondrial se fundamentó en el hecho que éste es el marcador de diversidad molecular más utilizado en estudios poblacionales de eucariotes, a tal punto que uno de sus fragmentos, citocromo oxidasa 1 (COX1), fue elegido como el estándar para la identificación y taxonomía molecular definida mediante el sistema de código de barras (Ratnasingham y Hebert, 2007). Entre las razones que sustentan dicha elección se destacan la facilidad para su amplificación por PCR, dada la presencia de múltiples copias del ADNmit en cada célula, su condición haploide y el alto nivel de conservación que existe en su contenido entre diferentes eucariotes, con pocas duplicaciones, ausencia de intrones y regiones intergénicas relativamente cortas (Gissi et al., 2008). Adicionalmente, el ADNmit es altamente variable a nivel intraespecífico, debido a las elevadas tasas de mutación propias de su ubicación en el ambiente oxidativo mitocondrial, lo cual facilita su utilización en estudios poblacionales (Galtier et al., 2009).

Se diseñaron nueve pares de cebadores anclados en regiones codificantes para la proteína ribosomal S4, las subunidades 2,3,4, 4L, 5 y 6 de la NADH deshidrogenasa, las subunidades  $\alpha$ , 6 y 9 de la ATP sintasa F0, las subunidades I y III de

la citocromo oxidasa y una hidrolasa mitocondrial (Cuadro 3). Seis de estos cebadores fueron diseñados para amplificar regiones intergénicas (Ss\_mit\_sega,b,c,d,e,f,g F/R); los cebadores restantes amplifican regiones codificantes para la proteína ribosomal S4 (Ss\_mit\_segH\_F/R) y una hidrolasa mitocondrial (Ss\_mit\_segI\_F/R). Dicha estrategia es similar a la que se utiliza para obtener las regiones ITS del ADNr, ya que los cebadores generalmente se ubican en las regiones 3' de gen 18S y 5' del 26S para amplificar el ITS1, 5.8S e ITS2 (Bulman y Marshall, 1998; Qu y Christ, 2004). La validación de los cebadores realizada partir de los nueve aislamientos de Sss incluídos en el estudio, indicó que las reacciones de PCR realizadas con cinco de éstos, generaban los fragmentos del tamaño esperado (Ss\_mit\_sega\_F/R, Ss\_mit\_segb\_F/R, Ss\_mit\_segf\_F/R y Ss\_mit\_segg\_F/R y Ss\_mit\_segi\_F/R). En la Figura 1 se presentan las amplificaciones para el par de cebadores Ss\_mit\_segb F/R y Ss\_mit\_segf F/R.

El análisis de identidad realizado para cada región mitocondrial seleccionada indicó que los aislamientos representativos de los tres tipos, difirieron en cerca de 5, 4 y 9 % para las regiones amplificadas con los cebadores Ss\_mit\_segb\_F/R, Ss\_mit\_segf\_F/R y Ss\_mit\_segg\_F/R, respectivamente (Figura 4). Estas diferencias



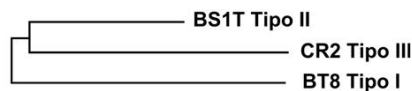
fueron evidentes en los árboles filogenéticos generados, donde se presentaron los aislamientos de cada tipo en ramas diferentes (Figura 4). Dichos resultados representan una importante fuente de información a ser tenida en cuenta en estudios genéticos futuros, pues los análisis de secuencias ITS del ADNr, sólo reportaban diferencias del 2,9 % entre los dos tipos (I y II) de Sss presentes en la región templada (Qu y Christ, 2004) y de máximo el 5 % entre diferentes aislamientos de Sss de Colombia (Osorio et al., 2012b). Sin embargo, aunque las evaluaciones se realizaron sobre aislamientos de Sss obtenidos en diferentes regiones cultivadoras de papa que representaban los tres tipos previamente identificados por Osorio et al. (2012b), es necesario estudiar su rango de variación en un mayor número de aislamientos del patógeno de este país y de otros que registren la presencia de sarna polvosa como Venezuela, Costa Rica y Ecuador.

Los resultados de esta investigación amplían el rango de herramientas moleculares disponibles para estudiar los niveles de variación de Sss, pudiendo además ser utilizados para definir la estructura poblacional del patógeno dentro y entre diferentes regiones cultivadoras de papa, así como para evaluar tasas de migración, deriva genética y desequilibrio de ligamiento; aspectos claves para

mejorar el conocimiento que se tiene del ciclo de vida de este patógeno. De gran interés resultará evaluar la posible asociación entre posibles patotipos del patógeno y las variaciones detectadas en el ADNmit y los microsátelites, ya que se ha reportado la existencia de diferencias entre los síntomas y tejidos afectados por Sss entre zonas cultivadoras de papa y variedades (Osorio et al., 2012a). Así por ejemplo, en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y el norte de Antioquia (Colombia) es frecuente observar pústulas sobre los tubérculos de las variedades Parda Pastusa y Diacol Capiro, mientras que en el departamento de Nariño y el oriente de Antioquia la enfermedad, se manifiesta principalmente por la presencia de agallas en raíces (Gilchrist, 2009; Osorio et al., 2012a). En forma similar, Carreño (2009) utilizando análisis de secuencias ITS y SSCP, estableció la presencia de subpoblaciones del patógeno relacionadas con el tipo de órgano afectado. En dicho estudio, aislamientos con secuencias ITS del tipo I, se asociaron exclusivamente con infecciones de tubérculo, mientras que aquellos del tipo II lo hicieron con síntomas de agallas en raíz. Por esto los mayores niveles de polimorfismo que ofrecen pruebas generadas en este estudio, permitirá tener mayores elementos de juicio sobre esta interesante asociación.

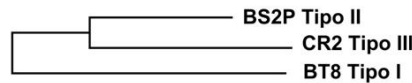
#### Ss\_mit\_seg\_b\_F/R

Aislamiento (Tipo)	BT8 (I)	BS1T (II)	CR2 (III)
BT8 (I)	ID	0,95	0,94
BS1T (II)	0,95	ID	0,96
CR2 (III)	0,94	0,96	ID



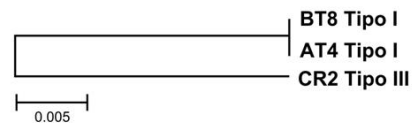
#### Ss\_mit\_seg\_f\_F/R

Aislamiento (Tipo)	BT8 (I)	BS2P (II)	CR2 (III)
BT8 (I)	ID	0,95	0,95
BS2P (II)	0,95	ID	0,96
CR2 (III)	0,95	0,96	ID



#### Ss\_mit\_seg\_g\_F/R

Aislamiento (Tipo)	BT8 (I)	AT4 (I)	CR2 (III)
BT8 (I)	ID	1	0,90
AT4 (I)	1	ID	0,90
CR2 (III)	0,90	0,90	ID



**Figura 4.** Matrices de identidad y árboles filogenéticos generados a partir de secuencias del ADNmit de aislamientos de *Spongospora subterranea* representando los tres tipos identificados de este patógeno. Regiones amplificadas con los cebadores Ssmit\_seg\_bFor/Rev; Ssmit\_seg\_fFor/Rev y Ssmit\_seg\_gFor/Rev. Para este último par de cebadores no fue posible obtener la secuencia del aislamiento representante del tipo II.

Los cebadores específicos dirigidos a las regiones mitocondriales de Sss generados en este trabajo, pueden ser utilizados en pruebas de detección molecular, a partir de tejido de planta, suelos infestados con quistosoros y tubérculos-semilla asintomáticos o con síntomas atípicos. El hecho de que estos cebadores amplifican ADNmit, ofrece mayor eficiencia en la pruebas de PCR debido al alto número de moléculas diana y a la especificidad de los cebadores diseñados. La utilidad del ADNmit para caracterizar las poblaciones de patógenos de plantas, ha sido ampliamente confirmada, siendo especialmente útil para el caso de *Phytophthora infestans*, el agente causal del tizón tardío de la papa, en donde permite la determinación de haplotipos mitocondriales, utilizando cuatro pares de cebadores (F1-R1, F2-R2b, F3-R3 y F4-R4) y su posterior digestión con las enzimas de restricción *CfoI*, *MspI* y *EcoRI* (Griffith y Shaw, 1998).

Se espera que los resultados de esta investigación, incentiven el desarrollo de nuevos estudios en el patosistema *S. tuberosum*-Sss y que dicha información sea utilizada para el apoyo en procesos como la selección de aislamientos a ser evaluados en los programas de mejoramiento genético de papa por resistencia a la sarna polvosa y de control biológico y químico del patógeno.

### CONCLUSIONES

Con base en análisis bioinformáticos de las secuencias obtenidas, basado en principios de pirosecuenciación, fue posible el diseño de cinco marcadores microsátélites, que resultaron eficientes para la obtención de regiones polimórficas entre aislamientos de *S. subterranea* f. sp. *subterranea* representando los tres tipos del patógeno reportados en el mundo. Similarmente, con base en secuencias del ADN mitocondrial, se seleccionaron tres pares de cebadores que pueden ser utilizados para la detección específica de *S. subterranea*, así como para adelantar estudios de variabilidad genética, ya que amplifican regiones que difieren hasta en un 9 % de las secuencias entre aislamientos de este patógeno.

### AGRADECIMIENTO

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo

Rural (proyecto 090-2007S4527-87-08), la Universidad Nacional de Colombia (Medellín) y Fedepapa. A José Fernando Gil e Inés Osorio por proveer las plantas de *N. benthamiana* inoculadas con Sss. A Paola González y Catalina Zuluaga del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, por facilitar muestras de quistosoros de Sss.

### LITERATURA CITADA

1. Álvarez, M., L. González y P. Gutiérrez. 2012. *Microsat predict*: un software para la detección de regiones microsátélites. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 10 p.
2. Bulman, S.R. y J.W. Marshall. 1998. Detection of *Spongospora subterranea* in potato tuber lesions using the polymerase chain reaction (PCR). *Plant Pathology* 47: 759-766.
3. Carreño, A.J. 2009. Evaluación de la variabilidad genética de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* mediante la comparación de regiones ITS del ADN ribosomal de cepas procedentes de las regiones productoras de papa en Colombia. Tesis. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 104 p.
4. Galtier, N., B. Nabholz, S. Glémin y G.D. Hurst. 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18: 4541-4550.
5. Gilchrist, E. 2009. Alternativas para el manejo integrado de la sarna polvosa de la papa. (*Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*). Tesis. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 95 p.
6. Gissi, C., F. Iannelli y G. Pesole. 2008. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity* 101: 301-320.
7. Griffith, G.W. y D.S. Shaw. 1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Applied and Environmental Microbiology* 10: 4007-4014.
8. Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.

- Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.
9. Harrison, J.G., R.J. Searle y N.A. Williams. 1997. Powdery scab disease of potato - A review. *Plant Pathology* 46: 1-25.
  10. Jaramillo, S. y J.M. Botero. 2007. Respuesta de diferentes poblaciones de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* a la rotación entre dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* ssp. *andigena*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía (Medellín)* 60: 3859-3876.
  11. Jones, R.A.C y B.D. Harrison. 1969. The behavior of *Potato mop top virus* in soil, and evidence for its transmission by *Spongospora subterranea* (Wall.) Lagerh. *Annals Applied Biology* 63: 1-17.
  12. Larkin, M., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. López, J.D. Thompson, T.J. Gibson y D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X, version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
  13. Merz, U. 2008. Powdery scab of potato-occurrence, life cycle and epidemiology. *American Journal of Potato Research* 85: 241-246.
  14. Merz, U. y R.E. Fallon. 2009. Powdery scab of potato-increased knowledge of pathogen biology and disease epidemiology for effective disease management. *Potato Research* 52: 17-37.
  15. Merz, U., A.K. Lees, L. Sullivan, R. Schwärzel, T. Hebeisen, H.G. Kirk, K. Bouček-Mechiche y H.R. Hofferbert. 2012. Powdery scab resistance in *Solanum tuberosum* an assessment of cultivar x environmental effect. *Plant Pathology* 61: 29-62.
  16. Nitzan, N., K. Haynes, J. Miller, D. Johnson, T. Cummings, D. Batchelor, C. Olsen y C. Brown. 2010. Genetic stability in potato germoplasm for resistance to root galling caused by the pathogen *Spongospora subterranea*. *American Journal of Potato Research* 87: 497-501.
  17. Osorio, I., P. Gutiérrez y M. Marín. 2012a. Revisión: *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* y su virus asociado *Potato mop-top virus* (PMTV), dos patógenos reemergentes en los cultivos de papa de Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 65: 6361-6378.
  18. Osorio, I., O. Marcela, P. Gutiérrez, E.P. González y M. Marín. 2012b. Variabilidad genética de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* en Colombia. *Bioagro* 24(3): 151-162.
  19. Qu, X.S. y B.J. Christ. 2004. Genetic variation and phylogeny of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* based on ribosomal DNA sequence analysis. *American Journal of Potato Research* 81:385-394.
  20. Qu, X.S., J.A. Kavanagh, D. Egan y B.J. Christ. 2006. Detection and quantification of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* by PCR in host tissue and naturally infested soils. *American Journal of Potato Research* 83: 21-30.
  21. Ramírez, L. 2011. Evaluación de accesiones de *Solanum phureja* Juz et Buck por su resistencia a *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.
  22. Ratnasingham, S. y P.D. Hebert. 2007. Bold: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes* 7: 355-364.
  23. Saitou, N. y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
  24. Salazar, L.F. 2006. Emerging and re-emerging potato diseases in the Andes. *Potato Research* 49: 43-47.
  25. Sambrook, J. y D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press, New York.
  26. Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *molecular biology and evolution* 28: 2731-2739.